

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
28 juin 2018 (28.06.2018)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2018/114148 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C12N 1/14 (2006.01) *C12P 1/02* (2006.01)
C12R 1/69 (2006.01)

européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2017/079293

(22) Date de dépôt international :
15 novembre 2017 (15.11.2017)

Publiée :
— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1663116 22 décembre 2016 (22.12.2016) FR

(71) Déposant : IFP ENERGIES NOUVELLES [FR/FR] ; 1
& 4 avenue du Bois-Préau, 92852 RUEIL-MALMAISON
(FR).

(72) Inventeurs : DROUGARD, Marion ; 0001 RUE DU
GUE, 92500 RUEIL MALMAISON (FR). JOURDIER,
Etienne ; 0035 RUE DU PR VICTOR PAUCHET, 92420
VAUCRESSON (FR). BEN CHAABANE, Fadhel ; 0030
RUE ORFILA, 75020 PARIS (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA,
CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,
HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR,
KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG,
MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM,
PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC,
SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM,
KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM),

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING ASPERGILLUS ORYZAE FUNGUS

(54) Titre : PROCEDE DE PRODUCTION DE CHAMPIGNON ASPERGILLUS ORYZAE

(57) Abstract: The present invention relates to a method for producing fungi of the species *Aspergillus oryzae* in free mycelium form, comprising at least the following steps: a) a sterilised culture medium A suitable for the growth of the fungus *Aspergillus oryzae*, containing at least 0.5 g/l of talc, is prepared in a bioreactor; b) *Aspergillus oryzae* spores are added to the sterilised culture medium A in a proportion of at least 10 spores/ml of culture medium; c) the sterilised culture medium A from step b) is incubated, in the presence of oxygen, at a temperature of between 15 and 45°C for at least 6 hours so as to obtain a culture medium A containing fungi of the species *Aspergillus oryzae* in free mycelium form.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un procédé de production de champignons de l'espèce *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre, comprenant au moins les étapes suivantes: a) on prépare dans un bioréacteur un milieu de culture stérilisé A adapté à la croissance du champignon *Aspergillus oryzae* contenant au moins 0,5 g/L de talc; b) on ajoute au milieu de culture stérilisé A des spores d'*Aspergillus oryzae* à raison d'au moins 10 spores/ mL de milieu de culture; c) on incube en présence d'oxygène le milieu de culture stérilisé A issu de l'étape b) à une température comprise entre 15 et 45°C pendant au moins 6 heures de manière à obtenir un milieu de culture A contenant des champignons de l'espèce *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre.

WO 2018/114148 A1

PROCEDE DE PRODUCTION DE CHAMPIGNON *ASPERGILLUS ORYZAE*

La présente invention concerne un procédé de production du champignon *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre.

5

Etat de la technique

La morphologie des champignons filamenteux est un paramètre important à prendre en compte lors de la mise en œuvre de ces champignons dans les bioprocédés. En effet, la morphologie des champignons filamenteux a une influence sur la rhéologie du milieu dans lequel ils se développent et par voie de conséquence sur les phénomènes de transfert de matière et de chaleur, et notamment le transfert des nutriments et de l'oxygène. Ainsi le contrôle de la morphologie permet d'améliorer la productivité du champignon et/ou faciliter sa mise en culture dans un bioréacteur.

On distingue classiquement deux types de morphologie: une morphologie non agrégée dite "mycélium libre" en opposition à une morphologie agrégée ("pellet" selon la terminologie anglo-saxonne). Pour des raisons d'accessibilité de l'oxygène et des nutriments (c'est-à-dire éviter les limitations diffusionnelles), il est préférable de mettre en œuvre dans un bioréacteur les champignons filamenteux sous forme mycélium libre.

Il est connu de la littérature scientifique que l'utilisation de microparticules de talc dans le milieu de culture permettait de contrôler la morphologie du champignon *Aspergillus terreus* (Joanna Gonciarz, Marcin Bizukojc, *Engineering in Life Sciences*, 2014, 14, 190-200) et donc d'obtenir un gain de productivité lorsque ces champignons sont cultivés pour produire des enzymes dans un milieu de culture contenant du talc.

Le champignon *Aspergillus oryzae* présente également un intérêt industriel en raison de sa capacité à produire par exemple des enzymes, du type cellulases ou amylases, utiles dans l'industrie des biocarburants. Plusieurs publications ont également montré son intérêt dans le domaine de la chimie verte car le champignon est également capable de produire, dans certaines conditions, des acides dicarboxyliques en C4 (comme par exemple l'acide malique, l'acide fumarique et encore l'acide succinique). Elle peut donc servir de souche-plateforme pour produire de nombreuses enzymes et molécules d'intérêt dans l'industrie de la fermentation.

Un but de l'invention est de fournir un procédé de production, notamment à l'échelle industrielle, du champignon *Aspergillus oryzae* avec une morphologie du type mycélium libre.

35

Résumé de l'invention

Ainsi l'invention se rapporte à un procédé de production du champignon *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre, comprenant au moins les étapes suivantes:

- 5 a) on prépare dans un bioréacteur un milieu de culture stérilisé A adapté à la croissance du champignon *Aspergillus oryzae* contenant au moins 0,5 g/L de talc;
- b) on ajoute au milieu de culture stérilisé A des spores d'*Aspergillus oryzae* à raison d'au moins 10 spores/ mL de milieu de culture;
- 10 c) on incube en présence d'oxygène le milieu de culture stérilisé A issu de l'étape b) à une température comprise entre 15 et 45°C pendant au moins 6 heures de manière à obtenir un milieu de culture A contenant des champignons de l'espèce *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre.

15 La demanderesse a observé de manière surprenante qu'il est possible de favoriser le développement du champignon *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre à partir de spores en réalisant une culture dans un milieu aqueux, compatible avec ledit champignon et qui contient par ailleurs des microparticules de talc. Les microparticules de talc ont une taille généralement comprise entre 2 à 20 µm et de préférence comprise entre 5 et 10 µm.

20 De préférence la teneur en talc est comprise entre 5 et 20 g/L de milieu de culture et de manière plus préférée entre 8 et 15 g/L de milieu de culture.

Dans un mode de réalisation préféré, à l'étape b) le milieu de culture A estensemencé avec 10^2 à 10^5 spores/mL de culture.

Il est à noter que cette étape de mise en culture des spores du champignon *Aspergillus*
25 *oryzae* est conduite dans un bioréacteur et qui inclut des réacteurs de petit volume tel que par exemple une fiole.

Selon un mode de réalisation préféré, le milieu de culture obtenu après l'étape c) est utilisé comme préculture du champignon *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre pour
30 réaliser au moins une première étape de propagation qui inclut au moins les étapes suivantes :

- d) on transfère toute ou partie du milieu de culture A issu de l'étape c) dans un bioréacteur contenant un milieu de culture stérilisé B exempt de talc, avec un rapport volumique (V milieu A ajouté)/(V milieu B) compris entre 0,1% et 10%, de manière à produire un milieu

de culture B contenant des champignons du genre *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre;

- e) on cultive en présence d'oxygène le milieu de culture B issu de l'étape d) à une température comprise entre 15 et 45°C pendant au moins 6 heures de manière à obtenir un milieu de culture B contenant des champignons *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre.

De manière surprenante, il a été constaté par la demanderesse que le champignon *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre obtenus à l'issue de l'étape c) peut être mis en culture dans un milieu exempt de talc et continuer à croître dans ledit milieu tout en conservant sa morphologie mycélium libre. En effet lorsqu'on réalise la même expérience avec les champignons *Aspergillus niger* et *Aspergillus terreus*, on constate que ces derniers reprennent la forme « pellets » une fois transférés dans un milieu de culture exempt de talc. Ce mode de réalisation est avantageusement mis en œuvre pour la production à l'échelle industrielle du champignon *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre.

Ainsi le procédé selon l'invention utilise le milieu de culture produit à l'étape c) comme inoculum à partir duquel on peut réaliser une étape de propagation/croissance mycélienne du champignon. Etant donné que l'étape de croissance mycélienne est effectuée dans un milieu ne nécessitant pas l'ajout de talc, le protocole de production selon l'invention présente l'avantage d'être également économique tant du point de vue des coûts en matières premières que des coûts liés au retraitement des résidus solides chargés en déchets minéraux qui sont difficiles voire impossibles à éliminer par un procédé d'incinération.

Selon un mode de réalisation préférée, le milieu de culture issu de l'étape e) est utilisé pour conduire une seconde étape de propagation. A cette fin, on opère au moins les étapes suivantes :

- f) on transfère tout ou partie du milieu de culture B issu de l'étape e) dans un bioréacteur contenant un milieu de culture stérilisé C exempt de talc, avec un rapport volumique (V milieu B ajouté)/(V milieu C) compris entre 0,1% et 10%, de manière à produire un milieu de culture C contenant des champignons du genre *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre;
- g) on cultive en présence d'oxygène le milieu de culture C issu de l'étape f) à une température comprise entre 15 et 45°C pendant au moins 6 heures de manière à obtenir un milieu de culture C contenant des champignons du genre *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre.

Dans le cadre de l'invention, on peut également procéder à une étape h) dite de production (bioconversion) de molécules d'intérêt par le champignon. Cette étape h) peut être menée de façon concomitante à l'étape e) ou à l'étape g). Cette étape h) peut alternativement être réalisée après les étapes e) ou g).

- 5 Par exemple les molécules d'intérêts susceptibles d'être produites par *Aspergillus oryzae* sont choisies parmi des enzymes, des alcools, des acides organiques, des esters. Les enzymes peuvent être des cellulases parmi lesquelles des endoglucanases, des exoglucanases, des β -glucosidases, des amylases ou encore des asparaginases ou tout autre enzyme.

10

Description détaillée de l'invention

Les autres caractéristiques et avantages de l'invention vont apparaître à la lecture de la description qui va suivre, donnée à titre uniquement illustratif et non limitatif, en se référant aux figures annexées et décrites ci-après:

- 15
- la figure 1 montre les images des cultures des champignons *Aspergillus terreus* et *Aspergillus oryzae* dans un milieu Sabouraud complémenté avec 10 g/L de talc, après 24 heures de culture;
 - la figure 2 montre les images des cultures des champignons *Aspergillus terreus* et *Aspergillus oryzae*, après transfert des cultures de la figure 1 dans un milieu

20 Sabouraud exempt de talc et après 72 heures d'incubation.

 - la figure 3 montre les images des cultures des champignons *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger* et *Aspergillus oryzae*, après 48 heures de culture dans différentes conditions en milieu YPDP (Yeast Extract Potatoes Dextrose Peptone).

- 25 L'invention se rapporte donc à un procédé de production du champignon *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre qui comprend au moins les étapes suivantes:

- a) on prépare dans un bioréacteur de culture un milieu de culture A adapté à la croissance du champignon *Aspergillus oryzae* et contenant au moins 0,5 g/L de talc;
- b) on ajoute au milieu de culture A des spores d'*Aspergillus oryzae* à raison d'au moins

30 10 spores/mL de milieu de culture;

- c) on incube le milieu de culture A issu de l'étape b) à une température comprise entre 15 et 45°C pendant au moins 6 heures de manière à obtenir un milieu de culture A contenant des champignons du genre *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre.

Les étapes a) à c) du procédé permettent de fournir *in fine* un milieu de culture dans lequel le champignon *Aspergillus oryzae* s'est développé sous forme de mycélium libre à partir de spores. La souche de champignon mise en œuvre dans le procédé peut être naturelle ou bien une souche modifiée par mutation, par sélection ou par recombinaison génétique.

- 5 Selon l'invention, l'étape a) consiste à préparer dans un bioréacteur qui inclut notamment des réacteurs de petit volume, par exemple en fiole, un premier milieu de culture A optimisé dans lequel les spores d'*Aspergillus oryzae* après inoculation sont susceptibles de se développer. Tout milieu de culture aqueux connu de l'homme de l'art qui contient au moins une source de carbone, d'azote et de phosphore et éventuellement des oligoéléments peut
10 être utilisé comme milieu de culture des spores.

Conformément à l'invention, le milieu de culture contient en outre des microparticules de talc ($3\text{MgO} \cdot 4\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$). La teneur en talc est d'au moins 0,5 g/L de milieu de culture, de préférence comprise entre 5 et 20 g/L de milieu de culture et de manière plus préférée comprise entre 8 et 15 g/L de milieu de culture. On peut utiliser toute source de talc
15 disponible sur le marché et dont le diamètre moyen des particules est généralement compris entre 2 et 20 μm et de préférence compris entre 5 et 10 μm .

L'étape b) d'inoculation des spores d'*Aspergillus oryzae* est réalisée de manière à obtenir un milieu de culture A contenant au moins 10 spores/mL et de préférence entre 10^2 et 10^5 spores/mL de milieu de culture.

- 20 Après inoculation des spores, le milieu de culture est mis en incubation (étape c) de manière à permettre la croissance cellulaire mycélienne d'*Aspergillus oryzae*.

L'étape c) est réalisée en présence d'oxygène dans les conditions opératoires suivantes:

- Température : entre 15 et 45°C, et de préférence entre 24 et 30°C;
- Durée : au moins 6 heures, de préférence au moins 24 heures;
- 25 • pH: entre 2,5 et 8, de préférence compris entre 4 et 7.
- Volume du milieu de culture : entre 50mL et 5L

Pour l'étape c), on peut également assurer une agitation du milieu de culture et avec ou sans contrôle de la teneur en oxygène dissous dans le milieu.

- 30 A l'issue de l'étape c), le milieu de culture A contient généralement au moins 2 g/L de biomasse, de préférence entre 7 et 12 g/L de biomasse.

Afin de limiter au maximum les risques de contamination, les bioprocédés industriels, qui peuvent mettre en jeu des bioréacteurs de plusieurs dizaines, voire centaines de mètres
35 cubes, font appel à des étapes successives et croissantes de propagation pour accroître la

masse cellulaire tout en limitant la durée de la phase de latence observée lors de la phase de croissance. Dans ce contexte, le milieu de culture contenant *Aspergillus oryzae* sous forme mycélium libre constitue l'inoculum avec lequel on opère au moins la première étape de propagation.

5 L'étape de propagation selon l'invention met en œuvre au moins les étapes suivantes :

d) on transfère tout ou partie du milieu de culture A issu de l'étape c) dans un bioréacteur contenant un milieu de culture stérilisé B exempt de talc, avec un rapport volumique (V milieu A ajouté)/(V milieu B) compris entre 0,1% et 10%, de manière à produire un milieu de culture B contenant des champignons du genre *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre;

e) on cultive en présence d'oxygène le milieu de culture B issu de l'étape d) à une température comprise entre 15 et 45°C pendant au moins 6 heures de manière à obtenir un milieu de culture C contenant des champignons du genre *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre.

15 Conformément à ce mode de réalisation, le milieu de culture A issu de l'étape c) est avantageusement employé comme inoculum pour conduire l'étape dite de propagation. En effet de manière surprenante, il a été observé que la morphologie mycélium libre du champignon *Aspergillus oryzae* est conservée lorsque le champignon est transféré dans un milieu ne contenant pas de talc. Ce mode de réalisation est particulièrement avantageux pour la production à l'échelle industrielle du champignon *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre car il est plus économique (coûts en matières premières et pour le

20 retraitement des résidus solides).

L'étape de mise en culture e) est généralement effectuée dans les mêmes conditions que celles mentionnées précédemment pour l'étape c), à savoir :

- Température : entre 15 et 45°C, et de préférence entre 24 et 30°C;
- Durée : au moins 6 heures, de préférence au moins 24 heures;
- pH: entre 2,5 et 8, de préférence compris entre 4 et 7.

Le rapport volumique ou taux d'ensemencement est un paramètre important car il conditionne la durée de la phase de latence (phase initiale après ensemencement, qui précède le début de la phase de croissance, au cours de laquelle aucune activité biologique n'est mesurée). Plus l'inoculum est important et plus la phase de croissance sera courte, limitant ainsi les risques de contamination sur l'étape en question.

Selon l'invention, le rapport volumique (V milieu B ajouté)/(V milieu C) est compris entre 0,1% et 10% et de préférence compris entre 1 et 10%

Dans le cadre de l'invention, l'étape e) de culture du champignon peut être conduite selon différents modes pour alimenter et soutirer le milieu de culture du bioréacteur.

Ainsi on peut mettre en œuvre l'étape e) selon un mode batch dans lequel le bioréacteur est rempli avec le milieu de culture stérilisé, avant ajout de l'inoculum. L'étape f) se déroule ensuite sans addition supplémentaire de milieu.

Alternativement, l'étape e) peut être menée selon un mode fed-batch (ou alimentation semi-continue) dans lequel le milieu de culture est apporté au fur et à mesure de la multiplication du champignon.

Enfin, l'étape e) peut être mis en œuvre en mode continu, avec ou sans confinement des champignons, dans lequel l'ajout du milieu de culture et le soutirage sont effectués aux mêmes débits.

Comme indiqué ci-avant, les bioprocédés industriels peuvent comporter N étapes successives de propagation. A cette fin, on peut transférer tout ou partie du milieu de culture obtenu à l'issue de la première étape de propagation pour réaliser une seconde étape de propagation dans un bioréacteur de volume plus important contenant un milieu de culture stérile exempt de talc.

Si le procédé industriel met en œuvre plus de deux étapes de propagation, on utilisera tout ou partie de milieu de culture issu d'une étape X précédente de propagation pour ensemer le bioréacteur de l'étape suivante X+1 de propagation. Ces étapes successives de croissantes de propagation se font généralement dans un rapport volumique ($V_{\text{milieu X}} / (V_{\text{milieu X+1}})$) compris entre 0,1% et 10%. Après transfert, on met en culture le nouveau milieuensemencé dans les conditions décrites ci-avant pour permettre la croissance du champignon en bioréacteur.

Dans le cadre de l'invention, la croissance des champignons pendant la phase de propagation du champignon peut s'accompagner d'une étape de production de molécules d'intérêt par le champignon. Cette étape de production h) peut se faire de façon concomitante à la croissance du champignon dans le milieu de culture. Dans ce cas de figure, les molécules d'intérêt sont généralement des métabolites dits "primaires" qui sont des composés produits par le champignon et utiles à sa croissance dans un milieu de culture donné. Les métabolites primaires peuvent être des enzymes, des acides aminés, des acides organiques, des alcools, des lipides, des nucléotides, des sucres.

Il est également possible d'induire la synthèse par le champignon de métabolites dits "secondaires" pendant ou après la phase de croissance. Ces métabolites secondaires

peuvent être choisis parmi des enzymes, des acides aminés, des acides organiques, des alcools, des lipides, des nucléotides, des sucres.

Par exemple on peut ajouter au milieu de culture un substrat inducteur qui en s'accumulant dans le milieu de culture va provoquer une modification du comportement physiologique du champignon.

La méthode selon l'invention de production du champignon *Aspergillus oryzae* peut avantageusement être intégrée dans un procédé de production de bio-solvant, par exemple d'alcools (éthanol, butanol et/ou isopropanol), dit de seconde génération qui fait intervenir une étape d'hydrolyse enzymatique de la biomasse lignocellulosique au moyen d'enzymes de type cellulases sécrétés par des champignons. De manière préférée, les cellulases sont choisies parmi les endoglucanases, les exoglucanases et les β -glucosidases.

Dans ce type d'application, l'étape de production de cellulases peut être induite en ajoutant dans le milieu de culture un ou plusieurs substrats carbonés choisis parmi le lactose, le sophorose, le xylose, le gentiobiose, le cellobiose.

Exemple

Exemple 1

Une première série de tests en fioles Erlenmeyer de 250 mL a été menée afin de comparer la croissance et le comportement morphologique de deux souches d'*Aspergillus* en milieu Sabouraud exempt de talc et en milieu Sabouraud contenant du talc.

On a d'abord préparé un milieu Sabouraud liquide complémenté avec 10g/L de talc à 10 μ m. 50 mL du milieu Sabouraud complémenté avec du talc sont versés dans des fioles Erlenmeyer de 250 mL et mis en stérilisation 20 min à 121°C. Des spores d'*Aspergillus terreus* (souche NRRL 1960) et d'*Aspergillus oryzae* (souche NRRL 3488) ont été ensemencées à raison de 10⁵ spores/mL dans le milieu Sabouraud stérilisé.

Les fioles sont mises en incubation à une température de 24°C pendant 24 heures.

Au bout de 24 heures d'incubation, on observe que les spores d'*Aspergillus terreus* (Fig. 1A) d'*Aspergillus oryzae* (Fig. 1B) se sont développées en adoptant la forme de mycélium libre non agrégé.

1mL de chacune des cultures obtenues après 24 heures d'incubation ont été ensuite transféré en fioles Erlenmeyer de 250 mL contenant 49 mL d'un milieu Sabouraud stérilisé et ne contenant pas de talc.

Les fioles sont mises en incubation pendant 72 heures à 24°C. Les figures 2A et 2B sont les photographies des fioles après 72 heures d'incubation. On constate qu'en milieu exempt de talc *Aspergillus terreus* s'est développé en adoptant une morphologie agrégée du type

pellets (Fig. 2A). Au contraire et de manière surprenante chez *Aspergillus oryzae*, la croissance dans un milieu sans talc s'est faite en conservant une morphologie du type mycélium libre (Fig. 2B).

Parallèlement, un test témoin a été effectué qui confirme qu'en absence de talc dans le milieu de culture Sabouraud, la croissance d'*Aspergillus oryzae* à partir de spores produit un champignon sous forme agrégée. La figure 3-A3 est une image de la fiole témoin prise après 48 heures d'incubation à 24°C d'un milieu Sabouraud stérilisé et ensemencé à 10^5 spores/mL.

Exemple 2

Une autre série de tests a été réalisée afin de confirmer que la croissance d'*Aspergillus oryzae* à partir d'un inoculum prélevé d'un milieu additionné de talc sous forme de mycélium libre se fait avec conservation de la morphologie mycélium libre.

Ainsi des spores d'*Aspergillus terreus* (souche NRRL 1960), d'*Aspergillus niger* (souche ATCC 11414) et d'*Aspergillus oryzae* (souche NRRL 3488) ont été mis en culture dans du milieu YPDP (Yeast Extract Potatoes Dextrose Peptone) contenant :

- 24 g/L de Potatoes Dextrose
- 4 g/L d'extrait de levure
- 4 g/L de Bacto Peptone

Les figures 3-A1, 3-A2 et 3-A3 sont des images des Erlenmeyers après incubation du milieu YPDP sans talc ensemencé avec 10^5 spores/mL avec des spores d'*Aspergillus terreus*, d'*Aspergillus niger* et d'*Aspergillus oryzae*, respectivement.

On observe qu'après 48 heures de mise en culture dans un milieu exempt de talc, les trois souches d'*Aspergillus* se développent en adoptant une morphologie du type pellets.

Les figures 3-B1, 3-B2 et 3-B3 montrent les fioles après 48 heures d'incubation à 24°C en milieu YPDP complémenté avec 10g/L de talc et ensemencé avec 10^5 spores/mL d'*Aspergillus terreus*, d'*Aspergillus niger* et d'*Aspergillus oryzae*, respectivement.

On remarque donc que les spores d'*Aspergillus terreus* et *Aspergillus oryzae* croissent en prenant une morphologie du type mycélium libre tandis qu'*Aspergillus niger* adopte une conformation agrégée.

Des inoculum (1 mL) prélevés sur les cultures (milieu YPDP comprenant 10g/L de talc) des trois souches d'*Aspergillus* obtenues après 24 heures d'incubation à 24°C ont été transférés

en milieu YPDP sans talc (49 mL). Les figures 3-C1, 3-C2 et 3-C3 montrent les cultures en Erlenmeyers après 48 heures d'incubation. On observe que seule la souche *Aspergillus oryzae* (Fig. 3-C3) est capable de croître en conservant la morphologie mycélium libre dans un milieu ne comprenant pas de talc. Les souches *Aspergillus terreus* (Fig. 3-C1),
5 *Aspergillus niger* (Fig. 3-C3) au contraire perdent la morphologie mycélium libre au profit de la morphologie agrégée en pellets.

Une autre série de test a été réalisée en milieu YPDP supplémenté avec 0,2 g/L de talc, cette teneur en talc correspondant à la teneur dans le milieu après transfert de l'inoculum.

10 Les spores d'*Aspergillus terreus*, d'*Aspergillus niger* et d'*Aspergillus oryzae* ont étéensemencés à 10^5 spores/mL dans le milieu et ensuite mis en culture à 24°C pendant 48 heures.

On observe un développement des spores avec une morphologie agrégée chez les trois souches d'*Aspergillus* (Fig. 3-D1, 3-D2 et 3-D3). On en conclut que la présence de talc
15 résiduel (0,2 g/L) apporté par l'inoculum n'est pas à l'origine de la morphologie fluide obtenue pour *Aspergillus oryzae*.

REVENDICATIONS

- 1) Procédé de production de champignons de l'espèce *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre, comprenant au moins les étapes suivantes:
- 5 a) on prépare dans un bioréacteur un milieu de culture stérilisé A adapté à la croissance du champignon *Aspergillus oryzae* contenant au moins 0,5 g/L de talc;
- b) on ajoute au milieu de culture stérilisé A des spores d'*Aspergillus oryzae* à raison d'au moins 10 spores/ mL de milieu de culture;
- 10 c) on incube en présence d'oxygène le milieu de culture stérilisé A issu de l'étape b) à une température comprise entre 15 et 45°C pendant au moins 6 heures de manière à obtenir un milieu de culture A contenant des champignons de l'espèce *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre.
- d) on transfère tout ou partie du milieu de culture A issu de l'étape c) dans un bioréacteur contenant un milieu de culture stérilisé B exempt de talc, avec un rapport volumique (V milieu A ajouté)/(V milieu B) compris entre 0,1% et 10%, de manière à produire un milieu
- 15 de culture B contenant des champignons du genre *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre;
- e) on cultive en présence d'oxygène le milieu de culture B issu de l'étape d) à une température comprise entre 15 et 45°C pendant au moins 6 heures de manière à obtenir
- 20 un milieu de culture B contenant des champignons *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre.
- 2) Procédé selon la revendication 1, comprenant en outre une seconde étape de propagation incluant les étapes suivantes:
- f) on transfère tout ou partie du milieu de culture B issu de l'étape e) dans un bioréacteur
- 25 contenant un milieu de culture stérilisé C exempt de talc, avec un rapport volumique (V milieu B ajouté)/(V milieu C) compris entre 0,1% et 10%, de manière à produire un milieu de culture C contenant des champignons du genre *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre;
- g) on cultive en présence d'oxygène le milieu de culture C issu de l'étape f) à une
- 30 température comprise entre 15 et 45°C pendant au moins 6 heures de manière à obtenir un milieu de culture C contenant des champignons du genre *Aspergillus oryzae* sous forme de mycélium libre.
- 3) Procédé selon les revendications 1 ou 2, comprenant en outre une étape h) de production de molécules d'intérêt par les champignons du genre *Aspergillus oryzae* sous
- 35 forme de mycélium libre.

- 4) Procédé selon la revendication 3, dans lequel l'étape h) de production de molécules d'intérêt est conduite de façon concomitante à l'étape e) ou g).
- 5) Procédé selon la revendication 3, dans lequel l'étape h) de production de molécules d'intérêt est conduite après les étapes e) ou g).
- 5 6) Procédé selon l'une des revendications 3 à 5, dans lequel les molécules d'intérêts sont choisies parmi des enzymes, des alcools, des acides organiques, des esters.
- 7) Procédé selon la revendication 6, dans lequel les enzymes sont des cellulases.
- 8) Procédé selon la revendication 7, dans lequel les cellulases sont choisies parmi les endoglucanases, les exoglucanases, et les β -glucosidases
- 10 9) Procédé selon la revendication 6, dans lequel les enzymes sont des amylases.
- 10) Procédé selon la revendication 6, dans lequel les enzymes sont des asparaginases.
- 11) Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel le milieu de culture A contient entre 5 et 20 g/L de talc.
- 12) Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel à l'étape b) le milieu de
15 culture A estensemencé avec au moins 10^2 à 10^5 spores/mL.

1/2

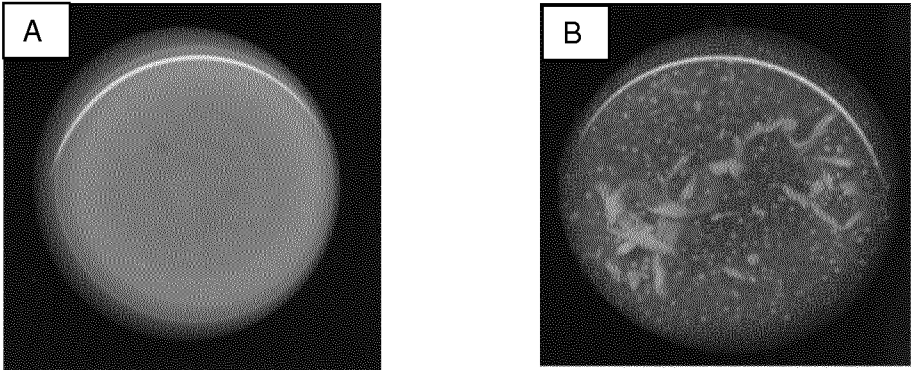


Fig. 1

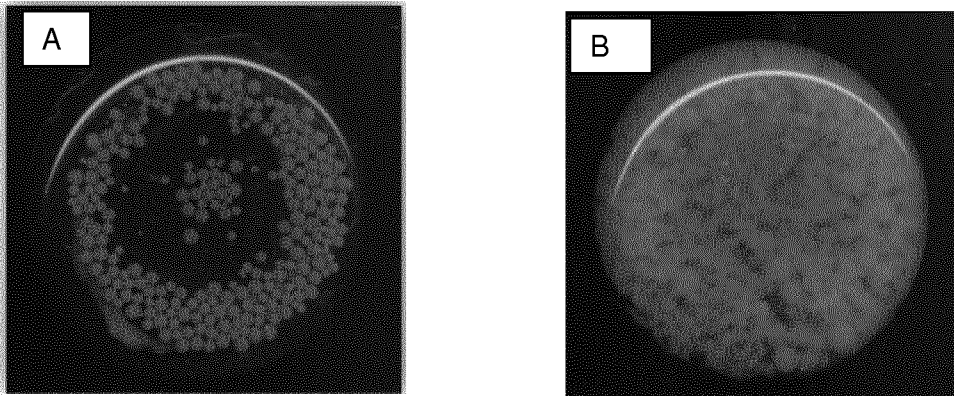


Fig. 2

2/2

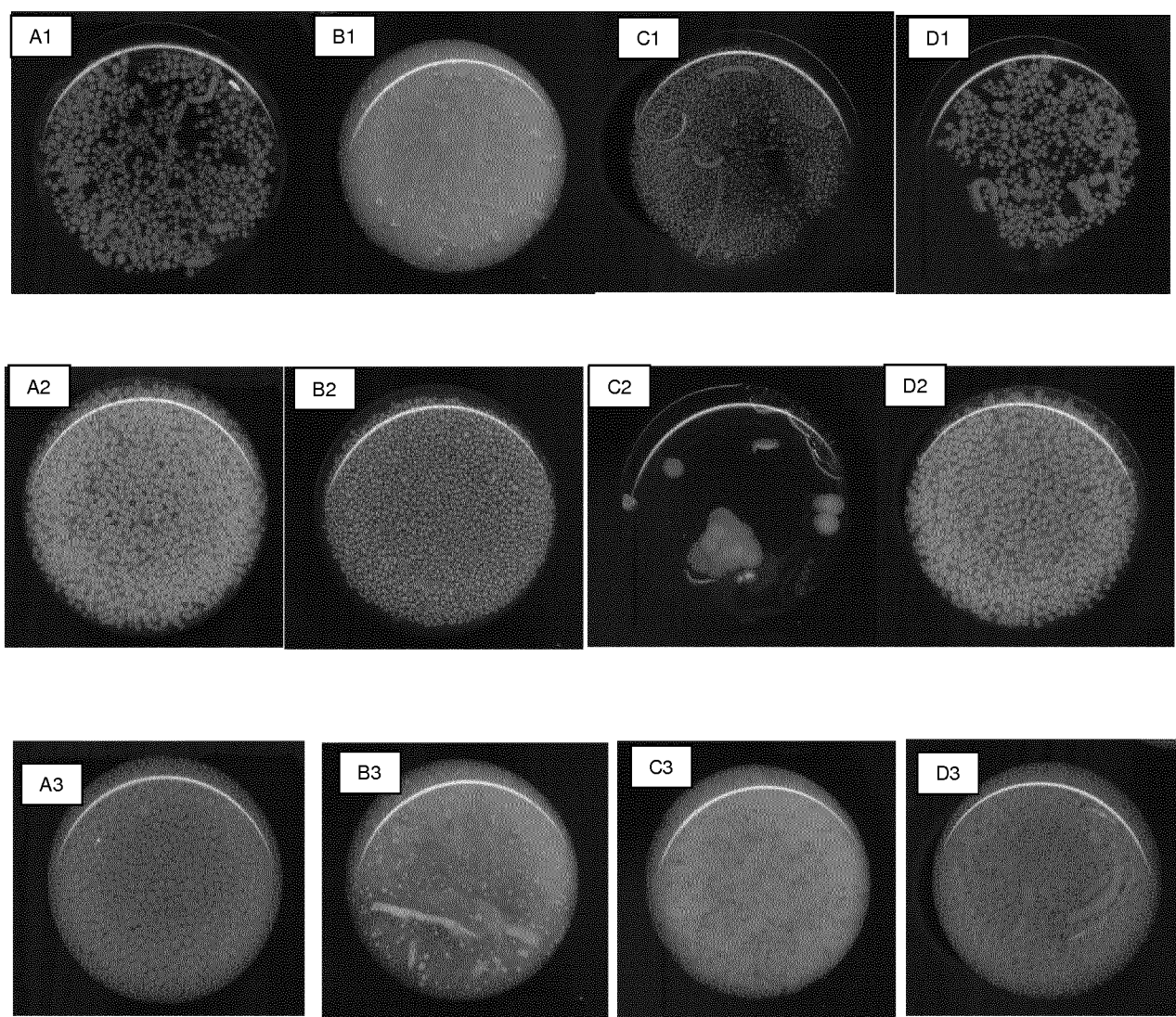


Fig. 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/079293

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N1/14 C12R1/69 C12P1/02
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N C12R C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DRIOUCH H ET AL: "rphology engineering of Aspergillus niger for improved enzyme production", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, WILEY ETC, vol. 105, no. 6, 15 April 2010 (2010-04-15), pages 1058-1068, XP002740897, ISSN: 0006-3592, DOI: 10.1002/BIT.22614 [retrieved on 2009-12-01] abstract page 1059, column 1, paragraph 2 - page 1064, column 1, paragraph 1 page 1067, column 1, paragraph 2 - column 2, paragraph 3 ----- -/--	1-12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 January 2018

Date of mailing of the international search report

19/01/2018

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Keller, Yves

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/079293

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOANNA GONCIARZ ET AL: "Adding talc microparticles to Aspergillus terreus ATCC 20542 preculture decreases fungal pellet size and improves lovastatin production", ENGINEERING IN LIFE SCIENCES, vol. 14, no. 2, 1 March 2014 (2014-03-01), pages 190-200, XP055363221, DE ISSN: 1618-0240, DOI: 10.1002/elsc.201300055 abstract page 190, column 2 - page 191, column 2, paragraph 2 page 192, column 2, paragraph 4 figures 1-6 page 199, column 1 -----	1-12
X	Anonymous: "Modern morphological engineering techniques for improving productivity of filamentous fungi in submerged cultures", 7 October 2016 (2016-10-07), XP055363049, Retrieved from the Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5055562/ [retrieved on 2017-04-07] the whole document -----	1-12
A	HABIB DRIOUCH ET AL: "Improved enzyme production by bio-pellets of Aspergillus niger: Targeted morphology engineering using titanate microparticles", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 109, no. 2, 2 September 2011 (2011-09-02), pages 462-471, XP055363441, ISSN: 0006-3592, DOI: 10.1002/bit.23313 the whole document -----	1-12
X	ROBERT WALISKO ET AL: "Microparticle based morphology engineering of filamentous microorganisms for industrial bio-production", BIOTECHNOLOGY LETTERS, SPRINGER NETHERLANDS, DORDRECHT, vol. 34, no. 11, 11 July 2012 (2012-07-11), pages 1975-1982, XP035119586, ISSN: 1573-6776, DOI: 10.1007/S10529-012-0997-1 the whole document ----- -/--	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2017/079293

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	KRULL RAINER ET AL: "Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology", JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 163, no. 2, 4 July 2012 (2012-07-04), pages 112-123, XP028975074, ISSN: 0168-1656, DOI: 10.1016/J.JBIOTEC.2012.06.024 the whole document	
X	----- HABIB DRIOUCH ET AL: "Filamentous fungi in good shape: Microparticles for tailor-made fungal morphology and enhanced enzyme production", BIOENGINEERED BUGS, vol. 2, no. 2, 1 March 2011 (2011-03-01), pages 100-104, XP055363532, US ISSN: 1949-1018, DOI: 10.4161/bbug.2.2.13757 the whole document -----	1-12

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2017/079293

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C12N1/14 C12R1/69 C12P1/02 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C12N C12R C12P		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	DRIOUCH H ET AL: "rphology engineering of Aspergillus niger for improved enzyme production", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, WILEY ETC, vol. 105, no. 6, 15 avril 2010 (2010-04-15), pages 1058-1068, XP002740897, ISSN: 0006-3592, DOI: 10.1002/BIT.22614 [extrait le 2009-12-01] abrégé page 1059, colonne 1, alinéa 2 - page 1064, colonne 1, alinéa 1 page 1067, colonne 1, alinéa 2 - colonne 2, alinéa 3 ----- -/--	1-12
☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 4 janvier 2018		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 19/01/2018
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Keller, Yves

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	JOANNA GONCIARZ ET AL: "Adding talc microparticles to Aspergillus terreus ATCC 20542 preculture decreases fungal pellet size and improves lovastatin production", ENGINEERING IN LIFE SCIENCES, vol. 14, no. 2, 1 mars 2014 (2014-03-01), pages 190-200, XP055363221, DE ISSN: 1618-0240, DOI: 10.1002/elsc.201300055 abrégé page 190, colonne 2 - page 191, colonne 2, alinéa 2 page 192, colonne 2, alinéa 4 figures 1-6 page 199, colonne 1 -----	1-12
X	Anonymous: "Modern morphological engineering techniques for improving productivity of filamentous fungi in submerged cultures", 7 octobre 2016 (2016-10-07), XP055363049, Extrait de l'Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5055562/ [extrait le 2017-04-07] le document en entier -----	1-12
A	HABIB DRIOUCH ET AL: "Improved enzyme production by bio-pellets of Aspergillus niger: Targeted morphology engineering using titanate microparticles", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 109, no. 2, 2 septembre 2011 (2011-09-02), pages 462-471, XP055363441, ISSN: 0006-3592, DOI: 10.1002/bit.23313 le document en entier -----	1-12
X	ROBERT WALISKO ET AL: "Microparticle based morphology engineering of filamentous microorganisms for industrial bio-production", BIOTECHNOLOGY LETTERS, SPRINGER NETHERLANDS, DORDRECHT, vol. 34, no. 11, 11 juillet 2012 (2012-07-11), pages 1975-1982, XP035119586, ISSN: 1573-6776, DOI: 10.1007/S10529-012-0997-1 le document en entier ----- -/--	1-12

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
T	KRULL RAINER ET AL: "Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology", JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 163, no. 2, 4 juillet 2012 (2012-07-04), pages 112-123, XP028975074, ISSN: 0168-1656, DOI: 10.1016/J.JBIOTEC.2012.06.024 le document en entier -----	
X	HABIB DRIOUCH ET AL: "Filamentous fungi in good shape: Microparticles for tailor-made fungal morphology and enhanced enzyme production", BIOENGINEERED BUGS, vol. 2, no. 2, 1 mars 2011 (2011-03-01), pages 100-104, XP055363532, US ISSN: 1949-1018, DOI: 10.4161/bbug.2.2.13757 le document en entier -----	1-12