

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
—
**INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE**
—
COURBEVOIE
—

①1 N° de publication : **3 086 670**

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **18 71106**

⑤1 Int Cl⁸ : **C 12 P 7/00** (2018.01), C 12 P 7/04, C 12 P 7/28,
C 12 M 1/16, C 12 N 11/08, C 12 R 1/145

⑫

BREVET D'INVENTION

B1

⑤4 PROCÉDE DE PRODUCTION D'ALCOOLS AVEC CLOSTRIDIUM SUR SUPPORT SOLIDE.

②2 Date de dépôt : 28.09.18.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public
de la demande : 03.04.20 Bulletin 20/14.

④5 Date de la mise à disposition du public du
brevet d'invention : 31.05.24 Bulletin 24/22.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche :

Se reporter à la fin du présent fascicule

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

○ Demande(s) d'extension :

⑦1 Demandeur(s) : *IFP ENERGIES NOUVELLES*
Etablissement public — FR.

⑦2 Inventeur(s) : GONZALEZ PENAS HELENA,
ROPARS MARCEL, TOTH ESZTER, LOPES
FERREIRA NICOLAS, COUPARD VINCENT et
MENIR SANDRA.

⑦3 Titulaire(s) : *IFP ENERGIES NOUVELLES*
Etablissement public.

⑦4 Mandataire(s) :

FR 3 086 670 - B1



Description

Titre de l'invention : Procédé de production d'alcools avec Clostridium sur support solide

Domaine technique

[0001] La présente description concerne un procédé de production d'alcools par fermentation d'un fluide sucré.

Technique antérieure

[0002] Afin de répondre aux enjeux de la transition énergétique, de nombreuses recherches sont menées pour développer des procédés dits « verts », permettant d'accéder à des intermédiaires chimiques d'une façon alternative au raffinage du pétrole et/ou à la pétrochimie.

[0003] Les alcools issus de procédés fermentaires (e.g. isopropanol et n-butanol) sont parmi les substituts de dérivés pétrochimiques les plus prometteurs. La fermentation ABE (Acétone – Butanol – Ethanol), réalisée par des microorganismes appartenant au genre *Clostridium*, est une des plus anciennes fermentations à avoir été industrialisée (début du 20ème siècle) et a été depuis largement étudiée. Plus récemment, la fermentation IBE (Isopropanol – Butanol – Ethanol) produisant un mélange d'isopropanol, butanol et éthanol et réalisée également par des microorganismes appartenant au genre *Clostridium*, a fait l'objet de nombreuses études.

[0004] Concernant le mode de conduite fermentaire employé dans ce type de procédé, la production en mode discontinu (« batch » selon la terminologie anglo-saxonne) reste la méthode conventionnelle pour les fermentations ABE et IBE, malgré la faible productivité affichée pour ce type de procédé, dans l'intervalle 0,1-0,7 g/L.h (voir, par exemple, Jones D. T., Woods D.R., 1986, Acetone-Butanol Fermentation Revisited. Microbiol. Rev., 50 (4), 484-524 ou Tableau 16.6 Lopez-contreras A. et al chapter book 16, Bioalcohol Production: Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass, 2010). Mais ces productivités restent trop faible pour envisager un procédé industriel économiquement viable. .

[0005] Un procédé continu avec des cellules en suspension dans un réacteur homogène peut également être envisagée. Mais la productivité est également assez faible et peut difficilement être augmentée de façon significative. Un des problèmes techniques majeurs est la concentration des cellules dans le milieu fermentaire, principalement contrôlée par le taux de dilution appliqué dans le procédé. Celui-ci ne peut pas être élevé pour éviter le lavage cellulaire (« wash out » selon la terminologie anglo-saxonne) dans le fermenteur. Pour ces raisons, depuis quelques années, un fort intérêt est porté par les méthodes visant une forte rétention de la biomasse microbienne. Deux moyens

existent : « l'immobilisation des cellules » et le « recyclage » cellulaire avec une rétention au moyen de membranes filtrantes.

- [0006] Deux techniques d'immobilisation pour procédé continu sont souvent citées : l'adsorption sur support solide et le confinement, les deux techniques ayant été étudiées dans la littérature pour la production d'ABE.
- [0007] Dans le premier cas d'adsorption sur support solide, l'adsorption physique des microorganismes sur une surface solide a lieu par des forces électrostatiques, forces de van der Waals, ou par liaison covalente entre la membrane cellulaire bactérienne et le support. Comme il n'existe pas de barrière physique entre le biofilm microbien et la solution de fermentation, différents équilibres entre les taux d'adsorption, de détachement cellulaire et de recolonisation du support solide peuvent être atteints en fonction du support solide, de la mise en œuvre et des conditions opératoires. Il est à noter que les cellules immobilisées sont typiquement entourées de polysaccharides excrétés par les propres microorganismes (EPS: « Extracellular Polymeric Substances » selon la terminologie anglo-saxonne), et présentent différents régimes de croissance et de bioactivité que lorsque les cellules se trouvent en suspension (voir, par exemple, Halan B., Buehler K., Schmid A., 2012, Biofilms as living catalysts in continuous chemical syntheses, Trends in biotechnol., 30 (9), 453-465).
- [0008] Plusieurs supports solides ont été testés et s'avèrent intéressants d'après la littérature pour la fermentation de type ABE, incluant le charbon (voir, par exemple, Qureshi N., Maddox I.S., 1987, Continuous solvent production from whey permeate using cells of *Clostridium acetobutylicum* immobilized by adsorption onto bonechar, Enzyme Microb. Technol., (9), 668-371), les briques (voir, par exemple, Qureshi N., Schripsema J., Lienhardt J., Blaschek H.P., 2000, Continuous solvent production by *Clostridium beijerinckii* BA101 immobilized by adsorption onto brick, World Journal of Microbiology & Biotechnology, (16), 377-382), et la pulpe papetière (voir, par exemple, Survase S.A., van Heiningen A., Granström T., 2012, Continuous biocatalytic conversion of sugar mixture to acetone-butanol-ethanol by immobilized *Clostridium acetobutylicum* DSM 792, Appl. Microbiol. Biotechnol., (93), 2309-2316). En revanche, de tels supports solides ne sont pas synthétiques et génèrent des problèmes majeurs de reproductibilité pour les procédés de fermentation.
- [0009] Dans le cas d'une encapsulation (immobilisation par confinement), les microorganismes sont introduits à l'intérieur d'une matrice poreuse, de façon à éviter leur diffusion vers le milieu extérieur, tout en permettant le transfert de matière pour le substrat et les nutriments, ainsi que les produits de réaction. Des exemples de supports utilisant la technique de confinement par encapsulation incluent les billes d'alginate (voir, par exemple, Mollah A.H., Stuckey D.C., 1993, Maximizing the production of acetone-butanol in alginate bead fluidized bed reactor using *Clostridium aceto-*

butylicum, J. Chem. Tech. Biotechnol., (56), 83-89), et de k-carrageenan (voir, par exemple, Godia F., Howard I., Scott D., Davison B.H., 1990, Use of immobilized microbial membrane fragments to remove oxygen and favor the acetone-butanol fermentation, Biotechnol. Prog., 1990, 210-213).

Résumé de l'invention

- [0010] Un premier objet de la présente description est de fournir un procédé de fermentation de type IBEA (Isopropanol – Butanol – Ethanol – Acétone) dans un réacteur dans lequel le taux de dilution hydraulique est différent du taux de dilution de la biomasse active. A cette fin, un procédé capable de fixer au moins en partie la biomasse bactérienne par adsorption sous forme de biofilm dans le réacteur fermentaire, améliorant la productivité volumique, est décrit ci-après.
- [0011] Selon un premier aspect, l'objet précité, ainsi que d'autres avantages, sont obtenus par un procédé de production d'alcools, dans lequel on introduit un fluide sucré dans un réacteur fermentaire pour produire un moût fermentaire enrichi en isopropanol, butanol, éthanol et acétone par rapport au fluide sucré, le réacteur fermentaire comprenant une biomasse produite par une souche appartenant au genre *Clostridium* supportée (*i.e.*, immobilisée) sur un support solide comprenant une mousse de polyuréthane.
- [0012] Il est entendu dans la présente description qu'une fermentation IBEA correspond à une fermentation dans laquelle le moût fermentaire comprend un apport d'au moins 0.2 g/L d'isopropanol, d'au moins 0.2 g/L de butanol, d'au moins 0.2 g/L d'éthanol et d'au moins 0.2 g/L d'acétone, par rapport au fluide sucré.
- [0013] Le procédé de production selon le premier aspect permet par ailleurs de maintenir une meilleure stabilité des microorganismes (e.g. maintien des performances dans la durée). De plus, bien qu'il soit connu qu'à partir d'une certaine teneur dans le milieu de fermentation, les produits fermentaires, et particulièrement les alcools (e.g. le butanol), ont un effet inhibiteur pour le microorganisme, le procédé de production selon le premier aspect permet de réduire au moins en partie les effets négatifs de ces produits inhibiteurs sur l'activité biologique présente dans le milieu.
- [0014] Selon un ou plusieurs modes de réalisation, le fluide sucré est introduit en continu dans le réacteur fermentaire.
- [0015] Selon un ou plusieurs modes de réalisation, la mousse de polyuréthane comprend au moins une des caractéristiques suivantes :
- des cavités volumiques (*i.e.*, pores ou cellules) dont le diamètre de sphère équivalent est compris entre 0,25 mm et 1,1 mm, de préférence entre 0,55 et 0,99 mm,
 - une surface spécifique interne comprise entre 4000 et 15000 m²/m³, de préférence entre 8000 et 10000 m²/m³, et

- une densité apparente (*i.e.*, masse sur volume apparent) mesurée dans l'air comprise entre 10 et 90 g/L, de préférence entre 10 et 80 g/L, de préférence entre 15 et 45 g/L, tel qu'entre 20 et 45 g/L.

- [0016] Selon un ou plusieurs modes de réalisation, la fermentation est réalisée à un taux de dilution (défini comme le rapport de débit de charge (volume liquide du fluide sucré) à convertir rapporté au volume liquide du réacteur fermentaire) compris entre $0,04 \text{ h}^{-1}$ et 1 h^{-1} , de préférence entre $0,08 \text{ h}^{-1}$ et $0,5 \text{ h}^{-1}$, tel qu'entre $0,12 \text{ h}^{-1}$ et $0,3 \text{ h}^{-1}$.
- [0017] Selon un ou plusieurs modes de réalisation, le réacteur fermentaire comprend entre 10% et 90%, de préférence entre 20% et 50%, de préférence entre 20% et 40% (e.g. 25-30%) en volume apparent de support solide par rapport au volume total du réacteur fermentaire.
- [0018] Selon un ou plusieurs modes de réalisation, le support solide est immergé au moins partiellement, préférablement totalement, dans le milieu réactionnel. Selon un ou plusieurs modes de réalisation, le support solide est traversé par convection naturelle ou forcée d'un flux de fluide sucré (e.g. circulation fluide descendante, montante, ou radiale, optionnellement en convection forcée (e.g. turbine radiale du type Rushton ou axiale ou au travers d'un support)).
- [0019] Selon un ou plusieurs modes de réalisation, le réacteur fermentaire est un réacteur à circulation fluide montante ou descendante ou radiale et optionnellement à dégagement gazeux à contrecourant.
- [0020] Selon un ou plusieurs modes de réalisation, la biomasse est produite par (et/ou comprend) un microorganisme appartenant au genre *Clostridium* et capable de produire des mélanges de type IBEA (e.g. *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium saccharobutylicum*, *Clostridium tyrobutyricum*, *C. saccharoperbutylacetonicum*, *C. butylicum* et autre *Clostridium sp*). Le microorganisme employé peut-être génétiquement modifiée ou non. De manière plus globale, la plupart des espèces de *Clostridium* dites « solvantogènes » peuvent être utilisées. Les souches préférablement employées sont celles appartenant à l'espèce *C. beijerinckii* ou *C. acetobutylicum*. Il peut s'agir de souches génétiquement modifiées ou non. Une souche génétiquement modifiée correspond à une souche dont le matériel génétique (ADN) a été modifiée par rapport à une souche initiale. Les modifications génétiques sont réalisées à l'aide d'outils génétiques bien connus de l'homme de l'art (cf Pyne et al Biotech Adv 2014 32(3):623-41 et Wasels et al J. Microbiol Methods 2017 140:5-11). Les modifications génétiques peuvent correspondre à des modifications du propre contenu génomique de la souche employée afin d'améliorer ses performances pour la production d'Isopropanol/Butanol/Ethanol. Les modifications génétiques peuvent également correspondre à l'intégration d'un (ou plusieurs) matériel(s) génétique(s) permettant d'améliorer les performances des souches de *Clostridium* utilisé dans le

procédé. On entend par matériel génétique, un fragment d'ADN contenant un ou plusieurs éléments génétiques (promoteur, gène, terminateur, structure régulatrice, etc.) intégré au sein du génome de la souche génétiquement modifiée (cf revue de Walther & Francois *Biotechnology Advances* 34 (2016) 984–996 pour ce qui est de *Clostridium acetobutylicum*). Selon un ou plusieurs modes de réalisation, la biomasse produite par la souche appartenant au genre *Clostridium* comprend une bactérie génétiquement modifiée ou non et appartenant à l'espèce *Clostridium beijerinckii* et/ou *Clostridium acetobutylicum*.

- [0021] Selon un ou plusieurs modes de réalisation, le fluide sucré comprend une solution aqueuse de sucres issus de la lignocellulose en C5 et/ou C6, et/ou de sucres issus des plantes saccharifères (e.g. glucose, fructose et saccharose), et/ou de sucres issus des plantes amylacées (e.g. dextrines, maltose et autres oligomères, voire d'amidon). Selon un ou plusieurs modes de réalisation, la solution aqueuse comprend de 20 à 500g/L.
- [0022] Selon un ou plusieurs modes de réalisation, le fluide sucré est produit à partir d'une charge de biomasse. Selon un ou plusieurs modes de réalisation, la charge de biomasse provient du traitement d'une source renouvelable. Selon un ou plusieurs modes de réalisation, la source renouvelable comprend la biomasse lignocellulosique (e.g. substrats ligneux, tels que des résineux et feuillus (par exemple des résineux tels les épicéas ou les pins, ou des feuillus tels les eucalyptus), les sous-produits de l'agriculture (e.g. paille) ou ceux des industries génératrices de déchets lignocellulosiques (industries agroalimentaires, papeteries)), et/ou les plantes de cultures dédiées (e.g. *miscanthus*, *Panicum virgatum* (panic érigé ou *switchgrass*)), et/ou les plantes sucrières, telles que la betterave sucrière, la canne à sucre, le topinambour et/ou les plantes amylacées (e.g. maïs et blé) et/ou les tubercules (e.g. manioc, topinambour et pomme de terre). Selon un ou plusieurs modes de réalisation, la source renouvelable comprend en outre une biomasse lignocellulosique de produits et résidus de l'industrie papetière et des produits de transformation de matériaux lignocellulosiques.
- [0023] Selon un ou plusieurs modes de réalisation, la charge de biomasse comprend environ 35 à 50% en poids de cellulose, 20 à 30% en poids d'hémicellulose et 15 à 25% en poids de lignine par rapport au poids total de la charge de biomasse.
- [0024] Selon un ou plusieurs modes de réalisation, le support solide est disposé à l'intérieur du réacteur fermentaire avant et/ou après l'immobilisation (e.g. par adsorption) de la biomasse produite par la souche appartenant au genre *Clostridium* sur le support solide.
- [0025] Selon un ou plusieurs modes de réalisation, la biomasse produite par la souche appartenant au genre *Clostridium* est immobilisée sur le support solide dans un réservoir secondaire, et le support solide supportant la biomasse produite par la souche appartenant au genre *Clostridium* (également nommée ci-après biomasse bactérienne) est

introduit dans le réacteur fermentaire. Il est possible d'immobiliser la biomasse bactérienne à l'intérieur d'un réservoir secondaire fonctionnant en boucle rapide (« in stream » selon la terminologie anglo-saxonne) par rapport au réacteur fermentaire. Il est notamment possible de mettre en œuvre une étape batch dans le procédé de la présente description, par exemple pendant une durée de 4-5 heures, par exemple avant l'introduction en continu du fluide sucré dans le réacteur fermentaire. Selon un ou plusieurs modes de réalisation, le milieu réactionnel qui contient/submerge le support solide subit un taux d'inoculation avec une solution d'inoculation de biomasse bactérienne (e.g. avec des cellules au taux de croissance sensiblement maximal) compris entre 0,5% et 20% en volume, préférablement entre 1% et 20% en volume par rapport au volume total du volume réactionnel (e.g. 10% en volume). Selon un ou plusieurs modes de réalisation, le support solide est immergé au moins partiellement, préférablement totalement, dans la solution d'inoculation pendant ladite étape « batch ». Selon un ou plusieurs modes de réalisation, la biomasse bactérienne est immobilisée sur le support solide sous forme de biofilm (*i.e.*, groupement microbien qui peut être, soit attaché à une surface solide (organique ou inorganique), soit former flocs ou agrégats de façon isolée, notamment par auto granulation, sur la surface solide).

[0026] Selon un ou plusieurs modes de réalisation, le support solide est introduit dans le réacteur fermentaire sous la forme d'un ou plusieurs blocs. Selon un ou plusieurs modes de réalisation, le support solide (e.g. sous la forme d'un seul bloc) est sensiblement sous la forme d'un cylindre circulaire droit ayant un diamètre inférieur ou sensiblement égal au diamètre interne du réacteur fermentaire. Selon un ou plusieurs modes de réalisation, le bloc a un diamètre sensiblement égal au diamètre interne du réacteur fermentaire. Bien que le bloc et le réacteur fermentaire soient décrits ici comme des cylindres circulaires droits, il est entendu que le bloc et le réacteur fermentaire peuvent être de forme quelconque. Selon un ou plusieurs modes de réalisation, le bloc est centré ou excentré par rapport à l'axe principal (vertical) du réacteur fermentaire, ou accolé à une paroi radiale du réacteur fermentaire.

[0027] Selon un ou plusieurs modes de réalisation, le support solide est introduit dans le réacteur fermentaire sous la forme d'un filet ou d'un contenant avec maillage comprenant une pluralité de cubes, parallélépipèdes ou autres formes quelconques à 3 dimensions (« chips » selon la terminologie anglo-saxonne) de mousse de polyuréthane, par exemple dont au moins une dimension est d'au moins 3 mm. Selon un ou plusieurs modes de réalisation, le filet ou le contenant avec maillage est un cylindre circulaire droit ayant un diamètre inférieur ou sensiblement égal au diamètre interne du réacteur fermentaire. Selon un ou plusieurs modes de réalisation, le filet ou le contenant avec maillage a un diamètre sensiblement égal au diamètre interne du réacteur fermentaire. Bien que le filet, le contenant avec maillage et le réacteur fer-

mentaire soient décrits ici comme des cylindres circulaire droit, il est entendu que le filet, le contenant avec maillage et le réacteur fermentaire peuvent être de forme quelconque.

- [0028] Selon un ou plusieurs modes de réalisation, le support solide forme un lit fluidisé ou un lit fixe dans le réacteur fermentaire. Selon un ou plusieurs modes de réalisation, le support solide forme un lit fluidisé maintenu en immersion, au moins partielle et préfé- rablement totale, par une grille.
- [0029] Selon un ou plusieurs modes de réalisation, le support solide est agité (e.g. méca- niquement). Selon un ou plusieurs modes de réalisation, le support solide est im- mobilisé à l'intérieur d'un filet ou d'un contenant avec maillage concentrique, par exemple concentrique à l'axe d'agitation (e.g. utilisation d'un réacteur du type Robinson Mahoney).
- [0030] Selon un ou plusieurs modes de réalisation, le support solide (e.g. bloc(s), filet, contenant avec maillage) est disposé dans le réacteur fermentaire de sorte à affleurer à la surface du milieu réactionnel. Selon un ou plusieurs modes de réalisation, le fluide sucré est introduit directement au-dessus ou au-dessous du (des) bloc(s), du filet ou du maillage.
- [0031] Selon un ou plusieurs modes de réalisation, la fermentation est une fermentation en anaérobiose (e.g. stricte), tel que sous un apport de gaz inerte (e.g. sous azote).
- [0032] Selon un ou plusieurs modes de réalisation, la fermentation est réalisée à une tem- pérature comprise entre 28°C et 40°C, de préférence entre 30°C et 37°C (e.g. 36°C), et/ou à une pression comprise entre environ 0,1 MPa et 0,15 MPa (i.e., pression atmo- sphérique + les hauteurs d'eau).
- [0033] Selon un ou plusieurs modes de réalisation, la fermentation est réalisée en continu pendant une durée d'au moins 250 heures, de préférence d'au moins 500 heures sans aucune limitation supérieure (e.g. 5000h).
- [0034] Selon un deuxième aspect, l'objet précité, ainsi que d'autres avantages, sont obtenus par un réacteur fermentaire (2) comprenant une biomasse produite par une souche ap- partenant au genre *Clostridium* supportée sur un support solide (9) comprenant une mousse de polyuréthane.
- [0035] Selon un ou plusieurs modes de réalisation, au moins une partie du moût fermentaire obtenu en sortie du réacteur fermentaire est recyclée à l'entrée du réacteur fermentaire. Il est notamment possible d'atteindre des vitesses linéaires indépendantes du temps de séjour global.
- [0036] Des modes de réalisation du procédé référencé ci-dessus ainsi que d'autres caracté- ristiques et avantages dudit procédé vont apparaître à la lecture de la description qui va suivre, donnée à titre uniquement illustratif et non limitatif, et en référence aux dessins suivants.

Liste des figures

- [0037] [fig.1]
- [0038] La figure 1 est une vue schématique d'un procédé de production d'alcools selon des modes de réalisation de la présente description.
- [0039] [fig.2]
- [0040] La figure 2 est une vue schématique d'un support solide dont le diamètre est sensiblement égal au diamètre interne d'un réacteur fermentaire selon des modes de réalisation de la présente description.
- [0041] [fig.3]
- [0042] La figure 3 est une vue schématique de supports solides centré, excentré ou accolé aux parois de réacteurs fermentaires selon des modes de réalisation de la présente description.
- [0043] [fig.4]
- [0044] La figure 4 est une vue schématique de supports solides selon des modes de réalisation de la présente description, comprenant des éléments en mousse de polyuréthane confinés dans un filet ou un contenant avec maillage.
- [0045] [fig.5]
- [0046] La figure 5 est une vue schématique d'un support solide formant un lit fluidisé contenu en immersion dans un réacteur fermentaire selon des modes de réalisation de la présente description.
- [0047] [fig.6]
- [0048] La figure 6 montre une vue schématique d'un procédé de production d'alcools selon des modes de réalisation de la présente description comprenant en outre une étape de finition de fermentation.
- [0049] [fig.7]
- [0050] La figure 7 montre l'évolution de la productivité volumique en IBEA d'un procédé de référence en fonction du taux de dilution imposé.

Description des modes de réalisation

- [0051] Des modes de réalisation du procédé selon le premier aspect et du réacteur selon le deuxième aspect vont maintenant être décrits en détail. Dans la description détaillée suivante, de nombreux détails spécifiques sont exposés afin de fournir une compréhension plus approfondie du procédé. Cependant, il apparaîtra à l'homme du métier que le procédé peut être mis en œuvre sans ces détails spécifiques. Dans d'autres cas, des caractéristiques bien connues n'ont pas été décrites en détail pour éviter de compliquer inutilement la description.
- [0052] Dans ce qui suit, le terme « comprendre » est synonyme de (signifie la même chose que) « inclure » et « contenir », et est inclusif ou ouvert et n'exclut pas d'autres

éléments non récités. En outre, dans la présente description, les termes « environ », « substantiellement » « sensiblement » et « à peu près » sont synonymes de (signifie la même chose que) marge inférieure et/ou supérieure de 10% de la valeur donnée.

[0053] Le fluide sucré

[0054] Selon un ou plusieurs modes de réalisation, le fluide sucré comprend une solution aqueuse de sucres issus de la lignocellulose en C5 et/ou C6, et/ou de sucres issus des plantes saccharifères (e.g. glucose, fructose et saccharose), et/ou de sucres issus des plantes amylacées (e.g. dextrines, maltose et autres oligomères, voire d'amidon). Selon un ou plusieurs modes de réalisation, la solution aqueuse de sucres en C5 et/ou C6 provient du traitement d'une source renouvelable. Selon un ou plusieurs modes de réalisation, la source renouvelable est du type biomasse lignocellulosique qui peut notamment comprendre les substrats ligneux (e.g. feuillus et résineux), les sous-produits de l'agriculture (e.g. paille) ou ceux des industries génératrices de déchets lignocellulosiques (e.g. industries agroalimentaires, papeteries). La source renouvelable peut également provenir de plantes sucrières, comme par exemple la betterave sucrière et la canne à sucre ou encore les plantes amylacées comme le maïs et le blé. La solution aqueuse de sucres en C5 et/ou C6 peut également provenir d'un mélange de différentes sources renouvelables.

[0055] La biomasse produite par la souche appartenant au genre Clostridium

[0056] La biomasse bactérienne est principalement adsorbée sous forme de biofilm sur un support solide. Préférentiellement, les bactéries sont des souches appartenant à l'espèce *Clostridium beijerinckii* et/ou *Clostridium acetobutylicum*. Les bactéries utilisées dans le procédé peuvent être des souches génétiquement modifiées ou non et naturellement productrice d'isopropanol et/ou des souches de *Clostridium* naturellement productrice d'acétone génétiquement modifiées pour les faire produire de l'isopropanol.

[0057] Le support solide

[0058] Le support solide comprend une mousse de polyuréthane. La mousse de polyuréthane est particulièrement avantageuse car elle donne accès non seulement à la production de mélanges de type IBEA, mais elle donne aussi accès à la production de type continu par immobilisation de la biomasse bactérienne. En effet, la demanderesse a mis en évidence que la mousse de polyuréthane est capable de fixer les bactéries du genre *Clostridium* de façon suffisamment importante (i.e., au-delà du taux de dilution causant le lavage cellulaire) permettant de produire en continu des mélanges de type IBEA. De plus, la mousse de polyuréthane est adaptée pour être immobilisée par immersion dans un réacteur.

[0059] Selon un ou plusieurs modes de réalisation, la mousse de polyuréthane comprend au moins une des caractéristiques suivantes :

- des cavités volumiques (i.e., pores ou cellules) dont le diamètre de sphère

équivalent est compris entre 0,25 mm et 1,1 mm, de préférence entre 0,55 et 0,99 mm,
 - une surface spécifique interne comprise entre 4000 et 15000 m²/m³, de préférence entre 8000 et 10000 m²/m³, et
 - une densité apparente (*i.e.*, masse sur volume apparent) mesurée dans l'air comprise entre 10 et 80 g/L, de préférence entre 25 et 45 g/L.

[0060] Le diamètre de sphère équivalent des cavités volumiques peut être notamment obtenu par analyse au microscanner X (e.g. tube HR 70kV 200 microA Point focal medium ; détecteur Varian pixel :6 microns ; durée d'acquisition : 2h) d'un échantillon (e.g. 7 mm x 7mm x 15 mm) et reconstruction d'un volume (e.g. 5 mm x 5 mm x 5 mm avec une taille de voxel de 6 microns) avec l'hypothèse de cellules sphériques.

[0061] Le procédé

[0062] La figure 1 représente un schéma de production d'un mélange d'alcools à partir d'un substrat du type biomasse lignocellulosique.

[0063] En référence à la figure 1, le fluide sucré comprenant par exemple des sucres en C5 et/ou C6 est introduit par le conduit 1 dans un réacteur fermentaire 2 pour subir une étape de fermentation.

[0064] Dans le réacteur fermentaire 2, le fluide sucré est mis en contact avec la biomasse bactérienne supportée sur un support solide comprenant une mousse de polyuréthane. Les sucres fermentescibles (e.g. sucres en C5 et/ou C6) sont ainsi transformés en alcools et/ou solvants par les microorganismes pour produire un (premier) moût (ou jus ou vin) fermentaire, notamment enrichi en isopropanol, butanol, éthanol et acétone par rapport au fluide sucré.

[0065] L'étape de fermentation dans le réacteur fermentaire 2 peut être réalisée à une température comprise entre 28°C et 40°C, de préférence entre 30°C et 37°C, de manière à ce que le moût fermentaire comprenne des produits de la réaction de fermentation de type IBEA, par exemple de l'isopropanol qui est ensuite évacué par un conduit 3.

[0066] Le moût fermentaire est introduit par le conduit 3 dans une unité de séparation 4 (optionnelle) permettant de séparer et d'extraire les composés d'intérêt du moût de fermentation, ces derniers étant évacués par le conduit 5. Les résidus de la séparation, couramment appelés vinasses, sont évacués de l'unité de séparation 4 par le conduit 6. Les vinasses sont généralement composées d'eau ainsi que de tout produit liquide ou solide non converti ou non extrait lors des étapes précédentes. L'unité de séparation 4 peut mettre en œuvre une ou plusieurs distillations, et éventuellement une séparation des matières solides et/ou en suspension par exemple par centrifugation, décantation et/ou filtration.

[0067] Plusieurs mises en œuvre ou technologies de réacteur fermentaire existant dans l'état de l'art sont adaptées pour immobiliser la biomasse bactérienne par adsorption sur le support solide, et ce que la mise en œuvre ait lieu à l'intérieur du réacteur fermentaire

2 ou dans un réservoir secondaire en mode « in stream ». Par exemple, la biomasse bactérienne peut être immobilisée sur un support solide directement dans le réacteur fermentaire 2 ou indirectement dans un réservoir secondaire 7 (optionnel), fonctionnant par exemple en mode « in stream » par rapport au réacteur fermentaire 2. Le support solide ainsi chargé de biomasse bactérienne peut alors être introduit dans le réacteur fermentaire, par exemple par le conduit 8 ou tout autre moyen.

- [0068] Selon un ou plusieurs modes de réalisation, le support solide forme un lit fluidisé ou un lit fixe.
- [0069] Dans le cas d'un lit fluidisé, un flux de liquide peut être établi directement sur le lit de mousse de polyuréthane en direction descendante (puisque la densité du moût fermentaire est généralement supérieure à la densité de la mousse de polyuréthane). Selon un ou plusieurs modes de réalisation, la vitesse superficielle liquide du fluide sucré est supérieure à la vitesse minimale de fluidisation. Selon un ou plusieurs modes de réalisation, la vitesse superficielle liquide du fluide sucré est modifiée (e.g. augmentée) en fonction de l'évolution de l'écart de densité qui a lieu en cours de fermentation. Par exemple, au fur et à mesure que le biofilm se forme sur le support solide, la densité du support solide peut être amenée à varier (e.g. augmenter), donnant lieu à des régimes hydrauliques évolutifs (e.g. taux de recyclage optionnel différents en début de fermentation et en fin de fermentation).
- [0070] Dans le cas d'un lit fixe, un support solide comprenant un empilage vrac ou structuré de particules de mousse de polyuréthane peut être envisagé, avec ou sans agitation mécanique (e.g. à l'intérieur d'une colonne).
- [0071] Selon un ou plusieurs modes de réalisation, le milieu fermentaire traverse le lit solide en courant montant ou descendant (« upflow » ou « downflow » selon la terminologie anglo-saxonne). Par exemple dans le cas d'une circulation liquide descendante, un système permettant un dégagement gazeux à contrecourant peut être prévu. Selon un ou plusieurs modes de réalisation, une circulation radiale peut être également envisagée dans le réacteur fermentaire 2, par exemple dans le cas où l'on applique une agitation mécanique au centre du réacteur fermentaire 2 (e.g. turbine radiale du type Rushton). Selon un ou plusieurs modes de réalisation, le solide est immobilisé à l'intérieur d'un panier concentrique à l'axe d'agitation, permettant notamment de contrôler les vitesses du milieu réactionnel et l'hydrodynamique imposée autour de ce dernier (e.g. réacteur du type Robinson Mahoney).
- [0072] *Immersion et mise en œuvre du support solide*
- [0073] Selon un ou plusieurs modes de réalisation, le support solide est partiellement ou totalement immergé, pour notamment augmenter la formation des biofilms et améliorer les performances.
- [0074] Selon un ou plusieurs modes de réalisation, le support solide est introduit sous forme

d'un seul bloc, par exemple en forme de cylindre dont le diamètre est inférieur ou sensiblement égal au diamètre interne du réacteur fermentaire 2. Selon un ou plusieurs modes de réalisation, comme montré sur la figure 2, le diamètre du support solide 9 est sensiblement égal au diamètre interne du réacteur fermentaire 2. Le bloc peut ainsi correspondre à un média filtrant au sein duquel les biofilms vont se développer. Bien qu'il soit possiblement plus difficile de gérer un apport d'insolubles pouvant être entraînés avec le fluide sucré, les performances d'un procédé utilisant un réacteur fermentaire 2 tel que présenté sur la figure 1 sont parmi les plus élevées. En revanche, le support solide 9 tel que représenté sur la figure 2 peut occasionner une légère surpression dans la phase liquide libre, au niveau inférieur. Il est à noter que si le dégagement gazeux est important pendant la fermentation, une poche de gaz peut se former sous le support solide et des passages préférentiels au sein du support solide 9 peuvent être générés lors de l'évacuation du gaz.

[0075] Selon un ou plusieurs modes de réalisation, comme montré sur la figure 3, le bloc de support solide 9 peut-être centré, excentré ou accolé à une paroi du réacteur fermentaire 2. Avantageusement, le support solide 9 ne perturbe en aucune façon la circulation du liquide en entrée comme en sortie du procédé, notamment lorsque opéré en continu. De plus, la présence éventuelle d'insolubles tels que ceux issus des grandes céréales ne pose pas de problèmes. Le flux de fluide sucré arrivant par le conduit 1 peut également être introduit au droit des blocs de support solide 9, par exemple quand ceux-ci affleurent à la surface du milieu réactionnel du réacteur fermentaire 2. Avantageusement, lorsque le support solide affleure à la surface du milieu réactionnel au niveau de l'entrée du fluide sucré, le milieu est localement moins concentré en alcool et la croissance des bactéries est favorisée.

[0076] Il est entendu qu'il n'est pas requis d'utiliser un support solide 9 d'un seul bloc. Selon un ou plusieurs modes de réalisation, le support solide comprend un filet ou un contenant avec maillage 10 comprenant des cubes ou des parallélépipèdes ou autres éléments de formes quelconques à 3 dimensions (e.g. polyèdres) de grande ou petite taille (e.g. au moins une dimension entre 3 mm et 10 m, tel que de 2 cm à 1 m), tel que montré sur la figure 4, les éléments étant constitués de mousse de polyuréthane. Selon un ou plusieurs modes de réalisation, le filet ou le contenant avec maillage 10 forme un cylindre dont le diamètre est inférieur ou sensiblement égal au diamètre interne du réacteur fermentaire 2. Selon un ou plusieurs modes de réalisation, le diamètre du filet ou du contenant avec maillage 10 est sensiblement égal au diamètre interne du réacteur fermentaire 2.

[0077] Il se peut que des dégagements gazeux aient tendance à faire remonter le support solide 9. En revanche, une plaque perforée, un simple filet ou une grille 11 (voir figure 5) peut suffire pour maintenir le support solide, par exemple en mouvement, dans le

réacteur fermentaire 2.

- [0078] Dans les modes de réalisation des figures 2 à 5, le réacteur fermentaire 2 est à circulation fluide montante. En revanche, il est entendu que le sens de circulation du fluide sucré peut être descendant. Il est également entendu que le sens de circulation peut être globalement montant ou descendant (vu de l'extérieur du réacteur fermentaire) et radial à l'intérieur du réacteur fermentaire 2.
- [0079] Etapes de finition
- [0080] Comme indiqué sur la figure 6, le procédé de production d'alcools peut mettre en œuvre un réacteur de finition 12 dit « finisseur » (optionnel). Selon un ou plusieurs modes de réalisation, le moût fermentaire soutiré du réacteur fermentaire 2 par le conduit 3 est introduit dans le réacteur de finition 12 adapté pour produire un deuxième moût fermentaire enrichi en IBEA par rapport au moût fermentaire soutiré du réacteur fermentaire 2. Le deuxième moût fermentaire est ensuite soutiré du réacteur de finition 12 et évacué par le conduit 6 et introduit dans l'unité de séparation 4 (optionnelle) permettant de séparer et d'extraire les composés d'intérêt du moût de fermentation, ces derniers étant évacués par le conduit 5. Le réacteur de finition 12 est de préférence sans mousse PU. Le finisseur est de préférence homogène et a pour objectif d'exploiter au mieux le potentiel en titre IBEA de la souche Clostridium, en permettant un temps de séjour prolongé, et d'ajouter une quantité de substrat carboné qui correspond aux besoins de la souche. Le réacteur de finition 12 permet notamment de garantir un épuisement des oses.
- [0081] Selon un ou plusieurs modes de réalisation, le procédé de production d'alcools met en outre une étape de récupération partielle des composés IBEA produits présents dans le premier et/ou le deuxième moût fermentaire. Cette étape d'extraction des composés IBEA fait appel à une étape de stripage avec un gaz sous pression envoyé dans le réacteur fermentaire 2 et/ou le réacteur de finition 12 afin d'entraîner les alcools présents dans la phase aqueuse.
- [0082] Selon un ou plusieurs modes de réalisation, le gaz de stripage est un gaz produit directement par fermentation et qui a été préalablement stocké (par des méthodes connues de l'homme de l'art) avant sa mise en œuvre. Le gaz de stripage comprend typiquement du dioxyde de carbone et éventuellement de l'hydrogène. Cette étape de stripage au gaz permet avantageusement de contrôler au cours de la fermentation la teneur en alcools présents dans le milieu afin de limiter les phénomènes d'inhibition des microorganismes qui apparaissent lorsque la teneur en alcools atteint une valeur critique. Selon un ou plusieurs modes de réalisation, l'étape de stripage au gaz peut être soit réalisée en continue soit de manière discontinue. Le débit de gaz fermentaire rapporté au volume de fermenteur est par exemple compris entre 0,5 et 2,5 l/l/min, de préférence compris entre 0,7 et 1,1 l/l/min.

[0083] Selon un ou plusieurs modes de réalisation, le procédé de récupération peut également être mis en œuvre de telle sorte que l'étape de stripage au gaz soit opérée dans un finisseur 12 contenant un solvant organique non miscible à l'eau, le solvant formant une phase organique surnageant au-dessus du moût de fermentation. Le solvant sera par ailleurs choisi de manière à être biocompatible avec le microorganisme.

[0084] Le gaz de stripage est ainsi injecté dans le moût de fermentation de manière à entraîner les alcools produits dans la phase organique surnageante et de telle façon qu'une partie des alcools soient transférés dans la phase organique lorsque le gaz de stripage traverse ladite phase organique.

Exemples

[0085] Exemple de référence : test en continu de cellules en suspension

[0086] On met en œuvre expérimentalement un essai en mode continu avec des cellules en suspension. Un bioréacteur disposant de 5 L de volume total est rempli avec 1,8 L de milieu fermentaire. Le glucose initial est fixé à 60 g/L, et l'inoculum est de 0,2L, soit un taux d'inoculation à 10% en volume par rapport au volume total du milieu fermentaire avec des cellules au taux de croissance maximal, après avoir subi une purge à l'azote d'1 heure visant à s'assurer d'une anaérobiose (stricte) dès le début de l'essai. La purge à l'azote est maintenue pendant l'étape batch préliminaire (4-5 heures). Le microorganisme employé est *Clostridium beijerinckii* DSM 6423. La température et l'agitation mécanique sont fixées à 36°C et 60 rpm respectivement dès le début de l'essai ; la pression est sensiblement atmosphérique + la hauteur d'eau du bioréacteur. L'essai se déroule en 2 étapes :

- une première étape batch (durée 4-8 heures) correspondant au temps de latence (« lag time » selon la terminologie anglo-saxonne) et démarrage de la croissance exponentielle (accompagné de génération de gaz de fermentation) ; et
- une deuxième étape en mode continu dans laquelle des taux de dilution différents sont imposés.

[0087] Une période de temps correspondante au minimum à trois fois (préférentiellement au moins 5 fois) le temps de séjour est attendue à chaque nouvelle consigne pour stabilisation. Ensuite, le moût fermentaire est analysé en glucose et métabolites principaux (i.e., isopropanol, butanol, éthanol et acétone).

[0088] La figure 7 montre l'évolution de la productivité volumique r en IBEA g/L.h en fonction du taux de dilution D imposé dans le bioréacteur (h^{-1}). Le taux de dilution D est défini comme le débit volumique entrant dans le réacteur divisé par le volume de dernier. Dans le cas d'un procédé avec microorganismes en suspension, ce paramètre peut être considéré à la fois comme l'inverse du temps de séjour pour le fluide et pour

les microorganismes. Conséquemment, un phénomène de lavage cellulaire apparaît au-delà d'un certain taux de dilution, conduisant à une perte en productivité volumique. Dans ce cas, le taux de dilution critique se situe entre 0,04 et 0,06 h⁻¹, moment où la productivité maximale atteint une valeur d'environ 0,45 g/L.h d' IBEA.

[0089] Test en mode batch avec de la mousse de polyuréthane

[0090] On met en œuvre expérimentalement un procédé en mode batch : deux fermentations avec des supports solides de type mousse de polyuréthane (Mousse 1, Mousse 2) aux caractéristiques physiques et structurales différentes, et une fermentation de contrôle (cellules en suspension). Les principales caractéristiques de ces deux mousses apparaissent dans le tableau 1 suivant :

[0091] [Tableaux1]

Support solide	Mousse 1	Mousse 2
Diamètres des pores (mm)	0,73	1
Surface spécifique interne (m ² /m ³)	8200	6000
Densité apparente (g/L)	29,8	20,5

[0092] Plusieurs bioréacteurs sont remplis de 20 mL de milieu fermentaire, qui a préalablement été mis sous anaérobiose afin de garantir l'absence d'oxygène. On introduit dans chaque bioréacteur 40% de volume solide (volume apparent) par rapport au volume total du bioréacteur. Le glucose initial est fixé à 90 g/L, le taux d'ensemencement est de 10% (vol liquide) (même inoculum pour l'ensemble des fermentations) avec des cellules au taux de croissance maximal. Le microorganisme employé est *Clostridium beijerinckii* DSM 6423. L'ensemble des bioréacteurs est introduit dans une jarre d'anaérobiose, et mis sous température (36°C), pour une durée fixe de 12 jours. La pression est sensiblement atmosphérique + la hauteur d'eau du bioréacteur. Ensuite, le moût de fermentation final est analysé, ainsi que les solides supportant du biofilm. Chaque condition opératoire est réalisée en triplicata afin de s'assurer de la répétabilité des expériences.

[0093] La présence des solides du type mousse de polyuréthane a plusieurs effets sur la surconsommation conséquente de glucose (voir tableau 2 ci-dessous) et sur le titre final en IBEA.

[0094]

[Tableaux2]

Support solide	Mousse 1	Mousse 2
Consommation de glucose (g/L)	51,4	44,7
Surconsommation de glucose (%) (par rapport au contrôle qui n'a pas de support solide selon la présente description)	31,4	14,3

- [0095] Le titre est quantifié à partir du rendement de fermentation qui est considéré invariable et la consommation en glucose sur chaque essai. Ainsi, les fermentations batch avec la Mousse 1 et la Mousse 2 ont produit respectivement 17,5 g/L et 15,2 g/L d'IBEA, titre dans les deux cas supérieur à celui obtenu avec la fermentation de contrôle (13,3 g/L d'IBEA)
- [0096] Exemple selon la présente description : test en continu avec de la mousse de polyuréthane
- [0097] On met en œuvre expérimentalement le procédé selon des modes de réalisation de la présente description, au moyen de deux fermentations en mode continu avec immobilisation sur des supports solides de type mousse de polyuréthane (Mousse 1, Mousse 2) aux caractéristiques physiques et structurales différentes. Les principales caractéristiques de ces deux mousses sont explicitées dans le tableau 1. Le remplissage est effectué en mode vrac, avec des cubes de dimensions 3 mm x 5 mm x 5 mm.
- [0098] A l'intérieur d'une colonne en verre de 112 ml (dimensions : diamètre interne = 32 mm, H= 13,9 cm) est introduit le support solide, à un taux volumique de 50% dans la colonne par rapport au volume interne total de la colonne. La colonne est disposée dans la boucle de recirculation d'une deuxième fiole de fermentation, dont le volume de milieu fermentaire atteint 80 ml. L'ensemble du système fermentaire a préalablement été mis sous anaérobiose par purge d'azote afin de garantir l'absence d'oxygène. Le glucose dans une nourrice de charge est fixé à 90 g/L, et le support solide subit un taux d'inoculation à 10% en volume avec des cellules au taux de croissance maximal par rapport au volume total du milieu fermentaire. Le microorganisme employé est *Clostridium beijerinckii* DSM 6423. Le système est mis sous température (36°C), sans agitation. La pression est sensiblement atmosphérique + la hauteur d'eau de la colonne en verre. L'essai se déroule en 2 étapes :
- une première étape batch (durée 4-5 heures) correspondant au « lag time » et démarrage de la croissance exponentielle (accompagné de génération gaz de fermentation) ; et
 - une deuxième étape en mode continu dans laquelle des taux de dilution différents sont imposés.

[0099] Une période de temps correspondante au minimum à trois fois le temps de séjour est attendue à chaque nouvelle consigne pour stabilisation. Périodiquement, le moût de fermentation final est prélevé stérilement de la colonne et analysé en glucose et métabolites principaux (*i.e.*, isopropanol, butanol, éthanol et acétone).

[0100] La présence de support solide du type mousse de polyuréthane a plusieurs effets sur la fermentation en mode continu : le tableau 3 ci-dessous montre l'évolution de la fermentation, en fonction du taux de dilution imposé, du pourcentage de consommation de glucose (%), de la teneur totale en IBEA (g/L), et de la productivité volumique (g/L.h en IBEA). Par rapport aux conditions de cellules en suspension (exemple de référence), une augmentation de productivité est observée dans le cas où les cellules sont immobilisées sur la Mousse 1 (facteur 6) ou la Mousse 2 (facteur 3).

[0101] [Tableaux3]

	Mousse 1	Mousse 2	Cellules libres
Taux de dilution (h ⁻¹)	0,14	0,14	0,05
Consommation de glucose (g/L)	48,6	23,4	28,8
Teneur en IBEA (g/L)	17	9	9
Productivité volumique (g/L.h)	2,46	1,3	0,4

[0102] Bien que des modes de réalisation et exemples mentionnés ci-dessus soient décrits en détail, il est entendu que des modes de réalisation supplémentaires peuvent être envisagés. Par exemple, la biomasse bactérienne utilisée dans le procédé selon la présente description peut correspondre à une autre souche que *Clostridium beijerinckii* DSM 6423. Aussi, les mousses de polyuréthane selon la présente description peuvent être autres que celles décrites au tableau 1. De plus, des teneurs en IBEA et des productivités volumiques améliorées peuvent être obtenues au moyen de taux d'inoculation, de taux de sucre, de taux de dilution, de températures, de pressions, d'agitations, de durées, etc. autres que ceux indiqués dans les exemples.

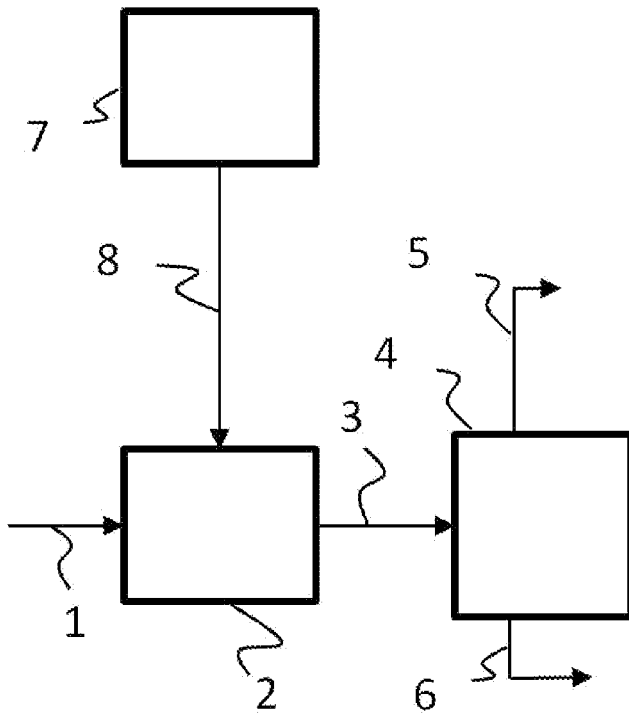
[0103] Sauf spécification contraire dans la présente description, il sera apparent pour l'homme du métier que tous les modes de réalisation décrits ci-dessus peuvent être combinés entre eux. Par exemple, sauf spécification contraire, toutes les caractéristiques des modes de réalisation décrits ci-dessus, peuvent être combinées avec ou remplacées par d'autres caractéristiques d'autres modes de réalisation.

Revendications

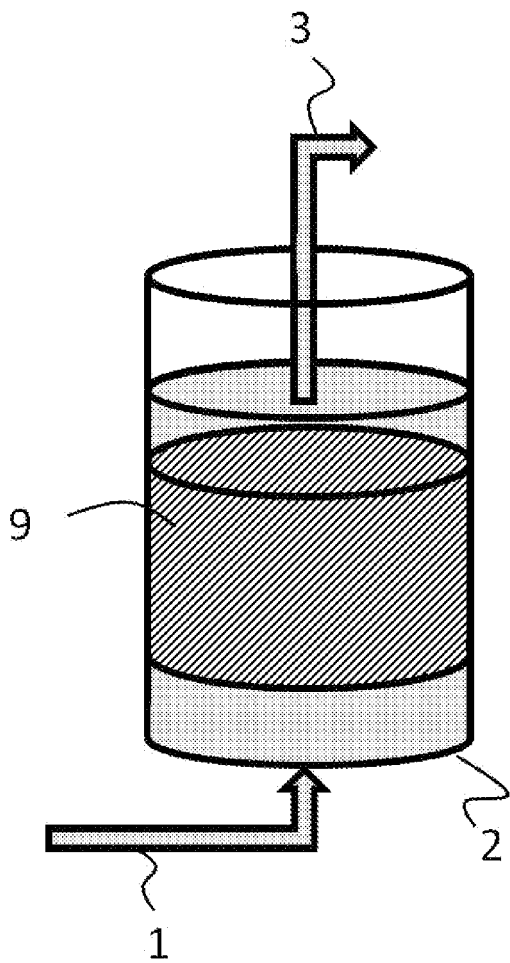
- [Revendication 1] Procédé de production d'alcools, dans lequel on introduit un fluide sucré dans un réacteur fermentaire (2) pour produire un moût fermentaire enrichi en isopropanol, butanol, éthanol et acétone par rapport au fluide sucré, le réacteur fermentaire (2) comprenant une biomasse produite par une souche appartenant au genre *Clostridium* supportée sur un support solide (9) comprenant une mousse de polyuréthane.
- [Revendication 2] Procédé selon la revendication 1, dans lequel la mousse de polyuréthane comprend au moins une des caractéristiques suivantes :
- des cavités volumiques dont le diamètre de sphère équivalent est compris entre 0,25 mm et 1,1 mm,
 - une surface spécifique interne comprise entre 4000 et 15000 m²/m³, et
 - une densité apparente mesurée dans l'air comprise entre 10 et 90 g/L.
- [Revendication 3] Procédé selon la revendication 1 ou la revendication 2, dans lequel le fluide sucré est introduit en continu dans le réacteur fermentaire (2).
- [Revendication 4] Procédé selon la revendication 3, dans lequel la fermentation est réalisée à un taux de dilution (D) du fluide sucré rapporté au volume du réacteur fermentaire (2) compris entre 0,04 h⁻¹ et 1 h⁻¹.
- [Revendication 5] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la biomasse produite par la souche appartenant au genre *Clostridium* comprend une bactérie appartenant à une espèce sélectionnée parmi les espèces *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium saccharobutylicum*, *Clostridium tyrobutyricum*, *C. saccharoperbutylacetonicum*, *C. butylicum*.
- [Revendication 6] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la biomasse produite par la souche appartenant au genre *Clostridium* comprend une bactérie génétiquement modifiée appartenant à l'espèce *Clostridium beijerinckii* naturellement productrice d'isopropanol et/ou *Clostridium acetobutylicum* génétiquement modifiée pour la production d'isopropanol.
- [Revendication 7] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la biomasse produite par la souche appartenant au genre *Clostridium* est immobilisée sur le support solide (9) dans un réservoir secondaire (7), et le support solide (9) supportant la biomasse produite par la souche appartenant au genre *Clostridium* est introduit dans le réacteur fermentaire (2).
- [Revendication 8] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans

- lequel, la biomasse produite par la souche appartenant au genre *Clostridium* est immobilisée sur le support solide sous forme de biofilm.
- [Revendication 9] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le support solide (9) est introduit dans le réacteur fermentaire (2) sous la forme d'un ou plusieurs blocs, et/ou sous la forme d'un filet ou d'un contenant avec maillage (10) comprenant une pluralité de cubes, parallélépipèdes ou autres formes quelconques à 3 dimensions de mousse de polyuréthane.
- [Revendication 10] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le support solide (9) est sensiblement sous la forme d'un cylindre circulaire droit ayant un diamètre inférieur ou sensiblement égal au diamètre interne du réacteur fermentaire (2).
- [Revendication 11] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le support solide (9) forme un lit fluidisé ou un lit fixe dans le réacteur fermentaire (2).
- [Revendication 12] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le support solide (9) est disposé dans le réacteur fermentaire (2) de sorte à affleurer à la surface du milieu réactionnel du réacteur fermentaire (2).
- [Revendication 13] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la production du moût fermentaire est mise en œuvre par fermentation en anaérobiose.
- [Revendication 14] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la fermentation est réalisée à une température comprise entre 28°C et 40°C, et/ou à une pression comprise entre environ 0,1 MPa et 0,15 MPa, et/ou pendant une durée d'au moins 250 heures.
- [Revendication 15] Réacteur fermentaire (2) comprenant une biomasse adaptée pour la production d'isopropanol, de butanol, d'éthanol et d'acétone et produite par une souche appartenant au genre *Clostridium* supportée sur un support solide (9) comprenant une mousse de polyuréthane.

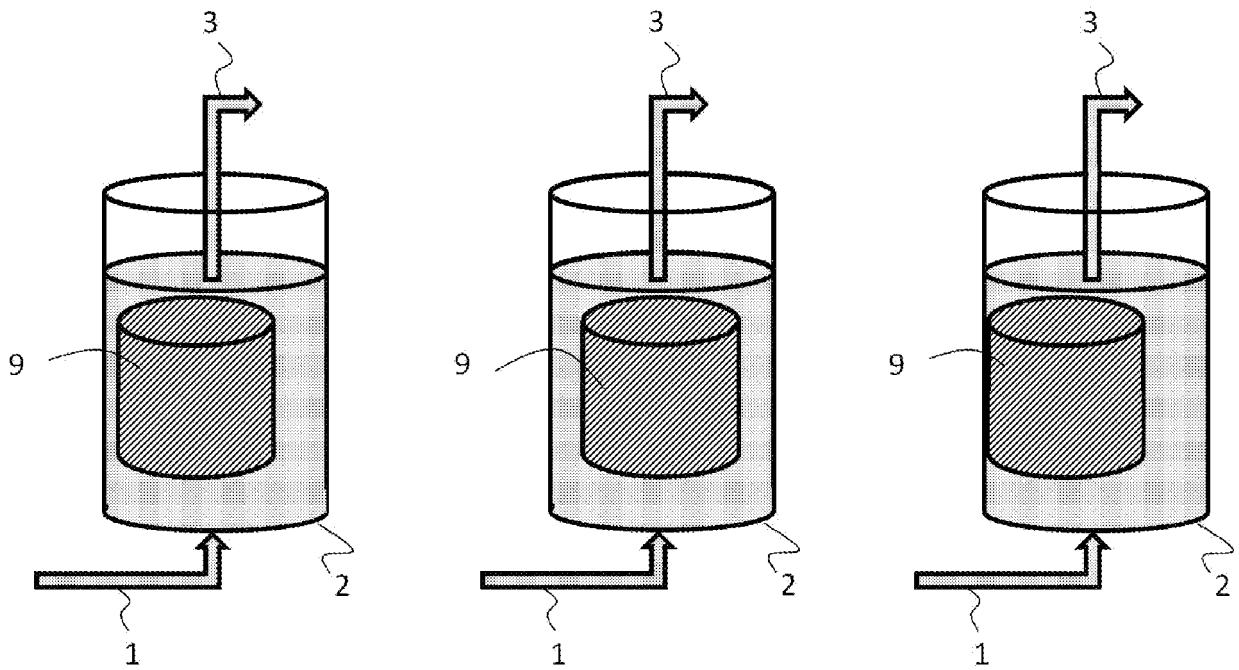
[Fig. 1]



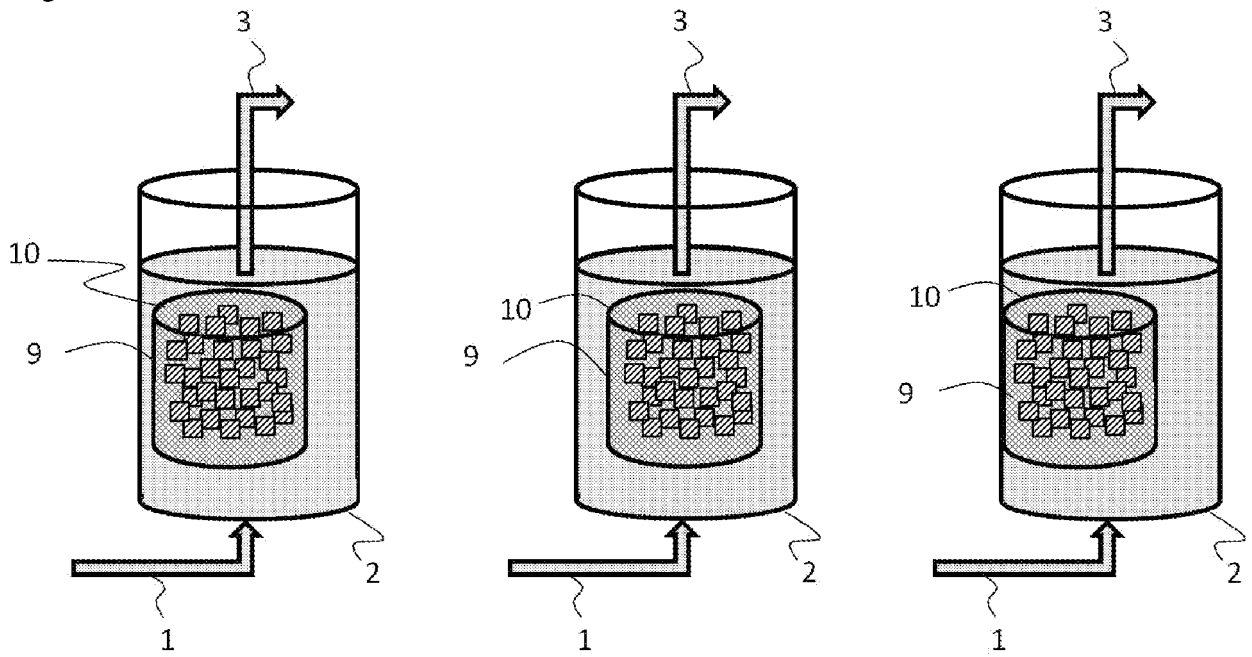
[Fig. 2]



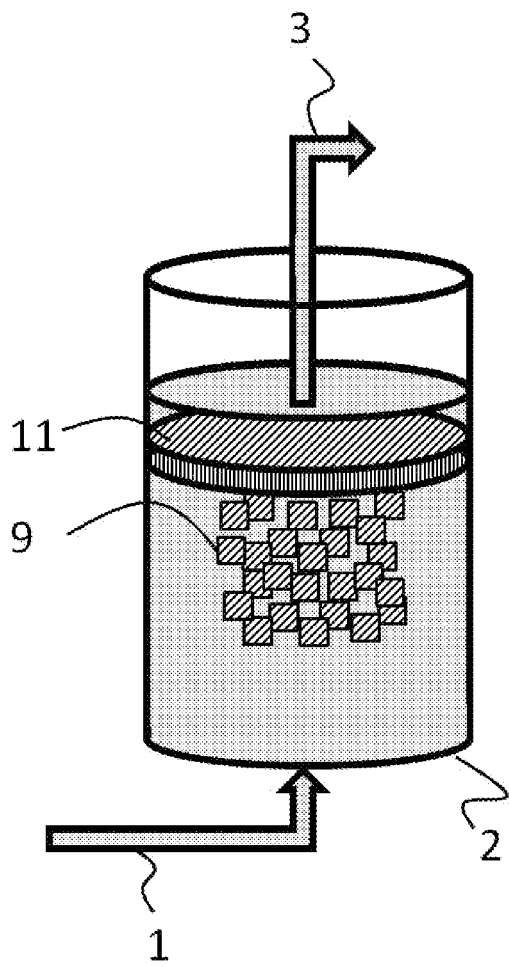
[Fig. 3]



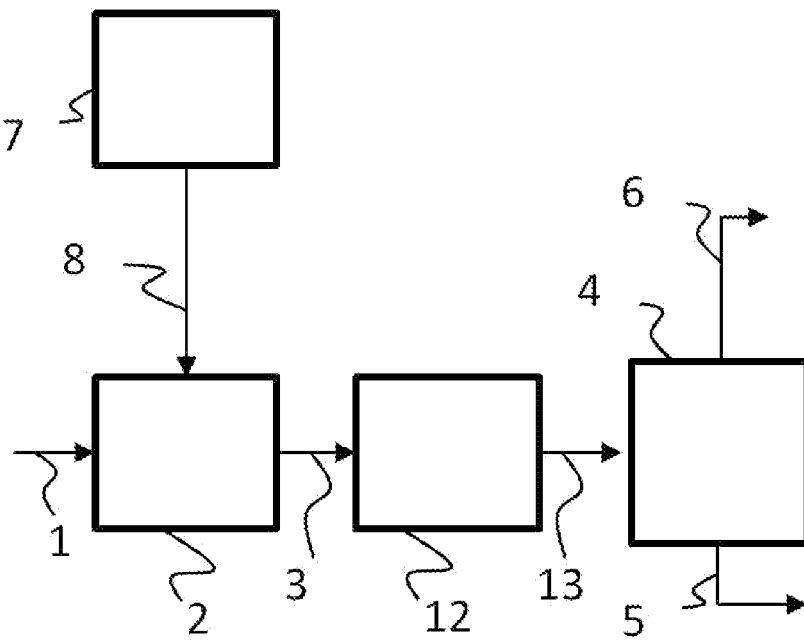
[Fig. 4]



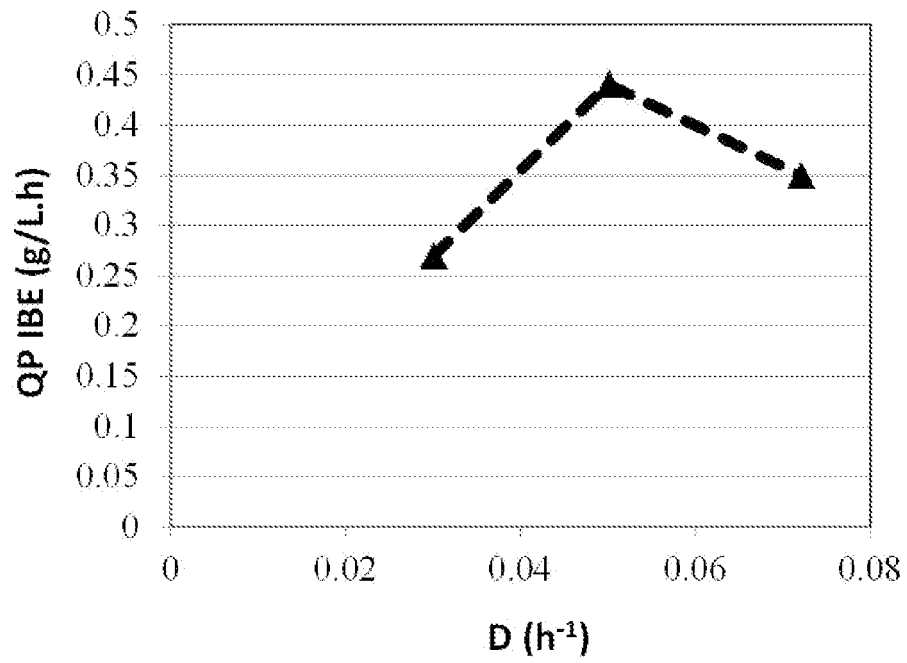
[Fig. 5]



[Fig. 6]



[Fig. 7]



RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveau) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ETABLISSEMENT DU PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.

Le demandeur a maintenu les revendications.

Le demandeur a modifié les revendications.

Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.

Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.

Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITES DANS LE PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.

Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.

Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.

Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION

YANG YING ET AL: "Production of butanol and isopropanol with an immobilized Clostridium",
BIOPROCESS AND BIOSYSTEMS ENGINEERING,
SPRINGER, DE,
vol. 39, no. 3,
28 décembre 2015 (2015-12-28), pages
421-428, XP035882748,
ISSN: 1615-7591, DOI:
10.1007/S00449-015-1525-1
[extrait le 2015-12-28]

SALEHA SHAMSUDIN ET AL: "Production of Acetone, Butanol and Ethanol (ABE) by Clostridium saccharoperbutylacetonicum N1-4 with Different Immobilization Systems",
PAKISTAN JOURNAL OF BIOLOGICAL SCIENCES,
vol. 9, no. 10,
1 janvier 2006 (2006-01-01), pages
1923-1928, XP055593092,
PK
ISSN: 1028-8880

FR 2 536 087 A1 (K F ENG CO LTD [JP])
18 mai 1984 (1984-05-18)

CN 102 643 870 B (INST PROCESS ENG CAS)
30 avril 2014 (2014-04-30)

ROMASKEVIC TATJANA, BUDRIENE SAULUTE,
PIELICHOWSKI KRZYSZTOF, PIELICHOWSKI JAN:
"Application of polyurethane-based materials for immobilization of enzymes and cells: a review",
CHIMIJA, [Online]
vol. 17, no. 4, 2006, pages 74-89,
XP055040112,
ISSN: 0235-7216
Extrait de l'Internet:
URL: http://www.elibrary.lt/resursai/LMA/Chemija/Che64/Che_14.pdf

2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL

NEANT

3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND

DE LA VALIDITE DES PRIORITES

NEANT