(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

COURBEVOIE

(11) **N° de publication :** **3 069 155**
(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) **N° d'enregistrement national :** **17 56909**

(51) Int Cl[8] : ***A 61 K 38/00*** *(2017.01), A 23 L 33/18, A 61 K 8/64, A 61 K 38/03*

(12) **BREVET D'INVENTION** **B1**

(54) COMPOSITION COMPRENANT UNE CONCENTRATION ELEVEE EN LIPOPEPTIDES ITURINIQUES.

(22) **Date de dépôt :** 21.07.17.

(30) **Priorité :**

(43) **Date de mise à la disposition du public de la demande :** 25.01.19 Bulletin 19/04.

(45) **Date de la mise à disposition du public du brevet d'invention :** 10.07.20 Bulletin 20/28.

(56) **Liste des documents cités dans le rapport de recherche :**

Se reporter à la fin du présent fascicule

(60) **Références à d'autres documents nationaux apparentés :**

◯ **Demande(s) d'extension :**

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

(72) **Inventeur(s) :** COUTTE FRANCOIS, DELECROIX ARNAUD, EL GHAZOUANI ABDELNASSER et JACQUES PHILIPPE.

(73) **Titulaire(s) :** LIPOFABRIK Société par actions simplifiée.

(74) **Mandataire(s) :** IP TRUST.

FR 3 069 155 - B1

COMPOSITION COMPRENANT UNE CONCENTRATION ELEVEE EN LIPOPEPTIDES ITURINIQUES

L'invention a trait à des compositions présentant une concentration élevée en lipopeptides ituriniques. En particulier, les compositions selon l'invention présentent une concentration en lipopeptides ituriniques comprise entre 5 et 200 g/L, et sont stables et homogènes grâce à la présence de tensioactifs et/ou de molécules hydrotropes.

Les lipopeptides ituriniques sont des molécules produites par différentes souches de *Bacillus sp.* et plus particulièrement les souches de *Bacillus subtilis, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus megaterium, Bacillus thermoamylovorans, Bacillus thermocloacae, Bacillus firmus, Bacillus mojavensis, Bacillus velenzensis, Bacillus valissmortis.* On citera en exemple et de manière non exhaustive, les souches *Bacillus subtilis* ATCC6633, W23, ATCC19659, DSM23117, QST713 ou AQ713, FMBJ, 3-10, RB14 , BH072 et leurs dérivées, les souches *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, KB3, SYBC H47, GA1 et leurs dérivés.

Cette famille de molécules comprend l'iturine A, A_L et C, la mojavensine, la mycosubtilline et les bacillomycines A, B, C, D, F, L et Lc. Ces composants sont connus essentiellement pour leur pouvoir antifongique mais ils présentent également des propriétés antibactériennes. Ces propriétés proviennent de leur nature amphiphile qui leur permet d'interagir avec différents constituants membranaires.

Les molécules ituriniques peuvent être produites en solution dans le bouillon de fermentation par les différentes souches mentionnées ci-dessus, puis elles peuvent être récupérées selon des méthodes connues de l'homme du métier afin de les extraire, de les concentrer et de les purifier à partir d'un surnageant de culture. Néanmoins, leur comportement en solution est dépendant de leur concentration. En effet, il est connu qu'au-dessus de la concentration micellaire critique (située entre 10 et 20 mg/L), les composés ituriniques comme les autres molécules de types lipopeptides forment des micelles plus ou moins complexes. Par ailleurs, la taille de ces micelles va évoluer pour former des structures de plus en plus complexes quand on augmente leur concentration, passant d'une taille moyenne de 10 nm à des concentrations en dessous de 500 mg/L (Jauregi et al., 2013), à des structures vésiculaires d'un diamètre moyen de 150 nm au-dessus d'1 g/L (Grau et al. 2001), puis à des superstructures de type bicouche lamellaire à une concentration de 10 g/L (Hamley et al., 2013). Comme le révèlent ces travaux sur la mycosubtiline (Hamley et al., 2013) ou sur l'iturine A (Grau et al. 2001), ces superstructures ne sont pas retrouvées chez les autres molécules lipopeptidiques de la famille des surfactines par exemple. Par ailleurs l'augmentation de la concentration en

composés ituriniques tant à augmenter leur interaction avec les protéines contenues dans le milieu de culture et ainsi à augmenter la taille des structures conduisant à les rendre insolubles (Jauregi et al. 2013).

Ces propriétés physico-chimiques des composés ituriniques posent donc des problèmes de solubilité, donnant lieu à des compositions instables et ayant tendance à précipiter ou à gélifier lorsque l'on augmente la concentration en lipopeptides ituriniques des compositions.

Problèmes résolus par la présente invention

Les inventeurs ont montré qu'il est possible de préparer une composition stable et homogène dans laquelle la concentration en lipopeptides ituriniques est supérieure à 5g/L grâce à l'ajout de molécules ayant des propriétés tensioactives. En effet, les agents tensioactifs permettent d'améliorer la solubilisation des lipopeptides ituriniques au-delà de 5g/L, en particulier à 10 g/L et à 20g/L et jusqu'à 50, 100 voire 200 g/L sans apparition de précipité ou de gel.

La présente invention trouve notamment des applications dans la production de solutions concentrées de molécules biopesticides antifongiques, antibactériennes ou biosurfactants pour l'industrie phytosanitaire, mais également dans les domaines des industries alimentaire, cosmétique, pharmaceutique et pétrolière.

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

Un premier objet de l'invention concerne une composition liquide stable et homogène comprenant un mélange de lipopeptides dans laquelle la concentration en lipopeptides ituriniques est supérieure à 5 g/L.

Dans une telle composition, les lipopeptides sont associés à des molécules ayant des propriétés tensioactives, grâce auxquelles la composition concentrée en lipopeptides ituriniques reste stable et homogène.

Par composition « stable et homogène », on entend une composition qui ne comprend pas de précipité, et qui reste homogène à des températures comprises entre 4°C et 40°C. L'absence de prise en masse est également un critère important, c'est-à-dire que la solution est liquide et non sous forme gélifiée.

Selon un mode de réalisation préféré, la composition selon l'invention comprend entre 20 et 200 g/L de lipopeptides ituriniques. Elle peut comprendre par exemple 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ou 200 g/L de lipopeptides ituriniques. De manière préférée, la concentration en lipopeptides ituriniques de la composition est supérieure à 50 g/L.

Par « molécules de la familles des iturines », on entend l'iturine A, A_L et C, la mojavensine, la mycosubtiline et les bacillomycines A, B, C, D, F, L et Lc.

Les compositions de la présente invention comprennent des molécules ayant des propriétés tensioactives.

Par « molécules ayant des propriétés tensioactives », aussi appelées « agents tensioactifs » ou plus simplement « tensioactifs », on entend notamment les molécules amphiphiles, les surfactants, les lipopeptides, comme par exemple, la surfactine, la fengycine (ou plipastatine), les tensioactifs chimiques et les tensioactifs biologiques, comme par exemple les rhamnolipides, les polysaccharides, etc…. Ces molécules peuvent être utilisées seules ou en association dans les compositions de l'invention.

Parmi les agents tensioactifs, on peut citer l'héparine, l'acide hyaluronique, le dextrane, l'amylose, le chitosane, des tensioactifs anioniques dérivés d'acides aminés, des tensioactifs non-ioniques dérivés des poly-glycosides, des tensio-actifs hydrotropes, des lipopeptides tels que les isomères de surfactine et/ou les isomères de fengycine (ou plipastatine), les rhamnolipides et les huiles végétales.

Les compositions de l'invention peuvent, en outre, contenir des adjuvants tels que des sources lipidiques, des sels et des solvants. Ces adjuvants peuvent participer à la solubilisation sans pour autant être des tensioactifs. A titre d'exemple de solvants, on peut citer l'éthanol, le méthanol, l'acétonitrile, le dimethyl sulfoxide, le butanol, le pentanol, l'acétone…

Selon un premier aspect, l'invention concerne une composition comprenant entre 5 et 50 g/L de lipopeptides ituriniques et entre 1 et 40 g/l de surfactine.

Dans une composition particulière, les lipopeptides ituriniques sont des mycosubtilines.

Dans une autre composition particulière, la quantité de lipopeptides ituriniques est de préférence comprise entre 10 g/L et 50g/L, voire entre 20 et 50 g/L, de manière encore préférée entre 30 et 50 g/L.

Selon un second aspect, l'invention concerne une composition comprenant entre 5 et 100 g/L de lipopeptides ituriniques, entre 1 et 40 g/l de surfactine et entre 1 et 100 g/l de fengycine (ou plipastatine).

Dans une composition particulière, la quantité de lipopeptides ituriniques est de préférence comprise entre 10 et 80 g/L, voire entre 20 et 80 g/L, de manière préférée entre 30 et 80 g/L.

Selon un troisième aspect, l'invention concerne une composition comprenant entre 5 et 100 g/L de lipopeptides ituriniques, entre 1 et 40 g/l de surfactine et entre 1 et 30 g/l de tensioactifs chimiques.

Dans une composition particulière, la quantité de lipopeptides ituriniques est de préférence comprise entre 10 et 80 g/L, voire entre 20 et 80 g/L, de manière préférée entre 30 et 80 g/L.

Dans un mode de réalisation particulier, les tensioactifs chimiques peuvent être des tensioactifs non ioniques de la famille des polyglycosides ou des tensioactifs anioniques dérivés d'acides aminés. De manière préférée, les tensioactifs chimiques consistent en un mélange de tensioactifs anioniques et de tensioactifs non ioniques.

Selon un quatrième aspect, l'invention concerne une composition comprenant entre 5 et 100 g/L de lipopeptides ituriniques, entre 1 et 40 g/l de surfactine, entre 1 et 100 g/l de de fengycine (ou plipastatine) et entre 1 et 30 g/l de tensioactifs chimiques.

Dans une composition particulière, la quantité de lipopeptides ituriniques est de préférence comprise entre 10 et 80 g/L, voire entre 20 et 80 g/L, de manière préférée entre 30 et 80 g/L.

Selon un cinquième aspect, l'invention concerne une composition comprenant entre 5 et 100 g/L de lipopeptides ituriniques micro-émulsionnée dans des composés huileux ou corps gras, comme par exemple de l'huile végétale. Dans une telle composition, la concentration en huile est comprise entre 1% et 100%, de préférence entre 50% et 100%, de manière particulièrement préférée entre 80% et 100%. Parmi les huiles végétales qui peuvent être utilisées, on peut citer l'huile de maïs.

Dans un mode de réalisation préféré, une telle composition comprend entre 10 et 80 g/L, voire entre 20 et 80 g/L de mycosubtiline, de manière préférée entre 50 et 80 g/L de mycosubtiline.

Ainsi, une composition particulière selon l'invention comprend:

- 2 à 8 % de lipopeptides ituriniques
- 3 % de tensioactifs chimiques constitués d'un mélange de tensioactifs non-ioniques et anioniques à hauteur de 1,5 % chacun
- 2 à 4 % de surfactines
- 0 à 10% de fengycines ou de plipastatines

Dans un mode de réalisation particulier, la composition comprend environ 3% de lipopeptides (1,25% de mycosubtiline et 1,85% de surfactine), 1,5% d'un tensioactif non-ionique dérivé des poly-glycosides et 1,5% d'un tensio-actif anionique dérivé d'acides aminés.

Dans un autre mode de réalisation particulier, la composition comprend environ 5% de lipopeptides (2,45% de mycosubtiline et 2,65% de surfactine) et 3 à 8% de fengycine (ou de plipastatine).

Les compositions selon l'invention peuvent être prêtes à l'emploi ou sous forme concentrée ; les solutions concentrées peuvent être diluées avant emploi.

Un deuxième objet selon l'invention concerne une composition déshydratée comprenant un mélange de lipopeptides dans laquelle la concentration en lipopeptides ituriniques est supérieure à 0,5%.

De telles compositions déshydratées se présentent sous forme de poudre ou de lyophilisat et sont « prêtes à l'emploi » ; en effet, il suffit de les réhydrater dans 100 mL de solution pour obtenir une composition dont la concentration en lipopeptides ituriniques est au minimum de 5 g/L.

Les ingrédients et leurs quantités relatives dans ces compositions solides sont les mêmes que celles décrites ci-dessus pour les compositions liquides. En effet, les concentrations en poids sec des différents composants de ces solutions déshydratées permettent d'obtenir des compositions liquides dont la concentration en lipopeptides ituriniques est supérieure à 0,5 g/L qui sont stables et homogènes conformément à l'invention.

Un troisième objet de l'invention concerne un procédé de préparation d'une composition comprenant un mélange de lipopeptides dans laquelle la concentration en lipopeptides ituriniques est supérieure à 5 g/L.

Les lipopeptides ituriniques de la composition peuvent être obtenus par fermentation d'une souche de *Bacillus sp.* et récoltés et concentrés depuis le surnageant de culture.

Les compositions selon l'invention peuvent être préparées en utilisant des préparations de lipopeptides disponibles dans le commerce sous forme de poudre. Ces poudres de départ contiennent une quantité de lipopeptides ituriniques variable pouvant aller de 10 à plus de 80%, par exemple 15% ou 75%. Ces poudres peuvent contenir un mélange de mycosubtiline et de surfactine dans un rapport de 30/70 à 70/30, voire de 95/5, par exemple de 35/65, de 40/60, de 45/55 ou de 50/50.

Pour préparer une composition selon l'invention, il faut ajouter au moins un tensioactif à une solution contenant une teneur élevée en lipopeptides ituriniques.

Le procédé de préparation de telles compositions peut comporter une étape supplémentaire de déshydratation de sorte à proposer une composition « prête à l'emploi » sous forme de poudre, dont les caractéristiques sont conformes aux compositions de la présente invention une fois réhydratée.

Ainsi le procédé permet de préparer des solutions liquides ou solides (sous forme de poudre ou de lyophilisat). De telles solutions concentrées sont particulièrement adaptées pour le stockage et la distribution. Elles sont à diluer avant utilisation.

De ce fait, une composition selon l'invention peut être obtenue par dissolution d'une poudre permettant la reconstitution d'une composition liquide telle que définie précédemment.

Les compostions selon l'invention trouvent leurs applications dans le domaine de l'agroalimentaire, des phytosanitaires et de la cosmétique ainsi que dans le domaine médical et pharmaceutique.

L'invention est illustrée à l'aide des exemples qui suivent.

EXEMPLES

Préparation de solutions contenant des lipopeptides à partir de surnageant de cultures de souches *Bacillus*

1 - Obtention des surnageants de culture

Les lipopeptides sont obtenus à partir d'un procédé de fermentation aérobie d'une souche *Bacillus* dérivée de la souche *Bacillus subtilis* ATCC 6633 pour la production de lipopeptides ituriniques et de souches dérivées de la souche de *Bacillus subtilis* 168 pour la production de surfactine et/ou de fengycine (ou de plipastatine). La culture est réalisée dans un milieu contenant une source de carbone (glucose, saccharose...), une source d'azote (sulfate d'ammonium, peptone, acides aminés libres, extrait de levures,...) et des oligoéléments et des sels sous agitation à 30°C. Le pH est maintenu à une valeur de 7. La culture est récoltée après 48 à 72h. Elle est ensuite centrifugée ou filtrée pour éliminer les cellules. Le surnageant de culture est ensuite concentré.

2 – Préparation de compositions à teneur élevée en lipopeptides ituriniques à partir de surnageants de culture

Pour obtenir des compositions à teneur élevée en lipopeptides ituriniques, les surnageants de culture peuvent être concentrés. La concentration du surnageant de culture peut être obtenue par toute méthode connue de l'homme du métier, en particulier :

- Par ultrafiltration tangentielle en utilisant une membrane dont le seuil de coupure peut être de 1KDa à 300 KDa. Pour exemple, 1000L de surnageant de culture obtenu comme décrit précédemment sont concentrés par passage sur la membrane d'ultrafiltration pour obtenir un retentât d'un volume de 10 à 100L. Les petites molécules sont ensuite éliminées par une ou des étapes de diafiltration. La solution ainsi obtenue peut être séchée par lyophilisation, atomisation ou utilisée telle quelle.
- Par précipitation à pH acide : une diminution du pH dans le but de précipiter sélectivement les lipopeptides est réalisée. Une addition d'acide sulfurique concentré est réalisée sur le surnageant obtenu. Après l'obtention d'un pH final aux alentours de 1, la solution est laissée sous agitation de 2 à 12h. Une centrifugation permet de récupérer un culot de matière contenant les lipopeptides. Ce culot est ensuite dissout par addition d'eau et de soude afin d'obtenir une valeur de pH comprise entre 7 et 8,5. La solution ainsi obtenue peut être séchée par lyophilisation, atomisation ou utilisée telle quelle.
- Par évaporation : le surnageant est concentré par évaporation sous vide. Par exemple 20L sont introduits dans un rotavapor et concentrés à 1 à 2L.

Le pourcentage de lipopeptides obtenu à l'issue de ces deux exemples de préparation est de l'ordre de 0,5 à 20% (poids/volume).

3 - Préparation de compositions à teneur élevée en lipopeptides ituriniques à partir de poudres de lipopeptides

Une composition à teneur élevée en lipopeptides ituriniques peut être préparée à partir de poudre de lipopeptides, comme illustré dans les deux exemples de compositions ci-après :

Composition 1 : Une composition comprenant environ 3,1% (m/v) de lipopeptides (soit 1,25% de mycosubtiline et 1,85% de surfactine) a été obtenue en resuspendant une poudre de lipopeptides comprenant un mélange mycosubtiline/surfactine en proportions 40/60 et d'une pureté environ égale à 15% en phase aqueuse (pH compris entre 7,5 et 8,5).

Composition 2 : Une composition comprenant environ 5,1% (m/v) de lipopeptides (soit 2,45% de mycosubtiline et 2,65% de surfactine) a été obtenue en resuspendant une poudre de lipopeptides comprenant un mélange mycosubtiline/surfactine en proportions 45/55 et d'une pureté environ égale à 75 % en phase aqueuse (pH compris entre 7,5 et 8,5).

4 – Préparation de compositions à teneur élevée en lipopeptides ituriniques comprenant des tensioactifs.

Des tensioactifs ont été ajoutés aux compositions 1 et 2 décrites précédemment de sorte à évaluer l'effet de telles molécules sur les propriétés des compositions.

Composition 1 : Deux tensioactifs ont été ajoutés à la composition 1 chacun dans une proportion de 10% (v/v), à savoir un tensioactif hydrotrope non-ionique dérivé des poly-glycosides (Nom commercial = Simulsol^{R} SL 7C commercialisé par la société Seppic) et un tensio-actif anionique dérivé d'acides aminés (Nom commercial = Proteol^{R} APL commercialisé par la société Seppic).

Composition 2 : 3 à 8% (m/v) de fengycine (ou de plipastatine) ont été ajoutés à la composition 2.

5 - Caractérisation des compositions obtenues : homogénéité et stabilité dans le temps.

a. Essai de stabilité à température ambiante

L'aspect des solutions 1 et 2 avec et sans tensioactifs a été étudié à température ambiante, ici à environ 21°C.

Composition 1 : L'ajout des deux tensioactifs a permis d'obtenir une solution homogène et d'éviter tout phénomène de précipitation ou de sédimentation. La composition 1 avec tensioactifs présente un aspect trouble mais homogène.

Composition 2 : L'ajout de fengycine (ou de plipastatine) a permis d'obtenir une solution homogène et éviter tout phénomène de prise en masse (qui a lieu en absence de fengycine ou de plipastatine). La composition 2 avec fengycine (ou de plipastatine) présente un aspect limpide et homogène.

b. Essais de stabilité à basse température

Des solutions lipopeptidiques concentrées (compositions 1 et 2) ont été placées à 4°C pour une période de 1 à 30 jours. Seules les solutions complémentées en tensioactifs ou en fengycine (ou de plipastatine) sont restées homogènes et aucun dépôt n'a été observé. Sans ces ajouts, les solutions lipopeptidiques concentrées sont susceptibles de prendre en masse ou de présenter un dépôt insoluble important.

REVENDICATIONS

1. Composition stable et homogène caractérisée en ce qu'elle comprend des lipopeptides ituriniques à une concentration supérieure à 20 g/L et des tensioactifs

2. Composition selon la revendication 1 dans laquelle la concentration en lipopeptides ituriniques est comprise entre 20 à 200 g/L,

3. Composition selon l'une des revendications 1 ou 2 dans laquelle les tensioactifs sont choisis parmi les molécules de la famille des surfactines, des fengycines de ou plipastatines et des tensioactifs chimiques ou biologiques et des huiles.

4. Composition selon la revendication 3 dans laquelle la concentration en lipopeptides ituriniques est comprise entre 20 et 50 g/l et les tensioactifs sont la surfactine, la concentration de la surfactine dans la composition étant comprise entre 1 et 40 g/L.

5. Composition selon la revendication 3 dans laquelle la concentration en lipopeptides est comprise entre 20 et 100 g/l et les tensioactifs sont la surfactine et la fengycine (ou plipastatine), la concentration de la surfactine étant comprise entre 1 et 40 g/L et la concentration de la fengycine ou de la plipastatine étant comprise entre 1 et 100 g/L.

6. Composition selon la revendication 3 dans laquelle la concentration en lipopeptides est comprise entre 20 et 100 g/l et les tensioactifs sont la surfactine et des tensioactifs chimiques, la concentration en surfactine étant comprise entre 1 et 40 g/L et la concentration en tensioactifs chimiques étant comprise entre 1 et 30 g/L.

7. Composition selon la revendication 3 dans laquelle la concentration en lipopeptides en comprise entre 20 et 100 g/l et les tensioactifs sont la surfactine, la fengycine ou la plipastatine, et des tensioactifs chimiques, la concentration de la surfactine étant comprise entre 1 et 40 g/L, la concentration de la fengycine ou de la plipastatine étant comprise entre 1 et 100 g/L et la concentration en tensioactifs chimiques étant comprise entre 1 et 30 g/L.

8. Composition selon l'une des revendications 3, 6 ou 7, dans laquelle les tensioactifs chimiques sont choisis parmi les tensioactifs non ioniques de la famille des polyglycosides et/ou les tensioactifs anioniques dérivés d'acides aminés.

9. Composition selon la revendication 3 dans laquelle la concentration en lipopeptides est comprise entre 20 et 100 g/l et les tensioactifs sont des huiles, la concentration en huile étant comprise entre 1 et 100%.

10. Composition selon l'une des revendications précédentes dans laquelle les lipopeptides ituriniques sont des mycosubtilines.

11. Procédé de préparation d'une composition telle que définie à l'une des revendications 1 à 10 comprenant les étapes de préparation d'une solution à teneur élevée en lipopeptides ituriniques et d'ajout de tensioactifs.

12. Procédé de préparation selon la revendication 11 comprenant en outre une étape de déshydratation.

13. Utilisation d'une composition selon l'une des revendications 1 à 10 dans des applications agroalimentaires, phytosanitaires ou cosmétiques.

14. Composition selon l'une des revendications 1 à 10 pour son utilisation dans le domaine médical ou pharmaceutique.

RAPPORT DE RECHERCHE

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

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveauté) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.
Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ETABLISSEMENT DU PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

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

☐ Le demandeur a maintenu les revendications.

[x] Le demandeur a modifié les revendications.

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

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

☐ Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITES DANS LE PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

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

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

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

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

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

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

JP 2003 128512 A (SHOWA DENKO KK) 8 mai 2003 (2003-05-08)

US 2016/183537 A1 (TAGHAVI SAFIYH [US] ET AL) 30 juin 2016 (2016-06-30)

CN 101 948 682 A (PETROCHINA CO LTD) 19 janvier 2011 (2011-01-19)

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

CHOUKRI HBID ET AL: "Influence of the production of two lipopeptides, Iturin a and Surfactin S1, on oxygen transfer duringfermentation", APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY ; PART A: ENZYME ENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY, HUMANA PRESS INC, NEW YORK, vol. 57 - 58, no. 1, 1 mars 1996 (1996-03-01), pages 571-579, XP035175765, ISSN: 1559-0291, DOI: 10.1007/BF02941737

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

NEANT