

ROYAUME DU MAROC  
-----  
OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIETE (19)  
INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE  
-----



المملكة المغربية  
-----  
المكتب المغربي  
للملكية الصناعية والتجارية  
-----

## (12) FASCICULE DE BREVET

(11) N° de publication : **MA 32410 B1** (51) Cl. internationale : **G06F 19/00**  
(43) Date de publication : **01.06.2011**

---

(21) N° Dépôt : **33450**  
(22) Date de Dépôt : **20.12.2010**  
(30) Données de Priorité : **24.06.2008 IN 1323/MUM/2008**  
(86) Données relatives à l'entrée en phase nationale selon le PCT : **PCT/IN2009/000362 24.06.2009**  
(71) Demandeur(s) : **INNOVATIVE CREATIONS BUSINESS MODULES PVT.LTD., 8, PRABHAT SOCIETY, NEAR RAVINDRA NAYTA MANDIR, PRABHADEVI MUMBAI-400 025 MAHARASHTRA (IN)**  
(72) Inventeur(s) : **GAJRAJ, Randhir, Singh**  
(74) Mandataire : **SABA & CO**

---

(54) Titre : **MILIEUX ET PROCEDE DE CULTURE D'ALGUES**

(57) Abrégé : La présente invention concerne la limitation de l'utilisation d'une atmosphère saline âcre, et la production d'une biomasse d'algues exempte de salinité. L'invention porte en outre sur un milieu exempt de salinité et sur un procédé de culture et de production de biomasse d'algues, de préférence de biomasse *Dunaliella* exempte de salinité et à teneur riche en caroténoïde mélangée naturelle.

**ABREGE**

La présente invention concerne la limitation de l'utilisation d'une atmosphère saline âcre, et la production d'une biomasse d'algues exempte de salinité. L'invention porte en outre sur un milieu exempt de salinité et sur un procédé de culture et de production de biomasse d'algues, de préférence de biomasse *Dunaliella* exempte de salinité et à teneur riche en caroténoïde mélangée naturelle.

**(QUINZE PAGES)**

**INNOVATIVE CREATIONS BUSINESS MODULES PVT. LTD..  
P.P. SABA & CO., Casablanca**

32410 01 JUN 2011

WO 2010/089762

PCT/TN2009/000362

## MILIEUX ET PROCEDE DE CULTURE D'ALGUES

## DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention concerne un milieu exempt de salinité et un procédé de culture d'algues. Fort particulièrement, la présente invention concerne un milieu exempt de salinité et un procédé de culture et de production d'une biomasse *Dunaliella* à teneur riche en caroténoïdes mélangés naturels.

## CONTEXTE DE L'INVENTION

Les algues *Dunaliella* sont des algues vertes unicellulaires motiles appartenant à la classe des Chlorophyceae. Elles sont habituellement trouvées dans les eaux marines. On a relevé une variété d'espèces *Dunaliella* dont *Dunaliella Salina* est une micro-algue halophile typique de couleur brun rougeâtre trouvée dans la saumure. Quelques organismes seulement arrivent à survivre dans de telles conditions très salines comme les étangs d'évaporation de l'eau de mer avec une salinité aussi élevée que 32% ou même plus. Pour survivre, ces organismes accumulent des concentrations très élevées de  $\beta$ -carotène incorporé dans l'huile Cis ou des fractions lipidiques des membranes externes de la cellule pour protéger spécialement l'ADN et d'autres organelles cellulaires contre la lumière intense avec une mutation tout à fait nocive causant des rayonnements UV-A et UV-B. *Dunaliella Salina* est une source riche en caroténoïdes mélangés naturels comme le bêta-carotène, l'alpha-carotène, la cryptoxanthine, la zéaxanthine, la lutéine et le lycopène, d'autres antioxydants et vitamines. Elle est utilisée dans les applications diététiques, colorantes, cosmétiques et pharmaceutiques. Cette algue accumule aussi des concentrations très élevées de glycérol interne à équilibre osmotique pour fournir une protection contre la pression osmotique induite par des concentrations salines élevées dans les atmosphères marines. Ceci offre la possibilité d'une production biologique commerciale de ces substances.

La culture commerciale de *Dunaliella* pour la production de  $\beta$ -carotène à travers le monde est l'une des réussites de la biotechnologie halophile ou marine. Différentes technologies sont employées, de la culture étendue à faible niveau technologique dans et autour des étangs d'eau salée à la culture intensive avec des densités cellulaires élevées dans des conditions soigneusement contrôlées dans plusieurs pays comme les Etats Unis, Israël, l'Australie et l'Inde. Actuellement, la production ou la culture de *Dunaliella* nécessite typiquement une atmosphère saline ainsi que l'emploi de chlorure de sodium et d'autres sels inorganiques et leurs dérivés pour créer une atmosphère/système d'équilibre osmotique nécessaire pour la survie et la croissance de l'espèce d'algue *Dunaliella*, notamment pour la production et le traitement de caroténoïdes mélangés naturels organiques.

Le JP 2003325165 révèle un procédé de culture et de production d'algues vertes *Dunaliella* dans l'eau de mer concentrée.

Le US 4554390 révèle un procédé de récolte d'algues du genre *Dunaliella* à partir de suspensions d'algues dans des saumures contenant du chlorure de sodium en une concentration d'environ 3M ou plus, où la suspension algale est mise en contact avec un adsorbant ayant une surface hydrophobe pour adsorber les algues dessus, et l'adsorbant avec les algues adsorbées dessus est séparé de la saumure. Le bêta-

carotène et d'autres composants cellulaires utiles peuvent être extraits des algues adsorbés moyennant un traitement avec un solvant adéquat.

Le US 4115949 révèle un procédé de production de glycérol et de substances protéiniques de valeur nutritive qui consiste à cultiver des espèces algales du genre Dunaliella dans un milieu nutritif contenant les minéraux nécessaires pour la croissance d'algues, ledit milieu nutritif ayant une teneur en chlorure de sodium d'au moins 1.5 M, la culture étant effectuée avec une provision adéquate en dioxyde de carbone qui est maintenue jusqu'à l'obtention d'une concentration maximale en algues, et à poursuivre la culture d'algues dans un milieu nutritif ayant une teneur en chlorure de sodium d'au moins 3 M, à cultiver les algues dans ce second milieu nutritif jusqu'à l'établissement d'une teneur élevée en glycérol, à récolter les algues, à récupérer de ce milieu le glycérol et à récupérer le résidu ayant une teneur élevée en protéines. Le milieu nutritif contient Mg<sup>++</sup> de 1 mM à 10 mM, K<sup>+</sup> de 1 mM à 10 mM, Ca<sup>++</sup> de 0.1 mM à 20 mM, Fe-EDTA d'environ 0.5 .mu.m à 45 .mu.m, SO<sub>4</sub><sup>=</sup> d'environ 1 mM à 5 mM ; et NO<sub>3</sub> d'environ 1 mM à 20 mM ; PO<sub>4</sub><sup>=</sup> d'environ 0.01 mM à 1 mM.

Le US 6936459 concerne un nouveau milieu et un procédé d'utilisation du nouveau milieu pour la production de bêta-carotène et d'autres caroténoïdes. Le milieu contient une proportion spécifiée d'une solution saline complexe à base d'eau douce qui sert à la production et la maximisation du bêta-carotène et de ses isomères au moyen d'une souche unique (ARL5) d'algues Dunaliella Salina à étape unique de croissance active. Le procédé consiste à cultiver Dunaliella Salina ARL5 (CCAP 19/36) afin de produire des cellules algales contenant du bêta-carotène et ses isomères ainsi qu'une biomasse protéinique élevée (a) en cultivant Dunaliella Salina ARL5 dans un milieu aqueux comprenant : une solution saline complexe comportant KCl, MgSO<sub>4</sub> et NaCl où la solution saline complexe contient 0.2M-1M KCl, 0.41M-1.5M MgSO<sub>4</sub>, 1M-5M NaCl ; et (b) en récupérant les carotènes desdites cellules algales.

L'invention concerne aussi une nouvelle souche de Dunaliella Salina ARL5 qui tolère KCl en une concentration atteignant 1M. Ce brevet révèle la culture d'algues dans une atmosphère saline.

Vu que Dunaliella survit ou se développe dans une atmosphère saline, la culture actuelle de Dunaliella est effectuée dans une atmosphère saline à concentration élevée en chlorure de sodium. Les milieux et le procédé actuellement employés sont complexes, encombrants, onéreux, nécessitent des intrants énergétiques élevés, des conditions climatiques tout à fait sévères et d'autres facteurs et habitats biotiques. Le soleil ardent avec une puissante mutation induisant des rayons UV-A et UV-B pourrait également avoir un effet négatif sur les caractéristiques, la croissance et la productivité des algues. De tels états nocifs sont susceptibles de nuire à la santé des personnes travaillant dans la région ainsi qu'aux diverses plantes et machines impliquées dans l'ensemble des processus. Par ailleurs, afin de pouvoir consommer cette Dunaliella riche en sel, divers processus doivent être employés pour la désaliniser, ce qui est de nouveau tout à fait gênant. En outre, l'évacuation des restes de milieu de culture de Dunaliella à concentrations très élevées en chlorure de sodium et en d'autres minéraux ainsi que des restes de biomasse organique après le traitement risque de créer un déséquilibre écologique et une pollution de l'environnement.

**BREVE DESCRIPTION DE L'INVENTION**

Un objectif de la présente invention vise à limiter l'utilisation de l'atmosphère saline et à fournir une biomasse algale exempte de salinité.

5 Un objectif de la présente invention vise à limiter l'utilisation de l'atmosphère saline et à fournir une biomasse *Dunaliella* exempte de salinité.

Un objectif de la présente invention vise à fournir un milieu exempt de salinité pour la culture et la production d'une biomasse algale.

Un objectif de la présente invention vise à fournir un milieu exempt de salinité pour la culture et la production d'une biomasse *Dunaliella*.

10 Un objectif de la présente invention vise à fournir un milieu exempt de salinité pour la culture et la production d'une biomasse *Dunaliella* à teneur riche en caroténoïde mélangé naturel.

De là, dans un aspect, la présente invention concerne un milieu exempt de salinité, comprenant au moins une substance osmotiquement active.

15 Un autre objectif de la présente invention concerne un procédé de culture et de production d'une biomasse *Dunaliella* à teneur riche en caroténoïde mélangé naturel.

20 De là, dans un aspect, la présente invention concerne un procédé de culture et de production d'une biomasse *Dunaliella* à teneur riche en caroténoïde mélangé naturel, qui consiste à : cultiver une biomasse algale dans ledit milieu exempt de salinité, permettre le développement de la culture dans des conditions de culture adéquates et récolter la biomasse *Dunaliella* à teneur riche en caroténoïde mélangé naturel.

Un objectif de la présente invention aussi concerne une culture de *Dunaliella* à teneur riche en caroténoïde mélangé naturel et ayant une marge élevée de tolérance de la température et du pH.

25 Un autre objectif aussi de la présente invention concerne une biomasse *Dunaliella* à teneur riche en caroténoïde mélangé naturel, exempte de salinité et ayant un goût agréable.

**DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION**

30 La présente invention vise à limiter l'utilisation d'une atmosphère saline âcre et à produire une biomasse algale exempte de salinité. La présente invention concerne un milieu exempt de salinité et un procédé de culture et de production d'une biomasse algale. Dans des modes de réalisation préférés, la présente invention concerne un milieu exempt de salinité et un procédé de culture et de production d'une biomasse *Dunaliella* à teneur riche en caroténoïde mélangé naturel.

35 L'expression "milieu exempt de salinité", telle utilisée dans la présente invention, désigne un milieu à teneur en chlorure de sodium ne dépassant pas 5 g/l ayant une salinité bien inférieure par comparaison à la salinité de l'eau de mer à teneur en chlorure de sodium dans la marge de 30 – 38 g/l.

Conformément à un mode de réalisation de la présente invention, un milieu exempt de salinité contient au moins une substance osmotiquement active ou un osmolyte produisant une biomasse *Dunaliella* à teneur riche en caroténoïde mélangé naturel. Ce milieu peut être utilisé pour cultiver, développer ou maintenir la biomasse *Dunaliella*.

- 5 La substance osmotiquement active ou l'osmolyte utilisé dans le milieu est sélectionné parmi, mais sans s'y limiter, l'alcool de sucre, le sucre, le sucralose, la sève du palmier à sucre ou leurs combinaisons. La substance osmotiquement active est pourvue en une concentration qui maintient la croissance et la survie des algues dans un environnement osmotiquement équilibré.
- 10 L'alcool de sucre peut être utilisé en une concentration d'environ 30 g/l à environ 350 g/l. Le sucre peut être utilisé en une concentration d'environ 40g/l à environ 450 g/l. Le sucralose peut être utilisé en une concentration d'environ 40g/l à environ 450 g/l. La sève du palmier à sucre est utilisée en une concentration qui exerce une double force au moins. Dans un mode de réalisation préféré, la concentration de la sève du
- 15 palmier à sucre n'exerce pas de force dépassant le triple. Quand utilisés en combinaison, l'alcool de sucre et le sucre ont une concentration totale atteignant 30 g/l.

Dans un mode de réalisation de la présente invention, le sucre peut être le saccharose.

- 20 Dans un mode de réalisation de la présente invention, la sève du palmier à sucre peut être obtenue du palmier. Dans un mode de réalisation préféré, la sève du palmier à sucre est obtenue du palmier de Palmyre. La sève du palmier à sucre est habituellement connue en Inde par Neera.

Dans un mode de réalisation de la présente invention, l'alcool de sucre est le glycérol.

- 25 Dans un mode de réalisation de la présente invention, le milieu exempt de salinité comprend aussi des minéraux de source organique ou inorganique, et au moins 0.1% de NaCl.

- 30 Les minéraux ajoutés au milieu exempt de salinité de la présente invention peuvent être sélectionnés parmi, mais sans s'y limiter, les carbonates ou les bicarbonates, les nitrates, les phosphates, les sulfates, les chlorures, le magnésium, le calcium, le fer, le bore, le complexe NPK, des oligoéléments et/ou leurs combinaisons.

- 35 Les carbonates ou les bicarbonates peuvent être sélectionnés parmi, mais sans s'y limiter, les carbonates ou les bicarbonates de sodium, de potassium, de magnésium et/ou leurs combinaisons, présents dans la marge d'environ 0.01 g/l à environ 1 g/l. Les nitrates peuvent être sélectionnés parmi, mais sans s'y limiter, les nitrates de sodium, de potassium, de calcium et/ou leurs combinaisons, présents dans la marge d'environ 0.00125 g/l à environ 0.125 g/l. Les phosphates peuvent être sélectionnés
- 40 parmi, mais sans s'y limiter, les phosphates en forme mono ou di de potassium, de sodium et/ou leurs combinaisons, présents dans la marge d'environ 0.005 g/l à environ 0.1 g/l. Les sulfates peuvent être sélectionnés parmi, mais sans s'y limiter, les sulfates de magnésium, de calcium, de fer, de sodium, de potassium et/ou leurs combinaisons, présents dans la marge d'environ 0.00009 g/l à environ 0.65 g/l. Les chlorures peuvent être sélectionnés parmi, mais sans s'y limiter, le chlorure de calcium, de magnésium, de fer et/ou leurs combinaisons, présents dans la marge d'environ

0.00014 g/l à environ 0.14 g/l. Le bore peut être ajouté en forme d'acide borique, présent dans la marge d'environ 0.00006 g/l à environ 0.006 g/l. Le complexe NPK est éventuellement présent dans la marge d'environ 0.001 g/l à environ 0.15 g/l. Les oligoéléments peuvent être sélectionnés parmi, mais sans s'y limiter, le cuivre, le zinc, le cobalt, le manganèse, le molybdène et/ou leurs combinaisons, présents en taux ppm.

Dans le mode de réalisation préféré de la présente invention, le milieu exempt de salinité contient le chlorure de sodium dans la marge d'environ 1 g/l à environ 2 g/l.

Conformément à un autre mode de réalisation de la présente invention, le milieu exempt de salinité comprend facultativement des vitamines, un extrait d'algue bleue-verte et/ou leurs combinaisons.

Les vitamines ajoutées au milieu exempt de salinité de la présente invention peuvent être une vitamine B complexe.

L'extrait d'algue bleue-verte à utiliser dans le milieu de la présente invention peut être préparé en ajoutant une biomasse d'algue bleue-verte à l'eau potable normale et maintenu pendant au moins 4 heures, le surnageant est séparé et utilisé dans le milieu. Facultativement, l'extrait d'algue bleue-verte est préparé en ajoutant une biomasse d'algue bleue-verte à un tampon phosphate 0.05 M ou à une solution de chlorure de calcium 0.1 M et maintenu pendant au moins 2 heures, le surnageant est séparé et utilisé dans le milieu.

Le milieu exempt de salinité de la présente invention est préparé dans de l'eau douce qui est l'eau potable.

Conformément à un autre mode de réalisation de la présente invention, le milieu exempt de salinité après la culture de *Dunaliella* peut être utilisé dans la production d'un alcool, de préférence l'éthanol et le 1,3-propanediol (PDO), trouvant une immense application dans l'industrie. Pour une telle production, une levure d'alcool ou des bactéries peuvent être ajoutées au milieu.

Un autre mode de réalisation de la présente invention aussi concerne un procédé de production d'une biomasse *Dunaliella* à teneur riche en caroténoïde mélangé naturel. Le procédé comprend les étapes suivantes : cultiver *Dunaliella* dans le milieu exempt de salinité contenant au moins une substance osmotiquement active ; permettre à la culture de se développer dans des conditions de culture adéquates et récolter la biomasse *Dunaliella* à teneur riche en caroténoïde mélangé naturel.

L'espèce de *Dunaliella* utilisée aux fins de la présente invention peut être sélectionnée parmi *Dunaliella salina* et *Dunaliella bardawil*. Dans un mode de réalisation préféré, l'espèce *Dunaliella* utilisée est *Dunaliella salina*. Dans un mode de réalisation idéal, l'espèce *Dunaliella salina* utilisée est isolée du lac de Sambhar de la province Ajmer du Rajasthan, en Inde. Cette même espèce a été désignée par *Dunaliella salina* SLS1 et a été déposée auprès de la Culture Collection of Algae and Protozoa au SAMS Research Marine Laboratory, Dunbeg, Argyll, PA371QA, UK en vertu du traité de Budapest. Cette même espèce a été attribuée le numéro d'accession CCAP 19/37 le 13 juin 2008.

Toutefois, une autre espèce halophile d'algue, vivant dans des conditions salines, peut également être utilisée dans la présente invention.

- Dans un mode de réalisation, pour la culture de *Dunaliella salina* d'après la présente invention, une culture de graines ou un inoculum peut être préparé en cultivant la *Dunaliella salina* isolée dans un milieu ATCC:1174 DA modifié. Le pH peut être maintenu dans la marge de 5.8-10.8. La température est préférablement comprise entre 18°C et 48°C. L'intensité de la lumière est préférablement maintenue entre 10-120 klux.
- Le milieu exempt de salinité contenant au moins une substance osmotiquement active et des minéraux tels décrits ci-dessus est utilisé dans le procédé de la présente invention.
- Les conditions adéquates de culture dans lesquelles la culture se développe pour obtenir la biomasse *Dunaliella* à teneur riche en caroténoïde mélangé naturel incluent le pH, la température, l'intensité de lumière et/ou la période de croissance.
- Conformément à la présente invention, le pH de la culture *Dunaliella* peut être maintenu dans la marge comprise entre 5.8 et 10.8. Dans les modes de réalisation préférés, le pH de la culture peut être maintenu dans la marge de 8.6-9.4.
- La température de la culture *Dunaliella* peut être maintenue entre 2°C à 60°C. Dans les modes de réalisation préférés, la température de la culture peut être maintenue entre 20°C et 42°C.
- L'intensité de lumière peut être maintenue entre 5-120 klux. Dans les modes de réalisation préférés, l'intensité de lumière peut être maintenue entre 40-80 klux.
- La culture *Dunaliella* peut se développer pendant une période d'au moins 10 jours. Dans les modes de réalisation préférés, la culture *Dunaliella* peut se développer pendant une période de 12 à 14 jours.
- L'algue *Dunaliella salina* SLS1 cultivée d'après le procédé de la présente invention est au moins 2 fois plus active sur le plan de la motilité moyenne que la souche conventionnelle de *Dunaliella*. La *Dunaliella salina* SLS1 cultivée est microscopique, a des dimensions de 6 - 12 microns et est plus petite par comparaison à la souche conventionnelle de *Dunaliella salina* ayant des dimensions de 9 - 16 microns. La *Dunaliella salina* SLS1 cultivée a une forme ronde à ovale par comparaison à la forme ovale à fusiforme de la souche conventionnelle de *Dunaliella salina*.
- Les flagelles de *Dunaliella salina* SLS1 sont légèrement plus longs que ceux de la souche conventionnelle de *Dunaliella*, et ont plus de mouvements de fouettement.
- L'algue cultivée d'après la présente invention a une limite de tolérance de température de -2°C à 60°C. Elle a une marge de tolérance du pH de 5.8 à 10.8.
- La biomasse *Dunaliella* à teneur riche en caroténoïde mélangé naturel peut être obtenue en récoltant la *Dunaliella salina* cultivée par toute technique convenable, de préférence la centrifugation, la floculation avec l'alun ou le chlorure ferrique pour produire une biomasse algale humide.
- La biomasse algale humide telle obtenue ci-dessus peut être soumise aussi à une technique de séchage adéquate sélectionnée parmi, mais sans s'y limiter, le traitement avec un alcool, un séchage par atomisation ou une lyophilisation, pour obtenir une biomasse *Dunaliella* en forme sèche.



Le rendement de la biomasse *Dunaliella* obtenue sur une base sèche varie dans la marge d'environ 80 mg/l du milieu par jour à environ 100 mg /l du milieu par jour.

La biomasse *Dunaliella* ainsi obtenue est exempte de salinité et a un goût agréable.

5 La biomasse *Dunaliella* obtenue par le procédé de la présente invention a une teneur riche en caroténoïde mélangé naturel, vitamines, acides aminés, glycérol et autres principes actifs.

10 La biomasse *Dunaliella* telle obtenue par le procédé de la présente invention peut être analysée par une technique spectrophotométrique UV à 450 nm pour déterminer la teneur en caroténoïdes mélangés. Les caroténoïdes individuels comme trans-bêta-carotène, cis-bêta-carotène, alpha carotène et d'autres peuvent être déterminés par CLHP en employant Waters make HPLC series 2487.

La biomasse *Dunaliella* telle obtenue par le procédé de la présente invention comprend une concentration supérieure en caroténoïdes mélangés naturels, qui peut être aussi élevée que 12% - 20%.

15 Les caroténoïdes mélangés naturels formant la biomasse *Dunaliella* sont constitués de trans-bêta-carotène dans la marge d'environ 12% à environ 15%, de cis-bêta-carotène dans la marge d'environ 1.5% à environ 1.8%, d'alpha carotène dans la marge d'environ 0.8% à environ 1% et d'autres caroténoïdes.

20 La biomasse *Dunaliella* telle obtenue par le procédé de la présente invention ayant de meilleures caractéristiques organoleptiques peut être utilisée soit en forme humide ou sèche ou, après traitement, peut être utilisée en tant que ou dans divers suppléments de santé, aliments, aliments pour animaux, boissons, produits agricoles, cosmétiques, colorants et produits pharmaceutiques.

25 La biomasse *Dunaliella* telle obtenue par le procédé de la présente invention peut être traitée davantage avec des huiles végétales, des solvants ou par une extraction supercritique avec le dioxyde de carbone pour l'extraction de caroténoïdes mélangés naturels.

30 Les caroténoïdes mélangés naturels ainsi extraits peuvent être utilisés comme antioxydant, produits thérapeutiques, de chimioprévention, cosmétiques, colorants et diverses autres applications.

35 La présente invention vise à limiter l'utilisation de l'atmosphère saline âcre et à produire une biomasse algale exempte de salinité. Puisque la biomasse algale obtenue est exempte de salinité, elle a un goût agréable, de meilleures caractéristiques organoleptiques et, par conséquent, convient mieux à l'emploi dans diverses applications nutraceutiques, alimentaires, pharmaceutiques, d'aliments pour animaux et d'autres applications semblables. En outre, vu qu'elle est exempte de salinité, la biomasse algale ne nécessite pas d'autres étapes de traitement, produits chimiques, une grande quantité d'eau, d'équipements et de main d'œuvre. D'où, le procédé conformément à la présente invention est plus simple, plus économique sur le plan de  
40 la main d'œuvre et du coût. En outre, l'invention révèle un double emploi du milieu exempt de salinité, non seulement pour la production de la biomasse algale à teneur riche en caroténoïdes naturels mélangés mais également pour la production d'éthanol

et de bio-PDO, évitant un gaspillage du milieu après la culture d'algues et limitant ainsi les risques de pollution de l'environnement.

L'invention est illustrée davantage dans les exemples restrictifs suivants.

#### EXEMPLES

- 5 Exemple 1 : Isolation de *Dunaliella Salina SLS1* et préparation d'un inoculum :  
*Dunaliella salina SLS1* est isolée des marais salants du lac de Sambhar par une dilution en série et des techniques de purification dans une solution saumâtre normale. Pour préparer l'inoculum, *Dunaliella salina SLS1* est cultivée dans des tubes et des fioles d'essai dans des conditions de laboratoire au pH 7.8 - 9.8, une température 24 -  
 10 28°C, une intensité de lumière 10 Klux dans le milieu ATCC: 1174 DA. Quand cultivée en phase exponentielle, elle est transférée dans un milieu NaCl ayant une concentration de 1 - 2 molaires dans l'eau potable à laquelle sont ajoutés des minéraux tels décrits ci-dessous dans le tableau 1 pour la culture dans des seaux en plastique et l'emploi comme inoculum dans le but d'effectuer des expériences additionnelles de  
 15 croissance et d'accumulation de caroténoïdes mélangés naturels avec différents osmolytes comme l'alcool de sucre, le sucre et Neera.

Tableau 1 :

Sels minéraux	Concentration g/l
Bicarbonate de sodium	0.005 - 1.50
NPK (19:19:19) avec oligoéléments	0.001 - 0.10
Sulfate de magnésium	0.003 - 1.20
Chlorure de calcium	0.00016 - 0.0016
FeSO4	0.00009 - 0.0009
NaCl	58 - 117

Exemple 2 : Culture de *Dunaliella salina SLS1* dans un milieu salin conventionnel exempt de substance osmotiquement active :

- 20 Le milieu salin conventionnel comprenant des composants tels décrits dans le tableau 2 et au moins 100 gm/l de NaCl préparé dans de l'eau potable est utilisé pour la culture de *D. salina SLS1*. 500 ml d'inoculum de *D. salina SLS1* tel obtenu dans l'exemple 1 sont ajoutés à 9.5 litres du milieu de culture préparé. Le pH est compris dans la marge de 6.8 - 10.4, la température dans la marge de 24 - 32°C et l'intensité de  
 25 lumière dans la marge de 10 - 100 Klux. Un apport frais en nutriments minéraux tels décrits dans le tableau 2 est introduit pendant une période de 10 jours. L'algue est récoltée par centrifugation à 12000 rpm pendant 15 minutes et déshydratée par des traitements alcooliques.

Tableau 2 :

Sels minéraux	Concentration g/l
Bicarbonate de sodium	0.101
NPK (19:19:19) avec oligoéléments	0.01
Sulfate de magnésium	0.065
Chlorure de calcium	0.0014

FeSO4	0.0009
NaCl	100 g/l

La *Dunaliella salina* SLS1 obtenue récoltée dans un milieu salin conventionnel exempt de substance osmotiquement active affiche le profil biochimique tel exposé dans le tableau 3.

Tableau 3

Rendement et profil biochimique	<i>Dunaliella salina</i> SLS1 cultivée comme dans l'exemple 2
Bêta carotène	8.6
Cis-bêta-carotène	1.2
Alpha-carotène	0.52
Rendement de biomasse sèche	66 mg/l/jour

- 5 Exemple 3: Culture de *Dunaliella salina* SLS1 dans un milieu contenant un alcool de sucre à titre de substance osmotiquement active :

Le milieu comprenant les composants tels décrits dans le tableau 4 et au moins 100 gm/l de glycérol préparé dans de l'eau potable est utilisé comme culture *D. salina* SLS1. 500 ml d'inoculum de *D. salina* SLS1 tel obtenu dans l'exemple 1 sont ajoutés à 9.5 litres du milieu de culture préparé. Le pH est compris dans la marge de 5.8- 10.8, la température dans la marge de 24 - 32°C et l'intensité de lumière dans la marge de 10 - 100 Klux. Un apport frais en nutriments minéraux tels décrits dans le tableau 4 est introduit de façon intermittente pendant une période de 10 jours afin d'augmenter le rendement de biomasse algale et d'enrichir les caroténoïdes mélangés naturels.

- 10 L'algue est récoltée par centrifugation à 12000 rpm pendant 15 minutes et déshydratée par des traitements alcooliques.

Tableau 4 :

Sels minéraux	Concentration g/l
Bicarbonate de sodium	0.101
NPK (19:19:19) avec oligoéléments	0.01
Sulfate de magnésium	0.065
Chlorure de calcium	0.0014
FeSO4	0.0009
NaCl	1
Extrait d'algue bleue-verte	0.1 ml/l

La *Dunaliella salina* SLS1 récoltée affiche le profil biochimique tel exposé dans le tableau 5 en termes de teneur élevée en carotène et rendement de culture par comparaison à la souche conventionnelle de *Dunaliella salina*.

20

Tableau 5 :

Rendement et profil biochimique	<i>Dunaliella salina</i> SLS1 cultivée par un procédé conventionnel	<i>Dunaliella salina</i> SLS1 cultivée comme dans l'exemple 3
Bêta carotène	8.6	14.6
Cis-bêta-carotène	1.2	1.5

Alpha-carotène	0.52	0.84
Rendement de biomasse sèche	66 mg/l/jour	96 mg/l/jour

Exemple 4 : Culture de *Dunaliella salina* SLS1 dans un milieu contenant du sucre à titre de substance osmotiquement active.

5 Le milieu comprenant les composants tels décrits dans le tableau 6 et au moins 200 gm/l de saccharose préparé dans de l'eau potable est utilisé pour la culture de *D. salina* SLS1. 500 ml d'inoculum de *D. salina* SLS1 tel obtenu dans l'exemple 1 sont ajoutés à 9.5 litres du milieu de culture préparé. Le pH est compris dans la marge de 6.8 - 10.4, la température dans la marge de 24 - 32°C et l'intensité de lumière dans la marge de 10 - 100 Klux. Un apport frais en nutriments minéraux tels décrits dans le tableau 6 est introduit de façon intermittente pendant une période de 10 jours afin d'augmenter  
10 le rendement de la biomasse algale et d'enrichir les caroténoïdes mélangés naturels. L'algue est récoltée par centrifugation à 12000 rpm pendant 15 minutes et déshydratée par des traitements alcooliques.

Tableau 6 :

Sels minéraux	Concentration g/l
Bicarbonate de sodium	0.101
NPK (19:19:19) avec oligoéléments	0.01
Sulfate de magnésium	0.065
Chlorure de calcium	0.0014
FeSO4	0.0009
NaCl	1 g/l
Extrait d'algue bleue-verte	0.1 ml/l

15 La *Dunaliella salina* SLS1 récoltée affiche un profil biochimique élevé tel exposé dans le tableau 7 en termes de teneur en carotène et rendement de culture par comparaison à la souche conventionnelle de *Dunaliella salina*.

Tableau 7 :

Rendement et profil biochimique	<i>Dunaliella salina</i> SLS1 cultivée par un procédé conventionnel	<i>Dunaliella salina</i> SLS1 cultivée comme dans l'exemple 4
Bêta carotène	8.6	13.2
Cis-bêta-carotène	1.2	1.8
Alpha-carotène	0.52	0.86
Rendement de biomasse sèche	66 mg/l/jour	87 mg/l/jour

Exemple 5 : Culture de *Dunaliella salina* SLS1 dans un milieu contenant Neera à titre de substance osmotiquement active :

20 Le milieu comprenant les composants tels décrits dans le tableau 8 et 9.5 litres de Neera double concentration est utilisé pour cultiver *D. salina* SLS1. 500 ml d'inoculum de *D. salina* SLS1 tel obtenu dans l'exemple 1 sont ajoutés à 9.5 litres du milieu de culture préparé. Le pH est dans la marge de 6.4 - 10.6, la température dans

la marge de 24 - 32°C et l'intensité de lumière dans la marge de 10 - 100 Klux. Un apport frais en nutriments minéraux tels décrits dans le tableau 8 est introduit de façon intermittente pendant une période de 10 jours pour augmenter le rendement de la biomasse algale et enrichir les caroténoïdes mélangés naturels. L'algue est récoltée par centrifugation à 12000 rpm pendant 15 minutes et déshydratée par des traitements alcooliques.

Tableau 8 :

Sels minéraux	Concentration g/l
Bicarbonate de sodium	0.101
NPK (19:19:19) avec oligoéléments	0.01
Sulfate de magnésium	0.065
Chlorure de calcium	0.0014
FeSO4	0.0009
NaCl	100 g/l

La *Dunaliella salina* SLS1 récoltée affiche un profil biochimique élevé tel exposé dans le tableau 9 en termes de teneur en carotène et rendement de culture par comparaison à la souche conventionnelle de *Dunaliella salina*.

Tableau 9 :

Rendement et profil biochimique	<i>Dunaliella salina</i> SLS1 cultivée par un procédé conventionnel	<i>Dunaliella salina</i> SLS1 cultivée comme dans l'exemple 5
Bêta carotène	8.6	12.3
Cis-bêta-carotène	1.2	1.35
Alpha-carotène	0.52	0.68
Rendement de biomasse sèche	66 mg/l/jour	80 mg/l/jour

15

20

### Revendications

1. Un milieu exempt de salinité pour la culture et la production d'une biomasse algale comprenant au moins une substance osmotiquement active.
- 5 2. Le milieu exempt de salinité tel revendiqué dans la revendication 1, où l'algue est une algue halophile.
3. Le milieu exempt de salinité tel revendiqué dans la revendication 2, où l'algue halophile est sélectionnée du genre *Dunaliella*.
- 10 4. Le milieu exempt de salinité tel revendiqué dans la revendication 3, où l'algue *Dunaliella* est sélectionnée parmi *Dunaliella bardawil* et *Dunaliella salina*.
5. Le milieu exempt de salinité tel revendiqué dans la revendication 4, où l'algue *Dunaliella* est *Dunaliella salina*.
6. Le milieu exempt de salinité tel revendiqué dans la revendication 5, où l'algue *Dunaliella salina* est *Dunaliella salina* SLS1.
- 15 7. Le milieu exempt de salinité tel revendiqué dans l'une des revendications de 1 - 6, où la substance osmotiquement active est sélectionnée parmi l'alcool de sucre, le sucre, le sucralose, la sève du palmier à sucre ou leurs combinaisons.
8. Le milieu exempt de salinité tel revendiqué dans la revendication 7, où la concentration en alcool de sucre varie d'environ 30 g/l à environ 350 g/l.
- 20 9. Le milieu exempt de salinité tel revendiqué dans la revendication 8, où l'alcool de sucre est le glycérol.
10. Le milieu exempt de salinité tel revendiqué dans la revendication 7, où la concentration en sucre varie d'environ 40g/l à environ 450 g/l.
- 25 11. Le milieu exempt de salinité tel revendiqué dans la revendication 10, où le sucre est le saccharose.
12. Le milieu exempt de salinité tel revendiqué dans la revendication 7, où la concentration de la sève du palmier à sucre exerce une double force.
13. Le milieu exempt de salinité tel revendiqué dans la revendication 7, où la concentration de la sève du palmier à sucre n'exerce pas de force dépassant le triple.
- 30 14. Le milieu exempt de salinité tel revendiqué dans la revendication 7, où la sève du palmier à sucre est obtenue du palmier, de préférence le palmier de Palmyre.
15. Le milieu exempt de salinité tel revendiqué dans la revendication 7, où la concentration du sucralose est d'environ 40 g/l à environ 450 g/l.
- 35 16. Le milieu exempt de salinité tel revendiqué dans l'une des revendications de 1 - 15, où le milieu comprend aussi des minéraux et au moins 0.1% de chlorure de sodium.
17. Le milieu exempt de salinité tel revendiqué dans la revendication 16, où les minéraux sont sélectionnés parmi des carbonates ou des bicarbonates, des

- nitrate, des phosphates, des sulfates, des chlorures, le magnésium, le calcium, le fer, le bore, le complexe NPK, des oligoéléments et/ou leurs combinaisons.
18. Le milieu exempt de salinité tel revendiqué dans la revendication 16, où la concentration en chlorure de sodium est d'environ 1 g/l à environ 2 g/l.
- 5 19. Le milieu exempt de salinité tel revendiqué dans l'une des revendications de 1 - 18, où le milieu comprend aussi des vitamines, un extrait d'algue bleue-verte et/ou leurs combinaisons.
20. Un procédé de culture et de production d'une biomasse *Dunaliella* à teneur riche en caroténoïdes mélangés naturels, qui consiste à :
- 10 cultiver *Dunaliella* dans un milieu exempt de salinité tel revendiqué dans l'une des revendications 1-19 ;
- permettre le développement de la culture dans des conditions adéquates de culture pour obtenir une biomasse *Dunaliella* à teneur riche en caroténoïdes mélangés naturels ; et
- 15 récolter la biomasse *Dunaliella*.
21. Le procédé tel revendiqué dans la revendication 20, où *Dunaliella* est sélectionnée parmi *Dunaliella bardawil* et *Dunaliella salina*.
22. Le procédé tel revendiqué dans la revendication 21, où l'algue *Dunaliella salina* est *Dunaliella salina* SLS1.
- 20 23. Le procédé tel revendiqué dans la revendication 20, où les conditions adéquates de culture comprennent un pH variant d'environ 5.8 à environ 10.8, une température variant d'environ -2°C à environ 60°C et une intensité de lumière variant d'environ 5 klux à 120 klux.
24. Le procédé tel revendiqué dans la revendication 23, où les conditions adéquates de culture comprennent un pH variant d'environ 8.6 à environ 9.4, une température variant d'environ 20°C à environ 42°C et une intensité de lumière variant d'environ 40 klux à 80 klux.
- 25 25. Le procédé tel revendiqué dans la revendication 20, où la culture *Dunaliella* peut se développer pendant une période de 10 jours.
- 30 26. Le procédé tel revendiqué dans la revendication 25, où la culture *Dunaliella* peut se développer pendant une période de 12 jours à 14 jours.
27. Le procédé tel revendiqué dans la revendication 20, où la teneur en caroténoïdes mélangés de la biomasse *Dunaliella* varie dans la marge de 12-20%.
- 35 28. Le procédé tel revendiqué dans la revendication 20 où le rendement de la biomasse *Dunaliella* à teneur riche en caroténoïdes mélangés sur une base sèche varie d'environ 80 à 100mg/l de milieu/jour.
29. Une biomasse *Dunaliella* telle obtenue par le procédé revendiqué dans l'une des revendications 20-28, où la biomasse *Dunaliella* est exempte de salinité et
- 40 comprend une concentration supérieure en caroténoïdes mélangés naturels.

- 5
30. La biomasse *Dunaliella* telle revendiquée dans la revendication 29, où la teneur en caroténoïdes de la biomasse *Dunaliella* varie dans la marge de 12-20%.
  31. La biomasse *Dunaliella* telle revendiquée dans la revendication 29, où la biomasse *Dunaliella* a une limite de tolérance de température d'environ -2°C à environ 60°C et une limite de tolérance du pH d'environ 5.8 à 10.8.

**Nombre de lignes : 600**