



(12) FASCICULE DE BREVET

- (11) N° de publication : **MA 34793 B1** (51) Cl. internationale : **C12N 1/12**
- (43) Date de publication : **02.01.2014**

-
- (21) N° Dépôt : **35014**
- (22) Date de Dépôt : **28.06.2012**
- (71) Demandeur(s) : **MASCIR (MORROCAN FOUNDATION FOR ADVANCED SCIENCE INNOVATION & RESEARCH), RUE MOHAMED EL JAZOULI, MADINAT AL IRFANE RABAT 10100 (MA)**
- (72) Inventeur(s) : **Imane WAHBY ; Iman BENNIS ; Hicham EL ARROUSSI ; Redouane BENHIMA**
- (74) Mandataire : **MOHAMED EL AMRANI**

-
- (54) Titre : **PROCÉDÉ POUR AUGMENTER LE POTENTIEL DE PRODUCTION DE BIOCARBURANT À PARTIR DE MICROALGUES EN UTILISANT DES BIO-MODULATEURS**
- (57) Abrégé : LA PRÉSENTE INVENTION OFFRE UNE MÉTHODE DE CULTURE ET TRAITEMENT DES MICROALGUES ISOLÉES DES ENVIRONNEMENTS MARINS ET EXTRÊMOPHILES POUR UNE PRODUCTION OPTIMALE DE BIODIESEL. LES ESPÈCES DE MICROALGUES SÉLECTIONNÉE PEUVENT ÊTRE DES ESPÈCES DU GENRE DUNALIELLA (D.BARDAWIL, D.ACIDOPHILA, D. BIOLECTA, D.LATERALIS, D. MARITIMA, D. MINUTA, D. PARVA, D.PEIRCEI, D. POLYMORPHA, D. PRIMOLECTA, D. PSEUDOSALINA, D. QUARTOLECTA, D. TERTIOLECTA, D. VIRIDIS ET AUTRES). POUR LA CULTURE DES MICROALGUES POUR LA PRODUCTION DE BIODIESEL, LES CONDITIONS OPTIMALES POUR LA PRODUCTION DE BIOMASSE ET DE LIPIDES SONT DIFFÉRENTES. CETTE INVENTION DONNE UNE MÉTHODE QUI PERMET DE STIMULER SIMULTANÉMENT L'ACCUMULATION DE LA BIOMASSE ET DES LIPIDES INTRACELLULAIRES (PLUS DE 60% PAR POIDS SEC), ESSENTIELLEMENT LES LIPIDES NEUTRES RECHERCHÉS POUR LA PRODUCTION DU BIODIESEL, EN RENFORÇANT L'ACTION DES BIO-MODULATEURS NATURELS OU DES ANALOGUES CHIMIQUES (AUXINES, CYTOQUININES, GIBBÉRELLINES, NAC1) DANS DES CONDITIONS HYPERSALINES ET ALCALINES. UN AUTRE ASPECT DE L'INVENTION EST L'APPLICATION DE MODIFICATIONS PONCTUELLES DU PH DES MILIEUX DE CULTURE PROVOQUANT LA PRÉCIPITATION SPONTANÉE DES CELLULES CHARGÉES EN LIPIDES UNE FOIS LE CYCLE DE CROISSANCE ET

D'EMMAGASINAGE DE LIPIDES DESTINÉES À LA PRODUCTION DE BIODIESEL FINALISÉ. CETTE MÉTHODE PERMET LA RÉCUPÉRATION RAPIDE ET PASSIVE, PEU DEMANDEUSE EN ÉNERGIE ET SANS L'ÉTAPE DE CENTRIFUGATION NI DE FILTRATION, DE LA BIOMASSE MICROALGALE POUR L'EXTRACTION DES LIPIDES INTRACELLULAIRES ET LEUR TRANSFORMATION EN BIODIESEL. CETTE MÉTHODE ASSURE DES CONDITIONS DE CULTURE TRÈS SÉLECTIVES AUX QUELLES UNIQUEMENT UN NOMBRE D'ESPÈCES DÉTERMINÉ PRÉSENTE UNE RÉPONSE SIMILAIRE ET/OU PEUT TOLÉRER, CE QUI LIMITE LES RISQUES DE CONTAMINATIONS, PAR D'AUTRES MICROALGUES, BACTÉRIES OU CHAMPIGNONS, ÉTANT UN PROBLÈME FRÉQUENT DANS LES SYSTÈMES DE CULTURES OUVERTS COMME LES BASSINS. CELA OFFRE UN SYSTÈME DE CULTURE DES MICROALGUES AVANTAGEUX ET APPLICABLE À GRANDE ÉCHELLE POUR L'APPLICATION BIOCARBURANT ET AUTRES.

Abrégé :

La présente invention offre une méthode de culture et traitement des microalgues isolées des environnements marins et extrémophiles pour une production optimale de biodiesel. Les espèces de microalgues sélectionnées peuvent être des espèces du genre *Dunaliella* (*D. bardawil*, *D. salina*, *D. acidophila*, *D. biolecta*, *D. lateralis*, *D. maritima*, *D. minuta*, *D. parva*, *D. peircei*, *D. polymorpha*, *D. primolecta*, *D. pseudosalina*, *D. quartolecta*, *D. tertiolecta*, *D. viridis* et autres).

Pour la culture des microalgues pour la production de biodiesel, les conditions optimales pour la production de biomasse et de lipides sont différentes. Cette invention donne une méthode qui permet de stimuler simultanément l'accumulation de la biomasse et des lipides intracellulaires (plus de 60% par poids sec), essentiellement les lipides neutres recherchés pour la production du biodiesel, en renforçant l'action des biomodulateurs naturels ou des analogues chimiques (auxines, cytoquinines, gibbérellines, NaCl) dans des conditions hypersalines et alcalines.

Un autre aspect de l'invention est l'application de modifications ponctuelles du pH des milieux de culture provoquant la précipitation spontanée des cellules chargées en lipides une fois le cycle de croissance et d'emmagasinage de lipides destinées à la production de biodiesel finalisé. Cette méthode permet la récupération rapide et passive, peu demandeuse en énergie et sans l'étape de centrifugation ni de filtration, de la biomasse microalgale pour l'extraction des lipides intracellulaires et leur transformation en biodiesel. Cette méthode assure des conditions de culture très sélectives aux quelles uniquement un nombre d'espèces déterminé présente une réponse similaire et/ou peut tolérer, ce qui limite les risques de contaminations, par d'autres microalgues, bactéries ou champignons, étant un problème fréquent dans les systèmes de cultures ouverts comme les bassins. Cela offre un système de culture des microalgues avantageux et applicable à grande échelle pour l'application biocarburant et autres.

02 JAN 2014

**Procédé pour augmenter le potentiel de production de biocarburant à partir de
microalgues en utilisant des bio-modulateurs**

Domaine de l'invention :

[0001] L'invention fournit une méthode et composition pour augmenter le potentiel d'une culture de microalgues pour la production de biocarburant, et autres produits à haute valeur ajoutée, en utilisant des bio-modulateurs dans des conditions de culture sélectives.

Etat de la technique :

[0002] Du à la diminution des réserves pétrolières mondiales ainsi que l'augmentation de la conscience mondiale envers le développement des énergies renouvelables, l'exploitation de nouvelles sources énergétiques alternatives aux carburants conventionnels attire de plus en plus l'attention mondiale. Parmi ces formes d'énergie propres on trouve le solaire, l'éolien et les biocarburants qui sont issus de sources biologiques fixatrices de carbone comme les organismes photosynthétiques. Ainsi, l'utilisation des biocarburants liquides dans le secteur du transport a connu une forte croissance due, majoritairement, aux politiques focalisées sur la sécurité énergétique et la diminution des émissions des gaz à effet de serre. Vu les contraintes techniques et socio-économiques liées à l'utilisation des biocarburants de première et deuxième génération (basés essentiellement sur utilisation de sources alimentaires comme les plantes pour la production de biodiesel), les biocarburants de troisième génération obtenus à partir des microalgues, semblent être la seule source de biocarburants de transport qui pourrait satisfaire la demande mondiale (Chisti 2007. *Biotechnol Adv*, 25: 294-306).

[0003] Les microalgues couvrent un groupe diversifié de microorganismes uni- ou pluricellulaires dont la plus part sont des organismes photosynthétiques. Ils couvrent les procaryotes (cyanobactérie ou Chloroxybacteria) et eucaryotes comme les algues vertes (Chlorophyta), algues rouges (Rhodophyta) et les diatomées (Bacillariophyta). Les avantages de l'utilisation des microalgues pour la production de biodiesel sont : (1) leur croissance rapide ; elles peuvent doubler leur biomasse en 3 à 3.5 h durant la phase exponentielle. (2) plusieurs espèces présentent un contenu lipidique élevé (20-60%) par poids sec de la cellule. (3) la production d'un kg de biomasse microalgale consomme 1.83 kg de CO₂ par fixation, ce qui contribuerait à la diminution des émissions des gaz à effet de serre. (4) la culture des microalgues fait appel à des ressources non utilisables en agriculture tels les terrains non arables ou les eaux de mer (pour les espèces marines) ou résiduaires, ne représentant aucune menace sur les ressources agricoles.

[0004] De ce fait, sur la base de l'efficacité photosynthétique et du taux de croissance des microalgues, les calculs théoriques indiquent que la production annuelle en huiles algale pourrait dépasser les 30, 000 L, ou 200 barils par hectares dans des cultures massives de microalgues. Soit 100 fois supérieur à certaines plantes oléagineuses comme le soja; principale source utilisée actuellement pour la production de biodiesel aux Etats Unis. Malgré tous ces avantages, certains handicaps retardent l'avancement de ce type de projets vers le

développement de procédés de production rentables à grande échelle. Parmi ces points critiques on cite: la méthode de culture, la productivité des microalgues et la méthode de récolte de la biomasse. Dans ce sens, le recours à la biotechnologie semble être la voie la plus prometteuse pour améliorer le rendement des microalgues oléagineuses et développer une industrie viable de biodiesel de troisième génération.

[0005] Le rendement des microalgues utilisées pour la production de biodiesel est essentiellement évalué en termes de croissance et de quantité et qualité des lipides accumulés par la cellule microalgale. Cependant, pour les microalgues, les conditions optimales de production de la biomasse et celles de production des lipides sont différentes. Griffiths et Harrison (2009) *J. Appli. Phycol.* 21 : 493-507 ont mentionné qu'il n'y a pas de corrélation entre le contenu lipidique et la productivité lipidique : certaines espèces riches en lipides (plus de 50% par poids sec) ont une productivité de moins de 20 mg/L/jour. De même des espèces avec un faible contenu lipidique (10% par poids sec) peuvent montrer des productivités considérables (plus de 50 mg/L/jour).

[0006] Un procédé de production de biodiesel rentable implique l'optimisation des deux aspects : croissance (biomasse) et contenu lipidique. La productivité peut être améliorée en modifiant les paramètres physicochimiques comme la température vu que les microalgues sont très sensibles aux conditions environnementales. Ainsi, face aux conditions adverses certaines microalgues peuvent répondre par une augmentation des lipides de réserves. Une autre méthode pour l'amélioration du rendement des microalgues est la modification des conditions de culture, par exemple le changement des conditions trophiques (U.S. Patent Publication 2009/0148928), ou le stress nutritionnel (U.S. Patent Appl. Publ. 2012/0088279, Rosenberg *et al.*, *Curr Opin Biotech* 19 : 430-436 (2008)). Cependant ces méthodes peuvent causer une répression de la croissance et donc une diminution de la productivité. D'autres parts, elles sont difficilement applicables à grande échelle pour une production industrielle.

Description de l'invention

[0007] L'invention offre un procédé de production de biodiesel à partir des microalgues optimisé à la fois pour la production de la biomasse et des lipides et pour la récupération passive de la biomasse une fois les microalgues sont chargées en lipides. Ce qui permet l'augmentation de la productivité de ces microalgues et la diminution du coût de production vu que la récolte de la biomasse se fait de manière passive.

[0008] Une culture de microalgues se réfère à une ou plusieurs espèces de microalgues vivant dans un environnement qui assure leur croissance et propagation. Les composants des cultures incluent généralement l'eau, le CO₂, les minéraux et la lumière (pour les espèces autotrophes). La température de culture est également contrôlée.

[0009] Un premier aspect de l'invention offre une méthode et composition pour la production de biodiesel à partir des microalgues marocaines. Le milieu de culture est basé sur l'eau de mer enrichie avec des niveaux non stressants de nutriments, essentiellement l'azote, phosphore et potassium, le fer et autres microéléments, les chélateurs et les tampons pour le contrôle du pH (Tris, MES, HEPES, MOPS, phosphate mono-, di- ou tri-basique, etc.). La température de croissance est comprise entre 20 et 35°C selon les espèces, pour les microalgues non thermophiles objet de cette invention.

[0010] Dans certains modes de réalisation, les espèces de microalgues choisies peuvent être des espèces oléagineuses et autres, appartenant aux classes des Chlorophyceae, Cyanophyceae, Bacillariophyceae, Xantophyceae, Chrysophyceae. Les microalgues oléagineuses sont les espèces qui peuvent, dans des conditions connues, accumuler un taux de lipides considérable par rapport à leur biomasse. Par exemple les microalgues oléagineuses sont capables d'accumuler des lipides jusqu'au moins 10%, au moins 20%, au moins 30%, au moins 40%, au moins 50% de leur biomasse. Ces microalgues peuvent appartenir aux genres *Dunaliella*, *Chlorella*, *Nannochloropsis*, *Haematococcus*, *skeletonemas*, *Melosira*, *Thalassiosira*, *Nitzschia*, *Navicula*, *Tetraselmis*, *Nannochloris*. Un des genres préférés pour la production de biodiesel est *Dunaliella* qui appartient à la classe des Chlorophyceae, ordre des Volvocales, famille des Dunaliellaceae, et contient les espèces suivants : *D. bardawil*, *D. salina*, *D. acidophila*, *D. biolecta*, *D. lateralis*, *D. maritima*, *D. minuta*, *D. parva*, *D. peircei*, *D. polymorpha*, *D. primolecta*, *D. pseudosalina*, *D. quartolecta*, *D. salina*, *D. tertiolecta*, *D. viridis* et autres capables de produire des lipides jusqu'au moins 10%, au moins 20% de la biomasse.

[0011] Dans certains modes de réalisation, l'espèce de microalgue peut être *Dunaliella tertiolecta*.

[0012] Un deuxième aspect de l'invention offre une méthode pour accélérer sélectivement la croissance des microalgues en utilisant des facteurs de croissance comme bio-modulateurs. Ces bio-modulateurs nommés de type I incluent au moins une, deux, trois, ou plusieurs molécules appartenant à la famille des auxines, cytokinines, gibbérellines, acide abscissique ou éthylène.

[0013] Les facteurs de croissance comme les phytohormones ou hormones végétales, les régulateurs de croissance et les molécules synthétiques ayant un effet similaire, sont impliqués ou contrôlent, entre autres, la division cellulaire, la croissance et le métabolisme des cellules végétales. La concentration et combinaison de ces phytohormones détermine leur mode d'action.

[0014] Dans certains modes de réalisation, les auxines peuvent être l'acide 2,4-Dichlorophenoxyacétique (2,4-D), l'acide 2,4,5-Trichlorophenoxyacétique (2,4,5-T), acide 1-naphtalène acétique (ANA), acide indole acétique (AIA), acide indole-3-butyrique (AIB).

[0015] Dans certains modes de réalisation, les cytokinines peuvent être la zéatine, thidiazuron (TDZ), benzylaminopurine (BAP), isopentényladénine (IPA), kinétine.

[0016] Dans certains modes de réalisation, les gibbérellines comprennent la GA₃.

[0017] Dans certains modes de réalisation, d'autres bio-modulateurs comme les molécules de signalisation peuvent être utilisées. Ces molécules incluent les jasmonates et l'acide salicylique à des concentrations allant de 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸ M dans le milieu de culture.

[0018] Dans certains modes de réalisation, le ratio (w/w) des bio-modulateurs en cas de mélange auxine : cytokinine, auxine : gibbérelline peut aller de 1 : 2 jusqu'à 2 : 1, de préférence 1 : 1.

[0019] Dans certains modes de réalisation, l'ajout de ce premier type de bio-modulateurs améliore la croissance des microalgues, 20%, 40%, 60%, 80%, 100% par rapport aux premières conditions de culture.

[0020] Dans certains modes de réalisation, les bio-modulateurs I sont additionnés en présence des vitamines B1 (Thiamine), B8 ou H (biotine) et B12 (cobalamine ou cyano-cobalamine) ou substances analogues ayant un effet similaire. Les vitamines sont ajoutées seules ou combinées, à des concentrations entre 0,005 et 0,05 mg/L de milieu de culture.

[0021] Dans certains modes de réalisation, l'ajout des bio-modulateurs I améliore l'accumulation du taux de lipides accumulés par unité de biomasse de 40%, 50%, 70% et 90%, 100% par rapport au control non traité.

[0022] Un autre aspect de l'invention est l'introduction d'un deuxième type de bio-modulateurs juste au début de la phase d'accumulation des lipides de réserves (entre 6 et 20 jours selon les espèces). Ce deuxième type de bio-modulateurs est des osmo-régulateurs qui potentialisent l'action du premier type de bio-modulateurs et engendre l'accumulation rapide des lipides. Pour les organismes biologiques ces sels minéraux interviennent dans : le contrôle de l'équilibre hydrique, l'action des hormones et enzymes, la régulation de l'équilibre acide-base (pH), la catalyse de nombreuses réactions biologiques, etc. Dans certains modes de réalisation, le temps d'ajout des osmo-régulateurs est décisif pour le rendement : l'addition précoce ou tardive des osmo-régulateurs peut diminuer le rendement et même causer le ralentissement de la croissance des microalgues.

[0023] Dans certains modes de réalisation, ce deuxième type de bio-modulateurs inclut NaCl, KCl ou autres osmo-régulateurs à des concentrations entre 0.5 et 5 M par rapport au milieu de culture.

[0024] Dans certains modes de réalisation, l'ajout de ce deuxième type de bio-modulateurs améliore le taux de lipides totaux. L'addition du deuxième groupe de bio-modulateurs (osmo-régulateurs) augmente le taux de lipides accumulés par unité de biomasse de 100%, 120%, 130%, 140%, 150%, 180%, 190% et plus de 200% par rapport au control.

[0025] Dans certains modes de réalisation, les osmo-régulateurs améliorent l'action des bio-modulateurs I entre 30 et 80% par rapport à l'utilisation des bio-modulateurs I seuls.

[0026] Dans certains modes de réalisation, les lipides neutres représentent généralement les lipides les plus recherchés pour la production de biodiesel. L'utilisation des bio-modulateurs I a amélioré l'accumulation des lipides neutres entre 5%, 20%, 30%, 50%, 90% et 120% et plus par rapport au contrôle. La combinaison des deux bio-modulateurs a significativement amélioré l'accumulation des lipides neutres avec une augmentation entre 60%, 70%, 140%, 150% et 170%.

[0027] Dans certains modes de réalisation les osmo-régulateurs ont potentialisé l'action du premier groupe de bio-modulateurs avec des pourcentages allant de 20%, 30%, 50%, 60%, 80% par rapport à l'utilisation des bio-modulateurs I seuls.

[0028] Dans certains modes de réalisation, cette combinaison de bio-modulateurs peut être utilisée pour la production d'autres produits à haute valeur ajoutée comme les caroténoïdes et les acides gras polyinsaturés.

[0029] Un autre aspect de l'invention est le développement d'une méthode pour la récolte passive (sans utilisation d'énergie) de la biomasse pour l'extraction des lipides. A la fin de la phase d'accumulation des lipides de réserves (et autres types de lipides) dans les cellules microalgales, la biomasse est séparée du milieu de culture par différentes méthodes seules ou combinées. Ces méthodes peuvent être la centrifugation, filtration sous pression, filtration mécanique ou autres, utilisées seules ou combinées. A l'échelle industrielle, vu les grands volumes utilisés, les centrifugeuses ou les appareils de filtrations sont de grande capacité (U.S. Patent Appl. Publ. No. 20040121447, U.S. Pat. No. 6,524,486) ce qui rend le procédé de récolte très coûteux. D'autres méthodes de séparation de la biomasse microalgale du milieu de culture en incluant des substances chimiques peuvent être utilisées. Ces substances ont un effet flocculant ou coagulant et peuvent être le sulfate d'aluminium, polyacrylamide ou autres. Cependant l'ajout de ces substances à la biomasse peut modifier sa composition et affecter négativement l'étape suivante qui est l'extraction des lipides. En plus, à l'échelle industrielle les cultures sont généralement réalisées en mode continue et l'élimination de ces substances du milieu après la récupération de la biomasse peut être très compliquée, d'où la difficulté d'appliquer ces méthodes de récupération de la biomasse à l'échelle industrielle.

[0030] La méthode proposée est basée sur des changements ponctuels du pH du milieu de culture pour maintenir les microalgues en suspension durant les phases d'accumulation de la biomasse et des lipides et provoquer la sédimentation des cellules chargées en lipides. Ces changements de pH varient entre 6 et 11. Un grand nombre d'acides peuvent être utilisés pour moduler le pH incluant l'acide chlorhydrique, l'acide lactique, l'acide acétique, l'acide sulfurique. De même, un grand nombre de bases peuvent être utilisés pour moduler le pH incluant l'hydroxyde de potassium, l'hydroxyde de sodium, l'hydroxyde de calcium. L'intérêt de cette méthode à l'échelle industrielle c'est qu'elle est à bas coût et réversible : une re-modification du pH après la récolte fait que les microalgues jeunes, utilisées pour un nouveau cycle de production, sont maintenues en suspension (état naturel) jusqu'à l'accumulation des lipides, et ainsi de suite.

[0031] Un autre aspect de l'invention offre un procédé de culture des microalgues et production de lipides adapté à une production industrielle de biodiesel à partir des microalgues. L'utilisation de conditions sélectives

augmente la productivité et limite la contamination par d'autres espèces surtout pour les cultures en bassins ouverts. La possibilité qu'offre le procédé, de récolter passivement la biomasse chargée en lipides, permet de faciliter la récolte de la biomasse et de diminuer le coût lié à la récolte de la biomasse par les techniques existantes comme la centrifugation ou la filtration.

[0032] Quand la biomasse microalgale est récoltée, les bioproduits (comme les lipides) sont libérés par des méthodes mécaniques (presse, billes en verre, choqué thermique ou osmotique, trituration, ultrasons ou autres méthodes connues), chimique (solvants, enzymes, surfactants ou autres). La séparation des lipides du reste de la biomasse peut se faire à l'aide d'un mélange de solvants comme l'hexane, méthanol, éthanol, isopropanol, chloroforme, di-chloro-méthane couplés généralement avec une méthode mécanique comme la centrifugation. Le produit isolé est donc traité de différentes manières suivant la finalité. Par exemple, pour la production de biodiesel à partir des lipides extraits de la biomasse, on peut appliquer une méthode connue qui est la transestérification comme l'exemple du processus utilisée en U.S. Pat. No. 5,354,878. Le protocole standard de transestérification implique un catalyseur alcalin ou acide pour transformer les triglycérides (et autres lipides) en esters d'acides gras (biodiesel) et glycerol.

Brève description des Figures

[0033] FIG.1. Montre un exemplaire de la courbe de croissance de *Dunaliella tertiolecta* en présence et absence des bio-modulateurs I. Le suivi de la croissance est effectué par mesure de la densité optique des cultures.

[0034] FIG.2. Montre un exemplaire de l'effet combiné des bio-modulateurs I et II sur la production des lipides par *Dunaliella tertiolecta* par rapport au control non traité. L'analyse des lipides est effectuée par gravimétrie après 14 jours du démarrage de la culture.

[0035] FIG. 3. Montre un exemplaire de l'effet combiné des bio-modulateurs I et II sur la production des lipides neutres par *Dunaliella tertiolecta* par rapport au control non traité et à l'application des bio-modulateurs I seuls. L'analyse des lipides est effectuée par cytométrie de flux après 4 jours de traitement.

Exemples :

[0036] Après la description détaillée de l'invention, les exemples spécifiques cités ci-dessous sont donnés pour illustrer certains aspects de l'invention.

Exemple 1. Effet de l'ajout des bio-modulateurs I sur l'accumulation de la biomasse de *Dunaliella tertiolecta*.

[0037] Les cultures des microalgues ont été réalisées (en triplicats et en trois expériences indépendantes) dans des bioréacteurs en verre ayant été préalablement stérilisés, contenant de l'eau de mer filtrée, stérilisée et enrichie avec le milieu de croissance f/2 (Guillard and Ryther 1962, Guillard 1975). Toutes les cultures ont été agitées par bullage en utilisant de l'air pur, et l'intensité lumineuse a été réglée à $65 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ sous un régime d'éclairage continu.

[0038] Un exemple de la composition du milieu f/2 est donné dans le Tableau 1.

Tableau 1

Composé	Quantité	Solution stock	Concentration finale
NaNO ₃	1 mL/L	75 g/L dH ₂ O	$8.83 \cdot 10^{-4}$ M
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	1 mL/L	5 g/L dH ₂ O	$3.63 \cdot 10^{-4}$ M
FeCl ₃ 6H ₂ O	1 ml/L	3.15 g/L dH ₂ O	$1 \cdot 10^{-5}$ M
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	1 ml/L	4.36 g/L dH ₂ O	$1 \cdot 10^{-5}$ M
CuSO ₄ 5H ₂ O	1 mL/L	9.8 g/L dH ₂ O	$4 \cdot 10^{-8}$ M
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	1 mL/L	6.3 g/L dH ₂ O	$3 \cdot 10^{-8}$ M
ZnSO ₄ 7H ₂ O	1 mL/L	22.0 g/L dH ₂ O	$8 \cdot 10^{-8}$ M
CoCl ₂ 6H ₂ O	1 mL/L	10.0 g/L dH ₂ O	$5 \cdot 10^{-8}$ M
MnCl ₂ 4H ₂ O	1 mL/L	180.0 g/L dH ₂ O	$9 \cdot 10^{-7}$ M

[0039] Pour préparer 1 L d'eau de mer enrichie avec le milieu f/2, 1 L d'eau de mer naturelle ou synthétique est filtré, autoclavé et additionné avec 1 ml des solutions stock stériles de NaNO₃, 1 ml NaH₂PO₄ H₂O et 1 ml des microéléments et 0,5 ml de solution vitamique. Le pH initial du milieu est ajusté à 7.2-7.8 avant inoculation des microalgues.

[0040] Dans cet exemple au moins 10 bio-modulateurs ont été sélectionnés incluant le 2,4-D (1 mg/L) et /ou AIA (1 mg/L) et /ou 6-BAP (1 mg/L) et /ou GA (1mg/L) et 3 vitamines: B1: 0.01 mg/L, B8 : 0.005 mg/ L et B12 0.05 mg/L (Tableau 2). Les solutions stocks sont préparées indépendamment, stérilisées par filtration (0.2 µm) avant de préparer la formule finale de bio-modulateurs I.

Tableau 2

Éléments inclus dans le Bio-modulateur I	Solution stock	Concentration finale (L ⁻¹)
Acide 2,4-Dichlorophenoxyacétique	1 mg/ml	1 mg
Acide Indole-3-acétique	1 mg/ml	1 mg
6-Benzylaminopurine	1 mg/ml	1 mg
Acide gibbérellique	1 mg/ml	1 mg
Vitamine B1	200 mg/L	0.1 mg
Vitamine B8	1 mg/L	0.0005 mg
Vitamine B12	1 mg/L	0.0005 mg

[0041] La croissance de microalgues a été mesurée par des prélèvements réguliers tous les 2 jours pour mesurer la densité optique. Dans le tableau 3, il est évident que l'ajout du groupe I de bio-modulateurs a engendré une augmentation de l'accumulation de la biomasse, essentiellement à des concentrations entre 0.5 et 1 mg/L de milieu durant la phase de croissance active de *Dunaliella tertiolecta*. Ce qui améliore sa croissance pour une postérieure application dans la production de produits issus de microalgues. Selon la Figure 1, l'application des bio-modulateurs I aux concentrations choisies améliore la croissance entre 20%, 30%, 40%, 50% et 60% par rapport au control non traité. Dans la plus part des cas, cette amélioration était de 40% dans le cas des espèces du genre *Dunaliella*.

Tableau 3

Effet des différentes concentrations de bio-modulateurs I sur la croissance de <i>Dunaliella tertiolecta</i>					
Concentration des Bio-modulateurs I	Contrôle	0.5 mg/L	1 mg/L	1.5 mg/L	
Croissance exprimée en densité optique	T0	0.029 ± 0.001	0.030 ± 0.01	0.030 ± 0.001	0.024 ± 0.006
	T0+2	0.126 ± 0.012	0.189 ± 0.006	0.139 ± 0.009	0.155 ± 0.010
	T0+4	0.306 ± 0.020	0.361 ± 0.030	0.321 ± 0.010	0.289 ± 0.040
	T0+6	0.402 ± 0.040	0.523 ± 0.024	0.511 ± 0.022	0.452 ± 0.042
	T0+8	0.518 ± 0.050	0.700 ± 0.020	0.710 ± 0.040	0.550 ± 0.043

Exemple 2. Effet des bio-modulateurs I et II sur l'accumulation des lipides totaux : analyses gravimétrique

[0042] L'exemple traite l'effet des bio-modulateurs I et II combinés sur l'accumulation des lipides chez deux souches de *Dunaliella tertiolecta*. Les souches utilisées dans l'exemple sont *D. tertiolecta* (SAG 13.86) et *D. tertiolecta* (MAR 029) isolée du Maroc. Les cultures ont été réalisées comme décrit dans l'exemple 1. Le groupe I de bio-modulateurs a été initialement additionné au milieu de culture et après 8 à 10 jours, le groupe II contenant des osmo-régulateurs a été additionné au milieu pour potentialiser l'action du groupe I. Les osmo-régulateurs (NaCl ou KCl) ont été préparés en solutions concentrées et les volumes nécessaires ont été ajoutés au milieu de culture pour avoir une concentration finale de 1 à 5M. Dans cet exemple la concentration d'osmo-régulateurs utilisée était 2 M. Après 4 jours de culture en présence des deux bio-modulateurs, la biomasse microalgale est récoltée (en utilisant la méthode décrite dans l'exemple 4. Les lipides totaux sont extraits en utilisant un protocole modifié à partir de la méthode de (Bligh et Dyer, 1959). L'extraction des lipides se fait après soumission de la biomasse à un traitement par ultrasons pendant 15 min pour la rupture des cellules. L'extraction chimique est par la suite réalisée en utilisant un mélange de chloroforme : méthanol : eau (2 : 1 : 0.75 v : v : v) suivie d'une centrifugation pendant 3 min pour séparer les phases organique et aqueuse. La phase organique est récupérée et additionnée avec du chlorure de sodium (0.9%, 1 : 5 v : v) et du sulfate de magnésium. Pour éviter l'oxydation des lipides, le protocole inclue l'utilisation de 1 à 5 ml de BHT (10%). Les solvants sont finalement évaporés et le poids des lipides mesuré.

[0043] Le Tableau 4 montre l'amélioration des lipides suite aux traitements. L'ajout du groupe I de bio-modulateurs améliore l'accumulation des lipides (Figure 2). On note que l'utilisation du groupe I de bio-modulateurs a amélioré le taux de lipides accumulés de 40%, 50% ,70% et 96% par rapport au control. L'addition du deuxième groupe de bio-modulateurs (osmo-régulateurs) a augmenté le taux de lipides accumulés de 120%, 140%, 180%, 190% et plus de 200% par rapport au control. Ainsi, les osmo-regulateurs ont amélioré l'action des bio-modulateurs I entre 30 et 60% par rapport à l'utilisation des bio-modulateurs I seuls. Dans cet exemple la meilleure combinaison était d'utiliser les bio-modulateurs I entre 0.5 et 1 mg/L et les osmo-régulateurs à 2 M.

Tableau 4

Effet de la combinaison des bio-modulateurs I et II sur l'accumulation des lipides chez <i>Dunaliella tertiolecta</i> . Les lipides sont quantifiés par gravimétrie et exprimés en % (g de lipide par g de biomasse)				
Organisme	Traitement			
<i>D. tertiolecta</i> (SAG 13.86)		<i>0.5 mg/L</i>	<i>1 mg/L</i>	<i>1.5 mg/L</i>
	Bio-modulateurs I	38.33 %	43.14 %	35.02 %
	Bio-modulateurs I+II	68.31 %	69.55 %	54.56 %
	Contrôle	24.39 %		
<i>D. tertiolecta</i> (MAR 029)	Bio-modulateurs I	48.62 %	42.04 %	37.13 %
	Bio-modulateurs I+II	65.56 %	62.2 %	51.26 %
	Contrôle	21.39 %		

Exemple 3. Effet des bio-modulateurs I et II sur l'accumulation des lipides neutres: analyses par cytométrie de flux

[0044] Les lipides neutres représentent généralement les lipides les plus recherchés pour la production de biodiesel. Les lipides neutres peuvent être analysés par différentes méthodes dont la cytométrie de flux. L'utilisation de cette méthode pour l'analyse des lipides des microalgues a été préalablement développée (Doan *et al.* 2011. *Bio Bioener*, 35: 2534-2544 ; Lopes da Silva *et al.* 2009. *Appl Biochem Biotechnol*, 159: 568-578 ; Alonzo et Mayzaud 1999. *Marine Chem*, 67: 289-301). La visualisation des lipides dans le cytomètre est possible suite à un marquage avec un marqueur fluorescent nommé rouge Nile qui, après excitation par un laser à 488 nm, émet une fluorescence jaune intense (longueur d'émission 560-640 nm) quand il est associé aux lipides neutres. Quand le rouge Nile est dissocié dans des lipides polaires il émet une fluorescence rouge à plus de 650 nm (ces longueurs d'émission sont spécifiques à l'équipement utilisé : dans ce cas c'est un FACS Calibur system, Becton Dickinson). Pour le marquage des cellules de microalgues, 1 ml de culture est additionné avec 50 µl d'une solution stock de NR (préparé en acétone) et le mélange est incubé entre 2 à 10 min à 37°C en obscurité. L'échantillon est ensuite analysé dans le cytomètre en utilisant les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission mentionnées.

[0045] L'analyse de l'accumulation des lipides neutres suite aux traitements bio-modulateur I et I+II a été effectuée chaque 2 jours. Le Tableau 5 indique l'effet positif de la combinaison des deux bio-modulateurs I et II sur l'accumulation des lipides neutres par deux souches de *Dunaliella tertiolecta*. Les souches utilisées dans l'exemple sont *D. tertiolecta* (SAG 13.86) et *D. tertiolecta* (MAR 029) isolée du Maroc. On constate que l'utilisation des bio-modulateurs I a amélioré l'accumulation des lipides neutres entre 5%, 20%, 30%, 50%, 90% et 120% par rapport au contrôle, selon le traitement et la souche. La meilleure réponse a été obtenue en utilisant une concentration de bio-modulateur I de 1 mg/L et la souche MAR029 a généralement montré une meilleure réponse au traitement. La combinaison des deux bio-modulateurs a significativement amélioré l'accumulation des lipides avec une augmentation entre 60%, 70%, 140%, 150% et 170%. Par rapport au contrôle. Il est évident que les osmo-régulateurs ont potentialisé l'action du premier groupe de bio-modulateurs avec des pourcentages allant de 20%, 30%, 50% et plus de 60% par rapport à l'utilisation des bio-modulateurs I seuls (Figure 3).

Unité arbitraire de fluorescence : F/F_A

F : fluorescence de l'échantillon après marquage

F_A : auto-fluorescence de l'échantillon avant marquage

Tableau 5

Effet de la combinaison des de bio-modulateurs I et II sur l'accumulation des lipides neutres chez <i>Dunaliella tertiolecta</i> . Les lipides sont analysés par cytométrie de flux et exprimés en unité arbitraire de fluorescence				
Organisme	Traitement			
<i>D. tertiolecta</i> (SAG 13.86)	Bio-modulateurs I	<i>0.5 mg/L</i>	<i>1 mg/L</i>	<i>1.5 mg/L</i>
		16.9	20.9	18.8
	Bio-modulateurs I+II	26.7	26.1	25.6
	Contrôle	15.9		
<i>D. tertiolecta</i> (MAR 029)	Bio-modulateurs I	31.6	35.5	24.9
	Bio-modulateurs I+II	39.1	44.7	40.5
	Contrôle	16.3		

Exemple 4. Récupération passive de la biomasse

[0046] Après accumulation des lipides, la biomasse microalgale doit être récupérée quand le maximum des lipides est accumulé, sinon ces lipides peuvent être consommés par la cellule pour répondre à ces propres besoins énergétiques. Différentes méthodes peuvent être utilisées pour séparer la biomasse du milieu de culture comme la centrifugation ou la filtration. L'exemple 4 offre l'évidence que la méthode développée permet de maintenir les cellules en suspension durant la phase de croissance et d'accumulation des lipides (changement périodiques de pH entre 6 et 8). Une fois les cellules chargées de lipides des modifications ponctuelles du pH entre (7 et 11) ont permis de les précipiter. Le pH maximal à appliquer en combinaison avec les bio-modulateurs II est 10.5. Différents temps de soumission aux fluctuations de pH ont été appliqués (30 min à 2 h) avec une totale précipitation de la biomasse riche en lipides à 2 heures du dernier changement brusque de pH. Le Tableau 6 montre l'effet progressif de la dernière modification du pH sur la précipitation des cellules chargées de lipides, cette modification de pH est appliquée 4 jours après le traitement avec les osmo-régulateurs. Le contrôle positif est une biomasse pour laquelle cette dernière modification du pH n'a pas été appliquée. Les résultats obtenus ont été comparés avec le contrôle positif et avec une biomasse du même âge et mêmes pourcentage de lipides (70%) maintenue a des pH entre 6 et 8 (selon l'état de la culture) et centrifugée durant 5 min à 5000 rpm.

Tableau 6

Effet de la dernière modification du pH sur la précipitation des cellules de microalgues traitées avec les bio-modulateurs I et II. Les résultats sont exprimés en densité optique

Organisme	Traitement	30 min		1 h		2 h	
		KOH	NaOH	KOH	NaOH	KOH	NaOH
<i>D. tertiolecta</i> (SAG 13.86)	pH=9,5	0,311	0,287	0,090	0,086	0,057	0,048
	pH=10	0,251	0,312	0,123	0,097	0,046	0,051
	pH=10,5	0,227	0,230	0,173	0,187	0,010	0,020
	Control non traité	0,521					
	Biomasse centrifugée	0,010					

[0047] La dernière modification brusque de pH a engendré une précipitation rapide des cellules chargées de lipides essentiellement après 2h de maintien de cette valeur de pH. On constate la récupération de 90 à 100% des cellules de *Dunaliella tertiolecta* traitées sans aucun traitement additionnel, et à la fin la DO a été équivalente à celle obtenue après une récupération par centrifugation.

Revendications

1. Procédé de production de biodiesel à partir des microalgues caractérisé en ce qu'il comprend:
 - (1) utilisation des microalgues marocaines pour la production de biodiesel, contenant au moins une espèce de microalgues.
 - (2) introduction d'un premier type de bio-modulateurs (bio-modulateurs I) pour stimuler la croissance de ces microalgues et aussi le contenu lipidique et donc une meilleure quantité et qualité de la biomasse.
 - (3) introduction, dans les cultures, d'un deuxième type de bio-modulateurs (bio-modulateurs II) dont l'action, combinée à celle du premier groupe, stimule la production des lipides recherchés pour la production de biodiesel.
 - (4) Récupération passive de la biomasse par des changements ponctuels des valeurs du pH du milieu de culture.
2. Procédé de production de biodiesel. Selon la revendication 1, caractérisé en ce que la matière première (microalgues) utilisées est des espèces appartenant aux classes des Chlorophyceae, Cyanophyceae, Bacillariophyceae, Xantophyceae, Chrysophyceae. Ces microalgues peuvent appartenir aux genres *Dunaliella*, *Chlorella*, *Nannochloropsis*, *Haematococcus*, *skeletonemas*, *Melosira*, *Thalassiosira*, *Nitzschia*, *Navicula*.
3. Procédé de production de biodiesel. Selon la revendication 1, caractérisé en ce que la microalgue utilisée est *Dunaliella tertiolecta*.
4. Procédé de production de biodiesel. Selon la revendication 1, caractérisé en ce que la méthode inclue 3 étapes : production de la biomasse, production des lipides et récupération des microalgues riches en lipides.
5. Procédé de production de biodiesel. Caractérisé en ce que l'étape (2) utilise un premier groupe de bio-modulateurs pour accélérer l'accumulation de la biomasse microalgale et diminuer le temps utilisé pour l'accumulation d'une biomasse déterminée. Les bio-modulateurs utilisés dans cette étape peuvent être, mais non pas limités à ceux cités, une auxine (Acide 2,4-Dichlorophenoxyacétique 2,4-D, Acide naphthalène acétique ANA, Acide indole acétique AIA, acide indole butyrique AIB), une cytokinique (zéatine, thidiazuron TDZ, benzylaminopurine BAP, isopentényladénine IPA, kinétine), une gibbérelline (acide gibbérellique GA₃), un composé de structure ou fonction similaire à une auxine, un composé de structure ou fonction similaire à une cytokinine, un facteur de croissance, un promoteur de croissance, des molécules impliquées dans la signalisation cellulaire (acide salicylique SA, acide jasmonique JA, methyl jasmonate MeJa).
6. Procédé de production de biodiesel. Selon la revendication 5, caractérisé en ce que pour l'étape 2, le premier groupe de bio-modulateurs peut être utilisé à des concentrations de 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2 mg/L. Les traitements utilisés incluent l'utilisation de bio-modulateurs seuls ou combinés. Les meilleures concentrations étant entre 0.5 – 1 mg/L.
7. Procédé de production de biodiesel. Selon la revendication 5, caractérisé en ce que la méthode inclue les vitamines B1, B8, B12 ou des substances ayant un effet similaire.

8. Procédé de production de biodiesel. Selon les revendications 5-7, caractérisé en ce que pour l'étape 2, le groupe de bio-modulateurs I est ajouté aux cultures de microalgues pendant la phase de croissance active : le même jour du lancement de la culture ou deux jours après ou quatre jours après suivant les espèces.

9. Procédé de production de biodiesel. Caractérisé en ce que l'étape 3 est réalisée par l'introduction d'un deuxième groupe de bio-modulateurs qui potentialise l'action du premier groupe et stimule l'accumulation rapide des lipides dans les cellules microalgales. Ce deuxième groupe de bio-modulateurs représente les sels minéraux ayant un rôle osmo-régulateurs comme le NaCl, KCl et autres.

10. Procédé de production de biodiesel. Selon les revendications 5 et 9, caractérisé en ce que la méthode est caractérisée par la combinaison des bio-modulateurs de type I et II

11. Procédé de production de biodiesel. Selon la revendication 1, caractérisé en ce que la méthode est utilisée pour la production des lipides et des produits algaux à haute valeur ajoutée comme les caroténoïdes et les acides gras polyinsaturés.

Figure 1

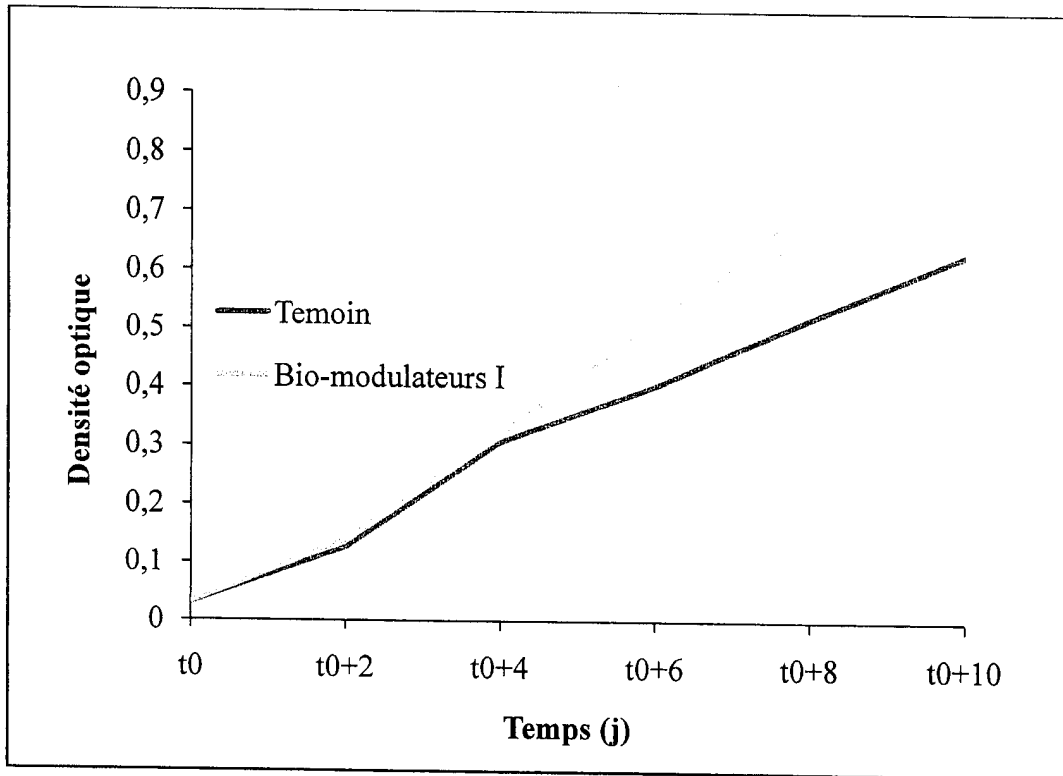


Figure 2

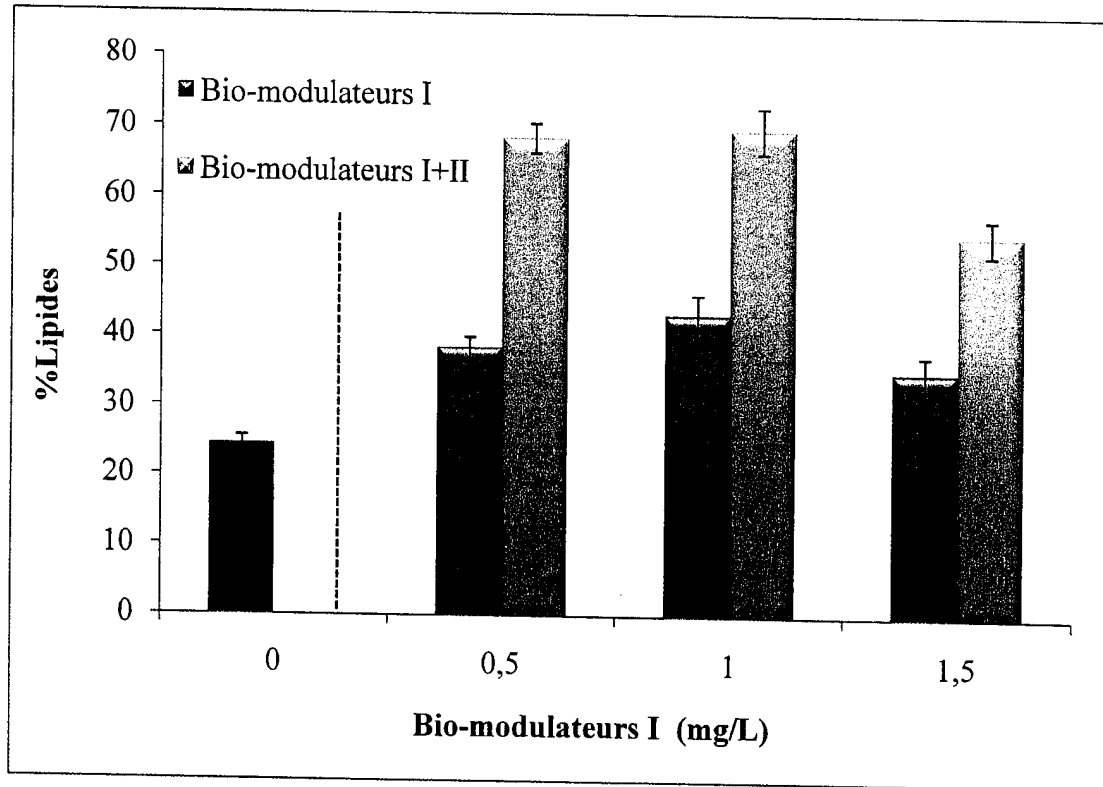


Figure 3

