

SESSION 2014

---

**CAPET  
CONCOURS EXTERNE  
ET CAFEP**

**Section : BIOTECHNOLOGIES  
Option : BIOCHIMIE – GÉNIE BIOLOGIQUE**

**ÉTUDE D'UN SYSTÈME, D'UN PROCÉDÉ  
OU D'UNE ORGANISATION**

Durée : 5 heures

---

*Calculatrice électronique de poche - y compris calculatrice programmable, alphanumérique ou à écran graphique – à fonctionnement autonome, non imprimante, autorisée conformément à la circulaire n° 99-186 du 16 novembre 1999.*

*L'usage d'un dictionnaire bilingue anglais-français est autorisé.*

*L'usage de tout ouvrage de référence, de tout autre dictionnaire et de tout autre matériel électronique est rigoureusement interdit.*

*Dans le cas où un(e) candidat(e) repère ce qui lui semble être une erreur d'énoncé, il (elle) le signale très lisiblement sur sa copie, propose la correction et poursuit l'épreuve en conséquence.*

*De même, si cela vous conduit à formuler une ou plusieurs hypothèses, il vous est demandé de la (ou les) mentionner explicitement.*

**NB : La copie que vous rendrez ne devra, conformément au principe d'anonymat, comporter aucun signe distinctif, tel que nom, signature, origine, etc. Si le travail qui vous est demandé comporte notamment la rédaction d'un projet ou d'une note, vous devrez impérativement vous abstenir de signer ou de l'identifier.**

## Les acides gras polyinsaturés dans l'alimentation Origine, production et intérêts physiologiques

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont des acides gras essentiels dont les rôles physiologiques peuvent être expliqués par leur structure stéréochimique :

- sous forme estérifiée dans les phospholipides, ils permettent de moduler la fluidité et la déformabilité des membranes cellulaires ainsi que l'activité de certaines protéines membranaires telles que récepteurs, transporteurs ou enzymes,
- ils sont précurseurs de médiateurs cellulaires oxygénés comme les prostaglandines et les leucotriènes ; par exemple, la prostacycline PGI<sub>3</sub> est un dérivé oxygéné oméga-3 inhibiteur de l'agrégation plaquettaire d'où son intérêt dans la prévention des maladies cardiovasculaires.

Favoriser la consommation de matières grasses riches en oméga-3 est donc un enjeu de santé publique indéniable qui offre un important potentiel commercial et marketing.

L'industrie agroalimentaire s'est emparée de cette stratégie économiquement attrayante pour mettre sur le marché de nouveaux produits enrichis en oméga-3 pour devenir des aliments fonctionnels :

- des huiles, des margarines et autres produits enrichis en oméga-3,
- des compléments alimentaires.



La source la plus connue d'oméga-3 est l'huile extraite des poissons, or en réalité, les poissons ne produisent pas ces AGPI mais les accumulent en consommant des algues.

La production des AGPI directement à partir des micro-algues présenterait de nombreux avantages :

- seule source naturelle d'acide éicosapentaénoïque (EPA) et d'acide docosahexaénoïque (DHA),
- absence d'odeur de poisson désagréable et réduction des risques de contaminations chimiques,
- meilleur potentiel de purification,
- répondre à la demande croissante et la diminution des stocks de poissons.

Avec les avancées technologiques de la micro-algoculture, les micro-algues sont considérées aujourd'hui comme une source possible de production de ces oméga-3. La valorisation de cette immense richesse n'en est qu'à ses balbutiements mais sera sans doute un des enjeux économiques et industriels du XXI<sup>ème</sup> siècle.

### En utilisant les documents fournis :

Proposer une démarche appropriée pour la mise au point au laboratoire d'une culture de micro-algues dans un objectif d'extraction d'une huile riche en acides gras polyinsaturés :

- choix du procédé et des conditions optimales de l'algoculture,
- contrôle de la qualité de l'huile obtenue.

Les choix devront être justifiés et les principes des méthodes explicités.

Discuter des bénéfices, pour la santé, d'une alimentation riche en oméga-3.

### Sources documentaires :

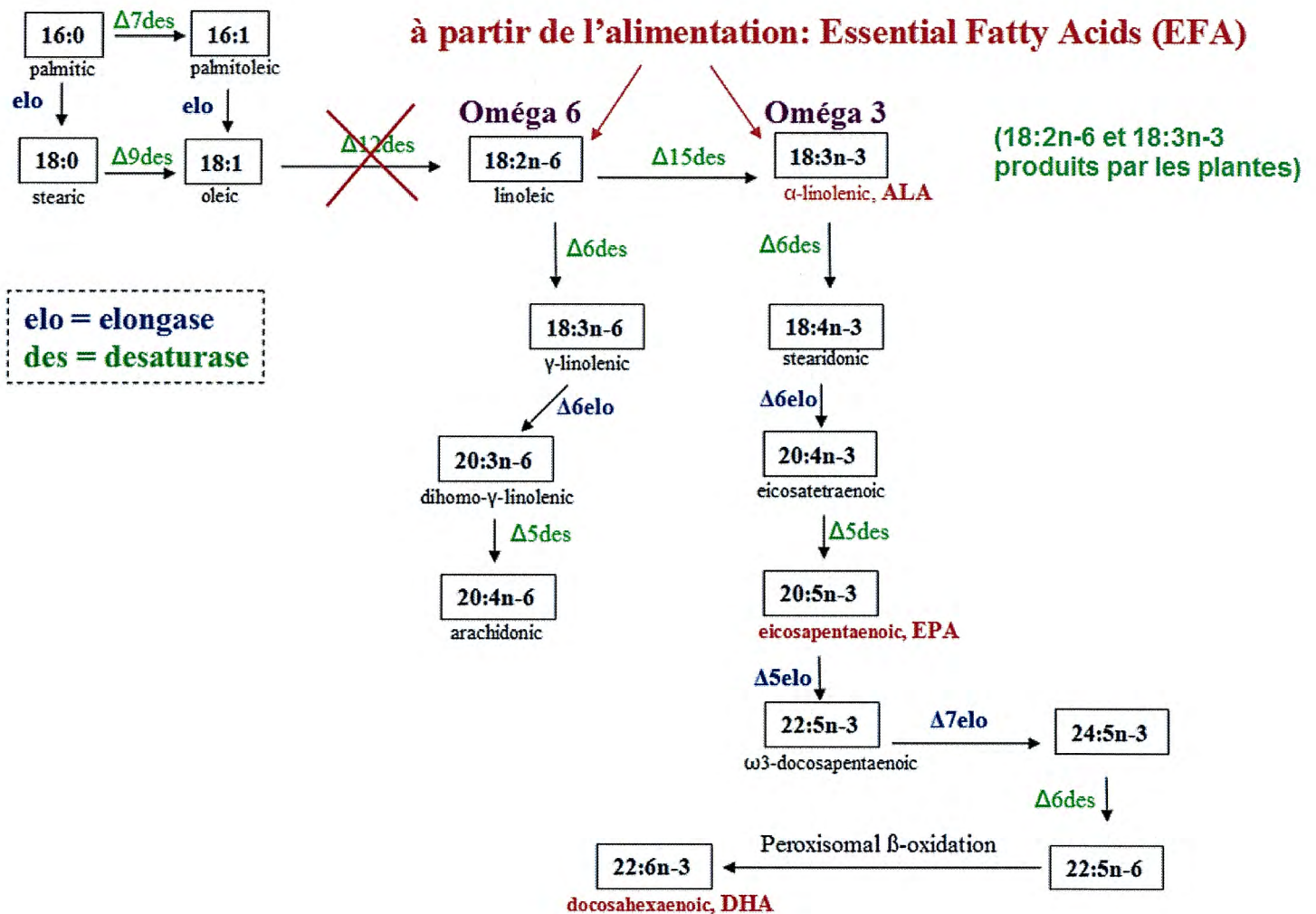
- *Livre turquoise - Algues, filières du futur - Julie PERSON - AdebioTech - Juillet 2011*
- *Article paru dans le journal de la Société de biologie, 202 (3), 201-211 (2008)*
- *Kasetsart Journal - Natural Science - The publication of Kasetsart University (Thailand) - April June 2007 - Volume 41 number 2 pages 324-334.*
- *Diaporama réalisé par M Thierry Tonon - Station Biologique de Roscoff - UMR 7139 CNRS-UPMC, Végétaux Marins et Biomolécules : A quoi peuvent servir les microalgues et les macroalgues marines ?*
- *Projet d'étude « Dosage des omégas 3 et 6 dans les suppléments alimentaires et les poissons gras » - Aurélie Eude - INSA de Rouen - Janvier-Mars 2005*
- *The Journal of Nutrition - July 2003 - Volume 133 number 7 pages 2273-2276*

## Document 1

Origine et synthèse des oméga-3

Il existe plusieurs acides gras polyinsaturés oméga-3 à longues chaînes carbonées différents :

- l'acide  $\alpha$ -linoléique C18:3n-3 (ALA)  
→ synthétisé par les végétaux, précurseur des autres oméga-3 et acide gras essentiel pour l'homme,
- l'acide éicosapentaénoïque C20:5n-3 (EPA),
- l'acide docosahexaénoïque C22:6n-3 (DHA).

Synthèse des acides gras polyinsaturés chez les mammifères

La synthèse chez l'homme d'EPA et de DHA à partir d'ALA a un rendement très faible, les enzymes étant aussi utilisées pour la synthèse de certains oméga-6 ce qui provoque une compétition entre les deux voies métaboliques en faveur des oméga-6 (car les aliments sont souvent plus riches en précurseurs d'oméga-6 que d'oméga-3).

Les EPA et DHA synthétisés peuvent donc s'avérer insuffisants et doivent être complétés par des apports alimentaires directs.

Les produits de la mer sont les seules sources naturelles de ces deux AGPI (les végétaux terrestres apportent uniquement l'ALA). Ils sont produits exclusivement par les micro-algues et se concentrent ensuite tout au long de la chaîne alimentaire.

## Document 2

### Production industrielle de micro-algues : une filière en pleine émergence

#### 1. Diversité des micro-algues

Les algues sont des végétaux beaucoup moins connus que les plantes terrestres et constituent un ensemble d'organismes extrêmement divers. Il en existerait au moins 200 000 espèces différentes sur le globe.

Un grand nombre d'entre elles sont des formes unicellulaires (micro-algues) et photosynthétiques peuplant les océans et cours d'eau depuis plus de trois milliards et demi d'années. Ces organismes constituent un groupe polyphylétique et très diversifié de procaryotes (les algues bleues ou cyanobactéries) et d'eucaryotes (dans lesquels on retrouve les algues vertes, rouges et brunes). Le classement des micro-algues est basé sur diverses propriétés telles que les caractéristiques morphologiques, la pigmentation ou encore la nature chimique des produits de stockage issus de la photosynthèse.

#### 2. Composition biochimique

Les micro-algues présentent une très grande diversité de molécules au sein de leurs cellules. Cette biomasse se différencie principalement des autres végétaux par sa richesse :

- en lipides : Les micro-algues peuvent accumuler plus de 50% de leur masse sèche en lipides. Ces lipides contiennent une proportion importante d'AGPI comme :
  - des oméga-3 : ALA mais aussi ses homologues supérieurs : EPA et DHA,
  - des oméga-6 : acide arachidonique (C20:4).
- en protéines : Le contenu élevé en protéines, peptides et acides aminés (entre 12 et 65% de matière sèche) de plusieurs espèces de micro-algues est une des principales raisons pour les considérer comme une source non conventionnelle de protéines dans l'alimentation humaine et animale (pisciculture).
- en vitamines : source importante de quasi toutes les vitamines essentielles : B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, C, E, K<sub>1</sub>
- en pigments : phycocyanine de la *spiruline* (colorant bleu), phycoérythrine (couleur rouge) de *Porphyridium purpureum*,  $\beta$ -carotènes de *Dunaliella salina*... Avec la demande croissante de molécules d'origine naturelle, le marché des pigments issus des micro-algues offre des perspectives commerciales élevées.
- en antioxydants.

Certaines espèces présentent aussi une richesse en oligosaccharides et polysaccharides, d'autres encore peuvent produire des molécules à activité antivirales ou antibiotiques chez l'homme.

Beaucoup de molécules restent probablement encore à découvrir et font l'objet de recherches dans de nombreux laboratoires à travers le monde.

#### 3. Historique de la culture des micro-algues

La consommation des algues remonterait à des millénaires. Les scientifiques ont découvert que le phytoplancton était consommé au Mexique depuis le temps des aztèques et que les tchadiens consomment la spiruline séchée (cyanobactérie *Arthrospira*) depuis plusieurs décennies. Sa forte teneur en protéines (jusqu'à 60% de la masse sèche) auraient permis de palier les problèmes de malnutrition.



Les micro-algues ne sont cependant cultivées et exploitées industriellement que depuis quelques dizaines d'années. La première installation industrielle d'algoculture a vu le jour dans les années 1960, au Japon.

L'Asie est le premier producteur de micro-algues au monde, et représente à elle seule environ 50% de la production mondiale. La France a développé ses premières unités de production de micro-algues plus tardivement – à la fin des années 80 – et l'on dénombre aujourd'hui une trentaine de sites de production sur le territoire et pour une production d'environ 10 à 15 tonnes par an.

#### 4. Mode de vie et production de la biomasse

Toutes les espèces de micro-algues présentent un métabolisme photo-autotrophe qui repose sur la photosynthèse. Certaines espèces sont capables de passer d'une croissance photo-autotrophe à une croissance hétérotrophe utilisant le glucose ou d'autres substrats carbonés pour leur métabolisme énergétique.

Les micro-algues présentent l'avantage d'avoir un cycle de division très court, de l'ordre de quelques heures, permettant la production rapide de biomasse (plusieurs grammes de matière sèche par litre).

Le développement des micro-algues nécessite des conditions de culture contrôlées comme l'eau (en fonction des souches cultivées l'eau sera douce, marine ou saumâtre), les nutriments, la lumière, le CO<sub>2</sub>, la température et le pH de la culture, ainsi que l'agitation ; elle peut parfois nécessiter plusieurs facteurs de croissance.

Certaines carences en nutriments sont parfois appliquées volontairement dans le but de stimuler la production de certains métabolites ; par exemple une carence en azote stimule la production de lipides.

Les premières cultures de micro-algues étaient en mode discontinu et en conditions semi-contrôlées dans des bassins à ciel ouvert. Depuis, les techniques de production ont évolué pour arriver aujourd'hui à des productions en mode continu et contrôlé en photobioréacteurs ; les systèmes ouverts ont également bénéficié d'optimisation et d'automatisation des cultures.

Les derniers développements technologiques s'orientent vers une culture hétérotrophe, en fournissant une source de carbone organique ; cela permet de s'affranchir de la lumière donc une culture dans des fermenteurs à cuves immenses et d'utiliser les techniques de fermentation déjà très abouties.

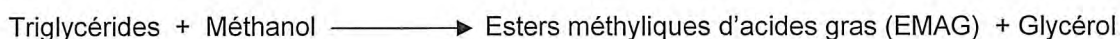
#### 5. Les utilisations biotechnologiques possibles

La diversité des espèces de micro-algues et leur richesse en métabolites permet un vaste panel d'applications et peut s'adresser à de nombreux secteurs industriels. Il est non seulement possible de valoriser la biomasse algale brute, mais aussi de l'utiliser pour la production de molécules d'intérêts : les industries agroalimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques utilisent différentes molécules issues de l'algoculture.

Leur utilisation comme source de biocarburant a aussi été envisagée : les micro-algues étant capables de produire une très grande quantité de lipides, cela permet d'obtenir une productivité en photobioréacteurs très supérieures aux meilleures plantes oléagineuses et de répondre aussi à de nombreux problèmes environnementaux (limiter l'agriculture intensive, capter le CO<sub>2</sub> émis par les industries polluantes pour permettre la photosynthèse).

	Palmier à huile	Colza	Micro-algues
Productivité en lipides (T.ha <sup>-1</sup> .an <sup>-1</sup> )	4-7	0,5-0,6	40-60

Ces algo-triglycérides peuvent ensuite être utilisés pour fabriquer du biodiesel après transméthylation chimique.



La valorisation des micro-algues est soumise aux mêmes contraintes réglementaires que les autres ressources naturelles utilisées à des fins industrielles.

Ainsi, les autorisations des micro-algues en alimentation humaine dépendent de la procédure CE 258/97 «Nouveaux aliments» (JOCE du 27/01/1997). Ce règlement européen concerne tous les aliments et ingrédients alimentaires composés de micro-organismes, de champignons, d'algues ou isolés à partir de ceux-ci.

L'autorisation porte sur l'espèce et sur son mode de production (raceways extérieurs, milieu marin naturel, conditions spécifiques...).

En alimentation humaine, seules trois micro-algues sont autorisées :

- la cyanobactérie *Arthrospira platensis*, plus connue sous le nom de spiruline, autorisée en Europe depuis 1981
- la diatomée *Odontella aurita* qui a obtenu une autorisation en tant qu'ingrédient alimentaire en 2002,
- la chlorophycée *Chlorella vulgaris* autorisée en France depuis 2004.

Deux extraits de micro-organismes marins et deux pigments sont également autorisés au niveau européen comme additif alimentaire :

- l'huile extraite de *Schizochytrium sp.*, à teneur élevée en DHA (au minimum 32% DHA (m/m)), est autorisée par la CE depuis 2003,
- l'huile extraite d'*Ulkenia sp.*,
- le  $\beta$ -carotène issu de la micro-algue *Dunaliella salina* (E160a),
- l'astaxanthine extraite de la micro-algue *Haematococcus pluvialis* (E161j).

**Production industrielle de micro-algues : les procédés utilisés en micro-algoculture**

**1. Culture d'algues phototrophes**

Comme pour tout végétal chlorophyllien, la photosynthèse chez les micro-algues permet de fixer le CO<sub>2</sub> grâce à l'énergie lumineuse pour produire de la biomasse. La température, le pH, le CO<sub>2</sub> dissous et l'homogénéisation sont des facteurs importants pour la performance de la culture. Il existe deux types de procédés :

**Systèmes ouverts : étangs à haut rendement de type « raceway »**

Ce sont les systèmes les plus utilisés à ce jour pour la production de micro-algues commerciales. Le milieu de culture d'une profondeur de quelques dizaines de centimètres circule grâce à des roues à aubes. Les éléments nutritifs sont apportés de manière à garantir une croissance optimale et un bullage assure l'apport en CO<sub>2</sub>.



Systèmes de production ouvert de type Raceway

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Simplicité de construction et d'utilisation</li> <li>• Investissements peu onéreux</li> <li>• Maintien de la température grâce au refroidissement par évaporation</li> <li>• Culture de masse sur des surfaces importantes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Faible productivité en biomasse à cause d'une mauvaise pénétration de la lumière en profondeur</li> <li>• Sujet aux conditions naturelles du milieu (température, luminosité) → productivité variable et saisonnière, et besoin important en eau pour compenser l'évaporation</li> <li>• Vulnérabilité des cultures aux contaminations (par des espèces locales ou des prédateurs) → surtout utilisé pour des espèces extrémophiles adaptées à des milieux très alcalins (<i>Spiruline</i>) ou hypersalins (<i>Dunaliella salina</i>)</li> </ul>

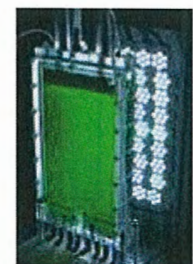
**Systèmes fermés : photobioréacteurs « PBR »**



PBR « airlift » à colonnes verticales



PBR tubulaires



PBR plats

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Systèmes adaptés à la culture de micro-algues sensibles aux contaminations</li> <li>• Meilleurs contrôle de la culture et transfert du CO<sub>2</sub> dans la phase liquide</li> <li>• Plus grand rapport surface/volume permettant d'obtenir des concentrations volumiques de cellules plus importantes</li> <li>• Peuvent être exposés à la lumière artificielle, ce qui garantit une luminosité constante et contrôlée → Rendement plus élevé</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Coût élevé et procédés complexes</li> <li>• Nécessitent un dispositif pour limiter l'élévation de la température accentuée par l'effet de serre</li> <li>• Nécessitent un dispositif pour éliminer l'oxygène produit par la photosynthèse en système clos</li> <li>• Demandent un nettoyage régulier à cause de la formation possible de bio-film</li> </ul>

## 2. Culture d'algues hétérotrophes

Il est aussi possible de cultiver des micro-algues selon des procédés biotechnologiques classiques, en utilisant des algues hétérotrophes et en les cultivant dans des fermenteurs au lieu de photobioréacteurs.

L'énergie est alors fournie par une source de carbone organique (sucres, acides organiques, glycérol...) et dans ce cas, les algues ne photosynthétisent pas mais respirent ; on s'affranchit ainsi du problème de diffusion de la lumière.

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"><li>• Technologie totalement maîtrisée à l'échelle industrielle sur les levures et les bactéries depuis plusieurs décennies</li><li>• Plus facile de prévenir les contaminations</li><li>• Meilleure productivité en biomasse</li><li>• Faible coût de production</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Coût et disponibilité des matières premières utilisées comme substrat énergétique comme les sucres (concurrence avec d'autres procédés biotechnologiques)</li></ul>



Fermenteur industriel

## Document 4

### Production industrielle de micro-algues : procédés de récolte et d'extraction

#### 1. Récolte

L'étape de récolte et/ou concentration est conditionnée par le choix de l'espèce et le mode de culture, et elle conditionne ensuite toutes les étapes en aval (extraction, purification, recyclage..).

La problématique de cette étape est d'autant plus marquée qu'il existe une très grande diversité des souches, présentant des cellules de taille pouvant aller de 1 à 100 µm et des suspensions allant de 0,1 à 10 g par litre, autant de paramètres à prendre en considération pour le choix de la technologie.

Plusieurs moyens de récolte sont donc possibles, ils répondent à deux principes de séparation bien distincts :

- séparation par différence de masse volumique des cellules par rapport à celle du milieu : techniques de sédimentation, de floculation-décantation, de flottation ou de centrifugation,
- séparation par exclusion en fonction de la taille : le tamisage, les procédés à membranes pouvant utiliser la micro- ou l'ultra-filtration frontale ou tangentielle.

#### 2. Séchage

La particularité de la biomasse micro-algale est de présenter un taux d'humidité très élevé qui est problématique pour la conservation et aussi pour l'extraction des produits à valoriser : une étape de séchage est souvent pratiquée : séchage solaire, atomisation ou lyophilisation,

#### 3. Extraction

Les molécules d'intérêt sont pour la plupart localisées à l'intérieur des cellules, il faut donc réussir à casser la barrière naturelle que représentent les différentes membranes pour atteindre les molécules cibles et les extraire : broyage (mécanique, ultrasons...), lyse enzymatique, chocs osmotiques, congélation/décongélation...

Un solvant d'extraction est ensuite choisi en fonction de sa polarité et de son affinité avec les molécules d'intérêt à extraire.

Il existe aussi certains cas particuliers de production où la biomasse micro-algale n'est pas récoltée physiquement, mais où l'on récupère seulement les substances d'intérêt produites par les cellules avant de redémarrer un cycle de culture. On parle alors de « milking » (littéralement « traite », comme pour des vaches laitières...).

Ce mode d'extraction peut être appliqué pour la production de lipides : dans ce cas, les algues sont mises en contact avec un solvant organique apolaire (type hexane), et on procède à une opération d'extraction liquide/liquide, suivie d'une séparation de phases. Les algues traitées sont ensuite remises en culture, avec dans certains cas des taux de survie proches de 100%.

## Document 5

### Etude de la synthèse de DHA chez la micro-algues *Schizochytrium* et optimisation du rendement de production

Polyunsaturated fatty acids including DHA are essential dietary fatty acids. At present, fish oils are a major source, but an alternative supply is needed because of increasing demand and fish dwindling stocks.

This need might be satisfied using a thraustochytrid found in mangrove forests of Thailand and identified by 18S rDNA sequencing : *Schizochytrium limacinum* BR2.1.2. Thraustochytrids such as *Schizochytrium* are aquatic heterotrophic microorganisms commonly found in marine and estuarine environment. The capacity of thraustochytrids to accumulate large amounts of polyunsaturated fatty acids, especially omega-3 fatty acids including docosahexaenoic acid (DHA), is well recognized.

This microorganism could provide a commercial source of this valuable lipid as a red pigment astaxanthin identified by TLC and HPLC. This study aims to improve both the DHA production (and astaxanthin) by optimizing media and culture conditions in the laboratory for later application to industrial production.

#### 1. Analytical procedures

##### Determination of cell mass

Growth was determined as the dry weight of the cells (drying conditions).

Fully grown cultures (50 mL volumes) were filtered through 0,8 µm membrane filters and washed twice with 50 mL of saline solution. Cells were dried at 60°C to constant weight.

##### Extraction and analysis of lipids

Lipid was extracted by the modified method of Bligh and Dyer (**figure 1**), followed by transmethylation.

The fatty acid methyl esters were analyzed in a gas chromatograph equipped with a flame ionization detector and a split injector at 1/40 ratio, and connected to an integrator. The column was a fused silica megabore, 30 m long and 0,52 mm inside diameter, coated with 1 µm thickness of 25% cyanopropyl - 25% phenyl - 50% methyl polysiloxane. Analysis conditions were 210°C column temperature, 250°C injection and detector temperatures, helium as carrier gas, and pentanoic acid (C15:1) as internal standard.

Fatty acids were identified and quantified by comparing retention times with standards (**figure 2 et 3**).

#### 2. Optimization of growth and DHA production by *Schizochytrium limacinum* BR2.1.2

*Schizochytrium limacinum* BR2.1.2 was tested in various culture conditions to find the optimal yield of DHA.

The following conditions were applied throughout unless otherwise stated. Thirty milliliters of GPY medium composed of 3% Glucose, 1% Peptone, 0,5% Yeast extract and 50% of natural sea water was used as the basal medium and placed in a 125 mL Erlenmeyer flask. All experiments were carried out in triplicate flasks.

Cultivation was initiated by addition of 1 mL of inoculum (adjusted cells concentration to 1,0 at OD 600 nm). Incubation was done on a rotary shaker at 140 rpm at room temperature for 6 days. To test different media, the basal media was modified in the following manner :

1. The carbon source replaced by either glucose, fructose, sucrose, glucose syrup and agricultural products i.e. molasses, and sugar cane juice (**figure 4**).
2. The nitrogen sources replaced by peptone, soybean meal : SBM (*tourteau de soja*), skimmed milk (*lait écrémé*), ammonium sulfate, potassium nitrate, sodium nitrate, monosodium glutamate : MSG (**figure 5**).
3. Sea salt concentration (salinity) 0- 200% of sea water (**figure 7**).

The effect of C/N ratio, temperature and incubation time on growth and DHA production were also determined (**figure 6,8 et 9**).

##### **Figure 1** : Extraction of lipids in solution by Methode of Bligh and Dyer

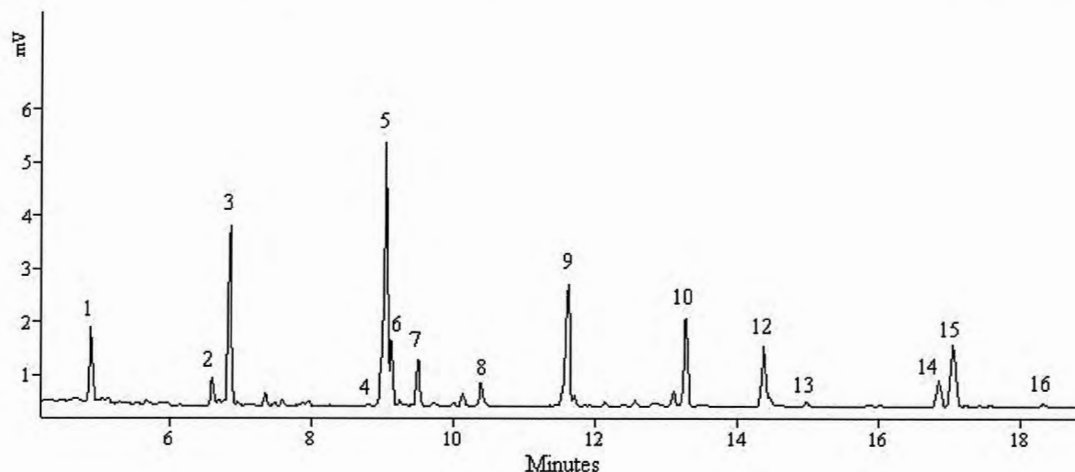
(Bligh, E.G. and Dyer, W.J. 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can.J.Biochem.Physiol.*37:911-917)

Use new (or solvent-cleaned) all-glass tubes :

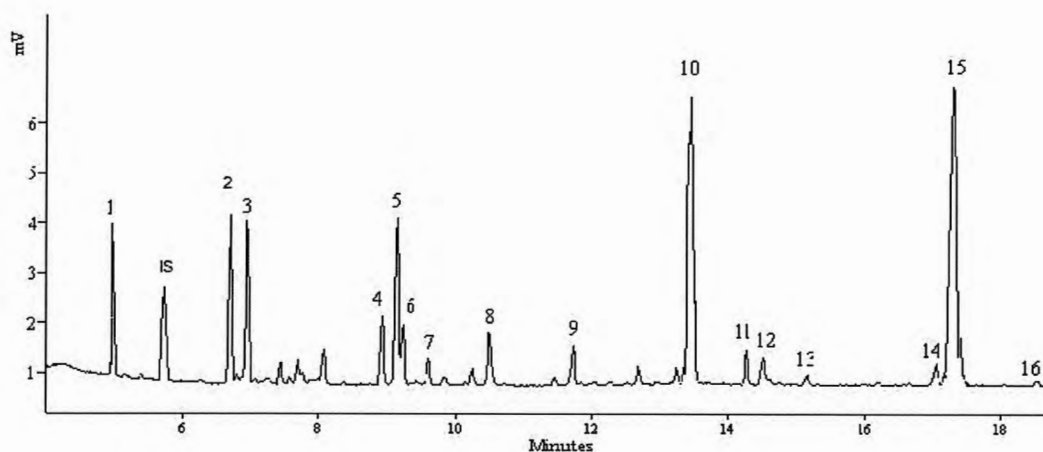
1. For each 1 ml of sample, add 3,75 ml 1:2 (v/v) CHCl<sub>3</sub>:MeOH and vortex well. If you will be subjecting the lipids to GC analysis, this solvent should include the final amount of internal standard (e.g., 5 µg b-sitosterol).
2. Then add 1,25 ml CHCl<sub>3</sub> and vortex well.
3. Finally add 1,25 ml dH<sub>2</sub>O and vortex well.
4. Centrifuge at 1000 RPM 5 min at room temperature to give a two-phase system (aqueous top, organic bottom).
5. Recover the bottom phase as follows : insert Pasteur pipette through the upper phase with gentle positive-pressure so that the upper phase does not get into the pipette tip. When the pipette tip is at the bottom of the tube, carefully withdraw bottom phase through the pipette, making sure to avoid interface or upper face (should only try to recover ~90% of bottom phase, not all of it).



**Figure 2** : Part of the chromatogram of the mixture of standards, PUFA No 1, Marine Source – Supelco



**Figure 3** : Part of the chromatogram of lipids produced by *Schizochytrium limacinum* BR2.1.2

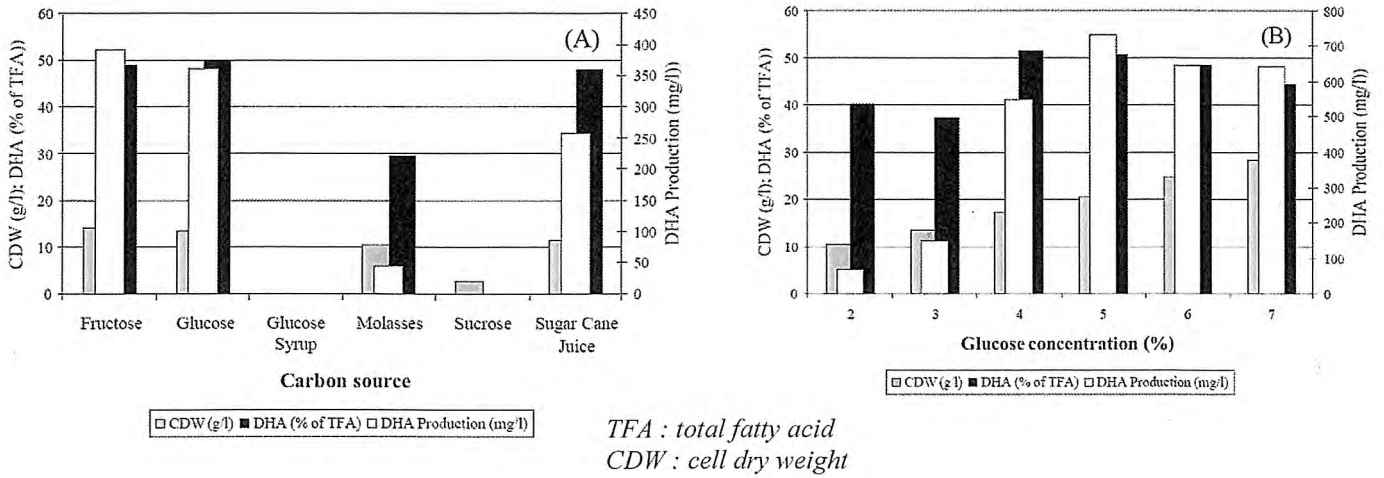


No.	Fatty Acid		A/A <sub>IS</sub>
1	myristic acid	C14:0	2,14
IS	internal standart : pentanoic acid		-
2	palmitic acid	C16:0	2,23
3	palmitoleic acid	C16:1 $\omega$ 7	2,31
4	stearic acid	C18:0	1,22
5	oleic acid	C18:1 $\omega$ 9	1,96
6	vaccenic acid	C18:1 $\omega$ 7	1,08
7	linoleic acid	C18:2 $\omega$ 6	0,51
8	stearidonic acid	C18:4 $\omega$ 3	1,16
9	11-eicosenoic acid	C20:1 $\omega$ 9	0,81
10	EPA (eicosapentaenoic acid)	C20:5 $\omega$ 3	8,29
11	behenic acid	C22:0	0,63
12	11-docosenoic acid	C22:1 $\omega$ 11	0,72
13	erucic acid	C22:1 $\omega$ 9	0,28
14	docosapentaenoic acid	C22:5 $\omega$ 3	0,41
15	DHA (docosahexaenoic acid)	C22:6 $\omega$ 3	11,81
16	nervonic acid	C24:1 $\omega$ 9	0,16

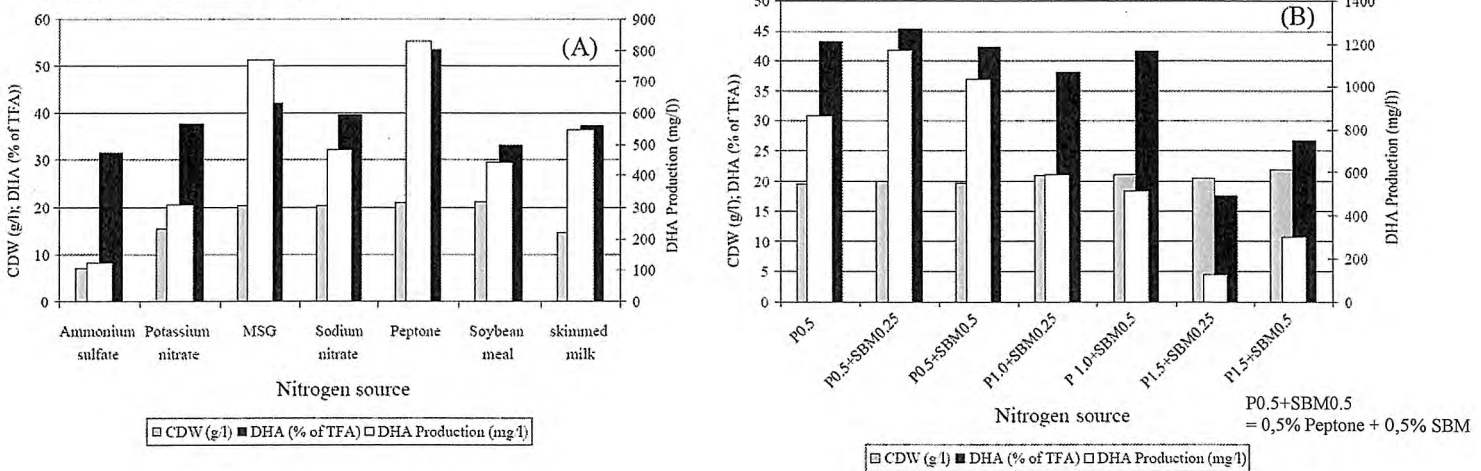
A/A<sub>IS</sub> = Ratio between the peak area of fatty acid and the peak area of internal standard

### 3. Results

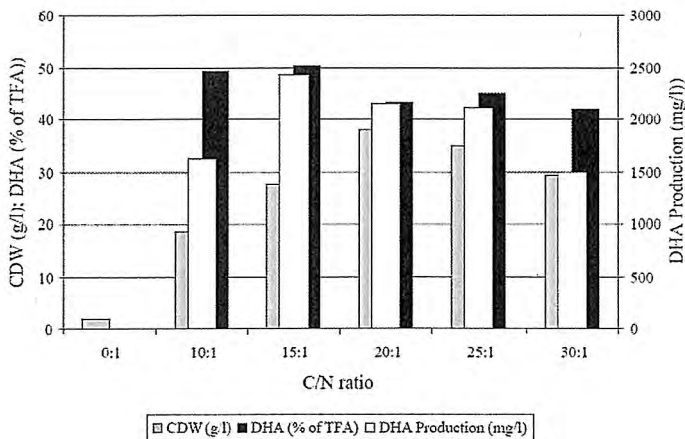
**Figures 4 :** Effect of (A) carbon sources and (B) glucose concentration on growth and DHA production by *Schizochytrium limacinum* BR2.1.2 cultivated at room temperature in shaker 140 rpm.



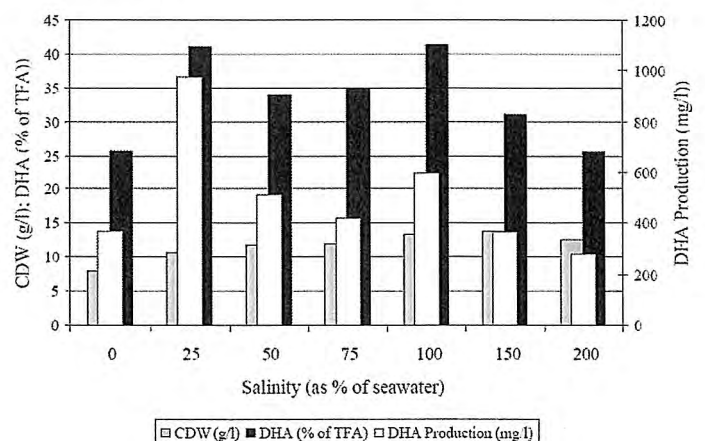
**Figure 5 :** Effect of (A) single nitrogen source and (B) combined nitrogen source on growth and DHA production by *Schizochytrium limacinum* BR2.1.2 cultivated at room temperature in shaker 140 rpm (P = peptone; SBM = soybean meal).



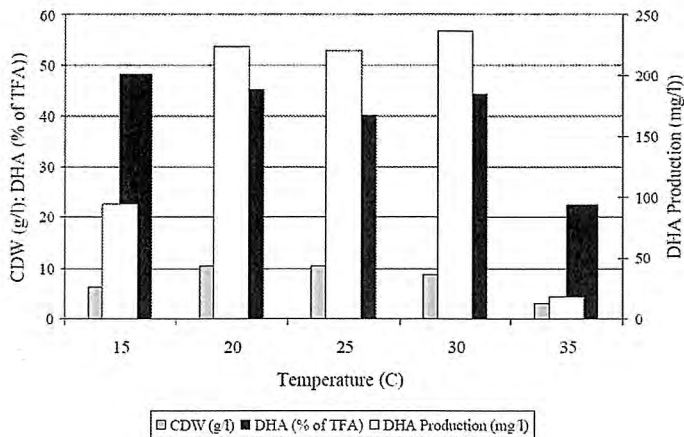
**Figure 6 :** Effect of C/N ratio on growth and DHA production in *Schizochytrium limacinum* BR2.1.2 cultivated at room temperature in shaker 140 rpm.



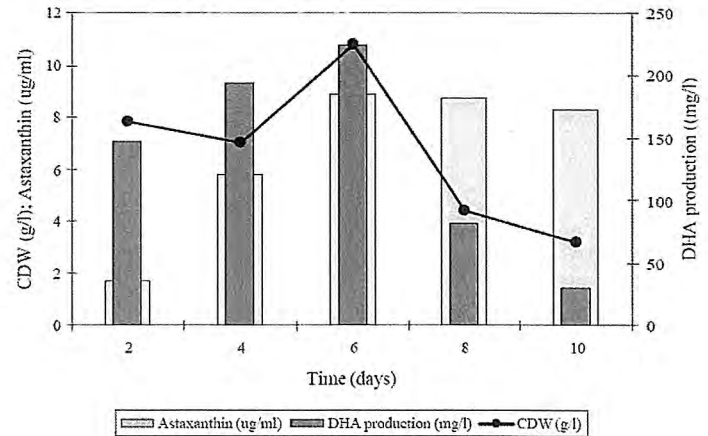
**Figure 7 :** Effect of salinity (as % of seawater) on growth and DHA production in *Schizochytrium limacinum* BR2.1.2 cultivated at room temperature in shaker 140 rpm.



**Figure 8** : Effect of temperature on growth and DHA production in *Schizochytrium limacinum* BR2.1.2 cultivated in thermostated incubator



**Figure 9** : Growth, astaxanthin and DHA production by *Schizochytrium limacinum* BR2.1.2 mutant strain in GPY broth at 25°C with 2 kLux light intensity and light/dark 16/8 hrs.



## Document 6

### Utilisation de l'huile de *Schizochytrium* pour la préparation d'une margarine enrichie en oméga-3

Journal officiel de l'Union européenne 12/06/2003

DÉCISION DE LA COMMISSION du 5 juin 2003 autorisant la mise sur le marché d'une huile extraite de la micro-algue *Schizochytrium* sp. à teneur élevée en DHA en tant que nouvel ingrédient alimentaire, en application du règlement (CE) no 258/97 du Parlement européen et du Conseil

#### SPÉCIFICATIONS DE L'HUILE À TENEUR ÉLEVÉE EN DHA (ACIDE DOCOSAHEXAÉNOÏQUE) OBTENUE PAR EXTRACTION À L'HEXANE DE LA MICROALGUE SCHIZOCHYTRIUM SP.

Test	Spécification
Acidité	Pas plus de 0,5 mg de KOH/g
Indice de peroxyde	Pas plus de 5,0 méq/kg d'huile
Humidité et volatilité	Pas plus de 0,05 %
Insaponifiable	Pas plus de 4,5 %
Acides gras trans	Pas plus de 1 %
Teneur en DHA	Au moins 32,0 %

#### UTILISATIONS DE L'HUILE À TENEUR ÉLEVÉE EN DHA (ACIDE DOCOSAHEXAÉNOÏQUE) PRODUITE À PARTIR DE LA MICROALGUE SCHIZOCHYTRIUM SP.

Groupe d'utilisation	Doses maximales d'emploi (exprimée en DHA)
Produits laitiers à l'exception des boissons à base de lait	200 mg/100 g ou 600 mg/100g pour les produits fromagers
Succédanés de produits laitiers à l'exception des boissons	200 mg/100 g ou 600 mg/100 g pour les substituts des produits fromagers
Matières grasses tartinables, sauces et assaisonnements	600 mg/100 g
Céréales de petit déjeuner	500 mg/100 g
Compléments alimentaires	200 mg par dose journalière recommandée par le fabricant
Aliments diététiques destinés à des usages médicaux particuliers	Selon les besoins nutritionnels particuliers des personnes auxquelles ils sont destinés
Denrées alimentaires destinées à être utilisées dans les régimes hypocaloriques destinés à la perte de poids	200 mg/substitut de repas

Note: tous les produits alimentaires contenant de l'huile riche en DHA produite à partir de *Schizochytrium* sp. doivent présenter une bonne stabilité oxydative, évaluée selon une méthodologie d'essai nationale/internationale appropriée et reconnue (l'AOAC par exemple).

Document 7

**Bénéfices de la consommation de matières grasses riches en oméga-3 pour la santé humaine**

**Figure 1** : Plasma concentrations of total triacylglycerol, glycerol and nonesterified fatty acid, after consumption of a control diet (●) and a fish oil diet (○)

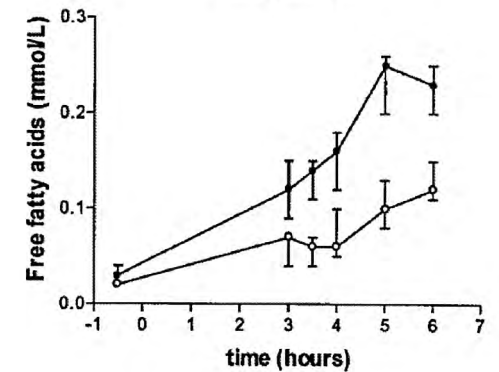
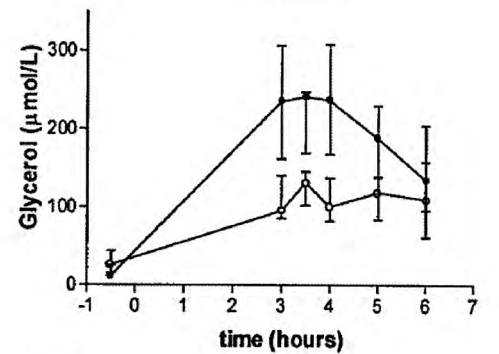
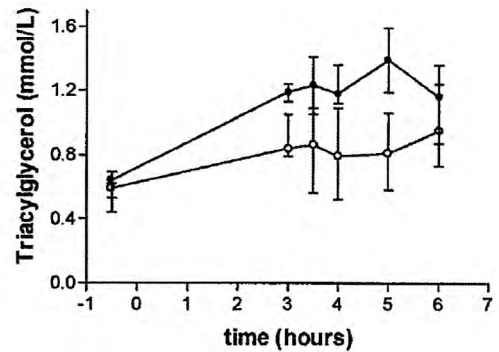
Fatty acid composition in the lipid fraction of the control and the fish oil diets<sup>1,2</sup>

	Control diet	Fish oil diet
	<i>g/100 g</i>	
18:2(n-6)	36.0 (33.2–36.9)	18.3 (17.0–22.9)
18:3(n-3)	3.9 (3.6–4.1)	5.3 (4.8–7.1)
18:4(n-3)	ND	1.8 (1.4–1.9)
20:5(n-3)	ND	5.4 (4.2–5.7)
22:5(n-3)	ND	0.6 (0.5–0.7)
22:6(n-3)	ND	7.4 (5.5–7.9)
Σ SFA	18.5 (18.3–18.6)	18.2 (17.2–18.6)
Σ MUFA	39.5 (38.5–42.9)	38.0 (36.6–38.5)
Σ PUFA	40.1 (36.9–40.9)	40.5 (39.8–43.0)
Σ (n-6) PUFA	36.0 (33.2–36.8)	19.3 (18.0–23.7)
Σ (n-3) PUFA	3.9 (3.6–4.1)	21.2 (19.2–21.7)
Unidentified	2.1 (1.8–3.1)	3.2 (3.1–3.4)

<sup>1</sup> Values are means (ranges) of determinations of diet aliquots collected during the whole study (*n* = 5).

<sup>2</sup> Abbreviations: ND, not detectable; SFA, saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids.

PUFA, polyunsaturated fatty acids.



**Figure 2** : Interrelationship between red blood cell membrane EPA+DHA level and risk of sudden cardiac death (SCD). Data are adapted from the epidemiologic studies of (□) Albert et al. and (○) Siscovick et al..

