

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
COURBEVOIE

①1 N° de publication :

3 134 582

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

②1 N° d'enregistrement national :

22 03535

⑤1 Int Cl⁸ : **C 12 N 1/20** (2022.01), C 12 P 7/24

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 15.04.22.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 20.10.23 Bulletin 23/42.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

○ Demande(s) d'extension :

⑦1 Demandeur(s) : *RHODIA OPERATIONS Société par
actions simplifiée — FR.*

⑦2 Inventeur(s) : GAREL Laurent, PIREAU Guillaume et
DAVID Chenglu.

⑦3 Titulaire(s) : RHODIA OPERATIONS Société par
actions simplifiée.

⑦4 Mandataire(s) : RHODIA OPERATIONS.

⑤4 Procédé de préparation d'un composé de formule (I) par fermentation.

⑤7 Titre : Procédé de préparation d'un composé de for-
mule (I) par fermentation

Domaine de l'invention

La présente invention se réfère à un procédé de prépa-
ration d'un composé de formule (I)
dans lequel n est compris entre 0 et 5, de préférence
compris entre 1 et 2,

R, identique ou différent, est choisi dans le groupe
constitué de OH, OR¹, formyle, CO₂H, les chaînes alkyles
linéaires ou branchées, optionnellement substituées, com-
prenant entre 1 et 6 atomes de carbone, alcényles, linéaires
ou branchées, optionnellement substituées, comprenant
entre 1 et 6 atomes de carbone

comprenant une étape (a) dans laquelle un substrat est
transformé en composé de formule (I) par bioconversion en
présence d'un microorganisme caractérisé en ce que
l'étape (a) est réalisée dans des conditions non aseptiques,
de préférence non stériles.

FR 3 134 582 - A1



Description

Titre de l'invention : Procédé de préparation d'un composé de formule (I) par fermentation

Domaine de l'invention

[0001] La présente invention se réfère à un procédé de préparation d'un composé de formule (I) comprenant une étape (a) dans laquelle un substrat est transformé en composé de formule (I) par bioconversion en présence d'un microorganisme caractérisé en ce que l'étape (a) est réalisée dans des conditions non aseptisées, de préférence dans des conditions non stériles.

Art antérieur

[0002] La vanilline peut être obtenue par différentes méthodes connues de l'homme de l'art, et notamment par les deux voies suivantes :

- Une voie dite naturelle basée sur un procédé biotechnologique comprenant notamment la culture d'un microorganisme apte à permettre la biotransformation d'un substrat de fermentation en vanilline. Il est notamment connu de la demande EP0885968 un tel procédé dans lequel le substrat de fermentation est l'acide férulique. Le brevet US 5017388 décrit un procédé dans lequel le substrat de fermentation est l'eugénol et/ou l'isoeugénol. Ces procédés aboutissent à la préparation d'une vanilline dite vanilline naturelle.
- Une voie dite synthétique comprenant des réactions chimiques classiques à partir du gaïacol ne faisant pas intervenir de microorganisme. Ce procédé aboutit à la préparation d'une vanilline dite vanilline synthétique.

[0003] Enfin la vanilline peut également être préparée selon une voie qualifiée de « bio-based » dans laquelle la vanilline est issue de lignine, on peut citer en particulier les documents US 2745796, DE1132113 et l'article intitulé « Preparation of lignin from wood dust as vanillin source and comparison of different extraction method » by Azadbakht et al in International Journal of Biology and Biotechnology, 2004, vol 1, No 4, pp 535-537, ou préparée à partir de matériaux d'origine naturelle, on peut citer en particulier le document WO 2019/020773.

[0004] La frambinone également être obtenue par différentes méthodes et notamment par un procédé de bioconversion tel que décrit dans le document CN 112391418.

[0005] Les procédés permettant la production d'une vanilline ou d'une frambinone dite naturelle sont réalisés dans des fermenteurs, dans des conditions stériles. La stérilisation est en générale obtenue par l'injection dans les dispositifs utilisés de vapeur d'eau pendant une durée en générale supérieure à 20 min. Les réactifs sont en général également stériles notamment par passage sur membrane filtrante. Ces procédés sont

donc fastidieux et coûteux à mettre en œuvre et requiert un équipement spécifique pouvant être stérilisé, l'impact énergétique de ces procédés est également très important.

[0006] La présente invention vise à mettre à disposition un procédé de préparation d'un composé de formule (I) simple à mettre en œuvre et dont l'empreinte écologique et/ou énergétique est améliorée.

[0007] Brève description

[0008] Un premier objet de la présente invention porte sur un procédé de préparation d'un composé de formule (I) comprenant une étape (a) dans laquelle un substrat est transformé en composé de formule (I) par bioconversion en présence d'un microorganisme caractérisé en ce que l'étape (a) est réalisée dans des conditions non stériles.

Description détaillée

[0009] Dans le cadre de la présente invention, et sauf indication contraire, l'expression « compris entre ...et... » inclut les bornes.

[0010] Dans le cadre de la présente invention, et sauf indication contraire, la croissance d'un microorganisme se réfère à un processus dans lequel ledit microorganisme se multiplie. La croissance aboutit à la production d'une biomasse.

[0011] Dans le cadre de la présente invention, et sauf indication contraire, le terme « bioconversion » se réfère à un procédé biotechnologique dans lequel un microorganisme permet la transformation d'un substrat en un produit de bioconversion. Le microorganisme peut être une souche sauvage, génétiquement modifiée obtenue par biologie moléculaire ou mutée, notamment par mutagénèse aléatoire ou dirigée.

[0012] Dans le cadre de la présente invention, et sauf indication contraire, le terme « procédé réalisé en conditions aseptiques » se réfère à un procédé réalisé dans des conditions exemptes de tout germe et/ou microorganisme.

[0013] Dans le cadre de la présente invention, et sauf indication contraire, le terme « procédé réalisé en conditions stériles » se réfère à un procédé réalisé dans des conditions exemptes de tout germe et/ou microorganisme susceptible d'être délétère au microorganisme apte à transformer un substrat en composé de formule (I) utilisé dans le cadre du procédé de la présente invention.

[0014] Dans le cadre de la présente invention, et sauf indication contraire, l'asepsie ou la stérilisation peut être obtenue par toute méthode, en particulier thermique, chimique, mécanique ou par rayonnement, permettant l'élimination des germes et/ou microorganismes. L'asepsie ou la stérilisation peuvent être réalisées sur les fluides, matières premières, et/ou dispositifs utilisés dans le cadre du procédé selon la présente invention. A titre illustratif on peut citer notamment, les méthodes suivantes :

- Stérilisation par chaleur sèche ou humide, réalisée par montée en température jusqu'à une température suffisante, suivie d'un maintien de cette température sur une durée suffisante pour l'élimination des germes et/ou microorganismes, à titre illustratif la température peut être de 121°C, puis maintien de cette température de 121°C pendant une durée suffisante permettant l'élimination des germes,
- Filtration sur membrane ou plusieurs filtrations successives sur membrane, dont le plus petit diamètre de coupure permet l'élimination de tout germe et/ou microorganisme

[0015] Dans le cadre de la présente invention, et sauf indication contraire, le terme « réacteur » fait référence à un récipient apte à la réalisation de réactions chimiques. Dans le cadre de la présente invention, le réacteur peut être utilisé après avoir été aseptisé ou stérilisé ou sans aseptisation ou stérilisation.

[0016] Dans le cadre de la présente invention, et sauf indication contraire, le terme « fermenteur » fait référence à un réacteur apte à la réalisation de fermentations. Dans le cadre de la présente invention, le fermenteur peut être utilisé après avoir été aseptisé ou stérilisé ou sans aseptisation ou stérilisation.

[0017] Dans le cadre de la présente invention et sauf indication contraire, un composé de formule (I) obtenu par un procédé de bioconversion peut être qualifié de composé de formule (I) naturel.

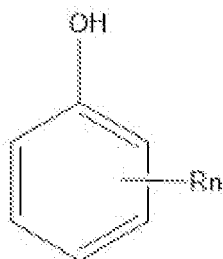
[0018] Dans le cadre de la présente invention et sauf indication contraire, une frambinone obtenue par un procédé de bioconversion peut être qualifiée de frambinone naturelle.

[0019] Dans le cadre de la présente invention et sauf indication contraire, une vanilline obtenue par un procédé de bioconversion peut être qualifiée de vanilline naturelle.

[0020] Un premier aspect de la présente invention se réfère à un procédé de préparation d'un composé de formule (I) comprenant une étape (a) dans laquelle un substrat est transformé en composé de formule (I) par bioconversion en présence d'un microorganisme caractérisé en ce que l'étape (a) est réalisée dans des conditions non stériles.

[0021] Dans le cadre de la présente invention, un composé de formule (I) présente la formule suivante :

[0022] [Chem.1]



Formule (I)

[0023] dans lequel n est compris entre 0 et 5, de préférence compris entre 1 et 2,

[0024] R, identique ou différent, est choisi dans le groupe constitué de OH, OR₁, formyle, CO₂H, les chaînes alkyles linéaires ou branchées, optionnellement substituées, comprenant entre 1 et 6 atomes de carbone, alcényles, linéaires ou branchées, optionnellement substituées, comprenant entre 1 et 6 atomes de carbone.

[0025] Selon un mode de réalisation particulier, R est choisi dans le groupe constitué de formyle -CHO, OH, OMe, OEt, OPr, OBu, méthyle, éthyle, -(CH₂)₂-C(O)-CH₃, -CH=CH-C(O)-CH₃, -CH=CH-CO₂H, -CO₂H, -CH₂-OH.

[0026] Selon un mode de réalisation particulier, le composé de formule (I) est choisi parmi vanilline et frambinone.

[0027] Dans le cadre de la présente invention, le microorganisme peut être n'importe quel micro-organisme capable de former le composé de formule (I) par bioconversion d'un substrat approprié. Le microorganisme, en particulier bactérie ou fungus, peut être un microorganisme sauvage, modifié génétiquement par biologie moléculaire, muté, par mutagénèse aléatoire ou dirigée.

[0028] De préférence le microorganisme est choisi parmi les bactéries appartenant à l'ordre des *Actinomycetales*, *Caulobacterales* ou *Pseudomonadales*, de préférence appartenant à la famille des *Streptomycetaceae*, *Pseudonocardiaceae*, *Micrococcaceae*, *Caulobacteraceae*, ou *Pseudomonadaceae*, très préférentiellement *Streptomyces setonii*, *Amycolatopsis sp.* *Streptomyces psammoticus*, *Amycolatopsis thermoflava*, *Micrococcus sp.*, *Caulobacter segnis*, *Pseudomonas fluorescens*. ou leurs mutants, encore plus préférentiellement *Streptomyces setonii*, *Amycolatopsis sp.* *Streptomyces psammoticus*. De manière préférée la réaction de bioconversion est conduite en présence d'une souche disponible sous le numéro ATCC39116, DSMZ 9991, DSMZ 9992, CCTCC 2015329, CCTCC 2011265, IMI 390106 ou Zyl 926 ou leurs mutants, préférentiellement ATCC39116, DSMZ 9991, DSMZ 9992, CCTCC 2015329, IMI 390106 ou Zyl 926 ou leurs mutants et très préférentiellement ATCC39116, DSMZ 9991, DSMZ 9992, CCTCC 2015329, IMI 390106 ou Zyl 926. Selon un autre mode de réalisation le microorganisme peut être choisi parmi les microorganismes génétiquement modifiés ap-

partenant à la famille *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *E.coli*, *Corynebacterium glutamicum*.

- [0029] Le microorganisme utilisé dans le cadre de la présente invention peut également être une souche telle que décrite dans WO 2014/102368, WO 2016/001203 ou EP 2721148.
- [0030] Selon un autre mode de réalisation, le microorganisme est choisi parmi les fungus appartenant au genre des *Aspergillus*, *Pycnoporus*, *Penicillium*, de préférence appartenant à la famille *Aspergillus luchuensis*, *Aspergillus niger*, *Picnoporus cinnabarinus*, *Penicillium camamberti*
- [0031] Dans le cadre de la présente invention, le substrat peut être transformé par bio-conversion en composé de formule (I).
- [0032] Dans le cadre de la présente invention, le substrat peut être transformé par bio-conversion en frambinone. Le substrat est en général choisi dans le groupe constitué de l'acide p-coumarique, p-hydroxybenzalacétone.
- [0033] Dans le cadre de la présente invention, le substrat peut être transformé par bio-conversion en vanilline. Le substrat est en général choisi dans le groupe constitué de glucose, acide férulique, eugénol, isoeugénol, acide coumarique, acide caféique, L-tyrosine, l'acide vanillique, 4-vinyl guaiacol, de préférence choisi parmi glucose, acide férulique et eugénol.
- [0034] Dans la cadre de la présente invention, l'étape (a) du procédé est réalisée dans des conditions non aseptiques, de préférence non stériles. Dans le cadre de la présente invention, l'expression « l'étape (a) est réalisée dans des conditions non aseptiques, de préférence non stériles » indique que le réacteur ou le fermenteur dans lequel est réalisé l'étape (a), et optionnellement les différents tuyaux d'alimentation ou de sortie du réacteur ou du fermenteur n'ont pas été aseptisés, de préférence n'ont pas été stérilisés préalablement à leur utilisation dans l'étape (a). Dans le cadre de la présente invention, l'expression « l'étape (a) est réalisée dans des conditions non aseptiques, de préférence non stériles » indique que le substrat de fermentation et/ou le solvant utilisé au cours de l'étape (a) n'ont pas été aseptisés, de préférence n'ont pas été stérilisés préalablement à leur utilisation dans l'étape (a). Dans le cadre de la présente invention, l'expression « l'étape (a) est réalisée dans des conditions non aseptiques, de préférence non stériles » indique que le transfert de la biomasse utilisée pour la fermentation n'est pas été réalisé de manière aseptique, de préférence n'est pas réalisé de manière stérile. Dans le cadre de la présente invention, l'expression « l'étape (a) est réalisée dans des conditions non aseptiques, de préférence non stériles » indique que le ou les gaz, en particulier l'air ou l'oxygène, utilisés au cours de l'étape (a) ne sont pas aseptisés, de préférence n'ont pas été stérilisés préalablement à leur utilisation dans l'étape (a).
- [0035] L'absence d'aseptisation, de préférence de stérilisation, des équipements, des réactifs

et de l'air ou l'oxygène utilisés lors de l'étape (a) de bioconversion est particulièrement avantageuse, notamment en ce qu'elle permet l'utilisation d'équipements plus simples. Le coût énergétique du procédé de bioconversion est également amélioré, en effet l'absence d'aseptisation, de préférence de stérilisation, réduit la consommation de vapeur et réduit l'empreinte carbone du procédé.

- [0036] Dans le cadre de la présente invention, l'étape (a) peut être réalisée en batch ou en fed-batch. Selon un autre mode de réalisation l'étape (a) peut être réalisée en continu. L'étape (a) peut également être conduite dans une cascade de réacteur parfaitement agités en série.
- [0037] Selon un mode de réalisation particulier, le substrat de fermentation est introduit dans le réacteur ou fermenteur. Une biomasse est introduite ensuite dans le réacteur.
- [0038] Selon un autre mode de réalisation particulier, le substrat de fermentation est introduit dans le réacteur contenant la biomasse.
- [0039] Le pH au cours de l'étape (a) est contrôlé et compris entre 7 et 9. Le pH peut optionnellement être régulé par ajout de base ou d'acide.
- [0040] L'étape (a) est en général réalisée à une température comprise entre 25 et 50°C, de préférence comprise entre 28°C et 45°C. L'étape (a) est en général réalisée sous agitation. L'étape (a) est en général réalisée sous air ou oxygène. Dans le cadre de la présente invention, la pO₂ au cours de l'étape (a) est contrôlée et optionnellement régulée. L'homme du métier pourra adapter la pO₂ au cours de l'étape (a) aux besoins du microorganisme apte à transformer un substrat en composé de formule (I), de préférence en vanilline ou frambinone, très préférentiellement en vanilline utilisé dans le cadre de la présente invention. A titre illustratif, la pO₂ peut être comprise entre 1% et 99%, de préférence de l'ordre de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%. La pO₂ correspond à la concentration en oxygène dissous dans le milieu de bioconversion par rapport à la concentration en oxygène dissous à saturation, sans biomasse. La pO₂ peut notamment être mesurée avec un O₂ Sensor Hamilton OXYFERM FDA VP 225.
- [0041] Avantageusement, le procédé de l'invention est non seulement plus durable, par le fait de la réduction de sa consommation énergétique, tout en permettant d'obtenir un rendement en composé de formule (I) au moins équivalent à ceux des procédés requérant une asepsie ou stérilisation.
- [0042] En général l'étape (a) de bioconversion est précédée par une étape (a₀) pendant laquelle un microorganisme est mis en culture de manière à obtenir une quantité de biomasse suffisante. Cette biomasse peut ensuite être utilisée dans un procédé de bioconversion selon la présente invention.
- [0043] La mise en culture de la bactérie est généralement réalisée en milieu aqueux, en présence d'éléments nutritifs. En général, le milieu de culture comprend une source de

carbone, une source organique ou inorganique d'azote, des sels inorganiques et des facteurs de croissance. L'homme du métier pourra adapter la composition du milieu de culture aux besoins du microorganisme apte à transformer un substrat en composé de formule (I) utilisé dans le cadre du procédé de la présente invention.

- [0044] La concentration en source de carbone est généralement comprise entre 5 et 50 g.L⁻¹, de préférence entre 20 et 34 g.L⁻¹. La source d'azote, telle qu'un extrait de levure, et les facteurs de croissance sont en général ajoutés à une concentration comprise entre 2 et 20 g.L⁻¹, de préférence entre 5 et 10 g.L⁻¹. En outre, des ions magnésium, tels que du sulfate de magnésium, peuvent être ajoutés à une concentration comprise entre 0,1 et 5 g.L⁻¹, de préférence comprise entre 0,5 et 1 g.L⁻¹. En général, le pH de la mise en culture est compris entre 3 et 9, en particulier compris entre 4 et 8, et très préférentiellement compris entre 6 et 8. En général, la température de la mise en culture est comprise entre 10 à 55°C, de manière particulièrement préférée dans la plage de 30 à 50°C, et très préférentiellement entre 35°C et 45°C.
- [0045] La période de culture dure en général entre 15 minutes et 80 heures, de préférence entre 1 heure et 50 heures et très préférentiellement entre 5 heures et 40 heures. La durée de la période de culture est variable et peut être adaptée en fonction du microorganisme apte à transformer un substrat en composé de formule (I) utilisé dans le cadre de la présente invention. A titre illustratif, la période de culture peut durer jusqu'à ce que la source de carbone, en général du glucose, soit presque intégralement consommée, de préférence telle que la concentration en source de carbone soit inférieure ou égale à 15 g.L⁻¹, de préférence inférieure ou égale à 5 g.L⁻¹, très préférentiellement inférieure ou égale à 3 g.L⁻¹. Selon un autre mode de réalisation, la période de culture peut durer jusqu'à ce que 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% de la source de carbone introduite en début d'étape (a0) ait été consommée.
- [0046] L'étape (a0) est en général réalisée dans un fermenteur, en conditions aseptiques, de préférence stériles.
- [0047] Dans le cadre de la présente invention, l'étape (a) peut être suivie d'une étape (b) de purification du composé de formule (I), obtenu. En général, la purification comprend une première étape dans laquelle le moût de fermentation est séparé de la biomasse.
- [0048] La purification du composé de formule (I) obtenu à l'issue de l'étape (a) peut notamment être réalisée par extraction liquide/liquide, par distillation, par cristallisation, par évaporation dans un évaporateur à film raclé, à film tombant, dans un évaporateur à cloison, et/ou par stripping. Des étapes de nanofiltration, ultrafiltrations peuvent également être opérées dans le cadre de l'étape (b) de purification.
- [0049] La purification de la vanilline obtenue à l'issue de l'étape (a) peut notamment être réalisée par extraction liquide/liquide, par distillation, par cristallisation, par évaporation dans un évaporateur à film raclé, à film tombant, dans un évaporateur à

cloison, et/ou par stripping. Des étapes de nanofiltration, ultrafiltrations peuvent également être opérées dans le cadre de l'étape (b) de purification. A titre illustratif, le procédé de purification peut être réalisé selon les procédés décrits dans WO2013/087795, WO 2014/114590, WO2018/146210, WO2021/019005.

- [0050] Selon un autre mode de réalisation, la vanilline peut être extraite en continu du fermenteur grâce à un dispositif de séparation de la vanilline. A titre illustratif, le procédé de purification peut être réalisé selon le procédé décrit dans WO2017/025339. Il n'y a pas de limitation particulière quant au choix du dispositif de séparation de la vanilline. De préférence, le dispositif de séparation de la vanilline est un dispositif de filtration sur membrane. Ce type de dispositif permet de récupérer du moût de fermentation, un rétentat contenant le microorganisme et un filtrat exempt de microorganisme. Le dispositif de séparation de la vanilline peut également permettre l'extraction sélective de la vanilline du moût de fermentation extrait.
- [0051] La présente invention vise également un composé de formule (I), de préférence une vanilline ou une frambinone, susceptible d'être obtenu selon le procédé de la présente invention. Enfin la présente invention se réfère à l'utilisation du composé de formule (I), de préférence la vanilline ou la frambinone obtenus selon la présente invention en tant qu'arôme dans le domaine de l'alimentation humaine et animale, de la pharmacie, ou en tant que parfum dans l'industrie des cosmétiques, de la parfumerie et de la détergence.

Exemples

- [0052] Exemple 1 : mise en culture
- [0053] La souche *Streptomyces setonii* ATCC 39116 est cultivée dans les conditions décrites dans le document WO 2017/025339.
- [0054] Exemples 2 et 3 : Procédé de bioconversion selon l'invention et comparatif
- [0055] Du milieu de croissance contenant de la biomasse, préparé selon l'exemple 1 est utilisé.
- [0056] Le pH du milieu de croissance est ajusté à 8,4 par ajout de soude à 30% molaire et maintenu constant, sous agitation et aération.
- [0057] Une solution contenant de l'acide férulique, de la soude à 30% molaire, et de l'eau est préparée. Cette solution est ensuite ajoutée dans le fermenteur ou réacteur contenant la biomasse.
- [0058] Conditions

[0059] [Tableaux1]

	Exemple 2 - Comparatif - (selon EP0885968)	Exemple 3 selon l'invention
Type de dispositif pour l'étape (a)	Fermenteur	Réacteur
Stérilisation du dispositif pour l'étape (a)	OUI	NON
Stérilisation du substrat	OUI	NON
Stérilisation de l'air	OUI	NON

[0060] Les résultats de bioconversion suivants ont été obtenus :

[0061] [Tableaux2]

	Exemple 2 - Comparatif - (selon EP0885968)	Exemple 3 selon l'invention
Concentration Vanilline (g/L)	13.9	15,4
Taux de conversion du substrat (%)	99,0	99,6
% de réduction de la consommation de vapeur par rapport à l'exemple 2	-	100%

[0062] Exemples 4 et 5 : Procédé de bioconversion selon l'invention et comparatif

[0063] Du milieu de croissance contenant de la biomasse, préparé selon l'exemple 1 est utilisé.

[0064] Le pH du milieu est ajusté à 8.4 on introduit une solution d'acide coumarique de façon à obtenir une concentration finale comprise entre 5 et 50 g/L. Le milieu réactionnel est maintenu à 37 °C et 170 tours/min pendant 24 h. Après 24 h de bioconversion, la biomasse est éliminée par centrifugation, le surnageant est filtré et analysé en HPLC. Le 4-hydroxybenzaldéhyde est obtenu dans les mêmes proportions selon l'exemple 4 et 5.

[0065] Conditions

[0066] [Tableaux3]

	Exemple 4 - Comparatif	Exemple 5 selon l'invention
Type de dispositif pour l'étape (a)	Fermenteur	Réacteur
Stérilisation du dispositif pour l'étape (a)	OUI	NON
Stérilisation du substrat	OUI	NON
Stérilisation de l'air	OUI	NON

[0067] Exemples 6 et 7: Procédé de bioconversion selon l'invention et comparatif

[0068] Du milieu de croissance contenant de la biomasse, préparé selon l'exemple 1 est utilisé.

[0069] On mélange 4-hydroxybenzalacétone dans le milieu obtenu après la période de croissance telle que décrite à l'exemple 1. Le mélange est incubé à 30°C sous agitation (200 tours/min) 72 heures.

[0070] Après 72h de bioconversion, la biomasse est éliminée par centrifugation, le surnageant est filtré et analysé en HPLC. La frambinone est obtenue dans les mêmes proportions selon l'exemple 6 et 7.

[0071] Conditions

[0072] [Tableaux4]

	Exemple 6 - Comparatif	Exemple 7 selon l'invention
Type de dispositif pour l'étape (a)	Fermenteur	Réacteur
Stérilisation du dispositif pour l'étape (a)	OUI	NON
Stérilisation du substrat	OUI	NON
Stérilisation de l'air	OUI	NON

[0073] Ainsi le procédé selon la présente invention permet d'obtenir des résultats au moins aussi bons que le procédé selon l'exemple 2 comparatif en termes de concentration en vanilline ou les exemples 4 et 6 comparatifs pour la préparation de 4-hydroxybenzaldéhyde et de frambinone.

[0074] Les résultats du tableau 2 démontrent que le procédé selon la présente invention est particulièrement avantageux en ce qu'il permet notamment de réduire la consommation de vapeur du procédé et simplifie les manipulations en ne requérant aucune stérilisation de matières entrants en jeu dans le procédé. Ces résultats sont obtenus tout en

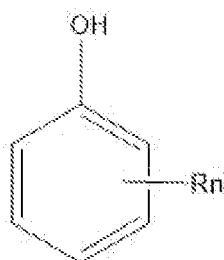
maintenant les rendements de l'étape (a) de bioconversion.

Revendications

[Revendication 1]

Procédé de préparation d'un composé de formule (I)

[Chem.2]



Formule (I)

dans lequel n est compris entre 0 et 5, de préférence compris entre 1 et 2,

R, identique ou différent, est choisi dans le groupe constitué de OH, OR₁, formyle, CO₂H, les chaînes alkyles linéaires ou branchées, optionnellement substituées, comprenant entre 1 et 6 atomes de carbone, alcényles, linéaires ou branchées, optionnellement substituées, comprenant entre 1 et 6 atomes de carbone, comprenant une étape (a) dans laquelle un substrat est transformé en composé de formule (I) par bioconversion en présence d'un microorganisme caractérisé en ce que l'étape (a) est réalisée dans des conditions non aseptiques, de préférence non stériles.

[Revendication 2]

Procédé de préparation d'un composé de formule (I) selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'étape (a) est réalisée dans un réacteur ou un fermenteur et en ce que ledit réacteur ou ledit fermenteur dans lequel est réalisé l'étape (a) n'a pas été aseptisé, de préférence n'a pas été stérilisé préalablement à son utilisation dans l'étape (a).

[Revendication 3]

Procédé de préparation d'un composé de formule (I) selon l'une quelconque des revendications 1 à 2 caractérisé en ce que le substrat de fermentation et/ou le solvant utilisés au cours de l'étape (a) n'ont pas été aseptisés, de préférence n'ont pas été stérilisés préalablement à leur utilisation dans l'étape (a).

[Revendication 4]

Procédé de préparation d'un composé de formule (I) selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que le transfert de la biomasse utilisée pour la fermentation n'est pas réalisé en conditions aseptiques, de préférence n'est pas réalisé en conditions stériles.

[Revendication 5]

Procédé de préparation d'un composé de formule (I) selon l'une

quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que le ou les gaz, de préférence l'air ou l'oxygène, utilisés au cours de l'étape (a) ne sont pas aseptisés, de préférence ne sont pas stérilisés préalablement à leur utilisation dans l'étape (a).

- [Revendication 6] Procédé de préparation d'un composé de formule (I) selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que le substrat de fermentation est introduit dans le réacteur ou fermenteur, la biomasse est introduite ensuite dans le réacteur.
- [Revendication 7] Procédé de préparation d'un composé de formule (I) selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 caractérisé en ce que le substrat de fermentation est introduit dans un réacteur contenant la biomasse.
- [Revendication 8] Procédé de préparation d'un composé de formule (I) selon l'une quelconque des revendications précédentes comprenant en outre une étape (a0) de mise en culture d'un microorganisme de manière à obtenir une quantité de biomasse suffisante préalable à l'étape (a).
- [Revendication 9] Procédé de préparation d'un composé de formule (I) selon l'une quelconque des revendications précédentes comprenant en outre une étape (b) de purification du composé de formule (I) obtenu à l'issue de l'étape (a).
- [Revendication 10] Procédé de préparation d'un composé de formule (I) selon l'une quelconque des revendications précédentes dans lequel le composé de formule (I) est choisi dans le groupe constitué de vanilline, frambinone.

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 910404
FR 2203535

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X, D	EP 0 885 968 A1 (GIVAUDAN ROURE INT [CH]) 23 décembre 1998 (1998-12-23) * abrégé; revendications; exemple 1 * * page 3, ligne 52 – page 5, ligne 6 * -----	1, 5, 7-10	C12N1/20 C12P7/24
A	DE 103 32 065 A1 (UNIV SCHILLER JENA [DE]) 27 janvier 2005 (2005-01-27) * abrégé; revendication 1 * * alinéas [0001], [0010], [0016] * -----	1-10	
A	US 4 156 100 A (BOGUTH WALTER [CH] ET AL) 22 mai 1979 (1979-05-22) * abrégé * * colonne 1, lignes 1-40 * * colonne 4, lignes 58-63 * * exemple 3 * -----	1-10	
A	US 2011/065785 A1 (LARSEN JAN [DK]) 17 mars 2011 (2011-03-17) * abrégé * * alinéa [0025] * -----	1	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
A	PRIEFERT . J RABENHORST . A STEINBÜCHEL H: "Biotechnological production of vanillin", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 56, 1 janvier 2001 (2001-01-01), pages 296-314, XP007921896, ISSN: 1432-0614, DOI: 10.1007/S002530100687 [extrait le 2001-06-23] * le document en entier * -----	1	C12P
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
27 février 2023		Schröder, Gunnar	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE **RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 2203535 FA 910404**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.
 Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **27-02-2023**
 Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0885968	A1	23-12-1998	AU 7196498 A	24-12-1998
			BR 9802011 A	08-02-2000
			CA 2238215 A1	19-12-1998
			DE 69833516 T2	14-09-2006
			DK 0885968 T3	03-07-2006
			EP 0885968 A1	23-12-1998
			ES 2258290 T3	16-08-2006
			IL 124800 A	25-07-2002
			JP 4359349 B2	04-11-2009
			JP H1169990 A	16-03-1999
			PL 326882 A1	21-12-1998
			TR 199801111 A2	18-01-1999
			US 6235507 B1	22-05-2001
			ZA 985146 B	21-12-1998

DE 10332065	A1	27-01-2005	AUCUN	

US 4156100	A	22-05-1979	US 4072715 A	07-02-1978
			US 4095038 A	13-06-1978
			US 4156100 A	22-05-1979

US 2011065785	A1	17-03-2011	BR PI0821393 A2	04-11-2014
			CA 2708962 A1	23-07-2009
			CA 2866645 A1	23-07-2009
			EP 2227551 A2	15-09-2010
			EP 2592150 A2	15-05-2013
			EP 2592151 A2	15-05-2013
			MY 158229 A	15-09-2016
			MY 171315 A	08-10-2019
			US 2011065785 A1	17-03-2011
			US 2011171708 A1	14-07-2011
			US 2012122174 A1	17-05-2012
			WO 2009090480 A2	23-07-2009
