

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
COURBEVOIE

(11) **Nº de publication :** 3 054 141
(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)
(21) **Nº d'enregistrement national :** 16 57030
(51) Int Cl⁸ : B 01 D 61/18 (2017.01), B 01 D 61/14

(12)

BREVET D'INVENTION

B1

(54) SEPARATION DES ENZYMES ISSUES DE TRICHODERMA REESEI PAR FILTRE PRESSE ET FILTRATION TANGENTIELLE SUR MEMBRANE CERAMIQUE.

(22) **Date de dépôt :** 22.07.16.

(30) **Priorité :**

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

Demande(s) d'extension :

(71) **Demandeur(s) :** IFP ENERGIES NOUVELLES Etablissement public, AGRO INDUSTRIES RECHERCHE ET DEVELOPPEMENT Société anonyme et INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE Etablissement public — FR.

(43) **Date de mise à la disposition du public de la demande :** 26.01.18 Bulletin 18/04.

(45) **Date de la mise à disposition du public du brevet d'invention :** 13.07.18 Bulletin 18/28.

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

Se reporter à la fin du présent fascicule

(72) **Inventeur(s) :** BEN CHAABANE FADHEL et ROUSSET ROMAIN.

(73) **Titulaire(s) :** IFP ENERGIES NOUVELLES Etablissement public, AGRO INDUSTRIES RECHERCHE ET DEVELOPPEMENT Société anonyme, INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE Etablissement public.

(74) **Mandataire(s) :** IFP ENERGIES NOUVELLES.



L'invention concerne un procédé de séparation d'enzymes cellulolytiques et hémicellulolytiques contenues dans un milieu de culture comprenant un champignon filamenteux *Trichoderma reesei*.

5 L'invention s'inscrit en particulier dans les procédés de production de sucre, de biocarburants, ou molécules biochimiques à partir de biomasse lignocellulosique.

Ce type de procédé comprend une étape d'hydrolyse enzymatique d'une biomasse prétraitée avec un cocktail enzymatique produit par exemple par le champignon filamenteux *Trichoderma reesei*. La présente invention porte sur la séparation de ce cocktail enzymatique et du champignon filamenteux *Trichoderma reesei*.

10 Il existe de nombreuses technologies de séparation utilisées seules ou en enchaînements.

Art antérieur

Dans le cadre de la séparation des enzymes du champignon, la demande de brevet WO-2016/16182 de la demanderesse préconise l'enchaînement suivant :

- 15
- une première séparation par décantation. Dans certains cas, des floculants peuvent être ajoutés pour augmenter l'efficacité de la séparation,
 - une seconde séparation par centrifugation pour réduire le culot (encore appelé taux de culot),
 - une microfiltration (filtration tangentielle) pour éliminer toute trace de microorganisme,
- 20
- une dernière étape d'ultrafiltration pour concentrer les enzymes.

La décantation et la centrifugation utilisées en continu dans les procédés industriels sont des procédé de séparation solide/liquide en fonction de leur différence de densité et en soumettant le milieu à une force centrifuge.

25 Les décanteurs sont des machines centrifuges munies d'une vis dont le bol tourne sur un axe horizontal. Ils sont utilisés principalement pour clarifier (décanteur deux phases) des mélanges avec des culots importants ou à forte teneur en matière en suspension (supérieur à 15% et souvent de l'ordre de 30%, et même jusqu'à 60 %). La décantation permet de réduire cette teneur à environ 5%. Le culot est mesuré en centrifugeant un échantillon à 4000 G pendant 5 minutes. Il correspond au pourcentage du volume occupé par le solide 30 par rapport au volume total de l'échantillon.

La centrifugation est utilisée avec des solutions ayant un culot inférieur à 15% et permet de faire descendre ce culot à des valeurs inférieures à 2%, voire à 1%. La centrifugation permet de clarifier le liquide trouble issu de la décantation.

Elle est utilisée dans de nombreux domaines : traitements des eaux, agro-alimentaire, 5 biotechnologie, industrie pharmaceutiques...

Les procédés de séparation par filtration tangentielle ou ultrafiltration sont mis en œuvre en fonction de la taille des éléments à séparer. Ils utilisent des membranes.

Ainsi dans le cas de la microfiltration les particules ont une taille variant de 0,1µm à 10µm. Ce procédé est utilisé pour séparer par exemple, des microorganismes comme des 10 champignons filamenteux. Pour des raisons économiques, ce sont le plus souvent des membranes organiques qui sont utilisées.

L'ultrafiltration est utilisée pour séparer des objets ayant des diamètres compris entre 1 et 100 nm. De telles membranes laissent passer les petites molécules (eau, sels) et arrêtent 15 les molécules de masse molaire élevée (polymères, protéines...). Elles vont être utilisées pour concentrer par exemple les protéines ou les enzymes.

Les facteurs qui peuvent avoir un impact sur les performances de séparation sont essentiellement la taille des molécules, la forme des molécules, leur charge, la nature de la membrane et les conditions opératoires.

Les membranes sont caractérisées par leur nature physico-chimiques. En général, on 20 distingue trois classes principales de membranes :

- les membranes organiques (naturelles ou synthétiques),
- les membranes minérales (inorganiques ou céramiques),
- les membranes composites.

Les membranes organiques sont fabriquées à base de polymère de cellulose (par exemple 25 acétate de cellulose). Elles ont des coûts de fabrication faibles, mais ne peuvent pas être utilisées pour séparer les cellulases qui risquent de les hydrolyser

Les membranes organiques à base de polymères synthétiques tels que le nylon et le polysulfone présentent beaucoup d'avantages par rapport aux précédentes et sont les plus utilisées pour la séparation des enzymes (protéines).

Les membranes minérales ont une très bonne résistance chimique, mécanique et thermique mais coûtent plus cher que les membranes organiques (environ 10 fois plus cher). Elles sont utilisées en biotechnologies dans différents procédés comme la clarification des jus de fruits, la débactérisation du lait ou la clarification des boissons alcoolisées (vin, bière, cidre). Elles trouvent des applications également dans le traitement des eaux.

5

Enfin, les membranes composites sont composées d'une partie en polymère déposée sur une autre partie micro poreuse. Ces dernières ont été développées essentiellement pour l'osmose inverse.

L'art antérieur est très fourni dans ce domaine.

10 Le brevet US-3398055 enseigne la séparation et la purification de cellulases produites par *Trichoderma reesei*. Le champignon est séparé avec un filtre rotatif sous vide. Les enzymes sont séparées en utilisant du coton et éluées avec une solution basique.

15 La demande de brevet US-2014/0295525 propose une séparation en 2 étapes des enzymes du champignon *Trichoderma*. Le procédé décrit la concentration des enzymes en deux étapes d'ultrafiltration, les enzymes ayant subi préalablement une étape de séparation solide/liquide. Dans une première étape de séparation par ultrafiltration, la membrane présente un MWCO de 100.000 (Da) à 200.000 (Da), soit environ 0.01µm à 0.02 µm de seuil de coupure. Le rétentat passe dans une seconde étape d'ultrafiltration sur une membrane présentant un MWCO de 5.000 à 50.000, et les 2 liquides contenant les enzymes 20 sont mélangés.

20

Le brevet indique que cette méthode permet de résoudre les problèmes d'encrassement de la membrane et d'agrégation des cellulases lors d'une étape unique d'ultrafiltration, même lorsqu'elle est précédée d'une séparation de particules solides dans un filtre céramique ou un matériau non-tissé.

25 Dans le brevet, il est constaté une rétention des enzymes dans le rétentat bien que leur taille soit comprise entre 10 kDa et 100 Da. Ce brevet décrit donc essentiellement une optimisation de l'étape de la concentration des enzymes.

30

Dans le cadre de la concentration du cocktail enzymatique issu du champignon *Trichoderma reesei*, on a pu constater de façon surprenante l'existence de ce phénomène de rétention des enzymes avec des membranes organiques qui ont une taille de 0.8µm, ayant donc des

pores 40 à 80 fois plus gros que ceux décrits par la demande de brevet US-2014/0295525. Cela pénalisait fortement le rendement de séparation des enzymes.

L'invention propose un procédé de séparation comprenant

- une étape de séparation du champignon *Trichoderma reesei* sur filtre-presse qui doit 5 avantageusement être réalisée dans les 30 ou 24 heures qui suivent la production,
- puis une étape de microfiltration sur membrane minérale,
- éventuellement suivie d'une étape de concentration sur membrane minérale ou organique.

Il a été constaté que l'enchaînement d'une séparation sur filtre presse suivie d'une 10 microfiltration sur membrane minérale, et éventuellement d'une ultrafiltration sur membrane minérale, permet d'obtenir des résultats particulièrement bons en termes de rendement et d'efficacité.

Résumé de l'invention

Plus précisément, l'invention propose un procédé pour séparer d'un milieu de culture, un 15 cocktail enzymatique et le champignon *Trichoderma reesei*, le milieu de culture résultant d'une production d'enzymes par le champignon, procédé dans lequel

- ledit milieu de culture est soumis, dans un délai inférieur ou égal à 30h, de préférence inférieur ou égal à 24 h, à partir de l'arrêt de la production, à une séparation sur filtre presse garni d'une toile ayant une porosité de 3-20 μ m, de façon 20 à obtenir un filtrat ayant une densité optique DO 600nm corrigée inférieure à 2.5 et
- la phase liquide obtenue est soumise à une microfiltration tangentielle sur membrane céramique ayant un seuil de coupure compris entre 0.5 et 1.4 μ m, de façon à ce que la DO 600nm corrigée ne dépasse pas 0.1.

Avantageusement, ledit milieu de culture est soumis à la séparation sur filtre presse sans 25 refroidissement préalable. De préférence, le milieu de culture n'est pas soumis à une décantation et/ou une centrifugation avant d'être séparé sur filtre presse.

La séparation sur filtre presse et la microfiltration sont réalisées à 20-30°C, de préférence 22-27°C.

Avantageusement, le filtrat est recyclé dans le milieu de culture alimentant le filtre presse à raison d'au plus 10% pds.

A l'issue de la séparation sur filtre presse (i.e. après compactage), on obtient généralement 5-10% pds de gâteau (la teneur du gâteau en matière sèche est d'au moins 20% pds, généralement entre 20 et 65% ou 20-45%, souvent de l'ordre de 25-35%) et 90-95% pds de filtrat. Le culot (pourcentage du volume occupé par le solide par rapport au volume total de l'échantillon, mesuré en centrifugeant un échantillon à 4000 G pendant 5 minutes) du filtrat issu du filtre presse est inférieur à 1,5 %.

De façon avantageuse, la microfiltration du filtrat obtenu à l'issue du filtre presse est réalisée dans un délai de 30h maximum, et de préférence 24h maximum.

De préférence, ledit filtrat issu du filtre presse est soumis à la microfiltration sans refroidissement préalable.

De préférence, la microfiltration tangentielle est réalisée sur une membrane céramique ayant un seuil de coupure compris entre 0.8 et 1.4 μ m.

De préférence, la phase liquide obtenue après microfiltration est soumise à une ultrafiltration, de préférence sur une membrane céramique, et de façon encore plus préférée sur membrane céramique ayant un seuil de coupure compris entre 5 et 15kDa.

De préférence, phase liquide obtenue après microfiltration est soumise à une ultrafiltration dans un délai maximum de 48h, de préférence 24h maximum.

Dans un mode de réalisation préféré, le cocktail enzymatique séparé est mis en contact avec une biomasse lignocellulosique prétraitée, de préférence par explosion à la vapeur, pour réaliser une hydrolyse enzymatique et obtenir des jus sucrés, lesdits jus sucrés subissent une fermentation éthanolique, l'hydrolyse enzymatique et la fermentation étant réalisées séparément ou simultanément, et l'éthanol produit est séparé par distillation.

25 Description détaillée de l'invention

Etape de production

Le cocktail enzymatique est produit par *Trichoderma reesei* dans une chaîne de production classique par fermentation aérée.

Le procédé de production du cocktail enzymatique débute par une phase de propagation, en général mise en œuvre dans de petits réacteurs de taille croissante, dans le but est de

multiplier le champignon filamenteux et de limiter la durée de la phase de latence et les risques de contamination.

Lorsque cette production est jugée suffisante (concentration en champignon supérieure à 10 g/L, de préférence supérieure à 15 g/L), on transfert le milieu de culture dans le réacteur 5 final de grand volume.

Le procédé de production d'enzymes comporte deux phases :

- une phase a) de croissance dudit microorganisme en présence d'au moins un substrat carboné de croissance en réacteur fermé aéré, ladite phase de croissance étant réalisée avec une concentration en substrat carboné de croissance comprise 10 entre 10 et 90 g/L
- une phase b) de production du cocktail enzymatique dans laquelle au moins un substrat carboné inducteur est introduit, ledit substrat carboné inducteur étant choisi dans le groupe formé par le lactose, le cellobiose, le sophorose, les résidus obtenus après fermentation éthanolique des sucres monomères des hydrolysats enzymatiques de biomasse cellulosique, et/ou un extrait brut de pentoses hydrosolubles provenant du prétraitement d'une biomasse cellulosique, ladite phase 15 de production étant réalisée avec une concentration en substrat carboné de production comprise entre 150 et 400 g/L.

Les microorganismes mis en œuvre dans le procédé de production d'un cocktail enzymatique selon l'invention sont des souches de champignons appartenant l'espèce *Trichoderma reesei*.

Les souches industrielles les plus performantes sont les souches appartenant à l'espèce *Trichoderma reesei*, modifiées pour améliorer le cocktail enzymatique par les procédés de mutation-sélection, comme par exemple la souche IFP CL847 (brevet français 25 FR-B-2 555 803). Les souches améliorées par les techniques de recombinaison génétique peuvent être également utilisées. Ces souches sont cultivées en réacteurs agités et aérés dans des conditions compatibles avec leur croissance et la production des enzymes.

Le substrat carboné de croissance dudit microorganisme utilisé dans ladite phase a) de croissance du procédé selon l'invention est avantageusement choisi parmi les sucres solubles industriels, et de préférence parmi le glucose, le lactose, le xylose, les résidus liquides obtenus après fermentation éthanolique des sucres monomères des hydrolysats enzymatiques de matériaux lignocellulosique et les extraits de la fraction hémicellulosique 30

sous forme de monomères provenant de substrat lignocellulosique prétraité, utilisé seul ou en mélange.

Selon sa nature, ledit substrat carboné de croissance est introduit dans le réacteur fermé avant stérilisation ou est stérilisé séparément et introduit dans le réacteur fermé après 5 stérilisation de ce dernier.

Ledit substrat carboné de croissance est utilisé dans ladite phase a) de croissance à une concentration initiale comprise le plus souvent entre 20 et 90 g de substrat carboné par litre de volume réactionnel.

De préférence, ladite phase a) de croissance est réalisée sur une durée comprise entre 10 30 et 70 h, de préférence entre 30 et 40 h.

De préférence, ladite phase a) de croissance opère à un pH de 4,8 et à une température de 20-30 °C, généralement 22-27 °C, de préférence de l'ordre de 27 °C.

Ledit substrat carboné inducteur utilisé dans ladite phase b) de production est avantageusement alimenté en phase fed-batch avec un flux limitant compris entre 30 et 15 80 mg par gramme de cellules et par heure. La température est généralement la même que dans l'étape a).

A l'issue de l'étape de production d'enzymes, on obtient généralement un milieu contenant une concentration en matière sèche comprise entre 10 et 45 g/L (correspondant au champignon sec). Le culot mesuré après centrifugation (4000G, 5 minutes) est supérieur à 20 15% et souvent de l'ordre de 30%, et même jusqu'à 60 %). Il correspond au pourcentage du volume occupé par le solide par rapport au volume total de l'échantillon.

On observe que le champignon retient une partie importante de liquide.

Le but de l'invention est de séparer les enzymes du champignon puis éventuellement de les concentrer.

25 Etapes de séparation solide/liquide dans laquelle le champignon est séparé du liquide.

Le liquide contient les enzymes et les sels résiduels.

Les essais menés par la demanderesse ont montré qu'une séparation sur filtre presse suivi d'une microfiltration (MF) sur membrane céramique donne de meilleurs résultats que les solutions de l'art antérieur que ce soit en termes de rendement ou d'efficacité.

Par ailleurs, les essais ont également montré que pour concentrer les enzymes, une ultrafiltration (UF) sur membrane céramique est sensiblement plus efficace que sur membrane organique.

5 Selon l'invention, le milieu de culture est soumis à une séparation sur filtre presse qui permet de maximiser la récupération des enzymes.

Elle est très avantageusement réalisée avant que l'autolyse du champignon se développe. En effet, cette autolyse peut pénaliser fortement à l'efficacité de la séparation par filtre-presse. Dans le cas de *Trichoderma reesei* ce délai est inférieur ou égal à 30h, et de préférence à 28h, et de façon encore plus préférée à 24 h.

10 A l'issue de cette séparation sur filtre presse, il est obtenu un gâteau contenant le champignon et un liquide contenant les enzymes.

Le liquide obtenu est soumis à une microfiltration tangentielle sur membrane céramique puis éventuellement à une ultrafiltration, de préférence en filtration tangentielle.

15 En effet, on a pu constater qu'une microfiltration sur membranes organiques conduisait à une rétention importante d'enzymes, ce qui nuisait au rendement de la séparation. Ce phénomène est étonnant puisque les pores sont jusqu'à 100 fois supérieurs à la taille des plus grosses enzymes produites. Nous n'avons pas pu donner d'explication à ce phénomène.

20 Par contre, on a également constaté que ce phénomène est limité lorsqu'on utilise des membranes minérales. Ainsi le rendement de récupération des enzymes est à un niveau élevé.

On détaille ci-après la séparation par filtre-presse, la microfiltration et l'ultrafiltration.

La séparation sur filtre presse:

Dès la fin de la production, l'aération et la régulation de pH sont arrêtées. Un conservateur 25 est avantageusement ajouté, par exemple du benzoate de sodium.

La production est arrêtée lorsque la totalité du sucre de la phase fed-batch est consommée ou lorsque la vitesse de consommation de base (qui est proportionnelle à la vitesse de production de protéines) est ralentie (vitesse inférieure à 30% ou plus).

Dans le délai avant autolyse, on procède à la séparation sur filtre-presse.

On a constaté qu'il est important de maintenir la température inférieure à 40°C et de préférence à 30°C. Au-delà, la séparation est bien moins efficace.

Il n'y a pas d'étape de refroidissement avant la séparation sur filtre presse. On entend par là que le refroidissement n'est pas recherché ; il se peut qu'il y ait une légère baisse de température lors du transfert entre l'unité où a lieu l'étape de production et l'unité filtre-presse ; cette baisse peut être de 3°C ou moins. Aussi, la séparation est souvent effectuée sensiblement à la même température que celle de la phase de production de l'étape a) soit une température de 17 à 30°C ou encore 20-30°C, généralement 22-27°C, et le plus souvent de l'ordre de 25°C. C'est généralement la température ambiante.

Le filtre presse est garni de toile, et généralement sans plateau à membrane. La porosité des toiles est comprise entre 3 et 20µm, de façon préférée entre 3 et 7µm et de préférence 5µm. On obtient généralement de 5 à 10 % pds de gâteau et 90 à 95 % pds de filtrat.

La séparation sur filtre presse peut être conduite en une ou 2 étapes.

La séparation sur filtre presse est généralement conduite en 2 étapes : une première étape de filtration à une pression P1 et une seconde étape de compactage à une pression P2 supérieure à P1. Généralement la pression P1 est comprise entre 1.2 et 6 bars et P2 entre 5 et 10bars.

Lorsque la séparation est conduite en une seule étape, il n'y a pas de compactage mais seulement une étape conduite à P1.

La siccité des gâteaux dépend des pressions appliquées.

L'objectif est de récupérer un maximum de filtrat le plus limpide possible.

Pour se faire, il est conseillé de recycler les premières fractions de filtrat (généralement plus troubles) dans le bac d'alimentation. Ce recyclage ne doit pas excéder 10 % du volume de filtrat. Dans le cas d'une bonne séparation et d'un gâteau perméable, il est recommandé de rajouter de l'eau au gâteau pour le laver et récupérer un maximum de protéines.

Une autre façon, qui peut être utilisée seule ou consécutivement à l'emploi du recyclage ci-dessus décrit, est de laisser se lyser le champignon qui est dans le gâteau, ce après une étape de refroidissement. Le champignon relargue alors des enzymes qui sont alors récupérées. Ce procédé est décrit dans la demande WO-2016/016182.

La séparation est réalisée de façon à obtenir un liquide (ou suspension) ayant une DO (densité optique) 600nm corrigée inférieure à 2,5 (corrigée signifie déduction faite de l'absorbance d'un filtrat 0,22µm équivalent). La mesure est réalisée sur un échantillon avec spectromètre classique de laboratoire.

5 Le culot (4000 g / 5min) est généralement inférieur à 1,5 %.

Microfiltration avec membranes minérales

Cette étape doit permettre d'éliminer la totalité des champignons du filtrat. Elle est réalisée de façon à ce que la DO 600nm corrigée ne dépasse pas 0,1 (déduction faite de l'absorbance d'un filtrat 0,22µm équivalent).

10 De préférence, et de la même façon que pour la séparation par filtre-presse, le filtrat est soumis à la microfiltration dans un délai d'au plus 30h, ou d'au plus 28h ou de préférence d'au plus 24h. Le plus souvent, la microfiltration peut être réalisée en ligne avec le filtre presse.

15 En ce qui concerne la température, de préférence la température n'est pas abaissée (pas de refroidissement recherché). Ceci permet de conserver un débit de produit satisfaisant. La température est donc généralement comprise entre 17 et 30°C ou encore 20 et 30°C, et généralement 22-27°C, et le plus souvent de l'ordre de 25°C. C'est généralement la température ambiante.

20 Les membranes à utiliser ont un seuil de coupure compris entre 0.5 et 1.4 µm, de préférence compris entre 0.6 et 1.4µm et de préférence entre 0.8 et 1.4µm.

On peut maximiser le rendement en enzymes par diafiltration (ajout d'eau au rétentat puis passage en microfiltration).

Ultrafiltration avec membranes minérales ou organiques

25 Cette étape permet de concentrer les enzymes produites par le champignon, notamment par *Trichoderma reesei*. Le cocktail enzymatique est un mélange complexe de plusieurs enzymes dont la taille varie entre 1×10^4 g/mol (10 kDa) et 10×10^4 g/mol (100 kDa).

Cette étape d'ultrafiltration est réalisée à une température généralement comprise entre 20-30°C, et généralement de 22-27°C, et le plus souvent de l'ordre de 25°C. Il est toujours avantageux de la mettre en œuvre le plus près possible (dans le temps) de la microfiltration.

Un délai de 48h maximum est préconisé, et ce délai est de préférence inférieur ou égal à 24h.

Cette étape permet de concentrer les protéines d'intérêt jusqu'à 150 g/l +/- 10g/l. La valeur du facteur de concentration volumique VCF (ou FCV) à atteindre est fonction de la 5 concentration protéique initiale.

Une dose supplémentaire de conservateur peut être ajoutée au rétentat à la fin de cette étape. On préconisera par exemple, l'ajout de benzoate de sodium entre 0.1 et 0.35%.

Il est préférable d'utiliser des membranes minérales pour l'ultrafiltration. On utilisera par exemple des membranes céramiques tubulaires de seuils de coupure compris entre 5 et 10 15KDa et de préférence 8-12, le plus souvent de l'ordre de 10 kDa.

Dans certains cas, des membranes organiques peuvent être utilisées mais avec précaution et uniquement dans les conditions préconisées par les fournisseurs.

De façon particulièrement avantageuse, le procédé selon l'invention est utilisé pour séparer les enzymes dans un procédé de production, à partir de biomasse lignocellulosique, de jus 15 sucrés, de biocarburants (tels que l'éthanol) ou molécules biochimiques.

Ces procédés comprennent les étapes de prétraitement de la biomasse lignocellulosique (par ex par explosion à la vapeur), la biomasse prétraitée est soumise à une hydrolyse enzymatique en présence d'enzymes (sécrétées par *Trichoderma reesei*), l'hydrolysat chargé en jus sucrés est soumis à une fermentation (par exemple alcoolique) et les produits 20 recherchés (par ex l'alcool) sont séparés (par ex par distillation).

Un procédé dans lequel l'invention s'applique particulièrement bien comprend un prétraitement de la biomasse lignocellulosique par explosion à la vapeur, la biomasse prétraitée est soumise à une hydrolyse enzymatique en présence d'enzymes sécrétées par exemple par *Trichoderma reesei* duquel elles ont été séparées selon le procédé de l'invention, l'hydrolysat chargé en jus sucrés est soumis à une fermentation alcoolique et l'éthanol est séparé par distillation.

L'hydrolyse enzymatique et la fermentation peuvent avoir lieu séparément ou simultanément.

Il est à noter que l'étape d'ultrafiltration s'est avérée être inutile la plupart du temps dans le cas d'une usine qui produit de l'éthanol avec une production in-situ d'enzymes.

Exemples

5 L'exemple 1 démontre la mauvaise perméabilité des enzymes obtenue avec une microfiltration avec membranes organiques. Ce problème est résolu à l'exemple 2 avec l'utilisation de membranes minérales. L'exemple 3 compare deux enchaînements réalisés soit avec un procédé conventionnel de séparation soit avec le procédé décrit dans le brevet. L'exemple 4 présente le bilan complet d'une séparation sur un volume important.

Exemple n°1 : essais de microfiltration sur membrane organique (comparatif)

10 Le milieu de culture à traiter issu de la phase de production possède la composition suivante :

- 40 g/L de protéines
- 20 g/L de biomasse (champignon *T. reesei*)

15 Après avoir subi une séparation via filtre-presse, le filtrat est testé sur différentes membranes de microfiltration.

Les figures 1 et 2 présentent les résultats des essais laboratoires réalisés avec des membranes organiques ayant des porosités allant de 0,1 à 0,8 µm : membranes MFG1: seuil de coupure de 0,1 µm (polysulphone), MFG2: 0,2µm (polysulphone), MFG8: 0,8µm (polysulphone), MFP5: 0,5µm (fluoro).

20 VCF représente le facteur de concentration volumique.

On remarque la faible perméabilité de ces membranes aux enzymes.

La perméabilité est définie comme étant le rapport entre la concentration des enzymes dans le perméat (ce qui passe à travers la membrane) et celle dans le rétentat (ce qui reste).

Exemple 2 : essais de microfiltration sur membrane céramique

25 Le même filtrat est utilisé avec 4 membranes avec les seuils de coupure de 0,14, 0,45, 0,8 et 1,4 µm.

La méthode utilisée a été de tester 4 seuils de coupure en parallèle pour chaque filtration. L'outil utilisé est un pilote de filtration permettant d'accueillir 4 membranes différentes dans un même carter. Il possède une sortie perméat par membrane et une seule boucle de rétentat. Il permet ainsi d'étudier en parallèle les variations de débits de perméat pour 5 4 membranes et de produire des échantillons.

Les mesures des concentrations en enzymes font apparaître des disparités.

Le filtrat issu du filtre-presse, a une concentration de 38.2 g/L en enzymes. Le rétentat final a été dosé à 44,3 g/L.

Il y a donc eu une légère concentration du rétentat ce qui suggère une rétention par une ou 10 plusieurs membranes. Les concentrations d'enzymes des 4 perméats sont les suivantes :

Seuil de coupure (μm)	0.14	0.45	0.8	1.4
Concentration enzymes dans le perméat (g/L)	17.1	17.0	33.9	38.1

Par rapport au rétentat initial, on voit que les concentrations obtenues par filtration à 0.8 et 1.4 μm sont proches des concentrations de la solution initiale. En revanche, il y a clairement rétention d'enzyme pour les cartouches à 0.14 et 0.45 μm . La concentration en protéines obtenue avec la membrane minérales ayant un seuil de coupure de 0.8 μm est environ 15 4.3 fois supérieure à la concentration en protéines obtenues avec la membrane organique ayant le même seuil de coupure (exemple 2)

Exemple 3 :

L'exemple 3 permet de comparer deux enchaînements réalisés soit avec un procédé conventionnel soit avec le procédé du brevet.

20 Le milieu de culture à traiter issu de la phase de production possède la composition suivante :

- 39 g/L de protéines
- 16,5 g/L de biomasse (champignon *T. reesei*)

25 Exemple 3 a : enchaînement conventionnel d'un décanteur, d'une centrifugeuse et de filtrations MF(microfiltration) sur membrane organique et UF(ultrafiltration) sur membrane organique.

On obtient les performances suivantes :

- Décantation : réduction du culot de 30% à 5% mais perte importante de protéines
Rendement 70%
- Centrifugation : réduction du culot de 5% à 1.5% sans perte importante. Rendement
5 95%
- MF organique à 0.8 μ m: réduction du culot de 1.5% à ~0%. Perméabilité faible de 0.3.
Rendement 50%.
- UF organique 10kDa: concentration en enzymes à 200 g/L. Rendement 80%.

Le rendement global de cet enchaînement est de 27%. Il est possible de s'approcher d'un
10 rendement de 50% en recyclant les culots des étapes de décantation, de centrifugation et le
rétentat de l'étape de MF et en leur faisant subir un nouveau cycle de séparation
(centrifugation, MF,UF)

Exemple 3b selon l'invention

Enchaînement d'une séparation sur filtre presse puis sur MF sur membrane céramique et
15 UF sur membrane céramique.

On obtient les performances suivantes :

- Séparation sur filtre presse : réduction du culot de 30% à 1.5% sans perte importante
Rendement 95%
- MF céramique (1,4 μ m): réduction du culot de 1.5% à ~0%. Perméabilité importante
20 de 0.9. Rendement 90%.
- UF céramique 10kDa: concentration en enzymes à 200 g/L. Rendement 90%.

Le rendement global sans faire de recyclage de cet enchaînement est de 77%.

Au vu de ces résultats, on note que l'étape UF est inutile dans le cas d'une usine qui produit
de l'éthanol avec une production in-situ d'enzymes. Dès lors le rendement est de 86%.

25 Par ailleurs, la filtration MF est bien plus efficace sur membrane céramique que sur
membrane organique. De plus, le rendement sur membrane céramique que ce soit en MF
ou UF est nettement supérieur à celui avec des membranes organiques.

Exemple n°4 : Test pilote avec l'enchaînement selon l'invention.

Ce test utilise un milieu de culture produit dans un réacteur de 6 m3. Ses caractéristiques sont les suivantes :

- Masse du milieu de culture: 4260 kg
- Concentration en protéines : 38 g/L
- Concentration en biomasse : 15 g/L

Séparation sur filtre-presse :

La séparation a été réalisée immédiatement après l'étape de production, et sans refroidir le produit. La température est de 27 °C.

Dans cette étape on cherche à éliminer la majorité du champignon par séparation sur filtre presse.

L'outil utilisé comporte 10 plateaux avec une surface de filtration globale de 3 m². Celui-ci permet de former par batch, 10 gâteaux de champignon de 30 mm d'épaisseur et ayant un volume total avant compactage de 30 litres. La toile utilisée est une toile multi filament ayant une porosité de 5 µm.

La séparation se fait en trois étapes :

- La première étape consiste en une filtration avec une pression en amont de 5 bars avec suivi du débit de filtration au cours du temps.
- Au cours de la deuxième étape, on arrête d'alimenter le filtre-presse, on compacte les gâteaux de champignon en appliquant une pression supérieure (9 bars). Cette deuxième étape presse le champignon et maximise la récupération d'enzymes.
- La troisième étape consiste en un débâtissage (récupération) des gâteaux qui sont pesés.

A noter qu'il aurait été possible de faire un lavage du gâteau pour minimiser les pertes ou laisser le champignon se lyser mais que cela n'a pas été fait dans le cas de cet exemple.

Il a fallu au total 14 filtrations/compactages pour traiter la totalité du milieu de culture (4260 kg).

Le tableau suivant présente le bilan masse de la séparation.

Variable	Valeur	Unité
Quantité totale alimentation	4260	kg
Quantité de filtrat récupérée sans compactage	3681,5	kg
Quantité filtrat récupérée par compactage	210	kg
Quantité totale de gâteaux	211,76	kg
Pertes quantifiées	30	kg
Bilan masse	97	%

La figure 3 présente l'évolution de la quantité filtrée en fonction du temps et la figure 4 l'évolution de la quantité filtrée en fonction de la pression en alimentation.

En première étape (filtration sous 5 bars), la durée du batch est de 25 minutes.

- 5 Au cours des premières minutes, le débit de filtration est élevé (entre 500 et 700 L/m²/h). Le champignon se « colle » contre la toile et va servir de média filtrant. La pression augmente et le débit de filtration diminue. On décide en général d'arrêter la filtration lorsque le débit semble trop faible par rapport au débit initial (par exemple moins de 10 ou 20%) et en fonction de l'objectif initial du temps de filtration.
- 10 On remarque qu'il n'y a pas de différence importante entre les différents batch réalisés. Cela montre que l'aptitude du produit à être filtré n'a pas évolué durant l'opération (qui a duré moins de 12 heures au total).

La masse moyenne par batch avant compactage est de 263± 30 kg. Le débit moyen de filtration est de 210 kg/m²/h.

- 15 Il est alors procédé au compactage (9 bars) qui a duré 10 minutes en moyenne a permis de récupérer en moyenne 15 kg de liquide par batch avec un débit moyen de 30 kg/m²/h. La masse moyenne de gâteau obtenu par batch est de 15± 1,5 kg.
- Le pourcentage poids de gâteau par rapport au filtrat est en moyenne de 5,4% et sa MS (matière sèche) moyenne de 25% pds, soit une perte de protéines à cette étape de 4,05% pds si on ne procède pas au lavage du gâteau.

Le rendement de récupération des protéines après l'étape de filtre-presse est de 95,4%.

Séparation par microfiltration sur céramique minérale :

Le filtrat issu du filtre-presse a ensuite été divisé en plusieurs échantillons qui sont traités par microfiltration sur des membranes minérales ayant des porosités de 0,8 et 1,4 μm . L'objectif de l'essai est de comparer leurs performances sur le filtrat de filtre-presse 5 renfermant des enzymes et des champignons avec un facteur de concentration volumique visé de 10. La microfiltration est suivie d'une diafiltration permettant de minimiser les pertes en protéines (ajout d'eau correspondant à 5 volumes de rétentat).

L'outil de microfiltration comporte 3 membranes de 0.33m^2 de surface de filtration sur chaque carter.

10 Le premier essai a permis de sélectionner la membrane 1.4 μm qui présente une performance de filtration meilleure que la membrane 0.8 μm à même pression transmembranaire En effet, le flux de perméat se stabilise à $100\text{ L/m}^2/\text{h}$ pour la première et à $60\text{ L/m}^2/\text{h}$ pour la deuxième jusqu'à un facteur de concentration volumique (FCV) de 7.5. Les deux membranes ont permis de clarifier le produit (pas de croissance de champignon sur le 15 perméat étalé sur milieu PDA).

La figure 5 représente l'évolution des concentrations en protéines dans le rétentat et les perméats. Elle montre que la perméabilité des deux membranes vis-à-vis des protéines est très bonne. La perméabilité des membranes à 1,4 μm est meilleure et est supérieure à 0,9. On rappelle qu'elle était de 0,2-0,4 avec les membranes organiques même avec des 20 porosités de 0,8 μm .

Le rendement de récupération des protéines après MF sur membrane minérale est de 93.3% par rapport à l'étape initiale.

Les enzymes ont ensuite été concentrées par UF sur membrane minérale avec un rendement de récupération de 92% soit un rendement global de 86%.

REVENDICATIONS

- 1- Procédé pour séparer d'un milieu de culture, un cocktail enzymatique et le champignon *Trichoderma Reesei*, le milieu de culture résultant d'une production d'enzymes par le 5 champignon, procédé dans lequel
- ledit milieu de culture est soumis, dans un délai inférieur ou égal à 30h à partir de l'arrêt de la production, à une séparation sur filtre presse garni d'une toile ayant une porosité de 3-20µm , de façon à obtenir un filtrat ayant une densité optique DO 600nm corrigée inférieure à 2.5 et
- 10 -la phase liquide obtenue est soumise à une microfiltration tangentielle sur membrane céramique ayant un seuil de coupure compris entre 0.5 et 1.4µm, de façon à ce que la DO 600nm corrigée ne dépasse pas 0.1 .
- 2- Procédé selon la revendication 1 dans lequel ledit délai est inférieur ou égal à 24 h.
- 3-Procédé selon l'une des revendications précédentes dans lequel ledit milieu de culture est 15 soumis à la séparation sur filtre presse sans refroidissement préalable.
- 4-Procédé selon l'une des revendications précédentes dans lequel à l'issue de la séparation sur filtre presse, on obtient 5-10% pds de gâteau et 90-95% pds de filtrat.
- 5-Procédé selon l'une des revendications précédentes dans lequel le culot (pourcentage du volume occupé par le solide par rapport au volume total de l'échantillon, mesuré en 20 centrifugeant un échantillon à 4000 G pendant 5 minutes) du filtrat issu du filtre presse est inférieur à 1,5 %.
- 6-Procédé selon l'une des revendications précédentes dans lequel le filtrat est recyclé dans le milieu de culture alimentant le filtre presse à raison d'au plus 10% pds.
- 7-Procédé selon l'une des revendications précédentes dans lequel la microfiltration du filtrat 25 obtenu à l'issue du filtre presse est réalisée dans un délai de 30h maximum , et de préférence 24h maximum.
- 8-Procédé selon l'une des revendications précédentes dans lequel ledit filtrat issu du filtre presse est soumis à la microfiltration sans refroidissement préalable.

9-Procédé selon l'une des revendications précédentes dans lequel la séparation sur filtre presse et la microfiltration sont réalisées à 20-30°C, de préférence 22-27°C.

10-Procédé selon l'une des revendications précédentes dans lequel la microfiltration tangentielle est réalisée sur une membrane céramique ayant un seuil de coupure compris 5 entre 0.8 et 1.4µm.

11-Procédé selon l'une des revendications précédentes dans lequel le milieu de culture n'est pas soumis à une décantation et/ou une centrifugation avant d'être séparé sur filtre presse.

12-Procédé selon l'une des revendications précédentes dans lequel la microfiltration est réalisée sur membrane céramique.

10 13-Procédé selon l'une des revendications précédentes dans lequel la phase liquide obtenue après microfiltration est soumise à une ultrafiltration sur une membrane céramique ayant un seuil de coupure compris entre 5 et 15kDa.

14-Procédé selon l'une des revendications précédentes dans lequel la phase liquide obtenue après microfiltration est soumise à une ultrafiltration dans un délai maximum de 48h, de 15 préférence 24h maximum.

15-Procédé selon l'une des revendications précédentes dans lequel le cocktail enzymatique séparé est mis en contact avec une biomasse lignocellulosique prétraitée , de préférence par explosion à la vapeur, pour réaliser une hydrolyse enzymatique et obtenir des jus sucrés, lesdits jus sucrés subissent une fermentation éthanolique, l'hydrolyse enzymatique et la 20 fermentation étant réalisées séparément ou simultanément, et l'éthanol produit est séparé par distillation.

Figure 1

PERMEABILITY VS VCF

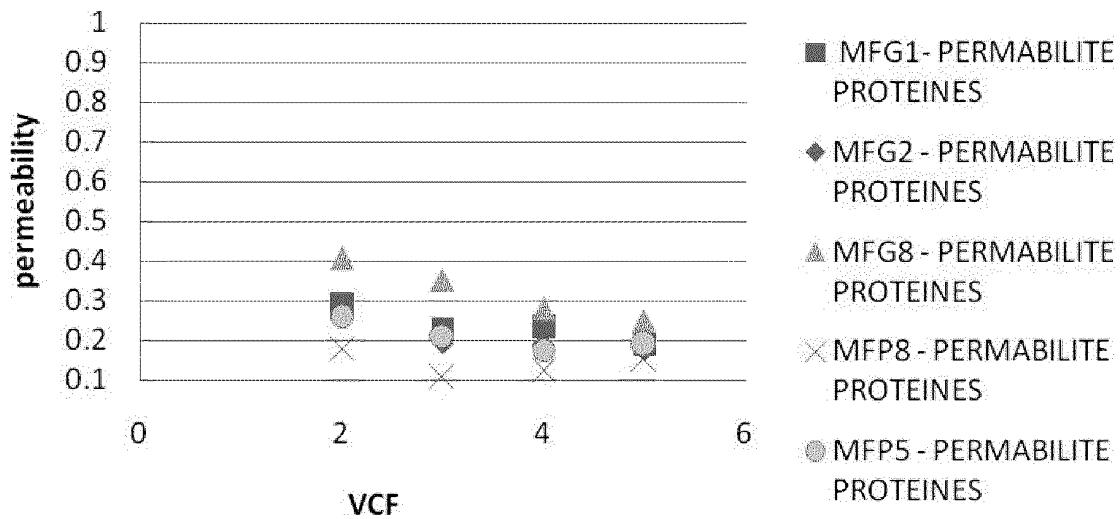


Figure 2

PERMEABILITY VS ELAPSED FILTRATION TIME

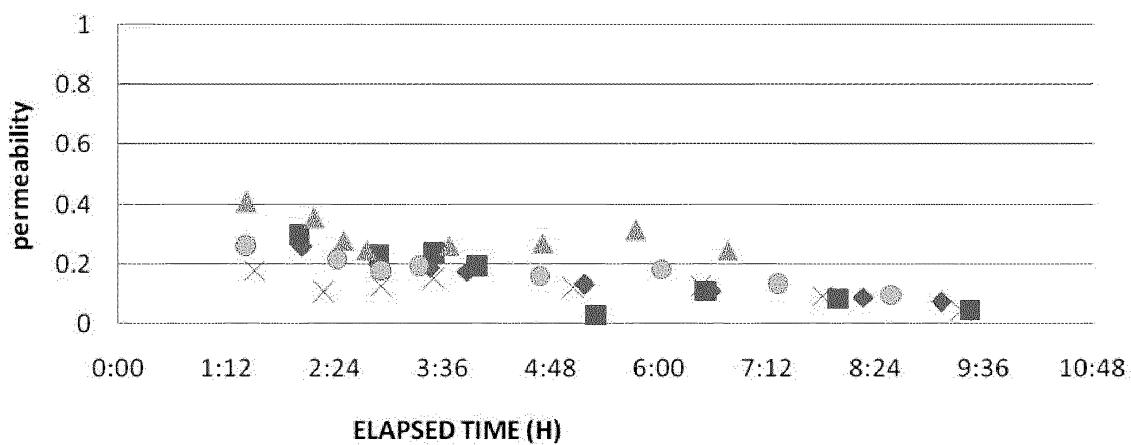


Figure 3

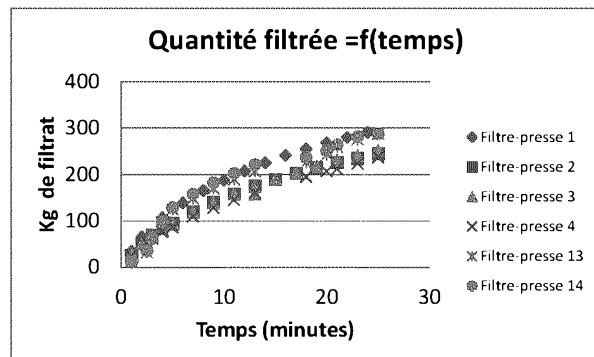
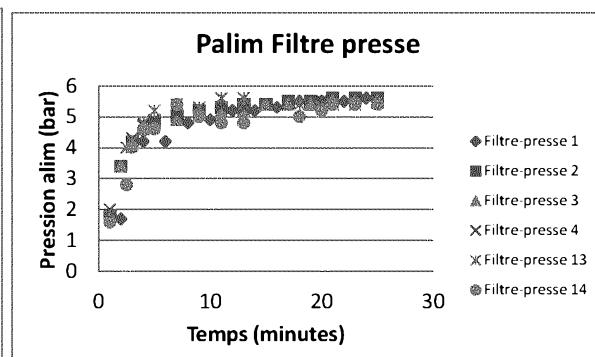
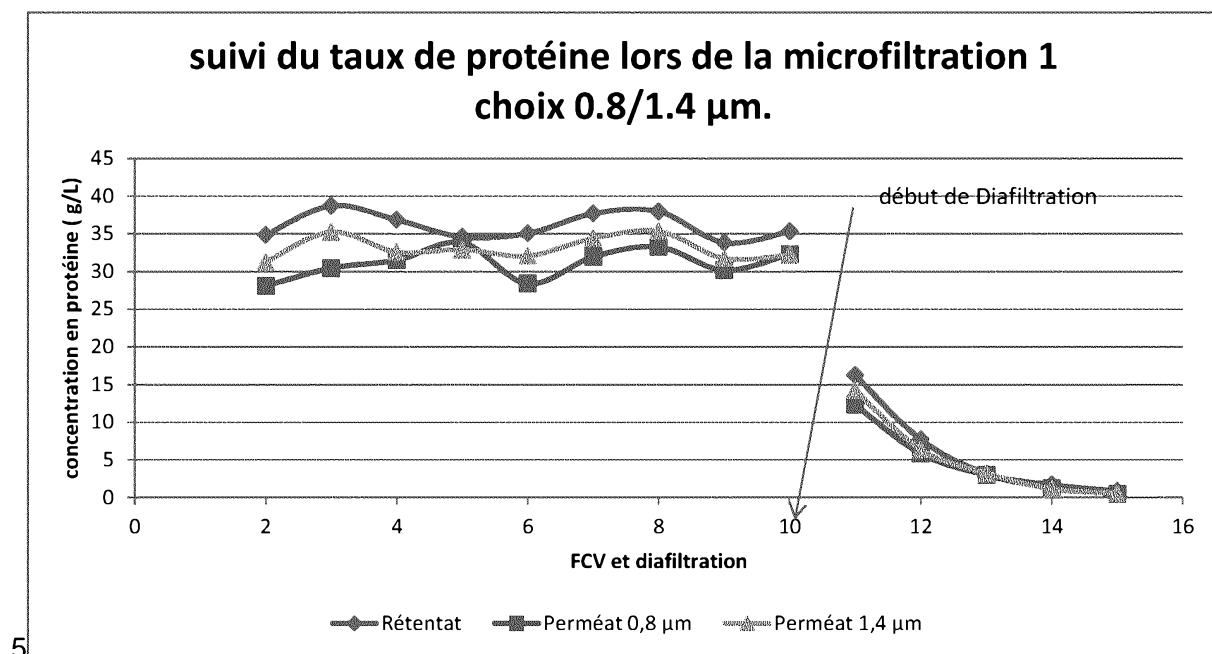


Figure 4



Figure



RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-17 et R.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (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'ÉTABLISSEMENT DU PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

- Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.
- Le demandeur a maintenu les revendications.
- Le demandeur a modifié les revendications.
- Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.
- Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.
- Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITÉS DANS LE PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

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

- Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.
- Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.
- Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.
- Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

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

WO 2016/016182 A1 (IFP ENERGIES NOUVELLES [FR])
4 février 2016 (2016-02-04)

S S RASHID ET AL: "Separation of Cellulase Enzyme from Fermentation Broth of Palm Oil Mill Effluent by Ultrafiltration Process", INTERNATIONAL JOURNAL OF CHEMICAL, ENVIRONMENTAL & BIOLOGICAL SCIENCES, vol. 1, no. 3, 1 janvier 2013 (2013-01-01) , pages 501-506, XP055372385, ISSN: 2320-4079

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

NEANT

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

NEANT