

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

①1 N° de publication : **3 020 380**  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)  
②1 N° d'enregistrement national : **14 55745**  
⑤1 Int Cl<sup>8</sup> : **C 12 P 5/02 (2017.01), C 12 R 1/01**

⑫

## BREVET D'INVENTION

B1

⑤4 PROCÉDE DE PRODUCTION DE METHANE PAR CO-CULTURE AEROBIE DE MICROORGANISMES ANAEROBIES.

②2 Date de dépôt : 20.06.14.

③0 Priorité : 23.04.14 FR 1453652.

④3 Date de mise à la disposition du public  
de la demande : 30.10.15 Bulletin 15/44.

④5 Date de la mise à disposition du public du  
brevet d'invention : 26.01.18 Bulletin 18/04.

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) : UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE  
Etablissement public et FONDATION  
MEDITERRANEE INFECTION — FR.

⑦2 Inventeur(s) : RAOULT DIDIER, KHELAFIA SABER  
et DRANCOURT MICHEL.

⑦3 Titulaire(s) : UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE  
Etablissement public, FONDATION MEDITERRANEE  
INFECTION.

⑦4 Mandataire(s) : CABINET BEAU DE LOMENIE  
Société civile.

FR 3 020 380 - B1



PROCEDE DE PRODUCTION DE METHANE PAR CO-CULTURE  
AEROBIE DE MICROORGANISMES ANAEROBIES.

La présente invention concerne un procédé de production de gaz méthane (CH<sub>4</sub>) par culture microbienne en conditions aérobie de  
5 microorganismes anaérobies.

Le méthane produit biologiquement a été considéré jusqu'à un passé récent comme n'étant produit que de façon anaérobie, c'est-à-dire sans oxygène, et usuellement en présence d'hydrogène, par fermentation anaérobie d'un certain nombre de déchets organiques.

10 Dans FR2537992, on produit du gaz CH<sub>4</sub> par fermentation et dégradation anaérobie de déchets organiques. Pour ce faire, on injecte de l'hydrogène qui réagit avec le CO<sub>2</sub> produit pour former du CH<sub>4</sub> et ainsi diminuer le taux de CO<sub>2</sub> en mélange avec CH<sub>4</sub>.il faut 10 à 5000 litres de gaz H<sub>2</sub> par m<sup>3</sup> de CH<sub>4</sub> produit.

15 Dans FR2601690, on utilise un méthanogène thermophile *Methanococcus thermolithotrophicus* sous alimentation en H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, la culture se faisant dans un milieu contenant essentiellement une source d'azote et une source de sels assimilables à 110°C en anaérobie.

20 Des travaux récents, depuis 2006 (1), ont montré que dans la mer il été possible de détecter du méthane dans un milieu aérobie, exclusivement après enrichissement par du methylphosphonate, par un ou plusieurs microorganismes fixant l'azote (Karl DM, Beversdorf L, Björkman KM, Church MJ, Martinez A, DeLong EF. Aerobic production of methane in the sea. Nat Geosci 2008;1:473-8).

25 Par ailleurs, le méthane naturel est produit dans l'intestin en conditions anaérobies sous l'activité de microorganismes méthanogènes. Dans le tube digestif le méthane est produit sous l'action de microorganismes Archae méthanogènes appelés, en particulier *Methanobrevibacter smithii* ou *Methanomassilicoccus luminyensis*, qui

fabriquent du méthane à partir de molécules d'hydrogène (H<sub>2</sub>) produites par la fermentation des sucres par des bactéries anaérobies du tube digestif, en particulier par les *Bacteroides*, en particulier par *Bacteroides thetaiotaomicron*.

5 Le but de la présente invention est de fournir un nouveau procédé biotechnologique de production de méthane en conditions aérobies.

Les inventeurs ont découvert de façon surprenante qu'il était possible de permettre la culture de bactéries anaérobies en associant au milieu de culture, un composé anti-oxydant tout en maintenant la  
10 culture d'archaea méthanogène.

Plus précisément, les inventeurs ont observé que l'addition de composés antioxydants dans un milieu de culture en atmosphère aérobie avec une bactérie anaérobie apte à produire de l'hydrogène, permettait aussi la culture d'une archaea méthanogène, du fait de la production  
15 d'hydrogène par ladite bactérie anaérobie. Ils ont pu mesurer la production d'hydrogène en présence de ladite bactérie anaérobie et la production de méthane par ladite archaea, faite de façon aérobie, par l'association des deux microorganismes anaérobies, notamment  
20 *Methanobrevibacter smithii* ou *Methanomassiliicoccus luminyensis* et *Bacteroides thetaiotaomicron*. Ainsi, la réalisation de chambres simples ou doubles de confection avec d'une part *Bacteroides thetaiotaomicron*, ou d'une autre bactérie anaérobie, et d'autre part *Methanobrevibacter smithii* ou *Methanomassiliicoccus luminyensis*, ou d'un autre organisme méthanogène permet de fournir une quantité significative de méthane.

25 La présente invention consiste donc essentiellement dans la production biologique de méthane (Biogaz) par une association d'une bactérie méthanogène et une bactérie anaérobie cultivant en aérobie dans un milieu riche en composants antioxydants et contenant une source hydrocarbonée.

30 Pour ce faire, la présente invention fournit un procédé de

production de gaz méthane dans un réacteur par co-culture en atmosphère aérobie, de préférence air ambiant d'au moins :

5 - un premier microorganisme consistant une bactérie anaérobie apte à produire de l'hydrogène par fermentation en présence d'un substrat et /ou d'un milieu de culture comprenant ou complé-  
menté en composé(s) hydrocarboné(s), notamment de l'amidon et/ou des sucres,  
et

10 - un deuxième microorganisme consistant en une Archaea méthanogène apte à produire du méthane à partir d'hydrogène et d'un substrat et /ou milieu de culture comprenant ou complé-  
menté en composé(s) hydrocarboné(s), notamment de l'amidon et/ou des sucres,  
et

15 - un substrat organique et minéral comprenant des composants de milieux de culture aptes à permettre la culture des deux dits premier et deuxième microorganismes anaérobies, ledit milieu de culture comprenant ou étant complé-  
menté en composé(s) hydrocarboné(s), notamment de l'amidon et/ou des sucres, et étant en outre supplémenté en composé(s) anti-oxydant(s).

20 Plus particulièrement, les autres conditions de culture, notamment de température, sont les conditions appropriées pour la culture desdits microorganismes. En particulier, on doit augmenter la température pour incuber si nécessaire à une température favorisant la croissance desdits microorganismes, notamment à au moins 30°C voire 37°C.

25 On comprend que le procédé selon la présente invention ne nécessite pas l'apport d'hydrogène externe et que le réacteur de co-culture comprend des moyens de récupération du gaz méthane produit.

De préférence, on réalise tout d'abord la culture dudit premier microorganisme dans ledit substrat et on introduit ledit deuxième microorganisme après que ledit premier microorganisme a déjà produit

des produits de fermentation et de l'hydrogène.

Plus particulièrement, ledit composé antioxydant est choisi de préférence parmi l'acide ascorbique, l'acide urique, le glutathion ( $\gamma$ -L-Glutamyl-L-cysteinylglycine). L'acide ascorbique est préféré car il est capable à des doses précises de permettre la culture à un niveau d'oxygène plus élevé.

Plus particulièrement encore, ledit composé antioxydant est mis en œuvre à une concentration de 1  $\mu$ g/ml à 2 mg/ml, ou concentration molaire de  $10^{-6}$  M à  $10^{-2}$  M, de préférence au moins 1g/l.

10 D'autres composés antioxydants tels que l'hydrosulfure de sodium (NaHS) ou la cystéine sont moins efficaces et requièrent des concentrations plus élevées.

De préférence, ledit milieu comprend une substance tampon régulateur de pH pour ajuster le pH de 7 à 7,5.

15 Plus particulièrement, ladite Archaea est une Archaea choisie parmi les Archae suivantes: *Méthanobrevibacter*, *Methanosphaera*, *Methanomassiliicoccus*, *Methanobacterium*, *Methanococcus* et *Methanosaeta*.

20 Plus particulièrement, ladite Archaea est une Archaea choisie parmi les Archae suivantes : *Methanobrevibacter smithii*, *Methanobrevibacter oralis*, *Methanosphaera stadtmanae*, *Methanomassiliicoccus luminyensis*, *Methanobacterium beijingense* et *Methanosaeta concilii*.

25 Plus particulièrement encore, ladite Archea est *Méthanobrevibactera smithii* ou *Methanomassiliicoccus luminyensis*.

Les bactéries anaérobies strictes c'est-à-dire qu'elles ne sont pas capables de cultiver en présence d'oxygène ou dans des concentrations inférieures à 1%, le plus communément inférieure à 0.1%, idéalement

0%. Parmi les bactéries anaérobies strictes, on cite plus particulièrement les bactéries extracellulaires, c'est à dire des bactéries qui ne peuvent vivre qu'à l'extérieur de cellules.

Plus particulièrement, ladite bactérie anaérobie apte à produire de l'hydrogène est choisie parmi les bactéries des familles *Actinobacteria* et *Bacteroidetes*.

De préférence, ladite bactérie anaérobie est du genre *Bacteroides*, Ces bactéries sont connues en particulier pour digérer l'amidon en produisant de l'hydrogène.

Plus particulièrement, ladite bactérie anaérobie est *Bacteroides thetaiotaomicron*.

On cite aussi comme *Actinobacteria*, la bactérie *Lactococcus lactis*.

Plus particulièrement, ledit milieu de culture comprend les composants que l'on retrouve dans les milieux de base de culture aptes à cultiver une archaea ou une bactérie anaérobie, comprenant au moins :

- plusieurs sources de carbone,

- une source de phosphore, de préférence un sel de phosphate,

- une source d'azote, de préférence un sel d'ammonium,

- au moins un sel de métaux choisi parmi K, Mg, Na, Ca, de préférence NaCl.

Plus particulièrement, ledit milieu culture est un milieu acellulaire est choisi parmi un milieu axénique constitué de substances chimiques ou biologiques défini qualitativement et quantitativement, et un milieu acellulaire comprenant un extrait de broyat ou lysat de tissu pluricellulaire.

Plus particulièrement, ledit milieu de culture est un milieu acellulaire conventionnel de bactérie anaérobie, de préférence un milieu comprenant des composants choisis parmi un extrait de broyat ou lysat de tissu pluricellulaire, un digestat enzymatique, notamment un digestat enzymatique de caséine, soja et/ou de tissu animal, une peptone, un extrait de levure, un sucre tel que dextrose ou glucose, un sel NaCl et/ou  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ .

Plus particulièrement encore, ledit milieu de culture est un milieu conventionnel de culture de bactéries anaérobies tel que les milieux dits bouillon de type cœur-cervelle, milieux Columbia à 5% de sang de mouton ou milieu Schaedler tels que décrits ci-après. D'autres milieux conventionnels appropriés sont les milieux Brucella ou Wilkins-Chagren. De tels milieux de culture acellulaires sont bien connus de l'homme de l'art.

On peut utiliser en particulier des milieux de culture polyvalents pour microorganismes anaérobies, notamment le milieu de Schaedler, ledit milieu étant complété en composés hydrocarbonés, de préférence de l'amidon et de(s) sucre(s), et en dit(s) composé(s) antioxydant(s).

Les inventeurs ont en effet testé différentes molécules présentant une activité antioxydante et ont découvert que certains composés antioxydants dans certaines concentrations présentent un effet supérieur sur la croissance des dites bactéries.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention ressortiront mieux à la lecture de la description qui va suivre, faite de manière illustrative et non limitative, d'un exemple de réalisation.

Pour illustrer l'invention, les inventeurs ont cultivé des archaea méthanogènes réputées anaérobies strictes (réputées ne cultiver qu'en l'absence stricte d'oxygène), en atmosphère aérobie (c'est à dire à l'air libre, contenant environ 16% d'oxygène) et en présence de bactéries

réputées anaérobie stricte, dans des milieux de culture de bactéries et d'archae réputées anaérobies, lesdits milieux de culture étant complémentés en composés anti-oxydants pour supporter la croissance en atmosphère d'air ambiant et complémentés en composés hydrocarbonés pour produite H<sub>2</sub> et CH<sub>4</sub>.

1) Souches utilisées.

Une archaea méthanogène *Methanobrevibacter smithii* souche DSM 861 a été obtenue auprès de la collection allemande de microorganismes et de cultures cellulaires (DSMZ, Braunschweig, Allemagne) aussi déposée à l'ATCC sous le numéro ATCC 35061.

Une archaea *Methanomassiliicoccus luminyensis* déposée à la collection de dépôt de microorganismes DSMZ (Allemagne), conformément au Traité de Budapest, sous le numéro DSM 24529 a aussi été testée décrite dans FR124779 (publié sous le numéro 2 990954).

Par ailleurs, une souche de bactérie anaérobie *Bacteroides thetaiotaomicron* a été obtenue au travers de l'étude "culturomics" des inventeurs (Lagier JC et al., Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. Clin Microbiol Infect. 2012;18:1185-93) aussi accessible dans divers collections de dépôt (CSUR P766 aussi déposée selon le Traité de Budapest à la collection de dépôt de micro-organismes DSMZ (Allemagne) le 19 mai 2014 sous le numéro DSM 28808, d'autres souches sont aussi accessibles dans divers collections de dépôt telles que les souches DSM 2079, ATCC 29148 et NCTC 10582).

Une autre souche de bactérie anaérobie suivante a aussi été testée : *Lactococcus lactis* déposée selon le Traité de Budapest à la collection de dépôt de micro-organismes DSMZ (Allemagne) le 19 mai 2014 sous le numéro DSM 28809, aussi disponible dans divers collections de dépôt dont la Collection Nationale de cultures de micro-organismes CNCM 1-2716.

2) Culture aérobie des microorganismes anaérobies à l'aide d'antioxydants.

Pour leur production en quantité suffisante, les deux souches *M. smithii* ou *M. luminyensis* et *B. thetaiotaomicron* ont été cultivées en atmosphère anaérobie à 37 °C dans un milieu de culture polyvalent. On a testé le milieu de Schaedler (Reference 42098 ; BioMérieux, La Balme-les-Grottes, France) ainsi que le milieu dénommé «milieu SAB » décrit dans FR 124779 (publié sous le numéro 2 990954) et WO 2013/0044933 habituellement utilisé pour cultiver les archaea méthanogènes humains et qui apparait approprié aussi pour la culture de bactéries anaérobies.

Le milieu Schaedler (commercialisé par Biomerieux, Marcy l'étoile, France) présentait la composition suivante pour 1 litre :

	- Digestat enzymatique de caséine	5.6 g
15	- Digestat enzymatique de tourteau de soja	1 g
	- Digestat enzymatique de tissus animal	5 g
	- Extrait de levure	5 g
	- NaCl	1.7 g
	- Phosphate de potassium	0.82 g
20	- Dextrose	5.82 g
	- Tris (hydroxyméthyl) Aminométhane	3 g
	- Hémine	0.01 g
	- L-cystéine	0.4g

Le milieu SAB utilisé était dépourvu de Na<sub>2</sub>S et de L-cystéine et comprenait : NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (0,07mg/l), Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O (0,02mg/l), FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (0,2 mg/l), MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (0,01 g/l), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,5 g/l), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,5 g/l), KCl (0,05 g/l), CaCl<sub>2</sub> (0,05 g/l), NaCl (1,5 g/l), NH<sub>4</sub>Cl (1 g/l), Na-Acétate (1 g/l), Extrait de levure (1 g/l), Biotrypticase (1 g/l), Solution d'oligoéléments de Widdel (2 ml/l), Solution d'oligoéléments de Balch (10 ml/l), Résazurine (1 mg/l), Na<sub>2</sub>Se<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O (0,015 mg/l), Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (0,02 mg/l), NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O

(0,07 mg/l), NaHCO<sub>3</sub> (4 g/l), Na-Formate (0,4 g/l), Methanol (40 mM), Solution de vitamines de milieu de Balch (10 ml/l), Acide valérique (0,6 g/l), Acide isovalérique (0,6 g/l), Acide 2-méthylbutyrique (0,6 g/l), Acide isobutyrique (0,6 g/l), Acide 2-méthylvalérique (0,6 g/l).

5 Les oligoéléments de Balch comprennent NaCl, FeSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub>, CoSO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, NiCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>.

Les oligoéléments de Widdel comprennent FeCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, NiCl<sub>2</sub> et CuCl<sub>2</sub>.

10 Les vitamines du milieu de Balch sont listées au tableau 6 ci-après et comprennent la biotine, acide folique, hydrochlorure de pyridoxine, hydrochlorure de thiamine, riboflavine, acide nicotinique, pantothénate de DL-calcium, vitamine B12, Acide p-aminobenzoïque, acide lipoiq.

15 Ce milieu Schaedler ainsi que ce milieu SAB ont été complétés par l'ajout des composés hydrocarbonés à savoir de 1 g/L d'amidon de riz et de 1 g/L de glucose (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) et l'ajout de composés anti-oxydants à savoir complété par l'ajout de 1 g/L d'acide ascorbique (VWR International, Louvain, Belgique), 0,1 g/L d'acide urique et 0,1 g/L de glutathion (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France).

20 La résazurine est mise en œuvre comme un indicateur d'oxydo-réduction à une concentration de 0,1mg/mL pour contrôler la présence d'oxygène (la résazurine oxydée a une couleur rose, et devient transparente en l'absence d'oxygène).

25 La culture aérobie en air ambiant de *M. smithii* ou *M. luminyensis* et *B. thetaiotaomicron* a été effectuée dans des récipients séparés et dans un même récipient incubés à 37°C contenant le milieu de culture complété par l'ajout de composés anti-oxydants et composés source de carbone. Le pH a été ajusté à 7,5 par ajout de KOH 10M.

Les deux souches ont été cultivées séparément ainsi qu'en co-

culture, en condition aérobie et par l'inoculation de  $10^5$  organismes/mL de chaque souche avec le milieu de culture complétement selon la présente invention et parallèlement avec le milieu Schaedler ou SAB complétement par les composés hydrocarbonés mentionnés ci-dessus  
5 mais en revanche sans composés anti-oxydants.

Les témoins positifs consistent en un tube contenant le milieu de culture complétement ci-dessus, inoculé en conditions anaérobie par  $10^8$  microorganismes/L de *M. smithii* ou *M. luminyensis* en présence du mélange gazeux de 80% H<sub>2</sub> + 20% de CO<sub>2</sub> à la pression de deux  
10 atmosphères requise pour la croissance optimale des archaea méthanogènes. Le milieu de culture complétement inoculé en anaérobie par  $10^8$  microorganismes/L de *M. smithii* ou *M. luminyensis* sans ce mélange de gaz a été introduit pour vérifier la croissance de cette archaea méthanogène sans H<sub>2</sub>. Le milieu de culture supplétement en  
15 ajoutant 1 g/L d'amidon de riz et de 1 g/L de glucose inoculé en anaérobie par  $10^8$  cellules/L de *B. thetaiotaomicron* a été introduit comme témoin positif et pour vérifier la production de H<sub>2</sub> par *B. thetaiotaomicron* en culture anaérobie. Ces contrôles ont été effectués en parallèle en atmosphère ambiante (aérobie). Le milieu de culture  
20 non-inoculé a été introduit comme contrôle négatif.

3) Détection de la croissance par chromatographie en phase gazeuse.

La croissance de *M. smithii* ou *M. luminyensis* a été évaluée quotidiennement par la production de méthane et la croissance de *B.*  
25 *thetaitaomicron* a été évaluée quotidiennement par la production d'hydrogène. La mesure de méthane et d'hydrogène a été réalisée l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse GC-8A (Shimadzu, Champs-sur-Marne, France) équipé d'un détecteur de conductivité thermique et une Chromosorb WAW 80/100 mailles colonne SP100 (Alltech, Carquefou,  
30 France). L'azote N<sub>2</sub> à une pression de 100 kPa a été utilisé comme gaz porteur. Le détecteur et les températures de l'injecteur étaient de 200°C

et la température de la colonne était de 150°C.

#### 4) Résultats.

##### 4.1) Contrôles.

Les contrôles négatifs sont restés négatifs sans croissance  
5 survenant après une semaine d'incubation indiquant que les résultats  
rapportés ici ne sont pas simplement le résultat d'une contamination par  
d'autres microorganismes.

Les contrôles positifs étaient positifs avec une production de  
méthane observée dans la culture anaérobie de *M. smithii* ou *M.*  
10 *luminyensis* et avec une production d'hydrogène observée dans la  
culture anaérobie *B. thetaiotaomicron*. Il n'y a eu aucune production de  
méthane décelable dans la culture de *M. smithii* ou *M. luminyensis*  
inoculée seul en anaérobie et en aérobie sans mélange de gaz.  
Egalement, la culture de *B. thetaiotaomicron* inoculée en aérobie sans  
15 composés antioxydants est restée négative et l'hydrogène n'a pas été  
produit.

##### 4.2) Co-culture aérobie.

Après une incubation de 24 heures à 37°C en air ambiant (dans  
des conditions aérobies), un milieu de culture sans composés anti-  
20 oxydants a conservé sa couleur rose indiquant la présence d'oxygène.  
Le milieu de culture aérobie avec les composés anti-oxydants est devenu  
transparent indiquant l'absence d'oxygène après sa réduction par les  
composés antioxydants.

Le milieu de culture inoculé en aérobie par *M. smithii* ou *M.*  
25 *luminyensis* avec les composés anti-oxydants est devenu transparent,  
mais la culture est restée négative et le méthane n'a pas été produit. Le  
milieu de culture inoculé en aérobie par *B. thetaiotaomicron* en présence  
des antioxydants est devenu transparent et une croissance bactérienne  
a été observée avec production d'hydrogène.

Les co-cultures de *M. smithii* ou *M. luminyensis* et *B. thetaiotaomicron* réalisées dans des conditions aérobies avec des composés anti-oxydants donnaient toutes une culture positive pour *B. thetaiotaomicron* avec production d'hydrogène après une incubation de 24 heures. En revanche, dans certaines expériences, aucune croissance n'était observée pour *M. smithii* ou *M. luminyensis* (bien que le milieu de culture soit devenu transparent). Les inventeurs ont émis l'hypothèse que *M. smithii* ou *M. luminyensis* est mort en raison de son exposition à l'oxygène avant que le milieu n'ait été réduit par les composés anti-oxydants.

Des expériences ont été effectuées avec introduction de *B. thetaiotaomicron* à t0 et *M. smithii* ou *M. luminyensis* ajoutée à t0+ 24 heures d'incubation. L'addition de *M. smithii* ou *M. luminyensis* après 24 heures d'incubation a permis dans tous les cas de rétablir sa croissance par la consommation de l'hydrogène préalablement produit par *B. thetaiotaomicron* en présence de composés antioxydants et en lui évitant une exposition mortelle à l'oxygène.

Cette même expérience a été réalisée sans composé anti-oxydant et la culture est restée négative pour les deux souches testées.

D'autre part, la bactérie anaérobie *Lactococcus lactis* DSM 28809 a aussi été testée avec succès combinée à ces deux archaea.

#### 4.3) Interprétation.

Ces résultats indiquent qu'il est possible de cultiver à l'air ambient (condition aérobie) des bactéries réputées strictement anaérobies, dans un milieu approprié contenant un mélange approprié d'antioxydants.

Dans ces conditions, les bactéries anaérobies produisent de l'hydrogène qui peut être alors utilisé dans un deuxième temps par les archaea méthanogènes pour la production de méthane.

Il est démontré qu'il est possible de produire du méthane à l'air ambiant, dans des conditions appropriées de co-culture de bactéries et de méthanogènes anaérobies dans un milieu de culture complété en composés source de carbone et composés anti-oxydants.

- 5 L'introduction des archaea méthanogènes dans un milieu contenant déjà des produits de fermentation et de l'hydrogène est préférable.

## REVENDEICATIONS

1. Procédé de production de gaz méthane par co-culture dans un réacteur en atmosphère aérobie, de préférence air ambiant, d'au moins :
- 5           - un premier microorganisme consistant une bactérie anaérobie apte à produire de l'hydrogène par fermentation en présence d'un substrat et /ou d'un milieu de culture comprenant ou complétement en composé(s) hydrocarboné(s), et
- un deuxième microorganisme consistant en un Archaea  
10 méthanogène apte à produire du méthane à partir d'hydrogène et d'un substrat et /ou milieu de culture comprenant ou complétement en composé(s) hydrocarboné(s), et
- un substrat organique et minéral comprenant des composants de milieux de culture aptes à permettre la culture des deux dits premier et  
15 deuxième microorganismes, ledit milieu de culture comprenant ou étant complétement en composé(s) hydrocarboné(s), et étant en outre supplémenté en composé(s) anti-oxydant(s).
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on réalise tout d'abord la culture dudit premier microorganisme dans ledit  
20 substrat et on introduit ledit deuxième microorganisme après que ledit premier microorganisme a déjà produit des produits de fermentation et de l'hydrogène.
3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que le(s) dit(s) composé(s) anti-oxydant (s) est (sont) choisi(s)  
25 parmi l'acide ascorbique, l'acide urique, le glutathion, de préférence l'acide ascorbique.
4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que ladite Archaea est une Archaea choisie parmi les archae

suivantes: *Méthanobrevibacter*, *Methanosphaera*, *Methanomassiliicoccus*,  
*Methanobacterium*, *Methanococcus* et *Methanosaeta*.

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que  
ladite archaea est une archaea choisie parmi les archaea suivantes:  
5 *Methanobrevibacter smithii*, *Methanobrevibacter oralis*, *Methanosphaera*  
*stadtmanae*, *Methanomassiliicoccus luminyensis*, *Methanobacterium*  
*beijingense* et *Methanosaeta concilii*.

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que ledit  
archaea est *Méthanobrevibacter smithii* ou *Methanomassiliicoccus*  
10 *luminyensis*.

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en  
ce que ladite bactérie anaérobie apte à produire de l'hydrogène est  
choisie parmi les bactéries des familles *Bacteroidetes* et *Actinobacteria*.

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que  
15 ladite bactérie anaérobie est du genre *Bacteroides*.

9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que  
ladite bactérie anaérobie est *Bacteroides thetaiotaomicron* ou  
*Lactococcus lactis*.

10. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que  
20 ladite bactérie anaérobie est *Lactococcus lactis*.

11. Procédé selon l'une des revendications 6 à 10, caractérisé  
en ce que ledit organisme est choisi parmi les souches de  
*Méthanobrevibacter smithii* DSM 861 et la souche *Methanomassiliicoccus*  
*luminyensis* DSM 24529 et la bactérie anaérobie est choisie parmi la  
25 souche *Bacteroides thetaiotaomicron* DSM 28808 et la souche  
*Lactococcus lactis* DSM 28809.

12. Procédé selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que ledit milieu de culture comprend au moins les composants suivants:

- plusieurs sources de carbone,
- 5       - une source de phosphore, de préférence un sel de phosphate,
- une source d'azote, de préférence un sel d'ammonium,
- au moins un sel de métaux choisi parmi K, Mg, Na, Ca, de préférence NaCl.

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que  
10 ledit composé antioxydant est mis en œuvre à une concentration de 1 mg/l à 2 g/l, de préférence au moins 1g/l.

14. Procédé selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que ledit milieu comprend une substance tampon régulateur de pH pour ajuster le pH de 7 à 7,5.

15       15. Procédé selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que ledit milieu comprend les composants du milieu de Schaedler complétement en composés hydrocarbonés, de préférence de l'amidon et de(s) sucre(s), et en dit(s) composé(s) antioxydant(s).

# RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-17 et R.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'ÉTABLISSEMENT DU PRÉSENT 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 CITÉS DANS LE PRÉSENT 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**

NEANT

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

GB 2 107 735 A (MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD)  
5 mai 1983 (1983-05-05)

DE 10 2006 035213 A1 (TINTSCHL ENGINEERING AG [DE] TINTSCHL BIOENERGIE UND STROEMUNGSTECHNIK)  
31 janvier 2008 (2008-01-31)

M. J. LEE ET AL: "Enhanced bio-energy recovery in a two-stage hydrogen/methane fermentation process", WATER SCIENCE & TECHNOLOGY, vol. 59, no. 11, 1 juin 2009 (2009-06-01), page 2137, XP055092763,  
ISSN: 0273-1223, DOI: 10.2166/wst.2009.236

MARK PIMENTEL ET AL: "Methanogens in Human Health and Disease", THE AMERICAN JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY SUPPLEMENTS, vol. 1, no. 1, 1 juillet 2012 (2012-07-01) , pages 28-33, XP055159007,  
ISSN: 1948-9498, DOI: 10.1038/ajgsup.2012.6

WO 2013/110891 A1 (ASSIST PUBL HOPITAUX MARSEILLE [FR])  
1 août 2013 (2013-08-01)

SHAN ZHANG ET AL: "Effects of VFAs Concentration on Bio-hydrogen Production with Clostridium Bifermentans 3AT-ma", ENERGY PROCEDIA, vol. 14, 8 mars 2012 (2012-03-08), pages 518-523, XP028466694, ISSN: 1876-6102, DOI:  
10.1016/J.EGYPRO.2011.12.968 [extrait le 2012-03-08]

BECKER P M ET AL: "Effects of plant antioxidants and natural vicinal diketones on methane production, studied with rumen fluid and a polylactate as maintenance substrate", ANIMAL FEED SCIENCE AND TECHNOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 170, no. 3, 21 septembre 2011 (2011-09-21), pages 201-208, XP028107411, ISSN: 0377-8401, DOI:  
10.1016/J.ANIFEEDSCI.2011.09.010 [extrait le 2011-10-06]

**3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND  
DE LA VALIDITE DES PRIORITES**

NEANT