



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2019/09/12  
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2020/03/19  
(45) Date de délivrance/Issue Date: 2023/10/03  
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2021/03/05  
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: EP 2019/074424  
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2020/053362  
(30) Priorité/Priority: 2018/09/14 (FR1858285)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C12N 1/06* (2006.01)  
(72) Inventeurs/Inventors:  
HOFFMANN, PIERRE-ALAIN, FR;  
GLEYES, EVELYNE, FR  
(73) Propriétaire/Owner:  
KYANOS BIOTECHNOLOGIES, FR  
(74) Agent: BCF LLP

(54) Titre : PROCÉDE DE CULTURE D'UN MICROORGANISME D'INTERET ET INSTALLATION ASSOCIEE  
(54) Title: METHOD FOR CULTIVATING A MICROORGANISM OF INTEREST AND ASSOCIATED FACILITY

(57) **Abrégé/Abstract:**

La présente invention vise un procédé (20) de culture d'au moins un microorganisme d'intérêt (28), en hétérotrophie ou mixotrophie, dans un milieu de culture (30) aqueux, des microorganismes contaminants (32) se développant naturellement dans ledit milieu de culture (30), caractérisé en ce qu'il comprend : - une étape (21) de prélèvement d'une portion du milieu de culture (30) comprenant le microorganisme d'intérêt (28) et des microorganismes contaminants (32); - une étape (22) de séparation physique du microorganisme d'intérêt (28) et des microorganismes contaminants (32) au sein de ladite portion de milieu de culture (30); - une étape (24) de lyse des microorganismes contaminants (32) ainsi séparés de sorte à produire un lysat (35); - une étape (25) de réintroduction dudit lysat (35) dans le milieu de culture (30).



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

(19) Organisation Mondiale de la  
Propriété Intellectuelle  
Bureau international(43) Date de la publication internationale  
19 mars 2020 (19.03.2020)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2020/053362 A1**(51) Classification internationale des brevets :  
C12N 1/06 (2006.01)(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/EP2019/074424(22) Date de dépôt international :  
12 septembre 2019 (12.09.2019)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
1858285 14 septembre 2018 (14.09.2018) FR(71) Déposant : KYANOS BIOTECHNOLOGIES [FR/FR] ;  
23 Avenue de Lombez, Appartement 21, Bâtiment B, 31300  
TOULOUSE (FR).(72) Inventeurs : HOFFMANN, Pierre-Alain ; 37 Avenue Fré-  
déric Estèbe, 31200 TOULOUSE (FR). GLEYESSES, Eve-  
lyne ; 5 Rue du Pic d'Estats, 31750 ESCALQUENS (FR).(74) Mandataire : GROUPEMENT IPSIDE ; 6 Impasse Mi-  
chel Labrousse, 31100 TOULOUSE (FR).(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de  
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO,  
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA,  
CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ,  
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,  
HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR,  
KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG,  
MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM,  
PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC,  
SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,  
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de  
protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM,  
KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG,ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM),  
européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES,  
FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,  
MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).

## Publiée:

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

(54) Title: METHOD FOR CULTIVATING A MICROORGANISM OF INTEREST AND ASSOCIATED FACILITY

(54) Titre : PROCÉDÉ DE CULTURE D'UN MICROORGANISME D'INTÉRÊT ET INSTALLATION ASSOCIÉE

(57) Abstract: The invention relates to a method (20) for cultivating at least one microorganism of interest (28), by heterotrophism or mixotrophism, in an aqueous culture medium (30), contaminating microorganisms (32) developing naturally in said culture medium (30), characterised in that it comprises: a step (21) of sampling a portion of the culture medium (30) comprising the microorganism of interest (28) and contaminating microorganisms (32); a step (22) of physically separating the microorganism of interest (28) and the contaminating microorganisms (32) in said portion of culture medium (30); a step (24) of lysis of the contaminating microorganisms (32) separated in this way so as to produce a lysate (35); and a step (25) of reintroducing said lysate (35) into the culture medium (30)

(57) Abrégé : La présente invention vise un procédé (20) de culture d'au moins un microorganisme d'intérêt (28), en hétérotrophie ou mixotrophie, dans un milieu de culture (30) aqueux, des microorganismes contaminants (32) se développant naturellement dans ledit milieu de culture (30), caractérisé en ce qu'il comprend : - une étape (21) de prélèvement d'une portion du milieu de culture (30) comprenant le microorganisme d'intérêt (28) et des microorganismes contaminants (32); - une étape (22) de séparation physique du microorganisme d'intérêt (28) et des microorganismes contaminants (32) au sein de ladite portion de milieu de culture (30); - une étape (24) de lyse des microorganismes contaminants (32) ainsi séparés de sorte à produire un lysat (35); - une étape (25) de réintroduction dudit lysat (35) dans le milieu de culture (30).



WO 2020/053362 A1

## Procédé de culture d'un microorganisme d'intérêt et installation associée

### Domaine de l'invention

La présente invention s'applique au domaine de la culture de biomasse microbienne en autotrophie et hétérotrophie.

5 Plus particulièrement, la présente invention vise un procédé de culture d'au moins un microorganisme d'intérêt, en hétérotrophie ou mixotrophie, et une installation de culture notamment adapté pour la mise en œuvre dudit procédé de culture.

### Etat de l'art

10 L'hétérotrophie est la nécessité pour un organisme vivant de se nourrir de constituants organiques préexistants. La notion d'hétérotrophie s'oppose à celle d'autotrophie qui est le mode de nutrition des organismes vivants qui peuvent se nourrir uniquement d'aliments inorganiques en présence d'une source d'énergie externe, par exemple la lumière (photoautotrophie).

15 La mixotrophie quant à elle, est le mode de nutrition d'organismes vivants caractérisé par le fait qu'ils sont capables de se nourrir soit par autotrophie soit par hétérotrophie soit par les deux modes trophiques simultanément ou encore par une photosynthèse bactérienne primitive.

Lorsque l'on souhaite produire ou mettre en œuvre une souche pure, 20 les procédés hétérotrophiques ou mixotrophiques en milieu ouvert ne sont aujourd'hui pas appliqués. En effet, le milieu ouvert implique généralement la survenue de contaminations des cultures par divers microorganismes contaminants qui affectent le rendement en matière du procédé de culture du fait de la consommation par le ou les microorganismes contaminants, des 25 nutriments destinés aux microorganismes d'intérêt. Ces microorganismes contaminants affectent également la qualité attendue du produit final (biomasse de microorganismes d'intérêt) du simple fait de leur présence significative.

Ce risque de contamination est aujourd'hui maîtrisé grâce au confinement des procédés et à la stérilisation des équipements. Cependant, les 30 coûts d'investissement et d'opération de ces procédés de culture pour qu'ils

soient réalisés dans des conditions aseptiques sont importants et ont une incidence directe sur le coût de production des microorganismes d'intérêt considérés ou de leurs métabolites.

Il paraît donc avantageux de trouver une solution permettant la production de microorganismes d'intérêt avec un rendement acceptable au niveau industriel, en milieu de culture ouvert ou fermé, sans avoir à se soucier des conditions de stérilisation dudit milieu et des équipements de culture.

### **Exposé de l'invention**

À cet effet, selon un premier aspect, la présente invention vise un procédé de culture d'au moins un microorganisme d'intérêt, en hétérotrophie ou mixotrophie, dans un milieu de culture aqueux, des microorganismes contaminants se développant naturellement dans ledit milieu de culture, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de prélèvement d'une portion du milieu de culture comprenant le microorganisme d'intérêt et des microorganismes contaminants ;
- une étape de séparation physique du microorganisme d'intérêt et des microorganismes contaminants au sein de ladite portion de milieu de culture ;
- une étape de lyse des microorganismes contaminants ainsi séparés de sorte à produire un lysat ;
- une étape de réintroduction dudit lysat dans le milieu de culture.

On entend par milieu de culture un milieu comportant des nutriments permettant le développement du microorganisme d'intérêt et des microorganismes contaminants.

On entend par « portion », un volume prélevé par unité de temps, par exemple par jour ou par heure. Ainsi, on peut considérer le terme « portion » comme un débit quotidien ou horaire, c'est-à-dire un volume prélevé respectivement par jour ou par heure, dans le milieu de culture. Ce volume est de préférence, par jour, supérieur ou égal à une fois le volume du milieu de culture et, de manière préférable, supérieur ou égal à trois fois le volume du milieu de culture. Encore de préférence, la portion prélevée correspond à un

volume prélevé par heure supérieur ou égal à  $1/24^{\text{ème}}$  du volume total du milieu de culture.

Ce volume prélevé quotidiennement permet de maintenir une quantité de microorganisme d'intérêt et de microorganismes contaminants compatible  
5 avec un fonctionnement correct du procédé objet de la présente invention.

Ce procédé de culture a pour avantage de permettre la culture en milieu ouvert ou fermé de microorganismes d'intérêt sans affecter le rendement en microorganisme d'intérêt car, les contaminants étant normalement gênants pour la culture en milieu ouvert, sont utiles au développement du ou des  
10 microorganismes d'intérêt selon le procédé objet de la présente invention. En effet, le lysat de microorganismes contaminant représente un apport nutritif assimilable pour le microorganisme d'intérêt, notamment en carbone organique. La culture en milieu ouvert étant permise par ce procédé de culture, les coûts d'investissement et d'opération dudit procédé sont avantageusement  
15 minimisés du fait que des conditions aseptiques ne sont pas nécessaires.

Suivant des modes de mise en œuvre préférés, l'invention répond en outre aux caractéristiques suivantes, réalisées séparément ou en chacune de leurs combinaisons techniquement opérantes.

Dans un mode de mise en œuvre particulier, l'étape de séparation  
20 physique comporte une étape de filtration ou séparation gravitaire de sorte à obtenir de façon séparée le microorganisme d'intérêt d'une part et les microorganismes contaminants d'autre part.

Selon un mode de mise en œuvre particulier, le microorganisme d'intérêt séparé par l'étape de séparation est réintroduit dans le milieu de  
25 culture, seul ou en mélange avec le lysat.

Selon un mode de mise en œuvre particulier, le milieu de culture aqueux est initialement dépourvu de carbone organique.

Dans un mode de mise en œuvre particulier dans lequel le procédé de culture est en mixotrophie, et dans lequel le milieu de culture aqueux est  
30 initialement dépourvu de carbone organique, le microorganisme d'intérêt est laissé en culture autotrophe pendant un temps  $t$  avant l'étape de prélèvement.

De préférence, le temps  $t$  est choisi de sorte à obtenir une concentration en microorganisme d'intérêt dans le milieu de culture comprise

entre  $5.10^5$  cellules par millilitre et  $1.10^7$  cellules par millilitre. En outre, la culture en autotrophie pendant le temps  $t$  permet avantageusement de valider l'état physiologique correct du microorganisme d'intérêt et d'établir des données de référence quant à ses performances de croissance.

5 Un passage du mode autotrophie au mode mixotrophie est réalisé par le mélange du lysat de microorganismes contaminants avec le microorganisme d'intérêt, ledit lysat fournissant notamment un apport nutritif en carbone organique au microorganisme d'intérêt. Le mode hétérotrophie est d'autant plus renforcé par une étape d'apport de carbone organique, fournit par une  
10 autre source que le lysat de microorganismes contaminants, dans milieu de culture.

A cet effet, selon un mode de mise en œuvre particulier, le procédé comporte une étape d'apport de carbone organique dans le milieu de culture. Cet apport de carbone organique peut être réalisé directement dans le milieu  
15 de culture, dans le lysat, au microorganisme d'intérêt séparé par la séparation physique, dans le mélange lysat/microorganisme d'intérêt séparé, ou dans une combinaison d'au moins deux de ces derniers.

Dans un mode de mise en œuvre particulier, le procédé de culture comprend une étape de concentration des microorganismes contaminants  
20 séparés par l'étape de séparation physique. L'étape de concentration des microorganismes contaminants est avantageuse en ce qu'elle permet une lyse d'un plus grand nombre de microorganismes contaminants lors de l'étape de lyse.

Selon un exemple de mise en œuvre particulier, l'étape de  
25 concentration comporte une étape de filtration ou séparation gravitaire de sorte à obtenir de façon séparée les microorganismes contaminants concentrés d'une part et du milieu de culture dépourvu de microorganismes contaminants d'autre part. Cela a pour avantage de permettre le recyclage du milieu de culture dépourvu de microorganismes contaminants. De plus cela a  
30 notamment pour avantage de réduire les coûts de la lyse du fait d'une diminution du volume de microorganismes contaminants à lyser suite à la concentration.

Dans un mode de mise en œuvre particulier, le milieu de culture comporte plusieurs microorganismes d'intérêt différents, ledit procédé comportant en amont de l'étape de séparation physique, une étape préalable d'isolement d'un seul type de microorganismes d'intérêt choisi ou d'un  
5 ensemble de microorganismes d'intérêts différents choisis au sein de ladite portion prélevée, de sorte que lorsque cette portion fait l'objet de la séparation physique elle ne comprend que ledit seul type de microorganismes d'intérêt choisi ou ledit ensemble de microorganismes d'intérêts différents choisis.

Selon un mode de mise en œuvre particulier, le procédé de culture  
10 comprend un cycle répété de ses étapes. Dans un exemple de mise en œuvre, le procédé comporte un cycle répété d'au moins les étapes de prélèvement, de séparation physique, de lyse et de réintroduction. De préférence ledit cycle répété comporte également l'étape de concentration, et/ou l'étape d'apport de carbone organique.

15 Du fait de ce mélange de modes trophiques au sein d'un procédé de culture cyclique, on peut qualifier le procédé objet de la présente invention de procédé de culture d'au moins un microorganisme d'intérêt en cyclotrophie.

Selon un exemple de mise en œuvre préféré, ledit au moins un microorganisme d'intérêt est la cyanobactérie *Aphanizomenon flos-aquae*  
20 (AFA).

Selon un deuxième aspect, la présente invention vise une installation de culture d'au moins un microorganisme d'intérêt, en hétérotrophie ou mixotrophie, comportant :

- au moins un compartiment de culture ouvert ou fermé configuré  
25 pour recevoir un milieu de culture aqueux, ledit au moins un microorganisme d'intérêt et des microorganismes contaminants ;
- au moins un appareil de séparation configuré pour effectuer au moins une séparation physique du microorganisme d'intérêt et des microorganismes contaminants au sein d'une portion du milieu de culture ;  
30
- un dispositif de lyse configuré pour effectuer une lyse des microorganismes contaminants séparés par la séparation physique de sorte à produire un lysat ;

- des moyens de transports configurés pour au moins :
  - prélever une portion du milieu de culture comprenant le microorganisme d'intérêt et des microorganismes contaminants ;
  - 5 ○ réintroduire ledit lysat dans le compartiment de culture.

Les avantages, buts et caractéristiques particuliers de l'installation objet de la présente invention étant similaires à ceux du procédé objet de la présente invention, ils ne sont pas rappelés ici.

10 Suivant des modes de réalisation préférés, l'invention répond en outre aux caractéristiques suivantes, mises en œuvre séparément ou en chacune de leurs combinaisons techniquement opérantes.

Dans un mode de réalisation particulier, les moyens de transports sont en outre configurés pour unifier le lysat avec le microorganisme d'intérêt isolé par la séparation physique, de sorte à former un mélange, et réintroduire ledit  
15 mélange dans le compartiment de culture.

Dans un mode de réalisation particulier, les moyens de transports sont en outre configurés pour apporter du carbone organique au milieu de culture directement dans le compartiment de culture, dans le lysat, dans le mélange lysat/microorganisme d'intérêt séparé ou au microorganisme d'intérêt séparé  
20 par la séparation physique. Cet apport de carbone organique provient d'une autre source que le lysat de microorganismes contaminants.

Dans un mode de réalisation particulier, l'installation de culture comporte au moins un système de concentration configuré pour concentrer les microorganismes contaminants isolés par la séparation physique.

25 Dans un mode de réalisation particulier, les moyens de transport comportent des moyens :

- de générer un premier flux de milieu de culture comprenant le microorganisme d'intérêt et des microorganismes contaminants, du compartiment de culture vers l'appareil de séparation ;
- 30 - de générer un deuxième flux du microorganisme d'intérêt sortant de l'appareil de séparation ;
- de générer un troisième flux de microorganismes contaminants de l'appareil de séparation vers le système de concentration ;



- de générer un quatrième flux de microorganismes contaminants concentrés du système de concentration vers le dispositif de lyse ;
- de générer un cinquième flux de milieu de culture dépourvu de microorganismes contaminants du système de concentration vers le compartiment de culture ;
- de générer un sixième flux de lysat du dispositif de lyse vers le compartiment de culture ;
- de générer un septième flux de carbone organique sortant d'un réservoir de carbone organique ;
- d'unifier le deuxième flux, le sixième flux et le septième flux de sorte à former un huitième flux unique courant vers le compartiment de culture.

Dans un mode de réalisation particulier, l'installation de culture comporte un dispositif de purge de microorganismes contaminants. De préférence il s'agit d'un dispositif de purge de microorganismes contaminants concentrés.

Dans un mode de réalisation particulier, l'installation de culture comporte un dispositif de purge de milieu de culture dépourvu de microorganismes contaminants et de microorganisme d'intérêt.

Dans un mode de réalisation particulier, l'installation de culture comporte un dispositif de récolte du microorganisme d'intérêt.

### **Présentation des figures**

L'invention sera mieux comprise à la lecture de la description suivante, donnée à titre d'exemple nullement limitatif, et faite en se référant aux figures qui représentent :

- Figure 1 : illustre les étapes comprises par le procédé de culture objet de la présente invention selon des modes de mise en œuvre.
- Figure 2 : illustre une installation de culture objet de la présente invention selon un mode de réalisation.
- Figure 3 : graphe de l'évolution de la concentration massique en *Aphanizomenon flos-aquae* (AFA) dans le temps au sein d'un milieu de culture selon la mise en œuvre du procédé objet de la

présente invention en autotrophie ou en mixotrophie avec réintroduction de différentes concentrations en lysat.

### **Description détaillée de l'invention**

5 On note dès à présent que les figures ne sont pas à l'échelle.

De manière plus générale, la portée de la présente invention ne se limite pas aux modes de mise en œuvre et de réalisation décrits ci-dessus à titre d'exemples non limitatifs, mais s'étend au contraire à toutes les modifications à la portée de l'homme de l'art. Chaque caractéristique d'un  
10 mode de réalisation peut être mise en œuvre isolément ou combinée à toute autre caractéristique de tout autre mode de réalisation de manière avantageuse.

La figure 1 illustre un procédé **20** de culture d'au moins un microorganisme d'intérêt, en hétérotrophie ou mixotrophie, dans un milieu de culture aqueux, des microorganismes contaminants se développant  
15 naturellement dans ledit milieu de culture, selon un mode particulier de mise en œuvre. Le procédé comporte une étape **21** de prélèvement d'une portion du milieu de culture comprenant le microorganisme d'intérêt et des microorganismes contaminants. De préférence, le procédé 20 est réalisé en  
20 mixotrophie, le milieu de culture aqueux étant initialement dépourvu de carbone organique et le microorganisme d'intérêt est laissé en culture autotrophe pendant un temps  $t$  avant l'étape 21.

Le procédé 20 comporte une étape **22** de séparation physique du microorganisme d'intérêt et des microorganismes contaminants au sein de la  
25 portion du milieu de culture.

La réalisation de l'étape 22 de séparation physique peut être basée sur une différence morphologique ou phénotypique entre les microorganismes d'intérêt et les microorganismes contaminants. Par exemple, il peut s'agir d'une différence de taille, de forme, de propriétés de surface, de densité, de  
30 propension à l'agrégation ou à la floculation.

Selon un exemple de mise en œuvre l'étape 22 de séparation physique comporte une étape de filtration ou séparation gravitaire de sorte à obtenir de façon séparée les microorganismes contaminants concentrés d'une

part et du milieu nutritif d'autre part. Un exemple de filtration utilisée dans un mode de mise en œuvre préféré est la filtration tangentielle ou encore la filtration frontale. La filtration peut être effectuée à l'aide d'une membrane.

Le procédé 20 comporte en outre une étape **23** facultative de concentration des microorganismes contaminants isolés dans l'étape 22.

L'étape 23 facultative de concentration des microorganismes contaminants peut se baser sur une caractéristique morphologique ou phénotypique des microorganismes contaminants. Par exemple, il peut s'agir de leur taille, de leur forme, de leurs propriétés de surface, de leur densité, de leur propension à s'agréger ou à flocculer.

Selon un mode de mise en œuvre préféré l'étape 23 de concentration comporte une étape de filtration ou séparation gravitaire de sorte à obtenir de façon séparée les microorganismes contaminants concentrés d'une part et du milieu de culture dépourvu de microorganismes contaminants d'autre part. Comme pour la séparation physique, dans un mode de mise en œuvre particulier, un exemple de filtration utilisée est la filtration tangentielle ou encore la filtration frontale, et la filtration peut notamment être effectuée à l'aide d'une membrane.

Le procédé 20 comporte une étape **24** de lyse des microorganismes contaminants séparés par la séparation physique de sorte à produire un lysat. Ce lysat représente avantageusement des nutriments assimilables par le microorganisme d'intérêt, notamment du carbone organique. Dans un mode de mise en œuvre particulier, l'étape 24 de lyse peut comprendre une lyse chimique et/ou une lyse thermique et/ou une lyse mécanique, des microorganismes contaminants.

Le procédé 20 comporte également une étape **25** de réintroduction dudit lysat dans le milieu de culture.

Selon un exemple de réalisation préféré, l'étape 25 est réalisée de sorte que le lysat est réintroduit dans le milieu de culture en mélange avec le microorganisme d'intérêt isolé par l'étape 22 de séparation physique.

Enfin, le procédé 20 comporte une étape **26** facultative d'apport de carbone organique au milieu de culture. Ce carbone organique provient d'une source autre que le lysat de microorganismes contaminants. En effet, cet

apport de carbone organique de l'étape 26 est un apport supplémentaire à l'apport de nutriments (dont du carbone organique) présents dans le lysat de microorganismes contaminants.

De préférence, l'étape 26 d'apport de carbone organique dans le milieu de culture se fait par introduction dudit carbone organique dans le  
5 mélange lysat et microorganisme d'intérêt, dans le lysat seul, dans le microorganisme d'intérêt isolé par l'étape 22 de séparation physique ou dans le milieu de culture aqueux directement.

Selon un mode de mise en œuvre préféré, le procédé comporte un  
10 cycle répété des étapes 21 à 26, les étapes 23 et 26 restants facultatives.

Selon un exemple de mise en œuvre dans lequel le procédé de culture est en hétérotrophie, l'étape 26 d'apport de carbone organique est introduite dans un cycle **C1** des étapes 21 à 25, après la mise en œuvre d'au moins un cycle C1, créant ainsi un cycle **C2** des étapes 21 à 26 qui est par la suite  
15 répété autant de fois que nécessaire.

Selon un exemple de mise en œuvre dans lequel le procédé 20 de culture est en mixotrophie, avec le milieu de culture aqueux initialement dépourvu de carbone organique et le microorganisme d'intérêt laissé en culture autotrophe pendant un temps t avant l'étape 21, l'étape 26 d'apport de carbone  
20 organique est introduite dès la mise en œuvre du premier cycle des étapes 21 à 25, avant l'étape de prélèvement 21, faisant ainsi commencer le procédé 20 par le cycle C2, ladite étape 26 étant réalisée par apport de carbone organique directement dans le milieu de culture aqueux au moins dans le premier cycle C2.

25 Dans un mode de mise en œuvre particulier le procédé 20 de culture comprend une étape (non représentée sur les figures) de clarification du lysat obtenue par l'étape 24 de lyse, une concentration et/ou un ajustement du pH du lysat, avant l'étape 25 de réintroduction.

La figure 2 illustre une installation **27** de culture d'au moins un  
30 microorganisme d'intérêt **28** en hétérotrophie ou mixotrophie. L'installation n'a avantageusement pas besoin d'être en condition aseptisée, ni préalablement, ni durant son utilisation pour la culture.

L'installation 27 comporte un compartiment **29** de culture ouvert ou

fermé configuré pour recevoir un milieu de culture **30** aqueux, ledit au moins un microorganisme d'intérêt 28 et des microorganismes contaminants **32**.

L'installation 27 comporte en outre au moins un appareil de séparation **33** configuré pour effectuer au moins une séparation physique du  
5 microorganisme d'intérêt 28 et des microorganismes contaminants 32 au sein d'une portion du milieu de culture 30.

L'installation 27 comporte un dispositif de lyse **34** configuré pour effectuer une lyse des microorganismes contaminants 32 séparés de sorte à produire un lysat **35**.

10 Selon un mode de réalisation particulier, l'installation comporte en outre au moins un système de concentration **36** configuré pour concentrer les microorganismes contaminants 32 séparés avant leur lyse.

L'installation 27 comporte des moyens de transports configurés pour au moins :

- 15
- prélever une portion du milieu de culture 30 comprenant le microorganisme d'intérêt 28 et des microorganismes contaminants 32 ;
  - réintroduire le lysat 35 dans le compartiment 29 de culture.

De préférence, les moyens de transport sont en outre configurés  
20 pour unifier le lysat 35 avec le microorganisme d'intérêt 28 séparé, de sorte à former un mélange et réintroduire ledit mélange dans le compartiment 29 de culture.

De préférence, les moyens de transport sont configurés pour apporter du carbone organique au milieu de culture 30 directement dans le  
25 compartiment 29 de culture ou au lysat 35 ou au microorganisme d'intérêt 28 séparé par la séparation physique ou au mélange de lysat 35 et microorganisme d'intérêt 28 ou dans une combinaison d'au moins deux de ces derniers.

Selon un mode de réalisation préféré, les moyens de transport  
30 comportent des moyens :

- de générer un premier flux **37** de milieu de culture 30 comprenant le microorganisme d'intérêt 28 et des microorganismes contaminants 32, du compartiment 29 de culture vers l'appareil de

séparation 33 ;

- de générer un deuxième flux **38** du microorganisme d'intérêt 28 sortant de l'appareil de séparation 33 ;
- de générer un troisième flux **39** de microorganismes contaminants 32 de l'appareil de séparation 33 vers le système de concentration 36 ;
- de générer un quatrième flux **40** de microorganismes contaminants 32 concentrés du système de concentration 36 vers le dispositif de lyse 34 ;
- de générer un cinquième flux **41** de milieu de culture 30 dépourvu de microorganismes contaminants, du système de concentration 36 vers le compartiment 29 de culture ;
- de générer un sixième flux **42** de lysat 35 du dispositif de lyse 34 vers le compartiment de culture 29 ;
- de générer un septième flux **43** de carbone organique ;
- d'unifier le deuxième flux 38, le sixième flux 42 et le septième flux 43 de sorte à former un huitième flux **44** unique courant vers le compartiment 29 de culture.

Selon un exemple particulier de réalisation, l'installation 27 comprend un réservoir de carbone organique **45**. Le septième flux 43 est de préférence généré de sorte qu'il sort du réservoir 45.

Le cinquième flux 41 est de préférence dépourvu de microorganismes d'intérêt.

Selon un mode de réalisation particulier les moyens de générer les différents flux comportent au moins un moteur et/ou une pompe (non illustrés sur les figures).

Dans un mode de réalisation particulier, l'installation 27 comporte un premier dispositif de purge **46** de microorganismes contaminants 32, un deuxième dispositif de purge **47** de milieu de culture 30 dépourvu de microorganismes d'intérêt et de microorganismes contaminants et un dispositif de récolte **48** du microorganisme d'intérêt 28.

Le procédé 20 de culture d'au moins un microorganisme d'intérêt 28, en hétérotrophie ou mixotrophie, est détaillé ci-dessous selon un mode de mise

en œuvre dans lequel est notamment utilisée une installation 27 objet de la présente invention selon un de ses modes de réalisation :

Il est préalablement introduit dans le compartiment 29 de culture, un milieu de culture 30 aqueux et du microorganisme d'intérêt 28. Le  
5 microorganisme d'intérêt 28 est de préférence laissé en culture autotrophe pendant un temps t.

Du carbone organique est alors introduit directement dans le compartiment 29 de culture selon l'étape 26, via le septième flux 43 de carbone organique sortant du réservoir 45. La culture passe alors en mixotrophie et des  
10 microorganismes contaminants 32 se développent dans le milieu de culture 30 avec le microorganisme d'intérêt 28.

Dans l'étape 21, le prélèvement d'une portion du milieu de culture 30 comprenant le microorganisme d'intérêt 28 et des microorganismes contaminants 32 est réalisé par génération du premier flux 37 de milieu de  
15 culture 30 du compartiment 29 vers l'appareil de séparation 33.

Dans l'appareil de séparation 33 est opérée l'étape 22 de séparation physique du microorganisme d'intérêt 28 et des microorganismes contaminants 32 au sein de la portion du milieu de culture 30 prélevée. De préférence, cette étape 22 est réalisée par filtration tangentielle membranaire.

20 Après l'étape 22 de séparation physique, le deuxième flux 38 de microorganisme d'intérêt 28 sortant de l'appareil de séparation 33 est généré, ainsi que le troisième flux 39 de microorganismes contaminants 32 de l'appareil de séparation 33 vers le système de concentration 36.

Dans le système de concentration 36 a lieu l'étape 23 facultative de  
25 concentration des microorganismes contaminants 32 séparés par l'étape 22. De préférence, cette étape 23 est réalisée par filtration tangentielle membranaire. On peut considérer cette étape 23 comme une deuxième séparation physique permettant de séparer d'une part les microorganismes contaminants 32 de façon concentrés et d'autre part du milieu de culture 30  
30 dépourvu de microorganismes contaminants 32 et de microorganisme d'intérêt 28.

Après cette étape 23, le quatrième flux 40 de microorganismes contaminants 32 concentrés est généré du système de concentration 36 vers le

dispositif de lyse 34, et le cinquième flux 41 de milieu de culture 30 dépourvu de microorganismes contaminants 32 et de microorganisme d'intérêt 28, est généré du système de concentration 36 vers le compartiment 29 de culture.

Dans le dispositif de lyse 34 a ensuite lieu l'étape 24 de lyse des microorganismes contaminants 32 séparés et concentrés, de sorte à produire le lysat 35.

Le troisième flux 39 est directement dirigé vers le dispositif de lyse 34 dans un mode de mise en œuvre où l'étape 23 de concentration n'a pas lieu. Dans un tel mode de mise en œuvre particulier, l'étape de lyse 24 est réalisée sur les microorganismes contaminants 32 séparés provenant directement de l'appareil de séparation 33 via le troisième flux 39.

Ensuite, dans l'étape 25 de réintroduction, le lysat 35 est réintroduit dans le milieu de culture 30 au sein du compartiment de culture 29 par génération du sixième flux 42 de lysat 35. De préférence, le deuxième flux 38 de microorganismes d'intérêt 28 et le sixième flux 42 de lysat 35 sont unifiés de sorte à former un mélange courant vers le compartiment 29.

Ce cycle C2 du procédé de culture peut être répété plusieurs fois.

Après le premier cycle C2, dans les étapes 26 de chaque cycle C2 suivant, le septième flux 43 de carbone organique sortant du réservoir 45 qui est généré est de préférence unifié avec le deuxième flux 38 et le sixième flux 42 de sorte à former le huitième flux 44 unique de mélange courant vers le compartiment 29 dans lequel il est réintroduit.

*Exemple appliqué à la culture d'Aphanizomenon flos-aquae (AFA) en mixotrophie en milieu ouvert*

#### Microorganismes utilisés

Le microorganisme d'intérêt 28 utilisé dans cette étude est une souche d'*Aphanizomenon flos-aquae* (AFA) isolée. L'AFA est une cyanobactérie d'intérêt industriel et commercial.

Des microorganismes contaminants 32 modèles sont constitués par un mélange de 5 souches de bacilles ayant des caractéristiques morphologiques et phénotypiques différentes. Ce mélange se présente sous la forme d'une



solution bactérienne vivante, concentrée et présentée en formulation liquide. La solution commercialisée sous la référence « Bactilit™ » par la société CG PACKAGING peut être par exemple utilisée.

Afin de simplifier le procédé, les microorganismes contaminants 32 sont initialement introduits dans la culture de cyanobactérie à raison d'une cellule du microorganisme d'intérêt 28 pour une cellule de microorganisme contaminant 32. Par ailleurs, il faut noter qu'un filament est considéré comme une cellule de cyanobactérie, quelle que soit sa taille.

#### 10 Milieus de culture

Le milieu de culture utilisé est un milieu BG11 (composition détaillée fournie en tableaux A à D), natif pour la culture en autotrophie, ou, additivé de lactosérum en poudre à une concentration finale de 4,5 g.L<sup>-1</sup> pour la culture en mixotrophie.

| Produit                                                                          | Concentration g/L |
|----------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| Na <sub>2</sub> MgEDTA                                                           | 0.1               |
| Ferric Ammonium Citrate                                                          | 0.6               |
| Acide citrique, H <sub>2</sub> O                                                 | 0.6               |
| CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O                                            | 3.6               |
| Eau osmosée, stérilisation 20 minutes à 121°C ou filtration (conservation à 4°C) |                   |

15 *Tableau A : composition de la solution stock 1*

| Produit                                                                          | Concentration g/L |
|----------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O                                            | 7.5               |
| Eau osmosée, stérilisation 20 minutes à 121°C ou filtration (conservation à 4°C) |                   |

*Tableau B : composition de la solution stock 2*

| Produit                         | Concentration g/L |
|---------------------------------|-------------------|
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 0.6               |

|                                                                                  |
|----------------------------------------------------------------------------------|
| Eau osmosée, stérilisation 20 minutes à 121°C ou filtration (conservation à 4°C) |
|----------------------------------------------------------------------------------|

Tableau C : composition de la solution stock 3

| Produit                                                      | Concentration g/L ou mL/L |
|--------------------------------------------------------------|---------------------------|
| Solution stock 1 (mL)                                        | 10                        |
| Solution stock 2 (mL)                                        | 10                        |
| Solution stock 3 (mL)                                        | 10                        |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (g)                          | 0.02                      |
| NaNO <sub>3</sub> (g)                                        | 1.5                       |
| Eau osmosée, pH ajusté à 9, stérilisation 20 minutes à 121°C |                           |

Tableau D : composition de la solution de milieu nutritif BG11

#### Conditions opératoires des cultures

La culture d'AFA est réalisée dans un local climatisé dont la température est régulée à 25±1°C. Le compartiment 29 de culture en verre borosilicaté (volume total = 250mL, volume de culture = 200mL, hauteur utile = 70mm, diamètre utile = 60mm) est équipé d'une agitation par pale (mobile d'agitation de type hélice marine, diamètre du mobile = 30mm, vitesse d'agitation = 60rpm).

L'apport lumineux est assuré par un panneau de diodes électroluminescentes (irradiance du rayonnement photosynthétiquement actif mesurée à la paroi externe du réacteur = 200  $\mu\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$ ).

Le taux d'inoculation des cultures a été fixé à  $5.10^5$  et  $1.10^6$  cellules.mL<sup>-1</sup>.

15

#### Opérations unitaires et conditions opératoires pour la séparation physique du microorganisme d'intérêt des microorganismes contaminants et pour la concentration des microorganismes contaminants

Concernant la séparation physique entre l'*Aphanizomenon Flos-Aquae* et les microorganismes contaminants modèles (diverses souches de bacilles

20

en mélange), la méthode utilisée consiste en une première filtration tangentielle avec membrane.

La concentration des microorganismes contaminants modèles fait appel à une deuxième séparation physique entre lesdits microorganismes contaminants et du milieu de culture BG11 réalisée par une deuxième filtration tangentielle avec membrane.

La première filtration fait appel à une membrane ayant une porosité de 5  $\mu\text{m}$ . Il est possible, pour la première filtration tangentielle, d'utiliser une membrane ayant une porosité comprise entre 0,65  $\mu\text{m}$  et 20  $\mu\text{m}$ , et de manière préférable comprise entre 1,2  $\mu\text{m}$  et 20  $\mu\text{m}$ , de préférence comprise entre 3  $\mu\text{m}$  et 20  $\mu\text{m}$ , et encore de préférence comprise entre 5  $\mu\text{m}$  et 20  $\mu\text{m}$ .

La seconde filtration fait appel à une membrane ayant une porosité de 0,2  $\mu\text{m}$ . Il est possible, pour la seconde filtration tangentielle, de définir un seuil de porosité inférieur à 5 $\mu\text{m}$ , et de manière préférable inférieur à 3  $\mu\text{m}$ , et de manière préférable inférieur à 1,2  $\mu\text{m}$ , et de manière préférable inférieur à 0,65  $\mu\text{m}$ , et de manière préférable inférieur à 0,2  $\mu\text{m}$ .

Concernant le débit de perméation à appliquer pour la première filtration tangentielle (c'est-à-dire le débit de prélèvement d'une portion du milieu de culture), il est de préférence choisi un débit quotidien supérieur ou égal à une fois le volume de l'installation 27 de culture, et de manière préférable supérieur ou égal à trois fois le volume de l'installation 27 de culture.

Concernant les vitesses tangentielles à appliquer dans la première filtration tangentielle, il est préférable d'appliquer des vitesses inférieures ou égales à 2,1 m.s<sup>-1</sup>, et de manière préférable inférieures ou égales à 0,7 m.s<sup>-1</sup>.

25

#### Opérations unitaires et conditions opératoires pour la lyse des microorganismes contaminants

Concernant la lyse des microorganismes contaminants, il est utilisé une lyse alcaline à chaud. Un volume de soude 5N a été ajoutée à la solution de microorganismes contaminants concentrés afin d'atteindre une concentration finale de 0,1N. Cette solution a ensuite été maintenue à 70°C pendant 10 minutes avant d'être refroidie.

30

### Résultats obtenus

Avant l'étape 21 de prélèvement du procédé de culture, le microorganisme d'intérêt est laissé en culture autotrophe dans le milieu de culture 30 pendant un temps t afin de valider l'état physiologique correct de la souche et d'établir des données de référence quant aux performances de croissance. Après le temps t, le procédé est lancé de façon cyclique répétée selon le cycle C2 avec l'étape 26 d'apport de carbone organique et l'étape 23 de concentration.

En autotrophie, une observation rapide permet de mettre en évidence que la souche croît avec une première phase, jusqu'à 100h, correspondant à croissance exponentielle puis, une seconde phase de croissance linéaire, entre 100h et 600h. Enfin, une phase de ralentissement s'observe après 600h. Ces tendances sont classiquement retrouvées dans le cas de croissance non balancée, c'est-à-dire dans le cas où un facteur environnemental devient limitant. Il peut s'agir de facteur nutritionnel (substrat, produit du métabolisme) ou de facteurs physico-chimiques. Dans le cas présent, il est raisonnable d'émettre l'hypothèse que l'énergie lumineuse puisse devenir limitante au-delà d'une certaine densité cellulaire (phénomène d'ombrage).

En appliquant une régression linéaire, il est possible de déterminer une équation représentative de la vitesse de croissance, à savoir :  $y = 0,002x + 0,4453$ .

Il est également possible d'évaluer la productivité volumique de la souche grâce aux mesures de concentrations massiques en microorganisme d'intérêt.

La concentration cellulaire dans les cultures est estimée par mesure de l'absorbance d'un échantillon liquide. La mesure de l'absorbance du milieu est réalisée à 600 nm par l'intermédiaire d'un spectrophotomètre. Cette absorbance (ou densité optique) est considérée comme étant en relation linéaire avec la concentration (loi de Beer-Lambert,  $Abs = \epsilon.l.C$ ) pour des valeurs comprises entre 0,1 et 0,4 unité. Des dilutions sont effectuées de manière à se situer dans ce domaine de validité.

La concentration cellulaire massique est également mesurée par mesure des matières en suspension (MES). La concentration en matières en

suspension ([MES]) est estimée par pesée de la masse sèche d'un volume connu de suspension cellulaire. Celui-ci est filtré sur une membrane de diamètre de pores de  $0,45\ \mu\text{m}$  ( $\varnothing=4,7\ \text{cm}$ ) préalablement séchée à  $60^\circ\text{C}$  et  $200\ \text{mm Hg}$  pendant 24 heures et pesée. Après filtration, la membrane et le dépôt  
5 cellulaire sont séchés dans les mêmes conditions puis pesés. La différence de masse ramenée au volume permet d'obtenir la concentration en matières en suspension dans la suspension filtrée.

La croissance microbienne est évaluée en termes de temps de doublement (ou temps de génération,  $t_g$ ) et de productivité volumique ( $r_x$ ).

10 Les paramètres de croissance autotrophe de la souche d'AFA sont une concentration de matière en suspension maximale ( $[\text{MES}]_{\text{max}}$ ) de  $0,75\ \text{g.L}^{-1}$  et une productivité volumique maximale ( $r_{x\ \text{max}}$ ) de  $26.10^{-3}\ \text{g.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ .

Lorsque l'on met en œuvre le procédé objet de la présente invention en mixotrophie, c'est-à-dire lorsqu'on engage le premier cycle C2 en  
15 commençant par l'étape 26 d'apport de carbone organique au milieu de culture, un gain de productivité est observé malgré la consommation d'une partie du carbone organique fourni par les microorganismes contaminants. En effet, l'ajout de lysat de microorganismes contaminants à la culture permet d'apporter du carbone organique hautement assimilable et donc, de recycler une partie du  
20 carbone organique initial consommé par les microorganismes contaminants.

#### Calcul du gain de rendement en productivité pour une culture d'AFA avec le procédé de culture en mixotrophie

La concentration massique d'AFA a été relevée dans le temps (toutes  
25 les heures pendant 150h) dans un milieu de culture BG11 natif (autotrophie : Témoin). En parallèle, la concentration massique d'AFA a été relevée dans le temps dans des milieux de cultures BG11 durant des essais de mise en œuvre du procédé de culture objet de la présente invention réalisé en mixotrophie, l'étape de réintroduction du lysat dans le milieu de culture étant réalisée avec  
30 des concentrations en lysat différentes ( $0,1\text{g/L}$  ou  $1\text{g/L}$  ou  $5\text{g/L}$ ) suivant les essais.

L'évolution de la concentration massique d'AFA dans le temps est visible sur le graphe en figure 3.

Ces résultats indiquent qu'un ajout de lysat permet d'augmenter la productivité et la concentration maximale en AFA dans les cultures. Cet effet est d'autant plus marqué que les concentrations en lysat sont importantes pour des valeurs comprises entre 0,1 et 5 g/L.

5            Une analyse stœchiométrique montre que l'ajout de 5g/L de lysat (correspondant à 165 mg de carbone organique par litre) permet d'augmenter le titre maximal en AFA de 111 mg d'AFA par litre. Ceci correspondant à un rendement de production hétérotrophe de microorganisme d'intérêt de 0,6 gramme d'AFA par gramme de carbone organique fournit par le lysat.

10           Une analyse cinétique montre que l'ajout de 5g/L de lysat permet d'augmenter, jusqu'à 29h de culture, la productivité en AFA de 26,4 mg d'AFA par litre par heure à 91,2 mg d'AFA par litre par heure, soit +340%.

## **REVENDICATIONS**

1. Procédé de culture d'au moins un microorganisme mixotrophe, en hétérotrophie ou mixotrophie, dans un milieu de culture aqueux, des microorganismes contaminants se développant naturellement dans le milieu de culture, comprenant :
  - une étape de prélèvement par jour d'une portion du milieu de culture comprenant le microorganisme mixotrophe et des microorganismes contaminants, la portion correspondant à un volume supérieur ou égal à une fois le volume du milieu de culture ;
  - une étape de séparation physique du microorganisme mixotrophe et des microorganismes contaminants au sein de la portion de milieu de culture;
  - une étape de lyse des microorganismes contaminants ainsi séparés de sorte à produire un lysat ;
  - une étape de réintroduction du lysat dans le milieu de culture.
2. Le procédé de culture selon la revendication 1, dans lequel le microorganisme mixotrophe séparé par l'étape de séparation est réintroduit dans le milieu de culture, seul ou en mélange avec le lysat.
3. Le procédé de culture selon la revendication 1 ou 2, comportant une étape d'apport de carbone organique dans le milieu de culture.
4. Le procédé de culture selon la revendication 3, en mixotrophie, dans lequel le milieu de culture aqueux est initialement dépourvu de carbone organique et le microorganisme mixotrophe est laissé en culture autotrophe pendant un temps  $t$  avant l'étape d'apport de carbone organique et l'étape de prélèvement.
5. Le procédé de culture selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, comprenant une étape de concentration des microorganismes contaminants séparés par l'étape de séparation physique.
6. Le procédé de culture selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans lequel le milieu de culture comporte plusieurs microorganismes mixotrophes différents, le procédé comportant en amont de l'étape de séparation physique, une étape

préalable d'isolement d'un seul type de microorganisme mixotrophe choisi ou d'un ensemble de microorganismes mixotrophes différents choisis au sein de la portion prélevée, de sorte que lorsque cette portion fait l'objet de la séparation physique elle ne comprend que le seul type de microorganisme mixotrophe choisi ou l'ensemble de microorganismes mixotrophes différents choisis.

7. Le procédé de culture selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, comprenant un cycle répété de ses étapes.

8. Le procédé de culture objet de l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans lequel l'au moins un microorganisme mixotrophe est la cyanobactérie *Aphanizomenon flos-aquae* (AFA).

9. Installation de culture d'au moins un microorganisme mixotrophe, en hétérotrophie ou mixotrophie, comportant :

- au moins un compartiment de culture ouvert ou fermé configuré pour recevoir un milieu de culture aqueux, l'au moins un microorganisme mixotrophe et des microorganismes contaminants ;
- au moins un appareil de séparation configuré pour effectuer au moins une séparation physique du microorganisme mixotrophe et des microorganismes contaminants au sein d'une portion du milieu de culture ;
- un dispositif de lyse configuré pour effectuer une lyse des microorganismes contaminants séparés par la séparation physique de sorte à produire un lysat ; et
- des moyens de transports configurés pour au moins :
  - o prélever par jour une portion du milieu de culture comprenant le microorganisme mixotrophe et des microorganismes contaminants, la portion correspondant à un volume supérieur ou égal à une fois le volume du milieu de culture ; et
  - o réintroduire le lysat dans le compartiment de culture.

10. L'installation de culture selon la revendication 9, dans laquelle les moyens de transports sont configurés pour :

- o unifier le lysat avec le microorganisme mixotrophe séparé, de sorte à former un mélange et réintroduire le mélange dans le



compartiment de culture ; et

- apporter du carbone organique au milieu de culture directement dans le compartiment de culture, dans le lysat ou dans le mélange ou au microorganisme mixotrophe séparé par la séparation physique.

11. L'installation de culture selon la revendication 9 ou 10, comportant au moins un système de concentration configuré pour concentrer les microorganismes contaminants séparés.

12. L'installation de culture selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, comportant un dispositif de purge de microorganismes contaminants, un dispositif de purge de milieu de culture dépourvu de microorganismes contaminants et de microorganisme mixotrophe et un dispositif de récolte du microorganisme mixotrophe.

1/3

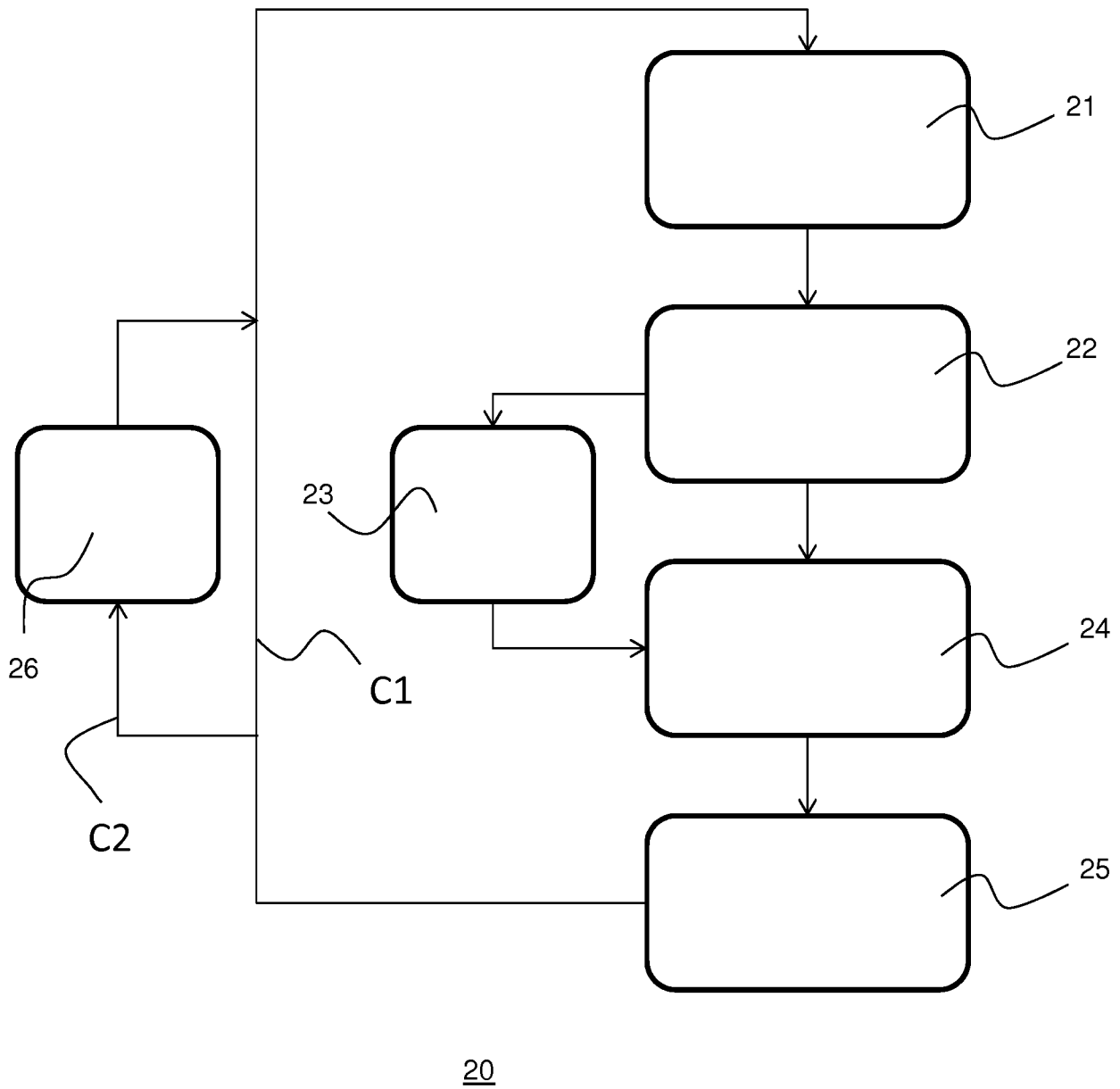


Fig. 1

2/3

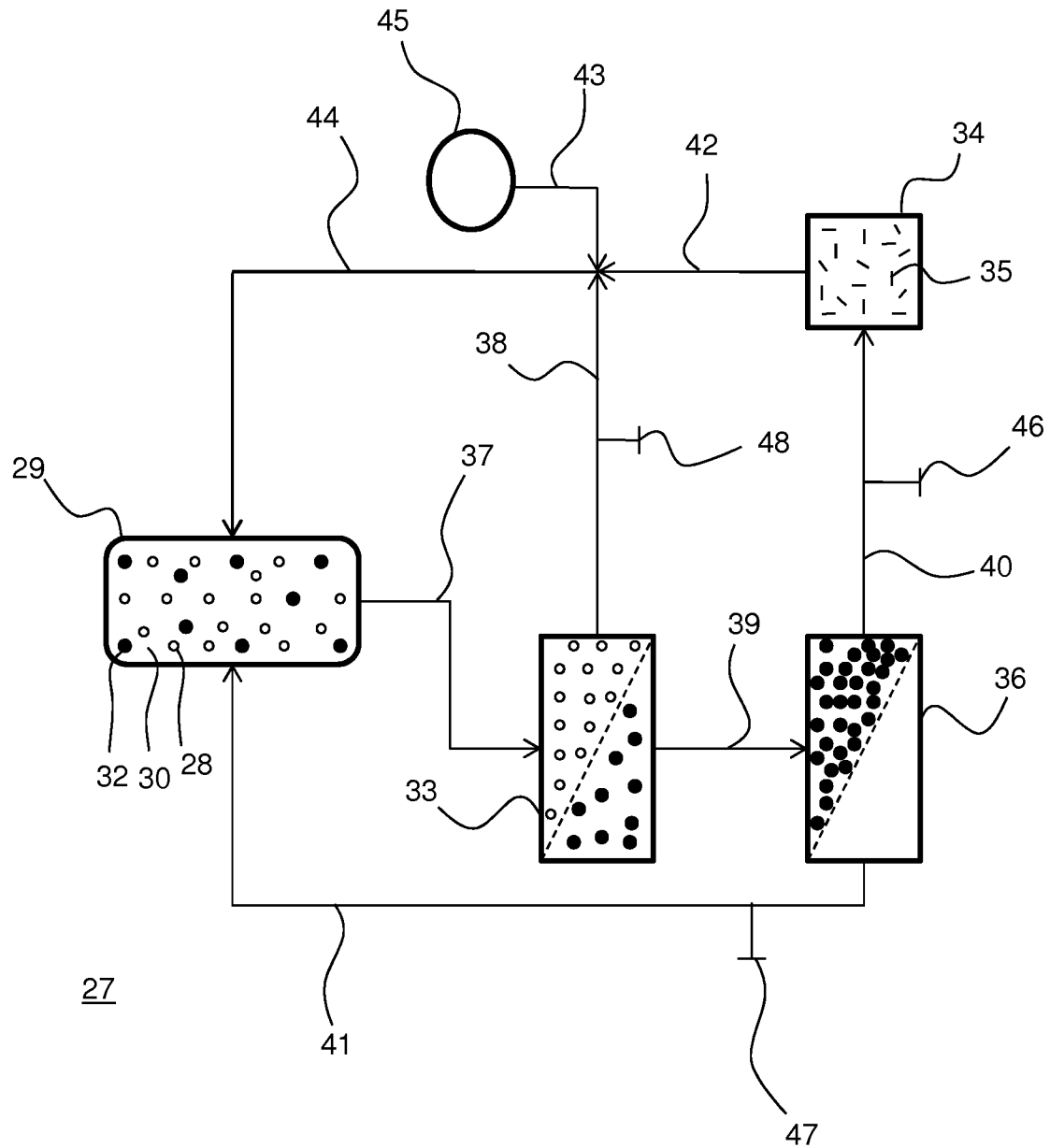
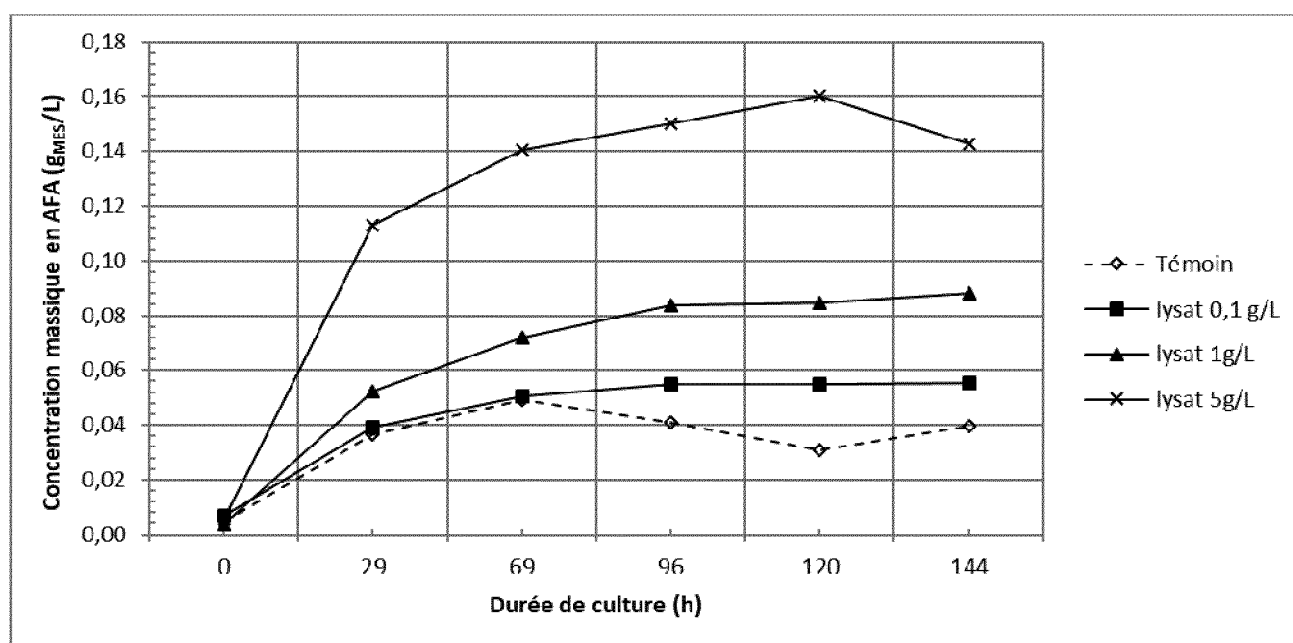


Fig. 2

3/3

**Fig. 3**