

(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
3 janvier 2014 (03.01.2014)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2014/003530 A4

(51) Classification internationale des brevets :
C12N 1/38 (2006.01) C12P 7/64 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/MA2013/000020

(22) Date de dépôt international :
28 juin 2013 (28.06.2013)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
35014 28 juin 2012 (28.06.2012) MA

(71) Déposant : MOROCCAN FOUNDATION FOR ADVANCED SCIENCE, INNOVATION & RESEARCH (MASCIR) [MA/MA]; Rabat Design Center, rue Mohamed El Jazouli, Madinat al Irfane, Rabat 10100 (MA).

(72) Inventeurs : WAHBY, Imane; Rabat Design Center, rue Mohamed El Jazouli, Madinat al Irfane, Rabat 10100 (MA). BENNIS, Iman; Rabat Design Center, rue Mohamed El Jazouli, Madinat al Irfane, Rabat 10100 (MA). EL ARROUSSI, Hicham; Rabat Design Center, rue Mohamed El Jazouli, Madinat al Irfane, Rabat 10100 (MA). BENHIMA, Redouane; Rabat Design Center, rue Mohamed El Jazouli, Madinat al Irfane, Rabat 10100 (MA).

(74) Mandataire : AMMANI, Abdelhaq; Rabat Design Center, rue Mohamed El Jazouli, Madinat al Irfane, Rabat 10100 (MA).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, 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, 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).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))

Publiée :

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

— avec revendications modifiées (art. 19.1))

Date de publication des revendications modifiées :

13 mars 2014

(54) Title : METHOD FOR INCREASING THE POTENTIAL FOR BIOFUEL PRODUCTION FROM MICROALGAE BY USING BIO-MODULATORS

(54) Titre : PROCÉDÉ POUR AUGMENTER LE POTENTIEL DE PRODUCTION DE BIOCARBURANT À PARTIR DE MICRO-ALGUES EN UTILISANT DES BIO-MODULATEURS

(57) Abstract : The present invention proposes a method for cultivating and processing microalgae isolated from marine and extremophilic environments for optimal biofuel production. The species of microalgae selected can be species of the genus *Dunaliella* (*D. bardawil*, *D. salina*, *D. acidophila*, *D. biolecta*, *D. lateralis*, *D. maritima*, *D. minuta*, *D. parva*, *D. peircei*, *D. polymorpha*, *D. primolecta*, *D. pseudosalina*, *D. quartolecta*, *D. tertiolecta*, *D. viridis* and others). For the purpose of cultivating microalgae for the production of biofuel, the optimal conditions for the production of biomass and lipids are different. This invention proposes a method which makes it possible to simultaneously stimulate the accumulation of biomass and intracellular lipids (more than 60% by dry weight), essentially the neutral lipids sought for the production of biodiesel, by reinforcing the action of natural bio-modulators or chemical analogues (auxins, cytoquinines, gibberellins, NaCl) in hypersaline and alkaline conditions. Another aspect of the invention is the application of *ad hoc* changes to the pH of the cultivation media causing the spontaneous precipitation of cells loaded with lipids once the cycle of growth and storage of lipids intended for the production of biodiesel is complete. This method makes it possible to recover microalgal biomass quickly and passively, requiring little energy and without the step of centrifugation or filtration, in order to extract the intracellular lipids and transform same into biodiesel. This method ensures very selective cultivation conditions which only a predetermined number of species has a similar response to and/or is able to tolerate, which limits the risks of contamination by other microalgae, bacteria or fungi, this frequently being a problem in open cultivation systems such as ponds. This offers a system for cultivating microalgae that is advantageous and applicable on a large scale for the biofuel application and others.

(57) Abrégé :

[Suite sur la page suivante]

WO 2014/003530 A4



La présente invention offre une méthode de culture et traitement des microalgues isolées des environnements marins et extrêmophiles pour une production optimale de biocarburant. Les espèces de microalgues sélectionnées peuvent être des espèces du genre *Dunaliella* (*D. bardawil*, *D. salina*, *D. acidophila*, *D. biolecta*, *D. lateralis*, *D. maritima*, *D. minuta*, *D. parva*, *D. peircei*, *D. polymorpha*, *D. primolecta*, *D. pseudosalina*, *D. quartolecta*, *D. tertiolecta*, *D. viridis* et autres). Pour la culture des microalgues pour la production de biocarburant, les conditions optimales pour la production de biomasse et de lipides sont différentes. Cette invention donne une méthode qui permet de stimuler simultanément l'accumulation de la biomasse et des lipides intracellulaires (plus de 60% par poids sec), essentiellement les lipides neutres recherchés pour la production du biodiesel, en renforçant l'action des bio-modulateurs naturels ou des analogues chimiques (auxines, cytokinines, gibbérellines, NaCl) dans des conditions hypersalines et alcalines. Un autre aspect de l'invention est l'application de modifications ponctuelles du pH des milieux de culture provoquant la précipitation spontanée des cellules chargées en lipides une fois le cycle de croissance et d'emmagasinement de lipides destinées à la production de biodiesel finalisé. Cette méthode permet la récupération rapide et passive, peu demandeuse en énergie et sans l'étape de centrifugation ni de filtration, de la biomasse microalgale pour l'extraction des lipides intracellulaires et leur transformation en biodiesel. Cette méthode assure des conditions de culture très sélectives aux quelles uniquement un nombre d'espèces déterminé présente une réponse similaire et/ou peut tolérer, ce qui limite les risques de contaminations, par d'autres microalgues, bactéries ou champignons, étant un problème fréquent dans les systèmes de cultures ouverts comme les bassins. Cela offre un système de culture des microalgues avantageux et applicable à grande échelle pour l'application biocarburant et autres.

REVENDEICATIONS MODIFIÉES
reçues par le Bureau international le 04 février 2014 (04.02.2014)

1. Procédé pour l'augmentation du potentiel de production de biocarburant à partir des microalgues, **caractérisé en ce que des** microalgues sélectionnées subissent une phase de croissance dans un milieu de culture enrichie par des phytohormones (bio-modulateurs I) et exposé à la lumière pendant une durée de 10 jours , suivie d'une phase de stress de 4 jours par l'augmentation de la salinité du milieu en ajoutant des sels minéraux ayant un rôle osmo-régulateurs comme NaCl, et KCl (bio-modulateurs II), et enfin, la phase de récupération passive de la biomasse par un changement de la valeur du pH du milieu de culture par ajout de NaOH ou KOH (bio-modulateurs III) jusqu'à avoir un PH=10.
2. Procédé pour l'augmentation du potentiel de production de biocarburant à partir des microalgues, Selon la revendication 1, **caractérisé en ce que** les microalgues utilisées sont des espèces halophiles et/ou appartenant aux classes des Chlorophyceae, Cyanophyceae, Bacillariophyceae, Xantophyceae, Chrysophyceae. Ces microalgues peuvent appartenir aux genres *Dunaliella*, *Chlorella*, *Nannochloropsis*, *Haematococcus*, *skeletonemas*, *Melosira*, *Thalassiosira*, *Nitzschia*, *Navicula*.
3. Procédé pour l'augmentation du potentiel de production de biocarburant à partir des microalgues, Selon les revendications 1 et 2, **caractérisé en ce que** la microalgue utilisée est *Dunaliella tertiolecta*.
4. Procédé pour l'augmentation du potentiel de production de biocarburant à partir des microalgues, Selon les revendications 1 à 3, **caractérisé en ce que** le Bio-modulateur I peut contenir:
 - Une auxine (acide 2,4-Dichlorophenoxyacétique 2,4-D, acide naphthalène acétique ANA, acide indole acétique AIA, acide indole butyrique AIB),
 - Une cytokinique (zéatine, thidiazuron TDZ, benzylaminopurine BAP, isopentényladénine IPA, kinétine),
 - Une gibbérelline (acide gibbérellique GA_s),

- Un composé de structure ou fonction similaire à une auxine, un composé de structure ou fonction similaire à une cytokinine, un facteur de croissance, un promoteur de croissance,
 - Des molécules impliquées dans la signalisation cellulaire (acide salicylique SA, acide jasmonique JA, methyl jasmonate MeJa).
5. Procédé pour l'augmentation du potentiel de production de biocarburant à partir des microalgues, Selon les revendications 1 à 4, **caractérisé en ce que** la concentration des phytohormones, utilisés seuls ou combinés, est comprise dans l'intervalle [0.01 - 2] mg/L.
6. Procédé pour l'augmentation du potentiel de production de biocarburant à partir des microalgues, Selon la revendication 1, **caractérisé en ce que** dans la phase de croissance on utilise les vitamines B1, B8, B12 ou des substances ayant un effet similaire comme nutriment.
7. Procédé pour l'augmentation du potentiel de production de biocarburant à partir des microalgues, Selon les revendications 1 à 6, **caractérisé en ce que** la concentration du bio-modulateur II dans le milieu de culture durant la phase du stress salin est compris entre 0.5 et 5 M.
8. Procédé pour l'augmentation du potentiel de production de biocarburant à partir des microalgues, Selon la revendication 1, **caractérisé en ce que** le bio-modulateur III est maintenu en contact avec le milieu de culture entre 15 min et 2h avant la récupération de la biomasse.
9. Procédé pour l'augmentation du potentiel de production de biocarburant à partir des microalgues, Selon les revendications précédentes, **caractérisé en ce que** le dit procédé est utilisé pour produire des molécules à haute valeur ajoutée comme les caroténoïdes et les acides gras polyinsaturés.