

(12) BREVET D'INVENTION BELGE

(47) Date de publication : 21/08/2023

(21) Numéro de demande : BE2022/5616

(22) Date de dépôt : 05/08/2022

(62) Divisé de la demande de base :

(62) Date de dépôt demande de base :

(51) Classification internationale : C12P 7/10, C12P 19/14

(30) Données de priorité :

(73) Titulaire(s) :

HENAN AGRICULTURAL UNIVERSITY
FUP
450046, ZHENGZHOU
Chine

(72) Inventeur(s) :

LU Chaoyang
450000 ZHENGZHOU
Chine

(54) Procédé de production biologique d'éthanol à partir de feuilles d'aleurite

(57) La présente invention concerne le domaine technique de la préparation de l'éthanol, et plus spécifiquement un procédé de production biologique d'éthanol à partir de feuilles d'aleurite.

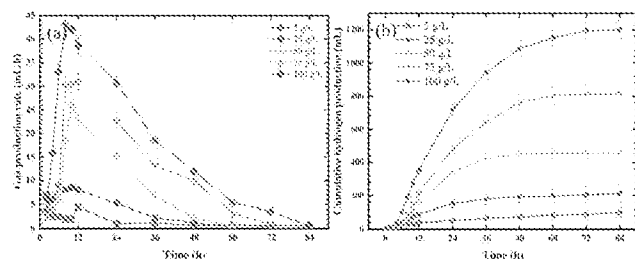


FIG.1

Procédé de production biologique d'éthanol à partir de feuilles d'aleurite

Domaine technique

La présente invention concerne le domaine technique de la préparation de l'éthanol, et plus spécifiquement un procédé de production biologique d'éthanol à partir de feuilles d'aleurite

Technologie de base

La Chine est un grand producteur et consommateur des oléagineux et possède une vaste superficie de cultures oléagineuses ligneuses, principalement le théier à huile, l'aleurite et le fruit de *Litsea cubeba*. L'aleurite est originaire de Chine et constitue un arbre forestier économique unique dont la culture remonte à plus de mille ans. Elle a une teneur élevée en huile, une large gamme d'applications pétrolières, est facile à cultiver et a une longue vie économique. L'aleurite présente de grands avantages économiques. Dans les années 1990, les chercheurs chinois ont effectué divers travaux de recherche, tels que la classification des ressources en germoplasme, la sélection et l'élevage de bonnes lignées familiales, de lignées asexuées et d'arbres supérieurs, la reproduction sexuelle de l'aleurite, les essais d'introduction de semences et l'analyse de ses traits biologiques. Pendant la croissance de l'aleurite et la production d'huile à partir de celle, est générée une grande quantité de déchets de biomasse, comme les feuilles et les branches de l'aleurite et son résidu après la production d'huile, etc. L'utilisation de cette biomasse est un sujet qui mérite d'être étudié.

L'éthanol est largement utilisé dans tous les aspects de la production sociale et joue un rôle important dans la préparation des aliments, les matières premières chimiques, la médecine et les soins médicaux et la substitution des combustibles fossiles. La production biologique d'éthanol présente les avantages d'une large gamme de substrats dégradables, de procédés de production simples et d'un

stockage et d'un transfert faciles des produits. Cependant, la production traditionnelle d'éthanol utilise principalement des cultures agricoles (riz, maïs, patates douces, sorgho, etc.) comme matières premières. Avec l'augmentation continue et régulière de la population chinoise et le déclin des terres cultivées efficaces année après année, la recherche d'une alternative bon marché à la fermentation des cultures pour la production d'éthanol est devenue une priorité urgente. Sur la base de ce qui précède, de nombreuses recherches ont également été menées sur l'utilisation de la biomasse, telle que la tige de maïs, pour la production biologique d'éthanol. Johnston et al. ont étudié la faisabilité du remplacement du maïs par la tige de maïs pour la production biologique d'éthanol et ont analysé l'effet du mélange de la tige de maïs avec le maïs sur le rendement en éthanol, le taux de fermentation et le sucre résiduel. Ils ont constaté que la substitution de la tige de maïs au maïs pour la production biologique d'éthanol pouvait donner de bons résultats. Li et al. ont étudié l'effet du prétraitement à laccase et de l'ajout de tensioactifs sur la saccharification simultanée de la tige de maïs fermentée par des levures modifiées. La combinaison du prétraitement à laccase et de l'ajout de rhamnolipides a permis d'augmenter la production d'éthanol. Le et al. ont utilisé le prétraitement à l'ammoniac pour améliorer la saccharification enzymatique et la production biologique d'éthanol à partir de la tige de maïs, obtenant une concentration maximale d'éthanol de 14,5 g/L. Molaverdi et al. ont utilisé le prétraitement au carbonate de sodium de la tige de maïs pour améliorer le rendement de fermentation de l'éthanol solide, augmentant les concentrations d'éthanol de 24 g/L à 41 g/L dans des conditions de faible charge en cellulase (5 FPU/g de substrat) et de prétraitement au carbonate de sodium. Stenberg et al. ont étudié l'effet de la concentration de substrat et de la cellulase sur la production d'éthanol par saccharification simultanée et ont constaté que la production d'éthanol augmentait avec l'augmentation de la charge de cellulase ; la faible concentration de substrat entraînait la production d'acide lactique et la

concentration élevée de substrat inhibait également la production d'éthanol.

Dans les références sur l'utilisation des ressources des cultures oléagineuses ligneuses, Hu et al. ont utilisé le fruit de *Litsea cubeba* pour extraire les substances de base pour les parfums telles que l'éthanol, l'isopropyltoluène et la sphaigne. Zhu et al. ont traité les coquilles de théier à l'huile avec du NaOH pour obtenir les fractions solides et liquides obtenus. La fraction solide a été hydrolysée par la cellulase et fermentée pour produire de l'éthanol, tandis que la fraction liquide a été oxydée pour préparer une pâte de vanilline avec des oligosaccharides. 17,35 g/L d'éthanol ont été obtenus à partir de la fraction solide contenant de la cellulose et une petite quantité de xylane à une concentration de 10%. Dans l'étude de Yan et al., les chercheurs ont utilisé l'éthanol comme méthode de prétraitement, en utilisant l'éthanol à micro-ondes pour prétraiter les coquilles de graines de théier à l'huile, puis les ont hydrolysées enzymatiquement pour préparer des oligosaccharides. Les études publiées ont principalement utilisé les déchets de fruits des cultures oléagineuses ligneuses, tandis que peu de recherches ont été menées sur la biomasse résiduelle telle que les branches et les feuilles produites par les cultures oléagineuses ligneuses. Les études existantes se concentrent sur les effets de la température sur les effets photosynthétiques et la structure interne des feuilles, et aucune étude n'a été trouvée sur l'utilisation de bonne qualité des feuilles d'aleurite.

La biotransformation des déchets de biomasse de de feuilles d'aleurite en éthanol permet une utilisation de bonne qualité des déchets. Les déchets solides des oléagineux ligneux contiennent des polysaccharides, des acides et des protéines, et ces composants organiques peuvent être valorisés. La biotransformation des déchets solides ligneux d'oléagineux en éthanol est également un bon moyen d'utilisation des ressources. Cependant, peu de recherches ont été rapportées sur la production biologique d'éthanol à partir de déchets solides de cultures oléagineuses ligneuses. Les propriétés physiques et chimiques des déchets solides des

oléagineuses ligneuses doivent être analysées en détail, et leurs propriétés physiques et chimiques uniques (forte teneur en toxines, forte teneur en lignine, déséquilibre des nutriments, etc.) imposent des exigences plus élevées à la saccharification et à la dégradation enzymatique, et la loi d'effet et le mécanisme d'amélioration des déchets solides des oléagineuses ligneuses sur la production biologique d'éthanol doivent être étudiés plus en détail.

Contenu de l'invention

La présente invention vise à fournir une méthode de production biologique d'éthanol à partir de feuilles d'aleurite qui peut augmenter la production d'éthanol.

Afin d'atteindre l'objectif susmentionné, la présente invention propose les solutions techniques suivantes :

Procédé de production biologique d'éthanol à partir de feuilles d'aleurite, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

1) Broyage : Les feuilles d'aleurite sont broyées en poudre à l'aide d'un broyeur puis sont mises de côté ;

2) Mélange : On pèse une certaine masse de poudre de feuilles d'aleurite à l'étape 1) dans un flacon prismatique, et verse une certaine masse d'eau distillée dans le flacon pour la mélanger à la poudre de feuilles d'aleurite afin d'obtenir un mélange ;

3) Produit fini : On pèse avec précision de la cellulase selon le rapport de 0,4:1 de la cellulase et de la poudre de feuilles d'aleurite, puis pèse une certaine masse de levure et les met dans un flacon prismatique, enfin secoue le flacon, de sorte que la cellulase et la levure puissent être entièrement mélangées au mélange pour produire de l'éthanol.

De préférence, dans le procédé ci-dessus pour la production biologique d'éthanol à partir de feuilles d'aleurite, la masse de la poudre de feuilles d'aleurite est de 1-20 g, de préférence 1 g, 5 g, 10 g, 15 g, 20 g.

De préférence, dans le procédé ci-dessus pour la production biologique d'éthanol à partir de feuilles d'aleurite, l'eau distillée est de 200 mL.

De préférence, dans le procédé ci-dessus pour la production biologique d'éthanol à partir de feuilles d'aleurite, la levure est de 0,5 g.

5 De préférence, dans le procédé ci-dessus pour la production biologique d'éthanol à partir de feuilles d'aleurite, la levure est une levure sèche de vinification à haute activité.

Comme il ressort des solutions techniques ci-dessus, par rapport aux techniques existantes, la présente invention étudie la faisabilité de la production
10 biologique d'éthanol à partir de feuilles d'aleurite en utilisant des feuilles d'aleurite comme substrat et une levure active comme microorganisme producteur d'éthanol; elle a principalement étudié les règles de changement des propriétés du gaz, des propriétés du liquide, des métabolites solubles et des propriétés cinétiques pendant la préparation biologique de l'éthanol à partir de feuilles d'aleurite. Les résultats
15 ont montré que le taux de production de gaz augmentait d'abord puis diminuait pendant la préparation, et que le taux de production de gaz maximum de 43 mL/h, la production de gaz accumulée maximum de 1201,5 mL et la concentration d'éthanol maximum de 6,17 g/L étaient obtenus lorsque la concentration de substrat était de 100 g/L.

20

Description des dessins

Afin d'illustrer plus clairement les solutions techniques dans les exemples ou les technologies de la présente invention, on fera ci-après une brève description des dessins qui sont nécessaires à la description des exemples ou des technologies. Il
25 sera évident que les dessins d'accompagnement de la description suivante ne sont que des exemples de la présente invention, et que d'autres dessins peuvent être obtenus à partir des dessins fournis sans aucun effort de création par les techniciens ordinaires dans ce domaine.

FIG. 1 montre les propriétés du gaz pendant la production biologique d'éthanol de la présente invention.

FIG. 2 montre les propriétés du liquide pendant la production biologique d'éthanol de la présente invention.

5 FIG. 3 montre les propriétés des substances solubles pendant la production biologique d'éthanol de la présente invention.

Application spécifique

Les solutions techniques dans les exemples de la présente invention seront
10 clairement et complètement décrites ci-après en relation avec les exemples de la présente invention, et il est clair que les exemples décrits ne sont qu'une partie des exemples de la présente invention, et non leur totalité. Sur la base des exemples de la présente invention, tous les autres exemples obtenus sans aucun effort de création par les techniciens ordinaires dans ce domaine entrent dans la portée de
15 protection de la présente invention.

Exemple 1:

Dans l'expérience, on a pris un flacon en verre de 200 ml comme réacteur de production biologique d'éthanol. On a pesé 1 g de poudre de feuilles d'aleurite et l'a ajoutée dans un flacon prismatique de 200 ml préalablement préparé, puis a
20 mesuré 200 ml d'eau distillée avec un cylindre de mesure et l'a versée dans le flacon pour mélanger avec la poudre de feuilles d'aleurite ; on a pesé 0,4 g de cellulase à l'aide d'une balance électronique et l'a ajoutée au flacon prismatique. Après l'ajout de la cellulase, on a pesé séparément 0,2 g de levure sèche de vinification à haute activité à l'aide de la balance et les ajoutées au flacon, et enfin
25 on a secoué bien le mélange pour que l'enzyme et la levure soient entièrement mélangées à la solution de réaction afin d'améliorer le rendement en éthanol. On a réglé la température de l'incubateur à 30 °C et a testé les données expérimentales selon le temps prédéfini.

Exemple 2:

Dans l'expérience, on a pris un flacon en verre de 200 ml comme réacteur de production biologique d'éthanol. On a pesé 5 g de poudre de feuilles d'aleurite et l'a ajoutée dans un flacon prismatique de 200 ml préalablement préparé, puis a mesuré 200 ml d'eau distillée avec un cylindre de mesure et l'a versée dans le flacon pour mélanger avec la poudre de feuilles d'aleurite ; on a pesé 2 g de cellulase à l'aide d'une balance électronique et l'a ajoutée au flacon prismatique. Après l'ajout de la cellulase, on a pesé séparément 0,2 g de levure sèche de vinification à haute activité à l'aide de la balance et les ajoutées au flacon, et enfin on a secoué bien le mélange pour que l'enzyme et la levure soient entièrement mélangées à la solution de réaction afin d'améliorer le rendement en éthanol. On a réglé la température de l'incubateur à 30 °C et a testé les données expérimentales selon le temps prédéfini.

15 Exemple 3:

Dans l'expérience, on a pris un flacon en verre de 200 ml comme réacteur de production biologique d'éthanol. On a pesé 10 g de poudre de feuilles d'aleurite et l'a ajoutée dans un flacon prismatique de 200 ml préalablement préparé, puis a mesuré 200 ml d'eau distillée avec un cylindre de mesure et l'a versée dans le flacon pour mélanger avec la poudre de feuilles d'aleurite ; on a pesé 4 g de cellulase à l'aide d'une balance électronique et l'a ajoutée au flacon prismatique. Après l'ajout de la cellulase, on a pesé séparément 0,2 g de levure sèche de vinification à haute activité à l'aide de la balance et les ajoutées au flacon, et enfin on a secoué bien le mélange pour que l'enzyme et la levure soient entièrement mélangées à la solution de réaction afin d'améliorer le rendement en éthanol. On a réglé la température de l'incubateur à 30 °C et a testé les données expérimentales selon le temps prédéfini.

Exemple 4:

Dans l'expérience, on a pris un flacon en verre de 200 ml comme réacteur de production biologique d'éthanol. On a pesé 15 g de poudre de feuilles d'aleurite et l'a ajoutée dans un flacon prismatique de 200 ml préalablement préparé, puis a mesuré 200 ml d'eau distillée avec un cylindre de mesure et l'a versée dans le flacon pour mélanger avec la poudre de feuilles d'aleurite ; on a pesé 6 g de cellulase à l'aide d'une balance électronique et l'a ajoutée au flacon prismatique. Après l'ajout de la cellulase, on a pesé séparément 0,2 g de levure sèche de vinification à haute activité à l'aide de la balance et les ajoutées au flacon, et enfin on a secoué bien le mélange pour que l'enzyme et la levure soient entièrement mélangées à la solution de réaction afin d'améliorer le rendement en éthanol. On a réglé la température de l'incubateur à 30 °C et a testé les données expérimentales selon le temps prédéfini.

Exemple 5:

Dans l'expérience, on a pris un flacon en verre de 200 ml comme réacteur de production biologique d'éthanol. On a pesé 20 g de poudre de feuilles d'aleurite et l'a ajoutée dans un flacon prismatique de 200 ml préalablement préparé, puis a mesuré 200 ml d'eau distillée avec un cylindre de mesure et l'a versée dans le flacon pour mélanger avec la poudre de feuilles d'aleurite ; on a pesé 8 g de cellulase à l'aide d'une balance électronique et l'a ajoutée au flacon prismatique. Après l'ajout de la cellulase, on a pesé séparément 0,2 g de levure sèche de vinification à haute activité à l'aide de la balance et les ajoutées au flacon, et enfin on a secoué bien le mélange pour que l'enzyme et la levure soient entièrement mélangées à la solution de réaction afin d'améliorer le rendement en éthanol. On a réglé la température de l'incubateur à 30 °C et a testé les données expérimentales selon le temps prédéfini.

Matériaux et méthode

Matériaux

Les feuilles d'aleurite sont broyées avec un broyeur pour détruire la structure cristalline de la cellulose et réduire la cristallinité. La poudre de cellulose broyée ne gonfle pas et est de petite taille, ce qui augmente la concentration de substrat et améliore la vitesse de saccharification.

5 Cellulase : (51 FPU/mL, Novozymes Biotechnology Co., Ltd, Denmark)。

Levure : une levure sèche de vinification à haute activité d'Anchor a été utilisée dans cette expérience ;

Méthode d'essai

10 La concentration d'éthanol a été déterminée à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse d'Agilent (7090B) avec une température de four à colonne de 40 °C, des températures d'entrée de l'échantillon et du détecteur de 250 °C et 300 °C respectivement, une pression de 10 psi, un débit de colonne chromatographique de 2,396 mL/min et une température de four de vanne de 44,1 °C. Le pH de la solution de réaction a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre (PHSJ-6L, Shanghai
15 INESA Scientific Instruments Co., LTD., Chine), le potentiel redox de la solution de réaction a été mesuré à l'aide d'un appareil de mesure du potentiel redox (SX712, Shanghai San-Xin Instrumentation, Inc., Chine) et la concentration en sucres réducteurs a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre visible (721, Shanghai Metash Instruments Co., Ltd., Chine) à OD540 nm.

20 Analyse des propriétés cinétiques

La cinétique de production de gaz a été analysée à l'aide de l'équation de Gompertz. On a utilisé l'équation de Gompertz pour l'analyse de la production de gaz et la présentation des données de sorte que la production potentielle cumulative maximale de gaz P, le taux maximal de production de gaz R_{max} et la période de
25 retard λ soient exprimés sous forme chiffrée :

$$H(t) = P \times \exp \left(-\exp \left[\frac{R_{\max} X e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right) \quad (1)$$

L'équation (2) est la dérivée de l'équation de Gompertz et R(t) représente le taux de production de gaz.

30
$$R(t) = \frac{R_{\max} X e}{P} \times \exp \left(\frac{R_{\max} X e}{P} (\lambda - t) + 1 \right) \times H(t) \quad (2)$$

Le taux moyen de production de gaz caractérise le taux moyen de production de gaz sur l'ensemble de la période de production de gaz.

$$R_{\text{overall}} = \frac{P}{(P/R_{\text{max}}) + \lambda} \cdot \frac{1}{V} \quad (3)$$

5

L'interprétation des symboles de l'équation est présentée dans le tableau 1.

Tableau 1 Symbolic annotation of equation

Symbol	Notes
H	Cumulative photo-fermentation hydrogen production (mL)
P	Maximum potential hydrogen production (mL)
R_{max}	Maximum hydrogen production rate (mL/h)
λ	Lag phase (h)
t	Time (h)
e	2.718
$R(t)$	Time-dependent hydrogen production rate (mL/h)
R_{overall}	Average hydrogen production rate (mL/h)
V	Working volume of the bioreactor (mL)

10 Résultats et discussion :

Comme le montre la figure 1-3 : Effet de la concentration de substrat sur les propriétés du gaz pendant la production biologique d'éthanol.

15 La production biologique d'éthanol s'est accompagnée de la production de grandes quantités de dioxyde de carbone gazeux. La figure 1a montre que le taux de production de gaz a eu tendance à augmenter puis à baisser avec le temps, avec un pic vers 12 h, ce qui indique que la production biologique d'éthanol était à son pic dans cette période, ce qui est également mis en évidence par la variation de la concentration d'éthanol dans la figure 3. Avec l'augmentation de la concentration de substrat, le taux de production a eu tendance à augmenter. Le taux maximal de production de gaz de 38,5 mL/h (12 h) a été atteint à une concentration de substrat
20 de 100 g/L, ce qui est étroitement lié à la concentration de substrat.

Comme le montre la figure 1b, la production cumulée de gaz a eu tendance continue à augmenter avec le temps, et avec l'augmentation de la concentration de substrat. La production cumulée maximale de gaz de 1201,5 ml s'est produite à une concentration de substrat de 100 g/L. Cette tendance est très similaire à la production photosynthétique d'hydrogène à partir de tige de maïs, où les micro-organismes dégradent la biomasse en sucres, qui sont ensuite convertis en produit cible (hydrogène ou éthanol).

Comme le montre la figure 3 : Effet de la concentration de substrat sur les propriétés du liquide pendant la production biologique d'éthanol :

La figure 2a montre l'évolution du pH lors de la production biologique d'éthanol à partir de feuilles d'aleurite. Le pH a eu tendance essentielle à baisser avec le temps, en raison de la conversion des sucres convertis de la cellulase en acides par la levure et de la production simultanée de l'éthanol. À mesure que la concentration de feuilles d'aleurite augmentait, le pH avait tendance à baisser, ce qui indique que la concentration plus élevée de substrat produisait davantage de substances volatiles d'acides gras (FIG. 3). Semblable à la production photosynthétique d'hydrogène, le pH de la production biologique d'éthanol présentait une tendance à la baisse avec le temps, mais le pH de la production photosynthétique d'hydrogène a remonté lentement dans les dernières étapes de la production d'hydrogène en raison de la conversion des bactéries photosynthétiques en hydrogène par à l'aide d'acides gras volatils dans les dernières étapes.

La figure 2b montre les règles de changement du potentiel redox et de la concentration de substrat avec le temps pendant la production biologique d'éthanol à partir de feuilles d'aleurite. Le potentiel redox a eu tendance à la baisse puis à la hausse avec le temps, et a eu tendance à la hausse avec l'augmentation de la concentration de substrat. Au pic du métabolisme microbien, le potentiel redox a eu tendance à la baisse rapide.

La figure 2c montre la tendance de la concentration en sucres réducteurs pendant la production biologique d'éthanol à partir de feuilles d'aleurite, la concentration en sucres réducteurs a eu tendance à la hausse avec le temps puis à la

baisse, et a eu tendance à la hausse continue avec l'augmentation de la concentration. Au début de la production biologique d'éthanol, le taux de conversion de la cellulase en sucres réducteurs était supérieur au taux de dégradation des sucres réducteurs par la levure, la concentration en sucres réducteurs ayant ainsi a eu tendance à la hausse. Cela indique que l'activité microbienne présente une règle de changement similaire pendant conversion biochimique.

Comme le montre la figure 3 : Effet de la concentration de substrat sur les substances solubles pendant la production biologique d'éthanol

La figure 3 montre l'évolution des substances solubles pendant la production biologique d'éthanol à partir de feuilles d'aleurite. Le principal composant des métabolites solubles était l'éthanol, avec de petites quantités d'acide acétique et d'acide butyrique. La concentration en éthanol a eu tendance à la hausse continue avec le temps et avec la concentration en substrat, avec un rendement maximal en éthanol de 6,18 g/L obtenu à une concentration en substrat de 100 g/L. Dans l'étude de Li et al. la concentration d'éthanol a eu tendance à la hausse continue avec le temps, jusqu'à 0,73 g/L. Dans l'étude de Le et al. la concentration d'éthanol la plus élevée de 14,5 g/L a été obtenue en utilisant un prétraitement à l'ammoniac pour améliorer la saccharification enzymatique et la production biologique d'éthanol à partir de la tige de maïs. Les différentes concentrations d'éthanol ont été déterminées par différents substrats, micro-organismes et conditions de traitement. D'après l'analyse de la concentration d'éthanol converti à partir de feuilles d'aleurite par unité, la concentration d'éthanol obtenue à partir de substrat par unité a eu tendance d'abord à augmenter puis à baisser avec l'augmentation de la concentration de substrat de feuilles d'aleurite, et le rendement maximal obtenu à 50 g/L était : 0,35 g d'éthanol par g de poudre de feuilles d'aleurite.

Effet de la concentration de substrat sur les propriétés cinétiques de la production biologique d'éthanol (comme indiqué dans le tableau 2) :

Tableau 2 Paramètres cinétiques pour la production biologique d'éthanol

Concentration (g/L)	R_m (mL/h)	λ (h)	R^2	P_{max} (mL)
5	1,76	-	0,96623	35,51
25	7,78	0,98	0,99303	45,90
50	20,98	5,01	0,99808	78,64
75	26,27	5,29	0,99614	477,85
100	36,15	3,56	0,99513	1208,27

L'équation cinétique permet de calculer le taux de production de gaz et la période de retard, etc. pour la production biologique d'éthanol et permet de prédire la production cumulative maximale de gaz, ce qui est important pour la compréhension scientifique de la production biologique d'éthanol. Le tableau 2

5 montre les paramètres cinétiques de la production biologique d'éthanol. Avec l'augmentation de la concentration du substrat des feuilles d'aleurite, le taux de production de gaz a eu tendance à augmenter. Avec l'augmentation de la concentration du substrat, la production maximale de gaz a eu tendance à la hausse continue et la production de gaz accumulée maximale était obtenue à une

10 concentration de substrat de 100 g/L. Les coefficients de corrélation pour tous les groupes expérimentaux étaient supérieurs à 0,9, ce qui indique que l'équation de Gompertz est bien adaptée à la production biologique d'éthanol.

En résumé, on peut constater que la production biologique d'éthanol à partir de feuilles d'aleurite a de bonnes perspectives. La concentration d'éthanol

15 biologique a augmenté avec la concentration de substrat des feuilles d'aleurite, mais le rendement spécifique a eu tendance à la hausse puis à la baisse. Le rendement maximal de 0,35 g/L a été obtenu lorsque la concentration de feuilles d'aleurite était de 50 g/L. Parallèlement à la production biologique d'éthanol, le pH du bouillon de fermentation a eu tendance à la baisse continue, le potentiel redox a

20 eu tendance à la baisse puis à la hausse, et la concentration de sucre réducteur a eu tendance à la hausse puis à la baisse. Les résultats expérimentaux fournissent une base théorique et technique pour la biotransformation des feuilles d'aleurite.

Chaque exemple dans ce manuel est décrit de manière progressive, chaque exemple se concentre sur les différences par rapport aux autres exemples, et il est suffisant de se référer aux parties identiques et similaires de chaque exemple. Pour le dispositif divulgué dans les exemples, la description est plus simple car elle correspond à la méthode de divulgation des exemples, et les parties pertinentes sont décrites dans la section sur la méthode.

La description ci-dessus des exemples divulgués permet aux techniciens professionnels de mettre en œuvre ou d'utiliser la présente invention. Une variété de modifications de ces exemples sera apparente pour les techniciens professionnels, et les principes généraux définis dans le présent document peuvent être mis en œuvre dans d'autres exemples sans s'écarter de l'esprit ou de la portée de la présente invention. En conséquence, la présente invention ne sera pas limitée aux exemples présentés ici, mais sera soumise à la portée la plus large compatible avec les principes et les nouvelles caractéristiques divulgués ici.

REVENDICATIONS

1. Procédé de production biologique d'éthanol à partir de feuilles d'aleurite, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :
 - 5 1) Broyage : Les feuilles d'aleurite sont broyées en poudre à l'aide d'un broyeur puis sont mises de côté ;
 - 2) Mélange : On pèse une certaine masse de poudre de feuilles d'aleurite à l'étape 1) dans un flacon prismatique, et verse un certain volume d'eau distillée dans le flacon pour la mélanger à la poudre de feuilles d'aleurite afin d'obtenir un
10 mélange ;
 - 3) Produit fini: On pèse avec précision de la cellulase selon le rapport de 0,4:1 de la cellulase et de la poudre de feuilles d'aleurite, puis pèse une certaine masse de levure et les met dans un flacon prismatique, enfin secoue le flacon, de sorte que la cellulase et la levure puissent être entièrement mélangées au mélange
15 pour produire de l'éthanol.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la poudre de feuilles d'aleurite a une masse de 1-20 g, de préférence 1 g, 5 g, 10 g, 15 g, 20 g.
3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le volume d'eau distillée est de 200 mL.
- 20 4. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la masse de levure est de 0,5 g.
5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que la levure est une levure sèche de vinification à haute activité.

Dessins

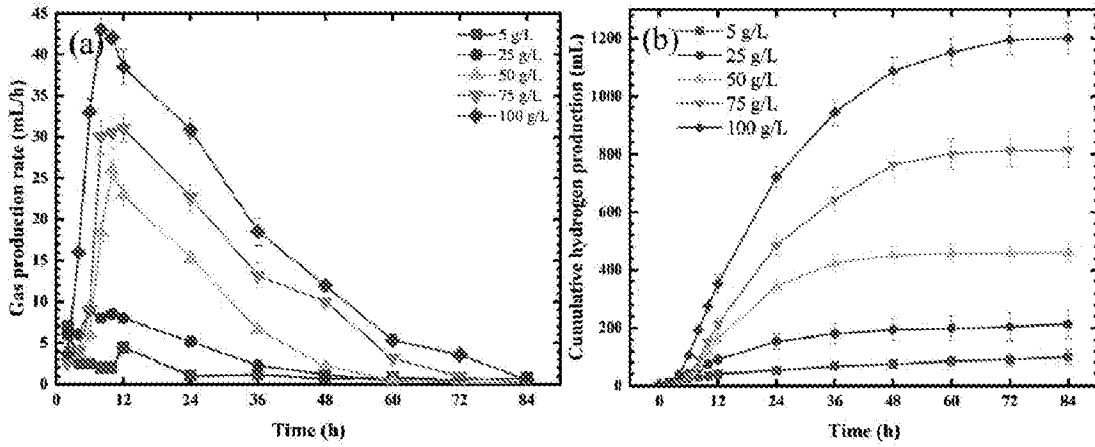


FIG.1

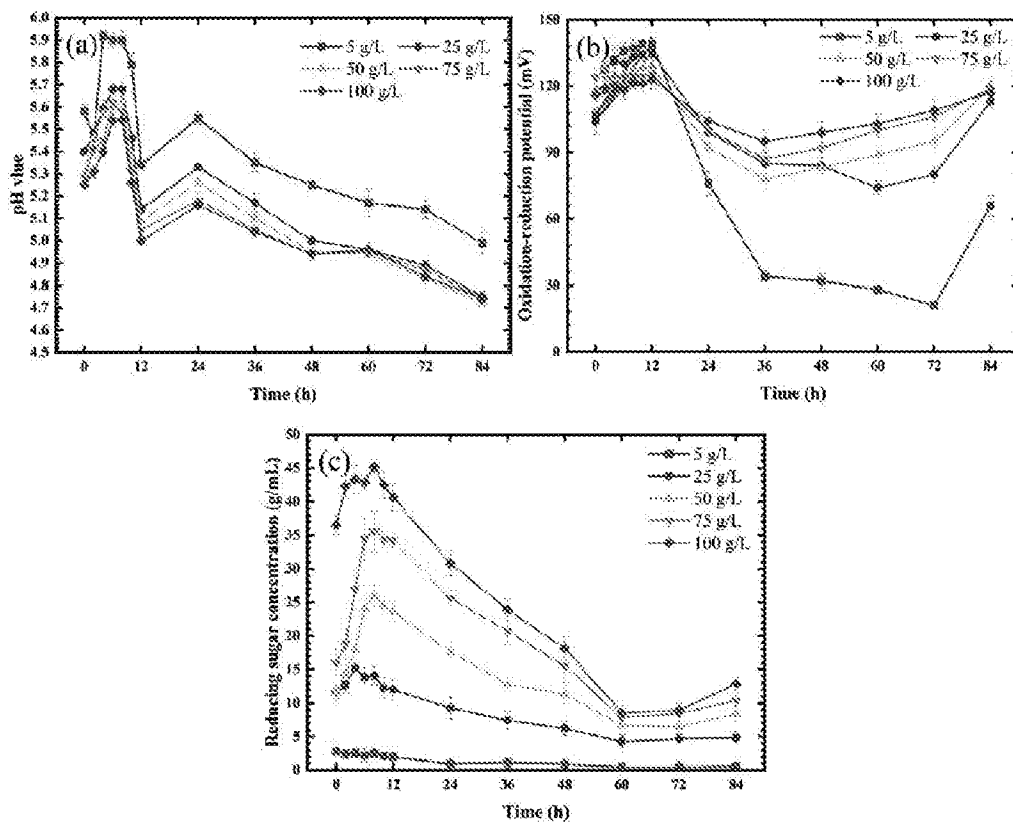


FIG. 2

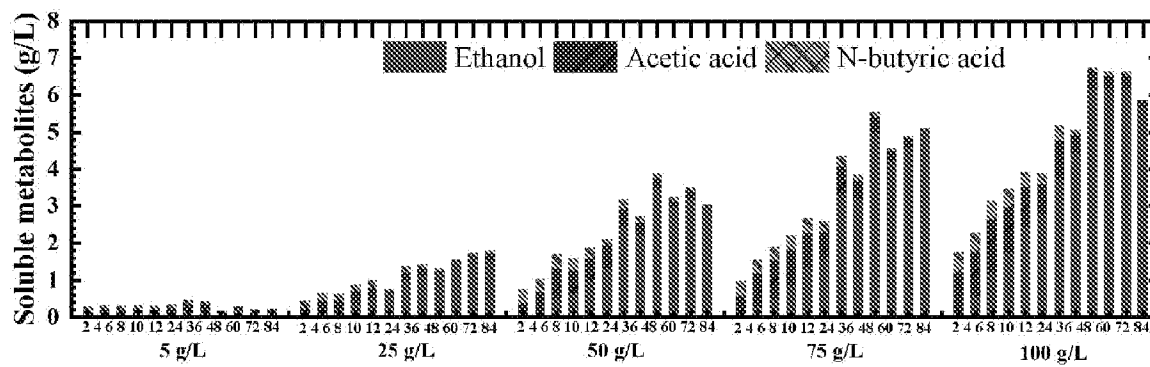


FIG. 3

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL ÉTABLI EN VERTU DE L'ARTICLE XI.23., §10 DU CODE DE DROIT ÉCONOMIQUE BELGE

IDENTIFICATION DE LA DEMANDE INTERNATIONALE	REFERENCE DU DEPOSANT OU DU MANDATAIRE LUPF1432896/BE-SSP
Demande nationale belge n° 202205616	Date du dépôt 05-08-2022
	Date de priorité revendiquée
Déposant (Nom) HENAN AGRICULTURAL UNIVERSITY	
Date de la requête d'une recherche de type international 24-09-2022	Numéro attribué par l'administration chargée de la recherche internationale à la requête d'une recherche de type international SN82225
I. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE (en cas de plusieurs symboles de la classification, les indiquer tous)	
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB Voir rapport de recherche	
II. DOMAINES RECHERCHES	
Documentation minimale consultée	
Système de classification	Symboles de la classification
IPC	Voir rapport de recherche
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents font partie des domaines consultés	
III. <input type="checkbox"/> IL A ÉTÉ ESTIMÉ QUE CERTAINES REVENDECTIONS NE POUVAIENT FAIRE L'OBJET D'UNE RECHERCHE (Observations sur la feuille supplémentaire)	
IV. <input type="checkbox"/> ABSENCE D'UNITÉ DE L'INVENTION ET/OU CONSTATATION RELATIVE À L'ÉTENDUE DE LA RECHERCHE (Observations sur la feuille supplémentaire)	

<p>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C12P7/10 C12P19/14 ADD.</p>				
<p>Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB</p>				
<p>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</p> <p>Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C12P C12R</p>				
<p>Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche</p>				
<p>Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data</p>				
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</p>				
Catégorie °	Documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées		
Y	<p>ZAHARI MIOR AHMAD KHUSHAIRI MOHD ET AL: "Efficient utilization of oil palm frond for bio-based products and biorefinery", JOURNAL OF CLEANER PRODUCTION, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 65, 12 octobre 2013 (2013-10-12), pages 252-260, XP028607799, ISSN: 0959-6526, DOI: 10.1016/J.JCLEPRO.2013.10.007 * abrégé * * page 253, colonne de gauche, alinéa 3 - colonne de droite, alinéa 2 * * page 254, colonne de gauche, alinéa 1-2 * * page 256, colonne de droite, alinéa 2 - page 258, colonne de droite, alinéa 1; figures 4,5; tableau 4 *</p> <p style="text-align:center;">----- -/--</p>	1-5		
<p><input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe</p>				
<p>° Catégories spéciales de documents cités:</p> <table style="width:100%; border:none;"> <tr> <td style="width:50%; border:none;"> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </td> <td style="width:50%; border:none;"> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt 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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </td> </tr> </table>			<p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p>	<p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt 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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document qui fait partie de la même famille de brevets</p>
<p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p>	<p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt 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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document qui fait partie de la même famille de brevets</p>			
Date à laquelle la recherche de type international a été effectivement achevée		Date d'expédition du rapport de recherche de type international		
23 février 2023				
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale		Fonctionnaire autorisé		
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Mateo Rosell, A		

C.(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie °	Documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>Sharmila Dudekula ET AL: "Extraction of bioethanol from plant leaves", Der Pharmacia Lettre, 8 (8), 1 janvier 2016 (2016-01-01), pages 97-99, XP093025954,</p> <p>Extrait de l'Internet: URL: https://www.researchgate.net/publication/304945622_Extraction_of_bioethanol_from_plant_leaves [extrait le 2023-02-21] * abrégé * * page 97, dernier alinéa - page 98, alinéa 2 *</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-5
Y	<p>Muhammad Yusuf ET AL: "Bioethanol Production from Neem Tree Leaves (Azadirachta indica) Using Saccharomyces cerevisiae as Fermenting Agent", IOSR Journal of Applied Chemistry, 1 janvier 2016 (2016-01-01), pages 32-37, XP093025985, DOI: 10.9790/5736-0903013237</p> <p>Extrait de l'Internet: URL: chrome-extension://efaidnbmninnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.iosrjournals.org/iosr-jac/papers/vol9-issue3/Version-1/E0903013237.pdf [extrait le 2023-02-21] * abrégé * * page 33, dernier alinéa - page 34, alinéa 1 * * page 34, alinéa 4; tableau 1 *</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-5
A	<p>MOODLEY PRESHANTHAN ET AL: "Bioethanol production from sugarcane leaf waste: Effect of various optimized pretreatments and fermentation conditions on process kinetics", BIOTECHNOLOGY REPORTS, vol. 22, 1 juin 2019 (2019-06-01), page e00329, XP093026101, ISSN: 2215-017X, DOI: 10.1016/j.btre.2019.e00329</p> <p>* abrégé * * page 2, alinéa 1-4; tableau 4 *</p> <p style="text-align: center;">-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-5

C.(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie °	Documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>FU JINXIA ET AL: "Fuel Properties of Pongamia (Milletoia pinnata) Seeds and Pods Grown in Hawaii", ACS OMEGA, vol. 6, no. 13, 25 mars 2021 (2021-03-25), pages 9222-9233, XP093026146, US ISSN: 2470-1343, DOI: 10.1021/acsomega.1c00635 Extrait de l'Internet: URL:https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acsomega.1c00635> * le document en entier *</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-5
A	<p>KUMAR K. RAJESH ET AL: "Biodiesel production and characterization from non-edible oil tree species Aleurites trisperma Blanco", BIOMASS CONVERSION AND BIOREFINERY, vol. 5, no. 3, 23 octobre 2014 (2014-10-23), pages 287-294, XP093026190, Berlin/Heidelberg ISSN: 2190-6815, DOI: 10.1007/s13399-014-0152-4 Extrait de l'Internet: URL:http://link.springer.com/article/10.1007/s13399-014-0152-4/fulltext.html> * le document en entier *</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-5



OPINION ÉCRITE

Dossier N° SN82225	Date du dépôt(<i>jour/mois/année</i>) 05.08.2022	Date de priorité (<i>jour/mois/année</i>)	Demande n° BE202205616
Classification internationale des brevets (CIB) INV. C12P7/10 C12P19/14			
Déposant HENAN AGRICULTURAL UNIVERSITY			

La présente opinion contient des indications et les pages correspondantes relatives aux points suivants :

- Cadre n° I Base de l'opinion
- Cadre n° II Priorité
- Cadre n° III Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- Cadre n° IV Absence d'unité de l'invention
- Cadre n° V Déclaration motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- Cadre n° VI Certains documents cités
- Cadre n° VII Irrégularités dans la demande
- Cadre n° VIII Observations relatives à la demande

Formulaire BE237A (feuille de couverture) (Juillet 2022)	Examineur Mateo Rosell, A
--	------------------------------

Cadre n° I Base de l'opinion

1. Cette opinion a été établie sur la base des revendications déposées avant le commencement de la recherche.
2. En ce qui concerne **la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande, la présente opinion a été effectuée sur la base d'un listage des séquences
 - a. faisant partie de la demande telle que déposée.
 - b. remis postérieurement à la date du dépôt aux fins de la recherche,
 - accompagné d'une déclaration selon laquelle le listage des séquences ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée.
3. En ce qui concerne la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés divulguées dans la demande, la présente opinion a été effectuée dans la mesure où une opinion valable pouvait être formulée en l'absence d'un listage des séquences conforme à la norme ST.26 de l'OMPI.
4. Commentaires complémentaires :

Cadre n° V Opinion motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications	1-5
	Non : Revendications	
Activité inventive	Oui : Revendications	
	Non : Revendications	1-5
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications	1-5
	Non : Revendications	

2. Citations et explications

voir feuille séparée

Cadre n° VIII Observations relatives à la demande

voir feuille séparée

Ad point V

Déclaration motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle ; citations et explications à l'appui de cette déclaration

Il est fait référence aux documents suivants :

- D1 ZAHARI MIOR AHMAD KHUSHAIRI MOHD ET AL: "Efficient utilization of oil palm frond for bio-based products and biorefinery", JOURNAL OF CLEANER PRODUCTION, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 65, 12 octobre 2013 (2013-10-12), pages 252-260, XP028607799, ISSN: 0959-6526, DOI: 10.1016/J.JCLEPRO.2013.10.007
- D2 Sharmila Dudekula ET AL: "Extraction of bioethanol from plant leaves", Der Pharmacia Lettre, 8 (8), 1 janvier 2016 (2016-01-01), pages 97-99, XP093025954,
Extrait de l'Internet:
URL:https://www.researchgate.net/publication/304945622_Extraction_of_bioethanol_from_plant_leaves
[extrait le 2023-02-21]
- D3 Muhammad Yusuf ET AL: "Bioethanol Production from Neem Tree Leaves (Azadirachta indica) Using Saccharomyces cerevisiae as Fermenting Agent", IOSR Journal of Applied Chemistry, 1 janvier 2016 (2016-01-01), pages 32-37, XP093025985,
DOI: 10.9790/5736-0903013237
[extrait le 2023-02-21]
- D4 Moodley Preshanthan ET AL: "Bioethanol production from sugarcane leaf waste: Effect of various optimized pretreatments and fermentation conditions on process kinetics", Biotechnology Reports, vol. 22, 1 juin 2019 (2019-06-01), page e00329, XP093026101, ISSN: 2215-017X, DOI: 10.1016/j.btre.2019.e00329

Nouveauté

1. D1 qui est considéré comme l'état de la technique le plus proche de l'objet de la revendication 1, divulgue (abrégé; page 253, colonne de gauche, alinéa 3 - colonne de droite, alinéa 2; page 254, colonne de gauche, alinéa 1-2; page 256, colonne de droite, alinéa 2 - page 258, colonne de droite, alinéa 1; figures 4,5; tableau 4): une utilisation efficace des feuilles de palmier à huile (OPF en anglais) pour l'obtention des produits biosourcés.

L'utilisation du jus d'OPF comme matière première pour la fermentation ont été étudiées avec deux bioproduits, à savoir le poly(3-hydroxybutyrate), P(3HB), et le bioéthanol. Le P(3HB) a été produit avec *Cupriavidus necator* NCIMB 11599 par fermentation fed-batch avec une masse sèche cellulaire et une teneur en PHB de 40 g/l et 75 % en poids, respectivement. D'autre part, la fermentation du bioéthanol à partir du jus d'OPF a été réalisée en utilisant la levure de boulanger.

Les pétioles d'OPF ont été collectés dans une plantation de palmiers à huile, le jus a été obtenu en pressant les pétioles d'OPF frais. Le résidu de fibre obtenu après le pressage (fibre pressée OPF) a été séché au soleil et broyé à l'aide d'un broyeur à marteau et ensuite à l'aide d'un broyeur à disques en condition humide. De l'eau a été ajoutée aux fibres d'OPF dans un rapport de 1:20 afin de faciliter le processus de broyage par disques. Le broyage par disque humide a été répété pendant 20 cycles jusqu'à ce que le mélange soit homogénéisé sous forme de pâte. Les pâtes de fibres et de fibres d'OPF broyées ont été conservées à 4 °C jusqu'à leur utilisation ultérieure.

La saccharification des fibres OPF a été effectuée dans des flacons coniques de 250 ml avec bouchons. Un gramme (poids sec) de fibres OPF broyées par voie humide a été ajouté à 20 FPU de cellulase dans 40 ml de tampon acétate 0,05 M. La saccharification a été réalisée pendant 48 heures. Une culture *S. cerevisiae* a été utilisée comme inoculum à 10% v/v. pour la production d'éthanol à partir de jus d'OPF.

Par conséquent, l'objet de la revendication 1 diffère de ce D1 connu en ce que l'on obtient de l'éthanol à partir de feuilles d'aleurites; il est donc nouveau.

2. D2 divulgue (abrégé; page 97, dernier alinéa - page 98, alinéa 2): la production d'éthanol à partir de feuilles de *Pongamia pinnata*.

Les feuilles de *P. pinnata* sont collectées et essuyées avec du coton trempé dans l'éthanol pour nettoyer la surface, et sont broyées en une poudre fine. L'éthanol est produit par hydrolyse des feuilles de la plante par l' α -amylase puis fermenté à l'aide de levures.

L'objet de la revendication 1 diffère de ce D2 connu en ce que l'on obtient de l'éthanol à partir de feuilles d'aleurites; il est donc nouveau.

3. D3 divulgue (abrégé; page 33, dernier alinéa - page 34, alinéa 1; page 34, alinéa 4; tableau 1): la production de bioéthanol en utilisant des levures comme agent de fermentation et des feuilles d'arbre de margousier (*Azadirachta indica*). La poudre séchée de feuilles de margousier et réduite en poudre sont hydrolysées à l'aide de H₂SO₄ à des concentrations 2%, 5%, et 10%. Les échantillons hydrolysés ont été fermentés en utilisant la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

L'objet de la revendication 1 diffère de ce D2 connu en ce que l'on obtient de l'éthanol à partir de feuilles d'aleurites; il est donc nouveau.

4. Finalement, D4 divulgue (* abrégé; page 2, alinéa 1-4; tableau 4): la production de bioéthanol à partir de déchets de feuilles de canne à sucre (DSL), en utilisant deux régimes de prétraitement optimisés différents ; sous deux modes de fermentation par *S. cerevisiae* : hydrolysats enzymatique filtré au sel et à l'alcali (SSA-F), sel et à l'alcali non filtré (SSA-U), sel et alcali à micro-ondes filtré (MSA-F) et sel et alcali à micro-ondes non filtré (MSA-U).

Activité Inventive

1. Le problème que la présente invention se propose de résoudre peut être considéré comme la valorisation des feuilles d'aleurites.

La solution à ce problème, proposée dans la revendication 1 de la présente demande, est la production d'éthanol à partir desdites feuilles.

L'effet technique dérivé de ladite solution est un bon moyen d'utilisation des ressources par biotransformation des déchets solides ligneux d'oléagineux en éthanol.

2. La solution proposée dans la revendication 1 de la présente demande, ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive pour les motifs suivants :

La biotransformation des déchets solides ligneux d'oléagineux tels que les feuilles des plantes en éthanol est connue de l'homme du métier.

Selon la description donnée dans les documents D1 et D2, l'obtention d'éthanol à partir des feuilles de palmier à huile ou à partir de feuilles de *P. pinnata*, respectivement, présente les mêmes avantages que ceux mentionnés dans la présente demande.

Par conséquent, l'utilisation des feuilles d'aleurites pour l'obtention d'éthanol serait considérée par l'homme du métier comme une solution de développement ordinaire pour résoudre le problème posé, c.à.d. la valorisation des déchets solides ligneux oléagineux.

Les revendications 2-5 dépendent de la revendication 1 et ne contiennent pas de caractéristiques qui satisfassent aux exigences d'activité inventive en étant combinées aux caractéristiques de l'une quelconque des revendications auxquelles lesdites revendications dépendantes sont liées.

Ces revendications sont dirigées vers des alternatives qui, dans la mesure où elles ne sont pas directement décrites dans D1-D3, ne sont que des modes de réalisation qui tombent dans la gamme du conventionnel pour l'homme du métier. De plus, aucune desdites caractéristiques ne semble pas être associée à un effet technique qui irait au-delà de l'effet technique que l'homme du métier y associerait avec lesdites caractéristiques techniques.

Ad point VIII

Certaines observations relatives à la demande

La description ne mentionne pas l'état de la technique pertinent. Les références citées dans la description sont incomplètes.