



(12) FASCICULE DE BREVET

- (11) N° de publication : **MA 33266 B1** (51) Cl. internationale : **C12P 7/64; C12N 5/04; C12N 5/02**
- (43) Date de publication : **02.05.2012**

-
- (21) N° Dépôt : **34339**
- (22) Date de Dépôt : **09.11.2011**
- (30) Données de Priorité : **21.04.2009 CO 09-040167**
- (86) Données relatives à l'entrée en phase nationale selon le PCT : **PCT/IB2009/007517 19.11.2009**
- (71) Demandeur(s) :
• **EMPRESAS PÚBLICAS DE MEDELLIN E.S.P., CARRERA 58 N° 42-125 EDIFICIO INTELIGENTE SOTANO 2 MEDELLIN (CO)**
• **UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA, Calle 67 Número 53-108 Medellín Medellín (CO)**
- (72) Inventeur(s) :
ATEHORTUA GARCES, Lucia ; CORREA CORDOBA, Sandra, Marcela
- (74) Mandataire :
ABU-GHAZALEH INTELLECTUAL PROPERTY (TMP AGENTS)

-
- (54) Titre : **METHODE POUR MULTIPLIER LE TISSU CELLULAIRE DE JATROPHA CURCAS**
- (57) Abrégé : La présente invention porte sur un procédé comprenant : l'obtention d'un explant provenant des graines de *Jatropha curcas*; le placement de l'explant issu de la graine de *Jatropha curcas* dans un milieu de culture; la rupture des liens intercellulaires du tissu d'explant, ce qui produit des cellules individuelles; l'incubation pendant un temps déterminé du milieu de culture avec les cellules individuelles produites, qui ont été multipliées; et l'extraction d'huile à partir des cellules qui se sont multipliées à partir des cellules individuelles produites à partir des explants issus de la graine de *Jatropha curcas*.

MÉTHODE POUR MULTIPLIER LE TISSU CELLULAIRE DE *Jatropha curcas*

ABSTRAIT

La méthode de la présente invention comprend : Obtenir un ex-plant des semences de *Jatropha curcas*; Mettre l'ex-plant dérivé de la semence de *Jatropha curcas* dans un milieu de culture ; Rompre les unions intercellulaires du tissu des ex-plants, ceux qui génèrent des cellules individuelles ; Incuber pour un temps déterminé le milieu de culture avec les cellules individuelles générées lesquelles se multiplient et extraire l'huile des cellules qui se sont multipliées à partir des cellules individuelles générées des ex-plants dérivés de la semence de *Jatropha curcas*.



MÉTHODE POUR MULTIPLIER LE TISSU CELLULAIRE DE *Jatropha curcas*

ANTÉCÉDENTS DE L'INVENTION

1. AIRE DE L'INVENTION

001. La présente invention concerne la multiplication cellulaire à partir des semences de plantes oléagineuses et l'obtention d'huiles à partir des cellules générées.

2. DESCRIPTION DE L'ART ANTÉRIEUR

002. Les semences des plantes oléagineuses ont été identifiées comme source dans la production d'huiles qui peuvent servir, entre autres usages, comme biodiesel.

003. Un exemple est la plante *Jatropha curcas*, laquelle contient une semence qui contient de l'huile. Cette huile, en plus de ses propriétés médicinales et vétérinaires, et pour fabriquer des savons, etc, est considérée appropriée comme un biodiesel de haute qualité. L'huile dérivée de la semence de *Jatropha curcas* possède des caractéristiques physico-chimiques et de rendement similaire au diesel pour moteurs (voir Murali, et al., Publication No. 2008/0194026 A1 de Sollicitude de Patente des États Unis (US), paragraphes 0008 – 0010).

004. En conséquence, dans l'art antérieur, il y a été décrit des méthodes de micro-propagation dans le but de générer des plantes *Jatropha curcas* dérivées des organes, tissus, cellules ou protoplastes (voir Murali, et al., paragraphes 0014, 0017, et 0024). Les plantes générées serviraient comme source de semences pour la production d'huile (voir Shuyi Qiu, et al., Publication No. 11225416 A de Sollicitude de Patente de China (CN), Abstract).

005. Malheureusement la possibilité de production d'huile dérivée de la semence de *Jatropha curcas* en grandes quantités pour l'utiliser comme biodiesel est limitée car il faudrait d'immenses surfaces de terrains pour la culture des plantes générées par micropropagation ou propagation conventionnelle.

006. La présente invention fournit une méthode pour la génération d'huile dérivée du *Jatropha curcas*, où la croissance des plantes n'est pas nécessaire. Par conséquent dans la méthode de la présente invention il n'est pas nécessaire d'utiliser des aires de terrains pour le génération de l'huile dérivée du *Jatropha curcas*, ou d'autres plantes oléagineuses.

RÉSUMÉ DE L'INVENTION



007. La présente invention fournit une méthode pour la production d'huile dérivée de cellules multipliées à partir du tissu de la semence de *Jatropha curcas*, où la méthode est applicable à d'autres semences de plantes oléagineuses. Dite méthode comprend l'obtention d'un ex-plant du cotylédon de la semence du *Jatropha curcas*, inoculer le dit ex-plant dans un milieu de culture avec des enzymes qui rompent les unions intercellulaires de telle manière que, en incubant sous agitation, soient générées des cellules individuelles lesquelles se multiplient. Des cellules multipliées dérivées des cellules individuelles dérivées du tissu du cotylédon de la semence de *Jatropha curcas* on extrait l'huile qui peut être utilisée comme biodiesel.

008. De manière spécifique, la méthode de la présente invention comprend :

Obtenir un ex-plant de la semence de *Jatropha curcas*; Mettre l'ex-plant dérivé de la semence de *Jatropha curcas* dans un milieu de culture liquide ; Rompre les unions intercellulaires du tissu des ex-plants dérivés de la semence de *Jatropha curcas* dans le dit moyen de culture où les ex plants génèrent des cellules individuelles ; Incuber pour un temps déterminé le moyen de culture avec les cellules individuelles générées des ex-plants dérivés de la semence de *Jatropha curcas*, où dans le temps déterminé les dites cellules individuelles se multiplient ; et Extraire de l'huile des cellules qui se sont multipliées à partir des cellules individuelles générées des ex-plants dérivés de la semence de *Jatropha curcas*.



009. Dans un aspect de la méthode de la présente invention, l'ex-plant est obtenu de la semence de *Jatropha curcas* par un procédé qui comprend : Désinfecter la semence de *Jatropha curcas* avec de l'éthanol où la dite semence est lavée avec de l'éthanol ; Hydrater dite semence de *Jatropha curcas* désinfectée avec un papier humidifié avec de l'eau stérile où le papier humidifié avec de l'eau stérile enveloppe la semence de *Jatropha curcas*; Stériliser la semence de *Jatropha curcas* hydratée avec de l'hypochlorite de sodium où la dite semence de *Jatropha curcas* hydratée se lave avec de l'hypochlorite de sodium : Retirer l'enveloppe de la semence de *Jatropha curcas* stérilisée où comme résultat on libère le cotylédon de la semence de *Jatropha curcas*; et, Obtenir des ex-plants du cotylédon de la semence de *Jatropha curcas*.

0010. La méthode de la présente invention peut s'appliquer à n'importe quelle plante oléagineuse. Cette méthode adaptée à n'importe quelle plante oléagineuse comprend :

- A. Obtenir un ex-plant de la semence d'une plante oléagineuse ;
- B. Mettre l'ex-plant dérivé de la semence dans un milieu de culture ;
- C. Rompre les unions intercellulaires du tissu des ex-plants dérivés de la semence dans ce milieu de culture, où les ex-plants génèrent des cellules individuelles ;
- D. Incuber pour un temps déterminé le milieu de culture avec les cellules individuelles générées des ex-plants dérivés de la semence où, en le temps déterminé dites cellules individuelles se multiplient ;

E. Extraire l'huile des cellules qui se sont multipliées à partir des cellules individuelles générées des ex-plants dérivés de la semence.

0011. Dans un autre aspect de la méthode de la présente invention, il est préférable que le milieu de culture contienne au moins NH_4NO_3 , CaNO_3 , CuSO_4 , MnSO_4 , ZnSO_4 , H_3BO_3 , KH_2PO_4 , Na_2MoO_4 , EDTA, FeSO_4 , CaCl_2 , CaCO_3 , $\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_7$ (Citrates de Sodium), MgSO_4 , K_2SO_4 , thiamine, glycine, inositol, acide nicotinique, pyridoxine, biotine, glutamine, Acide naphthalène acétique, zéatine, et une source de carbone.

0012. Dans un aspect du milieu de culture de la méthode de la présente invention, le dit milieu de culture peut contenir un sel sélectionné du groupe qui consiste de CaNO_3 , et KNO_3 .

0013. Dans un autre aspect de milieu de culture de la méthode de la présente invention, le dit milieu de culture peut contenir un sel sélectionné du groupe qui consiste en CaCl_2 , y KCl .

0014. Dans un autre aspect de milieu de culture de la méthode de la présente invention, le dit milieu de culture peut contenir une hormone sélectionnée du groupe qui consiste en acide indole acétique (IAA), acide naphthalène acétique (NAA), et acide indole butyrique (IBA).

0015. Dans un autre aspect supplémentaire du milieu de culture de la méthode de la présente invention, le dit moyen de culture peut contenir une hormone sélectionnée du groupe qui consiste en kinetine, benziladenine (BA), Gibereline (GA), et Zeatine.

0016. Dans un autre aspect du milieu de culture de la méthode de la présente invention, le dit moyen de culture peut contenir une source de carbone sélectionnée du groupe qui consiste en saccharose (sucrose) fructose et glucose.

0017. Dans un autre aspect du milieu de culture de la méthode de la présente invention au milieu de culture il est ajouté de la cellulase, pectinase et hemicellulase où la cellulase, pectinase et hemicellulase rompent les unions intercellulaires du tissu des explants dérivés de la semence de *Jatropha curcas* dans le dit milieu de culture.

0018. Dans un autre aspect supplémentaire de la méthode de la présente invention, l'huile est extraite du milieu de culture avec les cellules individuelles qui se sont multipliées à partir des cellules individuelles générées des ex-plants dérivés de la semence de *Jatropha curcas* au moyen d'une procédure qui comprend : Ajouter un solvant organique ; Sonication ; Centrifugation ; Extraction de la phase supérieure ; et Évaporation et séchage du solvant.

0019. La présente invention fournit également un milieu de culture où le milieu de culture comprend : NH_4NO_3 , CaNO_3 , CuSO_4 , MnSO_4 , ZnSO_4 , H_3BO_3 , KH_2PO_4 , Na_2MoO_4 ,

EDTA, FeSO₄, CaCl₂, CaCO₃, NaC₆H₇O₇ (Citrates de Sodium), MgSO₄, K₂SO₄, thiamine, glicine, inositol, acide nicotinique, pyridoxine, biotine, glutamine, Acide nafatalenacétique, zeatine, et une source de carbone.

0020. Dans un aspect du milieu de culture de la présente invention, le dit milieu de culture contient cellulase, pectinase et hemicellulase où la cellulase, pectinase et hemicellulase rompent les unions intercellulaires du tissu des ex-plants dérivés de la semence de *Jatropha curcas* dans le dit milieu de culture.

0021. Dans un aspect du milieu de culture de la méthode de la présente invention, le dit milieu de culture peut contenir un sel sélectionné du groupe qui consiste en CaNO₃, et KNO₃.

0022. Dans un autre aspect du milieu de culture de la méthode de la présente invention, le dit milieu de culture peut contenir un sel sélectionné du groupe qui consiste en CaCl₂, y KCl.

0023. Dans un autre aspect du milieu de culture de la méthode de la présente invention, le dit milieu de culture peut contenir une hormone sélectionnée du groupe qui consiste en acide indolacétique (IAA), acide naftalanacétique (NAA) et acide indolbutirique (IBA).

0024. Dans un autre aspect supplémentaire du milieu de culture de la méthode de la présente invention, le dit milieu de culture peut contenir une hormone sélectionnée du groupe qui consiste en kinétine, benziladenine (BA) gibbereline (GA) et Zeatine.

0025. Dans un autre aspect du milieu de culture de la méthode de la présente invention, le dit milieu de culture peut contenir une source de carbone sélectionnée du groupe qui consiste en saccharose (sucrose) fructose et glucose.

0026. D'autres objectifs et avantages de la présente invention seront mis en évidence dans la description détaillée de l'invention et les revendications.

DESCRIPTION DÉTAILLÉE DE L'INVENTION

0027. La méthode de la présente invention comprend : Obtenir un ex-plant de la semence de *Jatropha curcas*; Mettre l'ex-plant dérivé de la semence de *Jatropha curcas* en un milieu de culture ; Rompre les unions intercellulaires du tissu des ex-plants dérivés de la semence de *Jatropha curcas* dans le dit milieu de culture, où les ex-plants génèrent des cellules individuelles ; Incuber pour un temps déterminé le milieu de culture avec les cellules individuelles générées des ex-plants dérivés de la semence de *Jatropha curcas*, où dans le temps déterminé les dites cellules individuelles se multiplient ; et Extraire de l'huile des cellules qui se sont multipliées à partir des cellules individuelles générées des ex-plants dérivés de la semence de *Jatropha curcas*.

0028. Dans la forme préférée de la méthode de la présente invention, le temps d'incubation préféré est d'au moins 3 jours à partir du moment où l'on met l'ex-plant dans le milieu de culture. Il serait toutefois préférable que le temps d'incubation soit au moins de 8 jours à partir du moment où l'on met l'ex-plant dans le milieu de culture. D'une manière encore plus préférable le temps d'incubation serait au moins de 14 jours à partir du moment où l'on met l'ex-plant dans le milieu de culture. L'incubation se fait préférablement au moyen d'agitation constante à la température ambiante et dans l'obscurité.

0029. L'incubation pourrait également se faire au moyen d'illumination avec une source de lumière qui émette une longueur d'onde déterminée, par exemple lumière infrarouge ou une source de lumière qui émette la longueur de l'onde qui soit idéale pour la multiplication des cellules dérivées d'une semence d'une plante oléagineuse spécifique.

0030. Les cellules individuelles générées des ex-plants dérivés de la semence de *Jatropha curcas*, une fois les unions intercellulaires rompues après au moins 3 jours d'incubation dans le milieu de culture peuvent être utilisées comme source de cellules pour ré-inoculer à un milieu de culture frais, en répétant la ré-inoculation plusieurs fois aux milieux de culture frais perpétuant ainsi la multiplication des dites cellules individuelles. La quantité préférée de cellules individuelles qui se ré-inocule à un milieu de culture frais est de 1 à 2×10^5 cellules par millimètre et le dit milieu de culture frais ré-inoculé sera incubé pour un temps déterminé jusqu'à ce que les cellules atteignent une phase stationnaire de multiplication.



0031. Dans un aspect de la méthode de la présente invention, l'ex-plant est obtenu de la semence de *Jatropha curcas* par un procédé qui comprend : Désinfecter la semence de *Jatropha curcas* avec de l'éthanol où la dite semence est lavée avec de l'éthanol ; Hydrater dite semence de *Jatropha curcas* désinfectée avec un papier humidifié avec de l'eau stérile où le papier humidifié avec de l'eau stérile enveloppe la semence de *Jatropha curcas*; Stériliser la semence de *Jatropha curcas* hydratée avec de l'hypochlorite de sodium où la dite semence de *Jatropha curcas* hydratée se lave avec de hypochlorite de sodium : Retirer l'enveloppe de la semence de *Jatropha curcas* stérilisée où comme résultat on libère le cotylédon de la semence de *Jatropha curcas*; et, Obtenir des ex-plants du cotylédon de la semence de *Jatropha curcas*.

0032. Pour les finalités de l'invention de la présente sollicitude, le terme ex-plant se réfère à une portion du cotylédon de la semence de *Jatropha curcas*. Sous la forme préférée, l'ex-plant qui est obtenu du cotylédon de la semence de *Jatropha curcas* est constitué par des portions coupées transversalement du cotylédon en forme de lamelles de 1 à 2 mm. d'épaisseur. Des ex-plants peuvent aussi être d'un autre type de portions du cotylédon avec différentes formes dérivées de la semence de *Jatropha curcas* ou des semences d'autres plantes oléagineuses. Dans la forme préférée de la présente invention la quantité d'ex-plants peut être de 1 à 7 grammes pour 100 ml de milieu de culture.

0033. La méthode de la présente invention peut être appliquée à n'importe quelle plante oléagineuse. Dite méthode adaptée à n'importe quelle plante oléagineuse comprend :

A. Obtenir un ex-plant de la semence d'une plante oléagineuse ;

- B. Mettre l'ex-plant dérivé de la semence dans un milieu de culture ;
- C. Rompre les unions intercellulaires du tissu des ex-plants dérivés de la semence dans dit milieu de culture, où les ex-plants génèrent des cellules individuelles ;
- D. Incuber pour un temps déterminé le milieu de culture avec les cellules individuelles générées des ex-plants dérivés de la semence où dans le temps déterminé les dites cellules se multiplient ;
- E. Extraire de l'huile des cellules qui se sont multipliées à partir de cellules individuelles générées des ex-plants dérivés de la semence.

0034. Le terme « plante oléagineuse » se réfère à n'importe quel végétal dont on peut extraire de la semence ou du fruit de l'huile, comestible dans certains cas, dans d'autres cas d'usage industriel ou médical. Les plantes oléagineuses incluent :

Glycine max (soja)

Elaeis guineensis (Palme africaine)

Elaeis oleifera (Noli ou palme américaine noli)

Arachis hypogaea (Cacahuète)

Helianthus annuus (Tournesol)

Zea mays (Mais)

Linum usitatissimum (Lin)

Brassica napus (Colza, raps, canola o nabicol)

Olea europaea L. (Olive)



Ricinus communis (Ricin)

Sesamum indicum (Sésame)

Simmondsia chinensis (Jojoba)

Vernicia fordii (Tung)

Prunus dulcis (Amande)

Carthamus tinctorius (Cartamo ou alazor)

Gossypium hirsutum (Coton)

Moringa oleifera (Marango)

Triticum aestivum (Blé)

et toute sorte de plantes dont les semences contiennent de l'huile.

0035. Dans un autre aspect de la méthode de la présente invention, de préférence, le milieu de culture contient au moins : NH_4NO_3 , CaNO_3 , CuSO_4 , MnSO_4 , ZnSO_4 , H_3BO_3 , KH_2PO_4 , Na_2MoO_4 , EDTA, FeSO_4 , CaCl_2 , CaCO_3 , $\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_7$ (Citrates de Sodium), MgSO_4 , K_2SO_4 , thiamine, glycine, inositol, acide nicotinique, pyridoxine, biotine, glutamine, Acide naphthalène acétique, zéatine, y une source de carbone.

0036. Dans un aspect du milieu de culture de la méthode de la présente invention, le dit milieu de culture peut contenir un sel sélectionné du groupe qui consiste en CaNO_3 , et KNO_3 .



0037. Dans un autre aspect du milieu de culture de la méthode de la présente invention, le dit milieu de culture peut contenir un sel sélectionné du groupe qui consiste en CaCl_2 , y KCl.

0038. Dans un autre aspect du milieu de culture de la méthode de la présente invention, le dit milieu de culture peut contenir une hormone sélectionnée du groupe qui consiste en en acide indole acétique (IAA), acide naphthalène acétique (NAA), y acide indole butyrique (IBA).

0039. Dans un autre aspect supplémentaire du milieu de culture de la méthode de la présente invention, le dit milieu de culture peut contenir une hormone sélectionnée du groupe qui consiste en kinétine, benziladenine (BA) gibbereline (GA) et Zeatine.

0040. Dans un autre aspect du milieu de culture de la méthode de la présente invention, le dit milieu de culture peut contenir une source de carbone sélectionnée du groupe qui consiste en saccharose (sucrose), fructose et glucose.

0041. Dans un autre aspect de milieu de culture de la présente invention, au dit milieu de culture on ajoute cellulase, pectinase et hemicellulase où la cellulase, pectinase et hemicellulase rompent les unions intercellulaires du tissu des ex-plants dérivés de la semence de *Jatropha curcas* dans le dit milieu de culture. Les unions intercellulaires du tissu des ex-plants dérivés de la semence de *Jatropha curcas* dans le dit milieu de culture.



Les unions intercellulaires du tissu des ex-plants dérivés de la semence de *Jatropha curcas* pourraient se rompre par d'autres procédés enzymatiques ou non enzymatiques.

0042. De la forme préférée, les rangs de concentrations des composants des milieux de culture de la méthode de la présente invention sont les suivants :

NH_4NO_3	100 – 500 mg/L
CaNO_3 , o KNO_3	200 – 400 mg/L
CuSO_4	0.1 – 5 mg/L
MnSO_4	10 – 40 mg/L
ZnSO_4	20 – 50 mg/L
H_3BO_3	10 – 20 mg/L
KH_2PO_4	50 – 200 mg/L
Na_2MoO_4	0.1 – 5 mg/L
EDTA (acide éthyle diamine tétra acétique)	10 – 50 mg/L
FeSO_4	10 – 50 mg/L
CaCl_2 , ou KCl	50 – 100 mg/L
CaCO_3	30 – 50 mg/L
$\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_7$ (Citrates de Sodium)	0.1 – 10 mg/L
MgSO_4	50 – 300 mg/L
K_2SO_4	700 – 1500 mg/L
thiamine	0.5 – 3 mg/L

glycine	0.5 – 3 mg/L
inositol	50 – 200 mg/L
acide nicotinique	0.1 – 10 mg/L
pyridoxine	0.1 – 10 mg/L
biotine	0.1 – 10 mg/L
glutamine	20 – 50 mg/L
IAA, ou NAA, ou IBA	0.5 – 10 mg/L
zeatine, ou kinetine, ou BA, ou GA	0.5 – 10 mg/L
saccharose, ou glucose, ou fructose	30000 – 100000 mg/L, y
hemicellulose, et pectinase, et cellulase	3000 – 10000 mg/L

0043. Sous la forme préférée de la méthode de la présente invention le EDTA est disodique. Le EDTA monosodique peut également être utilisé dans la méthode de la présente invention.

0044. Sous la forme préférée de la méthode de la présente invention l'inositol est myo-inositol.

0045. Sous la forme préférée de la méthode de la présente invention le milieu de culture s'ajuste à un pH de entre 4.8 et 6.5.



0046. Sous un aspect supplémentaire de la méthode de la présente invention l'huile est extraite du milieu de culture avec les cellules individuelles que se sont multipliées à partir des cellules individuelles générées des ex-plants dérivés de la semence de *Jatropha curcas* au moyen d'un procédé qui comprend : Ajouter un solvant organique; Sonication; Centrifugation; Extraction de la phase supérieure; et, Évaporation et séchage du solvant.

0047. Dans le cas de *Jatropha curcas* ou de n'importe quelle autre plante oléagineuse, l'extraction de l'huile, des cellules qui se sont multipliées à partir des cellules individuelles générées des ex-plants dérivés du cotylédon de la semence, est fait quand la quantité de cellules atteignent une étape stationnaire dans le milieu de culture. Au milieu de culture avec les cellules qui se sont multipliées on ajoute un solvant organique. Le solvant organique préféré est l'hexane, bien que d'autres solvants tels que l'isopropanol ou l'éthanol ou d'autres produits puissent être utilisés.

0048. Les parois des cellules individuelles se rompent lorsqu'on soumet à sonication le mélange du solvant, le milieu de culture et les cellules individuelles, libérant l'huile des cellules. Le mélange de solvant et milieu de culture qui contient les cellules cassées et l'huile libérée se centrifuge, ce qui sépare ce mélange en deux phases, une supérieure et une inférieure. La phase supérieure contient le solvant et l'huile libérée et la phase inférieure contient les résidus de dites cellules et le milieu de culture. La phase supérieure avec le solvant et l'huile se sépare et ensuite le solvant de dite phase s'évapore par roto-évaporation et réchauffement ce qui donne la purification de l'huile.



0049. La présente invention fournit également un milieu de culture où le milieu de culture comprend : NH_4NO_3 , CaNO_3 , CuSO_4 , MnSO_4 , ZnSO_4 , H_3BO_3 , KH_2PO_4 , Na_2MoO_4 , EDTA, FeSO_4 , CaCl_2 , CaCO_3 , $\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_7$ (Citrates de Sodium), MgSO_4 , K_2SO_4 , thiamine, glycine, inositol, acide nicotinique, pyridoxine, biotine, glutamine, Acide naphthalène acétique, zeatine, et une source de carbone.

0050. Sous un aspect du milieu de culture de la présente invention, le dit milieu de culture contient de la cellulase, pectinase et hemicellulase, où la cellulase, pectinase et hemicellulase rompent les unions intercellulaires du tissu des ex-plants dérivés de la semence de *Jatropha curcas* dans le dit milieu de culture.

0051. Sous un aspect du milieu de culture de la méthode de la présente invention, le dit milieu de culture peut contenir un sel sélectionné du groupe qui consiste en CaNO_3 , y KNO_3 .

0052. Sous un autre aspect du milieu de culture de la méthode de la présente invention, le dit milieu de culture peut contenir un sel sélectionné du groupe qui consiste en CaCl_2 , y KCl .



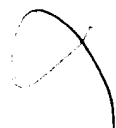
0053. Sous un autre aspect du milieu de culture de la présente invention, le dit milieu de culture peut contenir une hormone sélectionnée du groupe qui consiste en acide indole acétique (IAA), acide naphthalène acétique (NAA) et acide indole butyrique (IBA).

0054. Sous un autre aspect supplémentaire du milieu de culture de la présente invention, le dit milieu de culture peut contenir une hormone sélectionnée du groupe qui consiste en kinetine, benziladenine (BA) Gibereline (GA) et Zeatine.

0055. Sous un autre aspect du milieu de culture de la présente invention, le dit milieu de culture peut contenir une source de carbone sélectionnée du groupe qui consiste en saccharose (sucrose), fructose et glucose.

0056. Sous la forme préférée, les rangs de concentrations des composants de la culture de la méthode de la présente invention sont les suivants :

NH_4NO_3	100 – 500 mg/L
CaNO_3 , ou KNO_3	200 – 400 mg/L
CuSO_4	0.1 – 5 mg/L
MnSO_4	10 – 40 mg/L
ZnSO_4	20 – 50 mg/L
H_3BO_3	10 – 20 mg/L
KH_2PO_4	50 – 200 mg/L



Na ₂ MoO ₄	0.1 – 5 mg/L
EDTA (acide éthyle diamine tétra acétique)	10 – 50 mg/L
FeSO ₄	10 – 50 mg/L
CaCl ₂ , ou KCl	50 – 100 mg/L
CaCO ₃	30 – 50 mg/L
NaC ₆ H ₇ O ₇ (Citrates de Sodium)	0.1 – 10 mg/L
MgSO ₄	50 – 300 mg/L
K ₂ SO ₄	700 – 1500 mg/L
thiamine	0.5 – 3 mg/L
glycine	0.5 – 3 mg/L
inositol	50 – 200 mg/L
acide nicotinique	0.1 – 10 mg/L
pyridoxine	0.1 – 10 mg/L
biotine	0.1 – 10 mg/L
glutamine	20 – 50 mg/L
IAA, ou NAA, ou IBA	0.5 – 10 mg/L
zéatine, ou kinetine, ou BA, ou GA	0.5 – 10 mg/L
saccharose, ou glucose, ou fructose	30000 – 100000 mg/L,
y	
hemicellulase, et pectinase, et cellulase	3000 – 5000 mg/L



0057. Sous la forme préférée du milieu de culture de la présente invention le EDTA est disodique. Le EDTA-monosodique peut aussi être utilisé dans la méthode de la présente invention.

0058. Sous la forme préférée du milieu de culture de la présente invention, le inositol est myo-inositol.

0059. Sous la forme préférée le milieu de culture de la présente invention s'ajuste à un pH de entre 4.8 et 6.5.

0060. Tandis que la description présente les versions préférées de la présente invention, on peut faire des changements supplémentaires sous la forme et la disposition des parties sans s'éloigner des idées ou principes de base compris dans les revendications.

EXEMPLES

0061. Semences mures de *Jatropha curcas*, auparavant nettoyées et lavées avec de l'eau et du savon, ont été désinfectées par des lavages à l'éthanol ; ensuite les dites semences ont été hydratées en étant enveloppées dans un papier humidifié avec de l'eau stérile ; par la suite, les semences furent stérilisées avec des bains d'hypochlorite de sodium à 3% ; ensuite l'enveloppe de la semence fut retirée à l'aide d'un bistouri ; du cotylédon résultant de la semence de *Jatropha curcas* on a coupé des ex-plants ou portions transversales laminaires d'une épaisseur de 1 à 2 mm.



0062. Entre 1 et 3 grammes d'ex-plants de cotylédon de semence de *Jatropha curcas* ont été placées dans 100 ml de milieu de culture avec la composition suivante et les concentrations suivantes :

NH ₄ NO ₃	400 mg/L
CaNO ₃	383 mg/L
CuSO ₄	0.25 mg/L
MnSO ₄	22.3 mg/L
ZnSO ₄	8.6 mg/L
H ₃ BO ₃	6.2 mg/L
KH ₂ PO ₄	170 mg/L
Na ₂ MoO ₄	0.25 mg/L
Na ₂ EDTA (acide éthylène diamine tétra acétique)	37.3 mg/L
FeSO ₄	27.85 mg/L
CaCl ₂	72.5 mg/L
CaCO ₃	20 mg/L
NaC ₆ H ₇ O ₇ (Citrates de Sodium)	0.5 mg/L
MgSO ₄	180.7 mg/L
K ₂ SO ₄	990 mg/L
thiamine	1 mg/L
glycine	2 mg/L



myo-inositol	100 mg/L
acide nicotinique	0.5 mg/L
pyridoxine	0.5 mg/L
biotine	1 mg/L
glutamine	30 mg/L
IAA	2 mg/L
kinetine	1 mg/L
saccharose	50000 mg/L, y
pectinase, et cellulase	5000 mg/L

0063. Le milieu de culture s'ajuste à un pH de 5.8 avec des solutions de HCl et/ou NaOH 0.1 N.

0064. Le dit milieu de culture a été incubé sous agitation constante à température ambiante, dans l'obscurité pendant 15 jours lorsqu'on a observé que le tissu des ex-plants s'était transformé en cellules en se multipliant individuellement avec une densité d'environ 2×10^5 cellules individuelles par millilitre.

0065. Les cellules se sont séparées du milieu de culture et ont été ré-inoculées en 100 ml de milieu de culture frais de composition et concentration égales en continuant l'incubation sous agitation constante dans l'obscurité pendant environ 10 jours de plus quand les cellules en se multipliant ont atteint un état stationnaire (approximativement 2×10^6 cellules individuelles par millilitre).

0066. Aux 100 ml de milieu de culture avec des cellules individuelles dans une densité d'environ 2×10^6 cellules individuelles par millilitre on a ajouté 100 ml d'hexane. Le mélange en résultant a été soumis à sonication durant 90 minutes. Ensuite le mélange a été centrifugé à 2500 rpm durant 30 minutes. Après la centrifugation il en est résulté une phase supérieure et une phase inférieure. La phase supérieure s'est séparée et a été transférée à un récipient qui s'est rota-éaporé à 70°C, et à a 180 rpm, et ensuite a été mis dans une poêle pendant 1 heure à 75 °C. L'huile en résultant a pesé 1.978 grammes (le rendement en résultant fut de de 19.78 grammes/L).

0067. L'huile a été analysée donnant les résultats de la table suivante :

Table 1: composition estimée en acides gras d'échantillon d'huile. Composition estimées d'échantillon d'huile (chromatographie gazeuse accouplée à des masses.

ACIDE GRAS	TEMPS DE RÉTENTION (Min)	COMPOSITION
%(p/p)		
Myristique	11.766	0.26
Acide Nonanoïque	13.155	0.15
Palmitique	13.460	19.96
Palmitoléïque	13.698	0.61

Stéarique	14.994	8.64
Oléique	15.188	38.46
Linoléique	15.555	31.35
Eicosanoïde	16.387	0.56

0068. La composition de l'huile obtenue des cellules individuelles dérivées du cotylédon de la semence de *Jatropha curcas*, par la méthode de la présente invention, est similaire à ce qui a été reporté en littérature, comme démontré dans le tableau suivant obtenu de Akintayo, E.T., Bioresource Technology 92 (2004) 307–310.

Table 3 of Akintayo, page 309.

Fatty acid composition (%)^a of PKBS (*Parkia biglobbosa*) and JTC (*Jatropha curcas*) seeds oils

Acide Gras	PKBS	JTC
Palmitique	27.5±0.5	19.5±0.8
Stéarique	10.5±0.4	6.8±0.6
Oléique	14.5±0.5	41.3±1.5
Linoléique	44.5±1.5	31.4±1.2
Linoléinique	3.0±0.2 –	
Saturé	38	26.3
Non saturé	62	72.7

a Les valeurs sont moyenne \pm déviation standard de déterminations doublées.

0069. La composition de l'huile dérivée de *Jatropha curcas* résultant de la méthode de la présente invention peut se comparer à la composition de l'huile dérivée de *Jatropha curcas* décrite dans la littérature. C'est pour cette raison, l'huile dérivée de *Jatropha curcas*, résultant de la méthode de la présente invention possède les caractéristiques requises dans un biodiesel de haute qualité comme décrit dans la littérature par rapport a l'huile dérivée de *Jatropha curcas*.



REVENDICATIONS

1. Une méthode pour produire de l'huile dérivée d'une semence où la méthode comprend :
 - A. Obtenir un ex-plant de la semence ;
 - B. Mettre l'ex-plant dérivé de la semence dans un milieu de culture ;
 - C. Rompre les unions intercellulaires du tissu des ex-plants dérivés de la semence dans ce milieu de culture, où les ex-plants génèrent des cellules individuelles ;
 - D. Incuber pour un temps déterminé le milieu de culture avec les cellules individuelles générées des ex-plants dérivés de la semence où dans le temps déterminé les dites cellules individuelles se multiplieront ; et,
 - E. Extraire de l'huile des cellules qui se sont multipliées à partir des cellules individuelles générées des ex-plants dérivés de la semence.

2. La méthode de Revendication 1, là où la semence est une semence d'une plante oléagineuse.

3. Une méthode pour produire de l'huile dérivée d'une semence de *Jatropha curcas*, où la méthode comprend :
 - A. Obtenir un ex-plant de la semence de *Jatropha curcas*;



- B. Mettre l'ex-plant dérivé de la semence de *Jatropha curcas* dans un milieu de culture ;
 - C. Rompre les unions intercellulaires du tissu des ex-plants dérivés de la semence de *Jatropha curcas* dans le dit milieu de culture où les ex-plants génèrent des cellules individuelles ;
 - D. Incuber pour un temps déterminé le milieu de culture avec les cellules individuelles générées des ex-plants dérivés de la semence de *Jatropha curcas*, où dans le temps déterminé les dites cellules individuelles se sont multipliées ; et,
 - E. Extraire de l'huile des cellules qui se sont multipliées à partir des cellules individuelles générées des ex-plants dérivés de la semence de *Jatropha curcas*.
4. La méthode de revendication 3, où l'ex-plant est obtenu de la semence de *Jatropha curcas* par un procédé qui comprend :
- A. Désinfecter la semence de *Jatropha curcas* avec de l'éthanol là où dite semence est lavée avec de l'éthanol ;
 - B. Hydrater la dite semence de *Jatropha curcas* désinfectée avec un papier humidifié avec de l'eau stérile où le papier humidifié avec de l'eau stérile est enroulé autour de la semence de *Jatropha curcas*;



- C. Stériliser la semence de *Jatropha curcas* hydratée avec de l'hypochlorite de sodium où la dite semence de *Jatropha curcas* une fois hydratée est lavée avec de l'hypochlorite de sodium ;
 - D. Retirer l'enveloppe de la semence de *Jatropha curcas* stérilisée où comme résultat on libère le cotylédon de la semence de *Jatropha curcas* ; et,
 - E. Obtenir des ex-plants du cotylédon de la semence de *Jatropha curcas*.
5. La méthode de la Revendication 3 où le milieu de culture contient au moins NH_4NO_3 , CaNO_3 , CuSO_4 , MnSO_4 , ZnSO_4 , H_3BO_3 , KH_2PO_4 , Na_2MoO_4 , EDTA, FeSO_4 , CaCl_2 , CaCO_3 , $\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_7$ (Citrates de Sodium), MgSO_4 , K_2SO_4 , thiamine, glycine, inositol, acide nicotinique, pyridoxine, biotine, glutamine, Acide naphthalène acétique, zéatine, et une source de carbone.
6. La méthode de Revendication 3, où on ajoute au milieu de culture de la cellulase, de la pectinase et de l'hémicellulase et où la cellulase, la pectinase et l'hémicellulase rompent les unions intercellulaires du tissu des ex-plants dérivés de la semence de *Jatropha curcas* dans le dit milieu de culture.
7. La méthode de la Revendication 5, où le milieu de culture contient un sel sélectionné du groupe qui consiste en CaNO_3 , et KNO_3 .



8. La méthode de la Revendication 5, où le milieu de culture contient un sel sélectionné du groupe qui consiste en CaCl_2 , et KCl .

9. La méthode de la Revendication 5, où le milieu de culture contient une hormone sélectionnée du groupe qui consiste en acide indole acétique (IAA), acide naphthalène acétique (NAA), et acide indole butyrique (IBA).

10. La méthode de Revendication 5, où le milieu de culture contient une hormone sélectionnée du groupe qui consiste en kinetine, benziladenine (BA), Gibereline (GA), et Zeatine.

11. La méthode de la Revendication 5, où le milieu de culture contient une source de carbone sélectionnée du groupe qui consiste en saccharose (sucrose), fructose, et glucose.

12. La méthode de Revendication 3, où l'huile est extraite du milieu de culture avec les cellules individuelles qui se sont multipliées à partir des cellules individuelles générées des ex-plants dérivés de la semence de *Jatropha curcas* au moyen d'un procédé qui comprend :
 - A. Ajouter un solvant organique ;
 - B. Sonication ;
 - C. Centrifugation ;



- D. Extraction de la phase supérieure ; et,
 - E. Évaporation et séchage du solvant.
13. Un milieu de culture où le milieu de culture comprend NH_4NO_3 , CaNO_3 , CuSO_4 , MnSO_4 , ZnSO_4 , H_3BO_3 , KH_2PO_4 , Na_2MoO_4 , EDTA, FeSO_4 , CaCl_2 , CaCO_3 , $\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_7$ (Citrates de Sodium), MgSO_4 , K_2SO_4 , thiamine, glycine, inositol, acide nicotinique, pyridoxine, biotine, glutamine, Acide naphthalène acétique, zéatine, et une source de carbone.
14. Le milieu de culture de la Revendication 13, où le milieu de culture contient de la cellulase, pectinase et hemicellulase.
15. Le milieu de culture de la Revendication 13, où le milieu de culture contient un sel sélectionné du groupe qui consiste en CaNO_3 , y KNO_3 .
16. Le milieu de culture de la Revendication 13, où le milieu de culture contient un sel sélectionné du groupe qui consiste en CaCl_2 , y KCl .
17. Le milieu de culture de la Revendication 13, où le milieu de culture contient une hormone sélectionnée du groupe qui consiste en acide indole acétique (IAA), acide naphthalène acétique (NAA), y acide indole butyrique (IBA).



18. Le milieu de culture de la Revendication 13, où le milieu de culture contient une hormone sélectionnée du groupe qui consiste en kinétine, benziladeninae(BA), Gibbereline (GA), et Zéatine.

19. Le milieu de culture de la Revendication 13 où le milieu de culture contient une source de carbone sélectionnée du groupe qui consiste en saccharose (sucrose), fructose, et glucose.

