

(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
5 décembre 2013 (05.12.2013)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2013/178937 A2

(51) Classification internationale des brevets :

A23D 9/02 (2006.01)	C11C 1/10 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)	C11C 3/00 (2006.01)
C11B 1/10 (2006.01)	C11C 3/10 (2006.01)
C11B 3/00 (2006.01)	C12P 7/64 (2006.01)
C11B 3/14 (2006.01)	A23D 9/007 (2006.01)
C11B 7/00 (2006.01)	

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2013/051187

(22) Date de dépôt international :

28 mai 2013 (28.05.2013)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

1254942 29 mai 2012 (29.05.2012) FR

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

(72) Inventeurs : PERRUT, Michel; 2 allée de la Prairie, F-54600 Villers Les Nancy (FR). PERRUT, Vincent; 17 rue du bout du monde, F-26110 Venterol (FR). LOOTEN, Philippe; 4 rue des Tulipiers, F-59160 Lomme (FR).

(74) Mandataires : GALLOIS, Valérie et al.; Becker & Associates, 25 rue Louis Le Grand, F-75 002 Paris (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,

AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, 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).

Publiée :

- sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport (règle 48.2.g))
- avec une (des) indication(s) relative(s) à du matériel biologique déposé, fournie(s) selon la règle 13bis, séparément, et non avec la description (règles 13bis.4.d)i) et 48.2.a) viii))

(54) Title : METHOD FOR CONTINUOUSLY ENRICHING AN OIL PRODUCED BY MICROALGAE WITH ETHYL ESTERS OF DHA

(54) Titre : PROCÉDÉ CONTINU D'ENRICHISSEMENT EN ESTERS ÉTHYLIQUES DE DHA D'UNE HUILE PRODUITE PAR DES MICROALGUES

(57) Abstract : The invention concerns a method of preparing an oil enriched with ethyl esters of DHA produced by fermenting microorganisms, characterised in that it comprises a step of purification by extraction by supercritical CO₂ on a multistage fractionating column operating with a counter-current with reflux extraction.

(57) Abrégé : L'invention est relative à un procédé de préparation d'une huile enrichie en esters éthyliques de DHA produit par fermentation de microorganismes, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de purification par extraction par CO₂ supercritique sur colonne de fractionnement multiétagée fonctionnant à contre-courant avec reflux d'extrait.



WO 2013/178937 A2

PROCEDE CONTINU D'ENRICHISSEMENT EN ESTERS ETHYLIQUES DE DHA D'UNE HUILE PRODUITE PAR DES MICROALGUES

La présente invention est relative à un procédé continu permettant,
5 industriellement, d'obtenir une huile riche en ester éthylique d'un acide gras naturel à partir d'une microalgue : l'acide docosahexaénoïque ou DHA.

Plus particulièrement, la présente invention est relative à l'élaboration d'une huile riche en ester éthylique de DHA à partir d'une huile issue de microalgue, qui à l'origine :

- est modérément riche en DHA et
- 10 - présente une quantité élevée en composés insaponifiables, essentiellement constitués de squalène.

Au sens de l'invention, on entend par « huile issue de microalgue », une huile extraite de microalgues de la famille des Thraustochytriales sp.

On entend au sens de l'invention par « microalgues de la famille des
15 Thraustochytriales sp. » des microalgues appartenant aux espèces *Schizochytrium sp.*, *Aurantiochytrium sp.* et *Thraustochytrium sp.*

Au sens de l'invention, on entend par huile « modérément riche en DHA », un huile contenant de 30 à 45 % de DHA en masse d'acides gras totaux (par mesure de simplification, on utilise également le terme « poids » d'acide gras totaux).

20 Au sens de l'invention, on entend également par « huile qui présente une quantité élevée en insaponifiables, essentiellement constitués de squalène », une huile renfermant de l'ordre de 10 à 30 % en poids d'insaponifiables, dont 15 à 25 % de squalène.

Enfin, on entend par « enrichissement d'une huile en ester éthylique de DHA issu
25 de microalgues », un procédé permettant d'augmenter d'un facteur 1,5 à 2 le contenu en DHA de l'huile, en l'occurrence ici, de passer d'une teneur initiale en DHA comprise entre 30 à 45 % de DHA en poids d'acides gras totaux à une huile présentant une teneur en esters éthyliques de DHA comprise entre 60 et 70 % de DHA en poids d'acides gras totaux.

30 Les lipides constituent une des trois grandes familles de macronutriments avec les protéines et les glucides.

Parmi les lipides, on distingue notamment les triglycérides et les phospholipides.

Les triglycérides représentent environ 95 % des lipides alimentaires ingérés. Dans l'organisme, ils sont présents principalement dans les tissus adipeux et constituent
35 la forme principale de stockage de l'énergie.

Les phospholipides sont des lipides de structure car ils sont des constituants des membranes cellulaires dont ils assurent, entre autre, la fluidité.

Triglycérides et phospholipides sont composés majoritairement d'acides gras qui sont à la fois apportés par l'alimentation et, pour certains d'entre eux, synthétisés par l'organisme.

Les sources d'alimentation en acides gras polyinsaturés dits « essentiels » sont
5 les huiles végétales (principalement en acides gras oméga 6 et oméga 9) et les huiles de poisson, qui contiennent en particulier de grandes quantités d'acides gras oméga 3.

Les acides gras polyinsaturés sont classés en fonction de la position de la première double liaison, à partir de la fonction méthyle finale.

Ainsi, dans la nomenclature, pour oméga « x » ou « nx », « x » correspond à la
10 position de la première insaturation.

La majorité des acides gras polyinsaturés d'intérêt biologique appartient à la famille des oméga 6 (acide arachidonique ou ARA) ou oméga 3 (acide eicosapentaénoïque ou EPA, acide docosahexaénoïque ou DHA).

En outre, dans la nomenclature, on définit également le nombre de carbone
15 constituant la chaîne ; ainsi l'EPA est décrit comme C20:5 et le DHA comme C22:6.

Le « 5 » et « 6 » correspondent ainsi au nombre d'insaturations de la chaîne carbonée présentés respectivement par l'EPA et par le DHA.

Le DHA, de la famille des acides gras oméga 3, est un acide gras que l'organisme sait synthétiser à partir de l'acide alpha-linolénique, ou qui est apporté par la
20 consommation de poissons gras (thon, saumon, hareng...).

Le DHA joue un rôle important dans la structure des membranes et dans le développement et le fonctionnement du cerveau et de la rétine.

Les huiles de poisson sont utilisés principalement comme source d'acides gras de type oméga 3, tels que le DHA et l'EPA, mais on les trouve également dans les huiles
25 de microalgues où on les extrait soit en mélange, soit séparément, comme c'est le cas par exemple des huiles issues de certaines souches sélectionnées, telles que celles du genre *Schizochytrium*, qui ne contiennent que des traces d'EPA mais de fortes teneurs en DHA.

Les méthodes conventionnelles pour enrichir les huiles de poisson en DHA et/ou EPA reposent sur la sélectivité par rapport à la longueur des chaînes des acides gras
30 constitutifs des huiles ou leur degré d'insaturation.

Il est tout d'abord nécessaire de procéder à la séparation des acides gras reliés sur le squelette glycéridique afin de pouvoir ensuite isoler les chaînes de DHA et/ou d'EPA.

Cette opération de séparation des acides gras de la chaîne glycérol est réalisée
35 par transestérification éthanolique (éthanolyse).

Les processus d'enrichissement les plus couramment utilisés ensuite, mis en œuvre pour les acides gras en tant que tels ou sur leurs esters, sont :

- la cristallisation,
- l'extraction à contre-courant,
- la distillation moléculaire, ou
- la chromatographie préparative.

5 La plupart du temps, différents procédés sont combinés afin d'obtenir un fort enrichissement.

Cependant, ces processus ont les inconvénients suivants :

- les procédés d'enrichissement à haute température donnent lieu des dégradations thermiques des acides gras (isomérisation, peroxydation, oligomérisation).
- 10 - l'inconvénient des techniques de chromatographie reste l'utilisation de quantités importantes de solvants, souvent toxiques.

En outre, la production à grande échelle par ces techniques est loin d'être évidente.

Pour ces raisons, des méthodes alternatives ont été développées et étudiées, méthodes qui reposent sur l'utilisation des fluides supercritiques, notamment par des procédés de fractionnement par CO₂ supercritique.

15

Une étape préalable à l'enrichissement en DHA et/ou EPA des huiles de poisson par CO₂ supercritique est la transestérification des acides gras, à l'aide de méthanol ou d'éthanol.

20 Le processus de fractionnement des esters éthyliques des acides gras par le CO₂ supercritique a par exemple été décrit abondamment dans la littérature.

Il convient toutefois de noter que la majorité des processus cités décrivent surtout l'enrichissement conjoint en esters éthyliques d'EPA et de DHA, et non en DHA uniquement.

25 Par ailleurs, la grande majorité de ces procédés :

- sont des procédés discontinus, par « batch »,
- utilisent des quantités trop importantes de fluide supercritique,
- ont un faible rendement,
- et ont finalement une faible productivité.

30 Par ailleurs, la température de 100°C imposée dans les colonnes dans de nombreux cas peut provoquer la dégradation des acides gras.

Les pressions appliquées sont également trop fortes, et leur réduction a pour conséquence directe l'augmentation de la consommation en CO₂ supercritique.

En d'autres termes, ces procédés ne sont pas utilisables à l'échelle industrielle dans des conditions économiquement viables.

35

Dans la demande de brevet JP 2005-255971, il est par exemple décrit un procédé d'enrichissement d'huile de poisson en esters éthyliques d'EPA et de DHA.

Les plages de température et de pression sont respectivement de 35 à 200°C et de $100 \cdot 10^5$ Pa à $500 \cdot 10^5$ Pa.

Les auteurs recommandent deux extractions successives en vue d'obtenir des teneurs élevées.

5 Une première extraction est effectuée sur la matière première, et une seconde extraction est effectuée sur le résidu de la première opération.

La colonne utilisée fait 3 m de haut pour un diamètre de 50 mm. Il comprend 6 enceintes distinctes de chauffage.

10 Les taux de solvant, définis comme le rapport du débit de CO₂ supercritique au débit d'huile traitée, utilisés pour obtenir des pourcentages élevés de DHA restent élevés.

Ces deux extractions successives compliquent également le procédé et le rendent industriellement inapplicable.

15 Il apparaît à la lecture de ces éléments que le choix de la technologie d'enrichissement en acides gras des huiles par fluide supercritique est privilégiée, mais nécessite encore des travaux d'optimisation.

Comme évoqué plus haut, une autre source d'acides gras oméga 3 sont les microalgues.

20 Cependant, la situation est bien plus complexe dans le domaine des huiles de microalgues car d'autres difficultés s'ajoutent, liées à la présence dans les huiles de microalgues de composés insaponifiables.

C'est ainsi que si l'opération de transestérification couramment opérée sur les huiles de poisson ne pose aucun problème technique majeur, cela devient problématique pour les huiles de microalgues, dès lors que la transestérification des huiles brutes est quasiment impossible sur le plan pratique à grande échelle.

25 Cette impossibilité technique est liée à la présence à des teneurs variables, mais souvent élevées, de composés insaponifiables, tel que le squalène.

En conséquence, on déplore des pertes importantes en composés valorisables.

Le squalène est un hydrocarbure polyinsaturé d'intérêt pharmaceutique, cosmétologique et diététique, présent en particulier dans les huiles de microalgues.

30 Il s'y trouve à des teneurs variables qui sont parfois élevées, dépassant 15 % en masse dans certaines souches sélectionnées telles que celles du genre *Schizochytrium*.

35 Dans l'état de l'art, il est connu que l'on peut réaliser la séparation du squalène des lipides, constitués essentiellement de triglycérides, par exemple par distillation moléculaire, mais au prix de plusieurs étapes successives si l'on veut extraire le squalène de l'huile et produire une huile ne contenant plus que des traces de squalène.

Comme tous les composants des huiles de microalgues sont particulièrement sensibles à la chaleur, cette méthode doit être conduite classiquement sous un vide très poussé, requérant des installations de très grand volume vu leur très faible productivité.

Il convient donc de proposer d'autres voies :

- 5 - plus efficaces, si l'on souhaite utiliser la distillation moléculaire, que les conduites classiquement mises en œuvre, ou
- fonctionnant à une température modérée et garantissant la protection des produits insaturés très instables à l'oxydation de tout contact avec l'air, tout en étant facilement industrialisable jusqu'à des capacités de traitement de centaines ou de milliers
- 10 de tonnes d'huile traitées par an.

A la connaissance de la société Demanderesse, aucun procédé efficace et industrialisable d'enrichissement d'huiles en esters éthyliques de DHA à partir de microalgues, à l'aide de technologie de type fluide supercritique n'est réellement accessible à l'homme du métier.

- 15 **Soucieuse de mettre au point un procédé efficace d'enrichissement de DHA produit par microalgues**, la société Demanderesse a développé ses propres recherches et a réussi à adapter les technologies d'extraction par fluide supercritique de manière à garantir un enrichissement en DHA de plus de deux fois le contenu de l'huile initiale.

- 20 La présente invention est donc relative à un procédé de préparation d'une huile enrichie en esters éthyliques de DHA produit par fermentation de microorganismes, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de purification par extraction par CO₂ supercritique sur colonne de fractionnement multiétagée fonctionnant à contre-courant avec reflux d'extrait.

- 25 Les microorganismes sont préférentiellement des microalgues appartenant à la famille des Thraustochytriales sp., plus préférentiellement encore des microalgues appartenant aux espèces *Schizochytrium* sp., *Aurantiochytrium* sp. et *Thraustochytrium* sp.

Mise en œuvre d'un enrichissement en esters éthyliques de DHA par CO₂ supercritique.

- 30 Dans ce premier mode préférentiel du procédé de préparation d'une huile enrichie en esters éthyliques de DHA conforme à l'invention, on met en œuvre un procédé caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 35 1) préparer une huile brute contenant un mélange de triglycérides riches en DHA et d'insaponifiables composés essentiellement de squalène, à partir d'une fermentation de microalgues de la famille des Thraustochytriales,

2) fractionner l'huile brute ainsi obtenue par contact avec un fluide à pression supercritique sur une colonne de fractionnement multiétagée fonctionnant à contre-

courant avec un reflux d'extrait, de manière à délivrer un extrait riche en squalène et un raffinat débarrassé de squalène,

3) transestérifier le raffinat ainsi obtenu par transestérification alcoolique en présence d'un catalyseur basique ou enzymatique, de préférence basique,

5 4) fractionner le mélange d'esters d'acides gras obtenu par contact avec un fluide à pression supercritique sur la même colonne de fractionnement multiétagée fonctionnant à contre-courant avec reflux d'extrait que celle de l'étape 2), de manière à délivrer un extrait riche en esters d'acides gras à chaînes courtes et un raffinat très riche en esters d'acides gras à chaînes longues,

10 5) purifier le mélange d'esters d'acides gras à chaîne longue obtenus lors de l'étape 4) par contact avec un fluide à pression supercritique, de manière à obtenir un extrait très riche en esters à chaîne longue débarrassé de ses impuretés, et,

6) recueillir la composition enrichie en esters éthyliques de DHA ainsi obtenue.

La première étape de ce procédé conforme à l'invention consiste à préparer une
15 huile brute contenant un mélange de triglycérides riches en DHA et d'insaponifiables composés essentiellement de squalène, à partir d'une fermentation de microalgues de la famille des Thraustochytriales.

Comme microalgues appartenant à la famille des Thraustochytriales, les souches commercialisées suivantes sont par exemple disponibles :

20 - *Schizochytrium* sp. référencée ATCC 20888,
- *Aurantiochytrium* sp. référencée ATCC PRA 276,

Par ailleurs, la société Demanderesse dispose également de sa propre souche de production, une *Schizochytrium* sp. déposée le 14 avril 2011 en France auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur sous le
25 n°CNCM I-4469 et également déposée en Chine auprès du CHINA CENTER FOR TYPE CULTURE COLLECTION de l'université de Wuhan, Wuhan 430072, P.R. China sous le n° M 209118.

La culture est réalisée en conditions hétérotrophiques. Généralement, l'étape de culture comprend une étape de préculture, pour revivifier la souche, puis une étape de
30 culture ou de fermentation proprement dite. Cette dernière étape correspond à l'étape de production des composés lipidiques d'intérêt.

Les conditions de culture de ces microalgues sont bien connues dans le domaine. La biomasse est ensuite traitée de manière à obtenir une huile brute contenant un mélange de DHA et d'insaponifiables composés essentiellement de squalène.

35 Ces traitements peuvent être réalisés par toute méthode connue par ailleurs de l'homme du métier.

Comme il sera exemplifié ci-après, le contenu en DHA entre 30 à 45 % en poids d'acides gras totaux et d'insaponifiables entre 10 à 30 % en poids, dont 15 à 25 % de squalène, peut être aisément obtenu à partir de la souche CNCM I-4469 décrite ci-dessus.

5 La deuxième étape de ce procédé consiste à fractionner l'huile brute ainsi obtenue par contact avec un fluide à pression supercritique dans une colonne de fractionnement multiétagée fonctionnant à contre-courant avec un reflux d'extrait, de manière à délivrer un extrait riche en squalène et un raffinat débarrassé de squalène.

A la connaissance de la société Demanderesse, ce traitement par fluide
10 supercritique, à l'aide d'une colonne de fractionnement multiétagée fonctionnant à contre-courant avec reflux d'extrait, n'a jamais été exploitée pour éliminer du squalène de l'huile produite par fermentation de microorganismes en général, et pour des microorganismes de type microalgues appartenant à la famille des Thraustochytriales en particulier.

La société Demanderesse a trouvé que l'on pouvait tirer partie de la différence
15 importante de solubilité entre le squalène (hydrocarbure non polaire) et les triglycérides constituant les lipides de l'huile dans le dioxyde de carbone à pression supercritique, le squalène étant beaucoup plus soluble que les triglycérides.

Pour ce faire, la société Demanderesse a trouvé que l'utilisation d'une colonne
20 de fractionnement multiétagée fonctionnant à contre-courant avec un reflux d'extrait permettait d'obtenir, de façon surprenante, un extrait riche en squalène et un raffinat débarrassé de squalène.

En effet, l'un des avantages importants des fluides supercritiques réside dans leur sélectivité « adaptable » vis-à-vis des composants d'un mélange.

Cette très haute sélectivité est liée aux propriétés particulières des fluides
25 supercritiques, et particulièrement de celles du dioxyde de carbone à pression supercritique : Le pouvoir solvant peut être finement réglé en jouant sur la pression et la température du fluide.

La société Demanderesse a vérifié que des conditions « douces » sont les plus sélectives car le solvant est d'autant plus sélectif que son pouvoir solvant est plus faible.

30 Ainsi, la société Demanderesse recommande d'utiliser préférentiellement le dioxyde de carbone pur, plutôt qu'additionné de co-solvant qui augmenterait son pouvoir solvant, et on choisit une pression d'opération « moyenne », généralement comprise entre 180 et 220 bar, et des températures comprises entre 35 et 75°C, et préférentiellement entre 40 et 72°C.

35 Le fluide à pression supercritique est pompé à haute pression par une pompe et porté à la température souhaitée dans un échangeur de chaleur avant d'être injecté en pied de colonne à un débit maintenu constant et affiché sur un débitmètre massique.

La charge est injectée via une pompe haute pression au milieu de la colonne entre les sections 1 et 2, ou 2 et 3, ou 3 et 4, comptées à partir du bas de la colonne, à un débit maintenu constant et affiché sur un débitmètre massique.

Le fluide chargé de l'extrait sort en tête de colonne, après quoi il est partiellement décomprimé vers 6 MPa et envoyé vers plusieurs étages de séparation, comportant notamment des séparateurs cycloniques montés en série, dont le corps est réchauffé par circulation d'eau dans une double-enveloppe.

L'extrait liquide est récupéré en pied de ces séparateurs tandis que le fluide à l'état gazeux est ensuite recyclé de façon classique : condensation dans un condenseur refroidi vers 0 à 5°C, stockage intermédiaire dans un ballon tampon dont le niveau de liquide est maintenu constant par alimentation en fluide frais depuis un stockage extérieur, pompage à haute pression et réchauffage à la température désirée.

Le raffinat est évacué en pied de colonne via une vanne de détente pilotée par une sonde de niveau maintenant ainsi l'interface huile-fluide dans la partie inférieure de la colonne ; afin d'éviter des à-coups de pression préjudiciables au fractionnement dans la colonne, ce raffinat est recueilli dans deux récipients-décanteurs en série, la pression dans le premier étant maintenue à une valeur inférieure d'environ 0,5 à 3 MPa en-dessous de la pression régnant dans la colonne.

Ces récipients permettent ainsi le soutirage du raffinat sans à-coups avec des pertes minimales de fluide dissous dans le raffinat.

Comme il sera exemplifié ci-après, à partir du mélange de DHA et d'insaponifiables composés essentiellement de squalène décrit ci-avant, notamment entre 30 à 45 % de DHA en poids d'acides gras totaux et entre 10 et 30 % en poids d'insaponifiables, dont 15 à 25 % de squalène, il est possible d'obtenir par cette étape de fractionnement par contact avec un fluide à pression supercritique :

- un raffinat présentant entre 35 et 45 % de DHA en poids d'acides gras totaux et moins de 1,5 % en poids de squalène,

- un extrait présentant entre 5 et 6 % de DHA en poids d'acides gras totaux et entre 70 à 75 % en poids de squalène.

La troisième étape de ce procédé consiste à transestérifier le raffinat ainsi obtenu par transestérification alcoolique en présence d'un catalyseur basique ou enzymatique, de préférence basique.

Il est important de souligner que la société Demanderesse a trouvé que l'huile de microalgues ainsi débarrassée de squalène peut être facilement traitée en vue de la transestérification des triglycérides en esters éthyliques d'acides gras.

Pour ce faire, la société Demanderesse recommande d'utiliser un solvant volatil différent de ceux décrits dans l'état de l'art qui sont des hydrocarbures légers de type hexane, cyclohexane ou heptane.

La société Demanderesse recommande également de choisir l'acétate d'éthyle
5 pour sa non-toxicité et pour le fait qu'il puisse être biosourcé.

La société Demanderesse a surtout trouvé que ce solvant permettait d'obtenir une transestérification totale avec des pertes minimales en acides gras polyinsaturés.

L'éthanol est choisi comme alcool et la potasse comme catalyseur basique.

La phase lourde est décantée, soutirée et éliminée. La phase légère est
10 évaporée sous vide, le solvant volatil étant réutilisé et le résidu d'évaporation est concentré en esters éthyliques d'acides gras.

Au terme de cette étape, comme il sera exemplifié ci-après est obtenu un raffinat présentant entre 40 et 45 % d'esters éthyliques de DHA.

La quatrième étape de ce procédé consiste à fractionner le mélange d'esters
15 d'acides gras obtenu par contact avec un fluide à pression supercritique, délivrant un extrait riche en esters d'acides gras à chaînes courtes et un raffinat très riche en esters d'acides gras à chaînes longues.

Le fractionnement supercritique des esters éthyliques est conduit dans des conditions similaires à celles opérées sur l'huile brute pour éliminer le squalène, mais
20 dans des conditions de pression et température sensiblement différentes.

On choisit ainsi une pression d'opération « moyenne », généralement comprise entre 110 et 130 bar, et des températures comprises entre 35 et 75°C, et préférentiellement entre 40 et 73°C.

Au terme de cette étape, comme il sera exemplifié ci-après, est obtenu un raffinat
25 très riche en esters éthyliques de DHA, notamment présentant entre 62 et 65 % d'esters éthyliques de DHA, mais encore fortement coloré.

La cinquième étape de ce procédé, qui peut être facultative mais est conseillée, consiste à purifier le mélange d'esters d'acides gras à chaîne longue obtenus lors de l'étape 4) par contact avec un fluide à pression supercritique, de manière à obtenir un
30 extrait très riche en esters à chaîne longue débarrassé de ses impuretés.

Afin d'éliminer les impuretés qui se sont accumulées lors des opérations de fractionnement précédentes durant lesquelles les raffinats ont été collectées, une étape supplémentaire de purification avec récupération du composé visé dans l'extrait a été conduite avec obtention d'une huile limpide et bien moins colorée que l'huile obtenue à
35 l'étape précédente, de façon analogue à celles des étapes 2 et 4, mais à des conditions de pression et température légèrement différentes.

On choisit ainsi une pression d'opération « moyenne », généralement comprise entre 140 et 150 bar, et des températures comprises entre 35 et 70°C, et préférentiellement entre 40 et 65°C.

La sixième étape de ce procédé consiste enfin à recueillir la composition enrichie en esters éthyliques de DHA ainsi obtenue.

Les esters éthyliques de DHA ainsi purifiés sont stockés sous atmosphère contrôlée (inertée à l'azote idéalement).

Un ajout d'antioxydants peut être favorable à la stabilisation de cette fraction.

La présente invention concerne en outre l'utilisation de la composition enrichie en esters éthyliques de DHA obtenue par le procédé selon la présente invention dans les domaines alimentaires.

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

Exemple 1 : Préparation d'une huile contenant entre 30 à 45 % de DHA en poids d'acides gras totaux et entre 10 à 30 % en poids d'insaponifiables, dont 15 à 25 % de squalène à partir de la souche *Schizochytrium sp* CNCM I-4469

Cet exemple illustre le procédé d'obtention d'une huile brute renfermant un mélange de DHA et d'insaponifiables, constitué essentiellement de squalène produite par fermentation de la microalgue *Schizochytrium sp.* appartenant à la société Demanderesse (déposée le 14 avril 2011 en France auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur sous le n°CNCM I-4469).

La fermentation a été conduite ici en deux phases de préculture successives préalables avant la phase de culture / production proprement dite en réacteur de 20 l.

Pour cette expérimentation, l'ajout des vitamines a été assuré dans le premier milieu de préculture, mais a été optionnel dans le second milieu de préculture et en production.

Les milieux de préculture présentaient alors la composition présentée dans les tableaux I et II suivants :

Tableau I

Milieu de la première préculture	%
Glucose	3
Extraits de levure	0,4
Glutamate de sodium	6,42
Na Cl	1,25
MgSO ₄	0,4
KCl	0,05
CaCl ₂	0,01
NaHCO ₃	0,05
KH ₂ PO ₄	0,4
Mélange vitamines	0,14
Oligo-éléments	0,8

Tableau II

Milieu de la seconde préculture	%
Glucose	8,57
Glutamate de sodium	6,42
Extraits de levure	0,64
Na Cl	2
KH ₂ PO ₄	0,64
MgSO ₄	2,29
CaCl ₂	0,03
NaHCO ₃	0,03
Na ₂ SO ₄	0,03
Mélange de vitamines	0,14
Oligo-éléments	0,2

5

D'une manière générale, on a utilisé de l'anti-mousse Clerol « FBA3107 » à 1 ml/l. Eventuellement, on a utilisé 50 mg/l de Pénicilline G "sodium salt" afin d'éviter la croissance de bactéries contaminantes.

10 Le glucose a été stérilisé avec le KH₂PO₄ et séparément du reste du milieu car on a évité ainsi la formation d'un précipité (Ammonium-Phosphate-Magnésium). Le mélange des vitamines et les oligo-éléments ont été ajoutés après filtration stérilisante. La composition du milieu de culture / production est donné par le tableau III suivant.

Tableau III

	%
Glucose Ajout à T0	7,5
Urée	1
Extraits de levure	1,2
Na Cl	0,25
KH ₂ PO ₄	0,96
MgSO ₄	1,2
CaCl ₂	0,12
NaHCO ₃	0,12
KCL	0,08
Ajout du mélange de vitamines	0,4
Oligo-éléments	0,56

La composition des mélanges de vitamines et des oligoéléments est donnée dans les tableaux IV et V suivants :

Tableau IV

Mélange vitamines	g/L
B1	45
B6	45
B12	0.25

5

Tableau V

Oligo-éléments	g/L
MnCl ₂ 2H ₂ O	8.60
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.2
NiSO ₄ 6H ₂ O	7.50
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.15
ZnSO ₄ 7H ₂ O	5.70
Cu SO ₄ 5H ₂ O	6.50
FeSO ₄ 7 H ₂ O	32.00
ZnCl ₂	1.50

Conditions de précultures

La première préculture a été réalisée en Erlenmeyers de 500 ml munis de baffles, dans lesquels on a ajouté une goutte d'antimousse CLEAROL FBA 3107 commercialisé par la société COGNIS GmbH Düsseldorf.

Le milieu de culture a été filtré après dissolution complète de ses constituants, complété éventuellement avec de la pénicilline G "sodium salt" à raison de 0,25 mg/l.

L'inoculation a été réalisée par prélèvement de colonies de microalgues cultivées en boîte de Pétri (à raison d'une oese de 10 µl).

L'incubation a duré 24 à 36 heures, à une température de 28°C, sous agitation à 100 rpm (sur agitateur orbital).

La biomasse décantant (ou adhérant à la paroi), on a pris bien soin de prélever 3 à 5 ml après avoir bien agité l'Erlenmeyer.

Pour la seconde préculture, on a utilisé des Erlenmeyers de 2 l, muni de baffles et de tuyauterie.

On a ajouté une goutte d'antimousse et l'extrait de levures dans 100 ml d'eau.

L'ensemble des constituants du milieu a été filtré après dissolution dans 300 ml d'eau déminéralisée. On pouvait éventuellement ajouter de la pénicilline G "sodium salt" et au préalable dans l'Erlenmeyer une goutte d'antimousse avant sa stérilisation.

L'ensemencement s'est fait ensuite avec 3 à 5 ml de la première préculture.

L'incubation a été réalisée à 28°C pendant encore 24 à 36 heures, sous agitation à 100 rpm.

Production en réacteur de 20 l

- 5 La culture proprement dite a été réalisée de la manière suivante en réacteur de 20 l.
- stérilisation du milieu pour partie dans le réacteur, et séparément pour l'autre partie de manière à éviter la formation d'un précipité,
 - ensemencement réalisé à partir de la biomasse produite en fin de seconde
 - 10 préculture à raison de 0,5 % v/v du milieu de culture,
 - culture maintenue à 30°C
 - taux de transfert d'oxygène fixé à 35 – 40 mmoles/l/h,
 - aération de 0,2 à 0,3 VVM,
 - pH initial > 5,5.
 - 15 - alimentation du glucose dès que la concentration est > 20 %, de manière à maintenir une concentration en glucose comprise entre 15 et 70 g/l.

Le tableau IV suivant présente les résultats obtenus la *Schizochytrium sp.* de la société Demanderesse.

Tableau IV :

Essais	E
Température des précultures (°C)	28
Température de culture (°C)	30
Titre en squalène en fin de culture (g/l)	4,4
Biomasse (g/l)	54
g/ 100 g de squalène sur biomasse sèche	8,2

20

Récupération de la biomasse

La biomasse extraite du fermenteur et lavée des solubles interstitiels par succession de deux séries de concentration par centrifugation (5 minutes à 5000 g) et dilution de la biomasse (à raison de 1/3 Vculot / Veau).

- 25 La concentration cellulaire sèche sur la matière sèche brute totale est de 95 %.
- La matière sèche est ensuite ajustée à 12 % avec de l'eau distillée.

Obtention de l'huile brute

La biomasse lavée est agitée dans un réacteur labo de type Fermenteur 2 l (tel que ceux commercialisés par la société Interscience) équipé avec une hélice marine et chicanes.

5 Ce système permet de limiter l'émulsification du lysat cellulaire généré tout en permettant un bon mélange indispensable pour l'action de l'enzyme lytique.

La température est ajustée à 60°C et le pH est régulé à environ 8 avec de la soude.

10 Ces conditions sont optimales pour l'activité de l'enzyme Alcalase (Novozymes) ajoutée à hauteur de 1%/sec.

La durée de la lyse est fixée à 4 h.

En fin de lyse, on ajoute 10 % d'éthanol ($V_{\text{éthanol}}/V_{\text{lysate}}$) dans le mélange réactionnel (émulsion huile dans eau) maintenue 15 min supplémentaires sous agitation.

15 On obtient alors une huile brute contenant de l'ordre de 35 % en poids de DHA et de l'ordre de 15 % en poids de squalène.

Exemple 2 : Enrichissement d'une huile en esters éthyliques de DHA par mise en contact avec fluide supercritique.

20 On utilise 200 litres d'huile d'algues *Schizochytrium* sp produite à partir d'algues *Schizochytrium* cultivées dans un fermenteur de 10 m³ selon des conditions opératoires extrapolées de celles de l'exemple 1 contenant des triglycérides, principalement avec des acides gras à chaînes courtes en C14, C16 pour 27%, à chaînes longues en C22 pour 43% dont 33 % d'acide docosahexaénoïque (DHA) et 10% d'acide OSBOND (acide tous-

25 cis-4,7,10,13,16-docosapentaénoïque) et une quantité non négligeable d'insaponifiables essentiellement constituées de squalène (~15,5%).

Les appareils suivants ont été mis en œuvre :

- Un réacteur de transestérification constitué d'un récipient de 100 litres doté d'un agitateur à vitesse variable ;
- 30 - Un évaporateur sous vide (Fabricant : TOURNAIRE) ;
- Une unité semi-industrielle d'extraction / fractionnement par fluide supercritique dotée d'une colonne de fractionnement à contre-courant d'un diamètre intérieur 125 mm et d'une hauteur de 8 m permettant d'établir un gradient de température selon 4 sections de 2 m.

35 Cette colonne est remplie d'un garnissage haute performance (type Sulzer BX). Cette unité est entièrement automatisée et permet un fonctionnement en continu.

Etape 1 : Traitement de l'huile brute en vue d'éliminer le squalène

Le fractionnement, opéré sur la colonne de fractionnement, repose sur la différence importante de solubilité entre le squalène (hydrocarbure non polaire) et les triglycérides : Le squalène est ainsi récupéré dans l'extrait avec une concentration élevée et les pertes en triglycérides sont limitées à moins de 3%.

Ainsi, le Tableau 1 présente les compositions de la charge, de l'extrait et du raffinat d'un essai pour lequel 34,6 kg d'huile ont été traités ; l'on a obtenu 6,295 kg d'extrait qui contient 72,3 % de squalène et 27,851 kg de raffinat qui n'en contient que de l'ordre de 1%, avec des pertes en DHA dans l'extrait limitées à environ 3 %.

Tableau 1

Composants	CHARGE	RAFFINAT	EXTRAIT
C14	9,1%	10,3%	5,6%
C16	19,0%	22,3%	7,0%
Osbond	10,7%	13,0%	2,0%
DHA	32,3%	39,3%	5,9%
Squalène	15,5%	1,1%	72,3%
<i>Autres</i>	13,4%	14,0%	7,2%
Total	100,0%	100,0%	100,0%

Etape 2 : Transestérification de l'huile traitée

La transestérification a été conduite en mode batch à température ambiante en utilisant l'acétate d'éthyle comme solvant de l'huile, l'éthanol comme alcool et la potasse comme catalyseur basique.

La phase lourde est décantée, soutirée et éliminée. La phase légère est évaporée sous vide, le solvant volatil étant réutilisé et le résidu d'évaporation est concentré en esters éthyliques d'acides gras.

Les paramètres du procédé et les résultats sont présentés dans le Tableau 4 récapitulatif ci-dessous.

Etape 3 : Fractionnement des esters

Le fractionnement supercritique des esters éthyliques a été conduit dans des conditions similaires à celles opérées sur l'huile brute, mais à des conditions de pression et température sensiblement différentes comme indiqué dans le Tableau 4.

Le Tableau 2 présente les compositions de la charge, de l'extrait et du raffinat d'un essai opéré sur une masse de 34,73 kg de charge, ayant conduit à l'obtention de 21,66 kg d'extrait et 12,18 kg de raffinat.

On notera que le raffinat obtenu est une huile assez fortement colorée, très enrichie en ester éthylique de DHA.

Tableau 2

5

Composants	CHARGE	RAFFINAT	EXTRAIT
C14	9,5%	0,3%	21,6%
C16	21,1%	1,2%	46,9%
Osbond	13,7%	20,8%	4,4%
DHA	41,6%	64,0%	11,9%
Squalène	1,6%	2,9%	<0,1%
<i>Autres</i>	12,4%	10,8%	15,2%
Total	100,0%	100,0%	100,0%

Etape 4 : Purification des esters

10 Afin d'éliminer les impuretés qui se sont accumulées lors des opérations de fractionnement précédentes durant lesquelles les raffinats ont été collectées, une étape supplémentaire de purification avec récupération du composé visé dans l'extrait a été conduite avec obtention d'une huile limpide et bien moins colorée que l'huile obtenue à l'étape précédente, de façon analogue à celles des étapes 1 et 3, mais à des conditions de pression et température légèrement différente (Cf. Tableau 4 ci-dessous).

15 Le Tableau 3 présente les compositions de la charge, de l'extrait et du raffinat d'un essai opéré sur une masse de 20,81 kg de charge, ayant conduit à l'obtention de 3,089 kg d'extrait et 17,469 kg de raffinat.

Tableau 3

	CHARGE	RAFFINAT	EXTRAIT
C14	0,3%	0,0%	0,3%
C16	1,2%	0,0%	1,1%
Osbond	20,8%	16,0%	20,5%
DHA	64,0%	50,1%	63,0%
Squalène	2,9%	0,0%	2,9%
<i>Autres</i>	10,8%	33,9%	12,2%
Total	100,0%	100,0%	100,0%

20

Le tableau 4 ci-dessous rassemble les conditions mises en œuvre lors de ces essais.

Tableau 4

Purification des esters éthylique de DHA	Etape 1	Etape 2 Notes (1)(2)(3)	Etape 3	Etape 4
Pression (bar)	200	Atm.	120	150
Température (°C)	40/50/50/72	20	40/50/50/73	40/45/45/65
Débit CO ₂ (kg/h)	185	--	210	150
Débit charge (kg/h)	5	Batch 20 kg	5	5
Taux de solvant (kgCO ₂ /kg huile)	37		42	30
Fraction collectée	Extrait Raffinat	Résidu Evaporation	Raffinat	Extrait
Fraction /Charge	20% (Extrait) 80% (Raffinat)	91%	62%	81%
Teneur en DHA	39% (Raffinat)	42%	64%	63%
Teneur en Squalène	72% (Extrait)			

- 5
- (1) Le solvant utilisé est l'acétate d'éthyle à raison de 1 kg/kg huile
 - (2) Le catalyseur utilisé est la potasse dissous dans l'éthanol (à 10%) et le mélange Ethanol/KOH est additionné à raison de 0,5 kg/kg huile
 - (3) La durée de la réaction conduite à température ambiante est de 2 heures

REVENDEICATIONS

- 1- Procédé de préparation d'une huile enrichie en esters éthyliques de l'acide docosahexaénoïque (DHA) produit par fermentation de microorganismes, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de purification par extraction par CO₂ supercritique sur colonne de fractionnement multiétagée fonctionnant à contre-courant avec reflux d'extrait, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- 5 1) préparer une huile brute contenant un mélange de triglycérides riches en DHA et d'insaponifiables composés essentiellement de squalène, à partir d'une fermentation de microalgues de la famille des Thraustochytriales,
- 10 2) fractionner l'huile brute ainsi obtenue par contact avec un fluide à pression supercritique sur une colonne de fractionnement multiétagée fonctionnant à contre-courant avec un reflux d'extrait, de manière à délivrer un extrait riche en squalène et un raffinat débarrassé de squalène,
- 15 3) transestérifier le raffinat ainsi obtenu par transestérification alcoolique en présence d'un catalyseur basique ou enzymatique, de préférence basique,
- 4) fractionner le mélange d'esters d'acides gras obtenu par contact avec un fluide à pression supercritique sur la même colonne de fractionnement multiétagée fonctionnant à contre-courant avec reflux d'extrait que celle de l'étape 2), de manière à délivrer un
- 20 extrait riche en esters d'acides gras à chaînes courtes et un raffinat très riche en esters d'acides gras à chaînes longues,
- 5) purifier le mélange d'esters d'acides gras à chaîne longue obtenus lors de l'étape 4) par contact avec un fluide à pression supercritique, de manière à obtenir un extrait très riche en esters à chaîne longue débarrassé de ses impuretés. .
- 25 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les microorganismes sont des microalgues appartenant à la famille des Thraustochytriales sp.
- 30 3. Procédé selon l'une ou l'autre des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que les microalgues appartenant à la famille des Thraustochytriales sp sont des microalgues des espèces *Schizochytrium sp.*, *Aurantiochytrium sp.* et *Thraustochytrium sp.*
- 35 4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la colonne de fractionnement multiétagée fonctionnant à contre-courant est une colonne dotée d'un garnissage structuré.

5. Procédé selon l'une quelconques des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le fluide à pression supercritique mis en œuvre dans l'étape 2) est porté à une pression comprise entre 180 et 220 bar, et des températures comprises entre 35 et 75°C, et préférentiellement entre 40 et 72°C.

5

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le fluide à pression supercritique mis en œuvre dans l'étape 4) est porté à une pression comprise entre 110 et 130 bar, et des températures comprises entre 35 et 75°C, et préférentiellement entre 40 et 73°C.

10

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le fluide à pression supercritique mis en œuvre dans l'étape 5) est porté à une pression comprise entre 140 et 150 bar, et des températures comprises entre 35 et 70°C, et préférentiellement entre 40 et 65°C.

15

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que le fluide à pression supercritique est le dioxyde de carbone pur.

9. Utilisation de la composition enrichie en esters éthyliques de DHA obtenue par l'une quelconque des revendications précédentes dans les domaines alimentaires.

20