

(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION BELGE

(41) Date de publication : 15/10/2024

(21) Numéro de demande : BE2023/5207

(22) Date de dépôt : 20/03/2023

(62) Divisée de la demande de base :

(62) Date de dépôt demande de base :

(51) Classification internationale : C12N 1/14, C12N 1/22, C12P 7/10

(30) Données de priorité :

(71) Demandeur(s) :

NOVOBIOM
SRL
4000, LIEGE
Belgique

(72) Inventeur(s) :

DESSILY Maxime
4000 LIEGE
Belgique

ZAQUI Caroline
4000 LIEGE
Belgique

SCHEUREN Jean-Michel
4000 LIEGE
Belgique

(54) PROCÉDÉ DE FERMENTATION SOLIDE À PARTIR D'UN SUBSTRAT FIBREUX POUR LA PRODUCTION DE BIOMOLÉCULES ENZYMATIQUES

(57) Procédé de fermentation solide pour la production de biomolécule enzymatiques à partir d'un substrat fibreux comprenant un conditionnement dudit substrat fibreux, une inoculation du substrat fibreux à l'aide d'une souche fongique choisie parmi des souches appartenant au genre des Ganoderma, Trametes, Pycnoporus, Pleurotus, Fusarium, une extraction de ladite biomolécule et une collecte de ladite biomolécule.

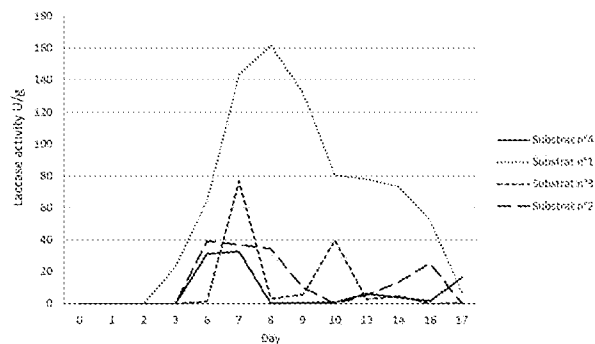


Fig.1

Procédé de fermentation solide à partir d'un substrat fibreux pour la production de biomolécules enzymatiques

La présente invention se rapporte à un procédé de fermentation solide à partir d'un substrat fibreux, comme par exemple, un substrat issu du recyclage des textiles ou un substrat formé de déchets textiles en fin de vie ou non encore valorisé ou encore de matériaux à base de fibres ligno-cellulosiques pour la production de biomolécules.

Dans le cadre de la production de biomolécules, il existe plusieurs procédés qui aujourd'hui permettent de produire des biomolécules. Toutefois, les biomolécules produites sont actuellement assez coûteuse de par les conditions extrêmement contrôlées qui doivent être mises en œuvre pour produire ces biomolécules.

Dans le cadre de la présente invention, les biomolécules envisagées sont des biomolécules produites de manière naturelle par la souche choisie et non pas des biomolécules qui sont produites, suite à une modification microbologique de la souche.

En effet, la présente invention vise simultanément à produire des biomolécules à bas coûts permettant une utilisation de celle-ci plus massivement, c'est-à-dire dans des secteurs où les biomolécules sont actuellement inutilisées ou peu utilisées à cause de leur coût de production qui en limite les usages dans des industries à faible marge ou dans des industries dans lesquelles les substances utilisées ne peuvent pas être extrêmement chères. On citera par exemple la détergence où les produits doivent être de plus en plus respectueux de l'environnement et où des biomolécules comme les enzymes à plus faible coût pourraient permettre un usage plus massif et donc à impact environnemental positif, certains procédés de transformation alimentaire ou encore la

bioremédiation de sols pollués où ces enzymes à bien moindre coût permettraient leur utilisation ou encore des usages où les soins de santé sont non accessibles à cause des faibles moyens financiers de la population voire pour les usages vétérinaires où des antibiotiques naturels et peu coûteux pourraient trouver une utilité.

De plus, la présente invention vise aussi l'usage de matière comme substrat qui sont recyclées ou pour lesquelles il n'y a actuellement pas encore de voie de valorisation, en fin de vie, ... afin d'améliorer l'impact environnemental.

10 En 2021, plus de 149 millions de tonnes de textiles ont été produites dans le monde. En Europe, la consommation de textile a augmenté de plus 40% sur les deux dernières décennies, et il est estimé que chaque habitant jette en moyenne 11 kg de textile par an. Seulement 38% des déchets textiles feraient l'objet d'une collecte et d'un tri en vue d'une
15 potentielle réutilisation et il est estimé, que seulement 1% sont recyclés et 87% sont incinérés ou enfouis des décharges.

Une des problématiques majeures des déchets textiles réside dans la diversité. En effet, il existe d'une part différents types de déchets, mais également de nombreux types de textiles et au sein de ceux-ci, de
20 nombreux types de fibres qui sont mélangées pour former les textiles.

S'il existe actuellement certaines solutions pour les déchets textiles de production (déchets de coupe, matériaux présentant des défauts, reliquat de production, ...), dont la nature est bien connue et contrôlée, certains types de déchets textiles sont extrêmement
25 problématiques pour le recyclage.

Pour l'instant, pour les textiles issus de l'habillement, les solutions existantes consistent en un tri mécanique permettant de récupérer les habits pouvant être vendus en seconde main, et pour la fraction restante,

un tri plus poussé de séparation des tissus en fonction de leur composition est réalisé manuellement ou par fibre optique. Les déchets textiles issus de l'ameublement ne sont pour l'instant pas valorisés et sont utilisés pour leur potentiel calorifique.

5 D'autre part, les mélanges de fibres synthétiques et naturelles retrouvées dans les coutils et autres voilages constituent un gisement de fibres plastiques non exploitables par les techniques existantes, malgré l'existence de traitement physico-chimiques permettant de fragiliser les fibres naturelles afin de rendre possible leur filage.

10 De plus, si dans certains cas, les coutils de matelas sont isolés du reste du matelas, ce n'est pas systématiquement le cas et ceci dépend de la technologie à disposition des centres de valorisation des déchets qui sont chargés du recyclage, aussi, certains centres s'appliquent à broyer les matelas avec leurs coutils, en retirent les parties
15 métalliques et génèrent ainsi un broyat comprenant un mélange de coutils et de mousse synthétiques ou naturelles déchetés.

Il existe également des techniques de fermentation liquide de fibres textiles préalablement prétraitées à la soude et aux enzymes cellulases afin de générer des sucres valorisables ensuite dans des
20 procédés de chimie verte.

Cependant, les approches existantes de traitement chimique et biologique des déchets de fibres textiles sont réalisées en milieu liquide, impliquent un usage conséquent en eau et produits chimiques, et constituent des procédés difficilement implémentables à une échelle
25 industrielle permettant de traiter les volumes de déchets générés.

L'invention a pour but de pallier les inconvénients de l'état de la technique en procurant une invention permettant d'utiliser des ressources peu coûteuses tout produisant des biomolécules actives afin

de faire baisser leurs coût de production et les mettre à disposition de manière plus large, offrant de cette manière une valorisation intéressante constituant une vraie motivation à opter pour des solutions plus vertes.

Pour résoudre ce problème, il est prévu suivant l'invention, un
5 procédé de fermentation solide pour la production de biomolécules à partir d'un substrat fibreux comprenant :

- une fourniture d'un substrat fibreux déchiqueté, tissé, non-tissé ou aggloméré
 - un conditionnement dudit substrat fibreux pour obtenir un
10 substrat fibreux conditionné contenant de 60 à 80% en poids d'eau par rapport au poids de substrat fibreux conditionné,
 - une inoculation du substrat fibreux à l'aide d'une à l'aide d'une souche fongique filamenteuse, plus
15 particulièrement une souche fongique filamenteuse saprophyte, encore plus particulièrement choisie parmi les divisions des Basidiomycètes et des Ascomycètes et préférentiellement choisie parmi des souches appartenant au genre des Agrocybe, Ganoderma,
20 Trametes, Pycnoporus, Pleurotus, Fomes, Fomitopsis, Irpex, Laetiporus, Inonotus, Lentinula, Fusarium, Aspergillus, Trichoderma, Penicillium, Cladosporium, Chaetomium, Acremonium, pour permettre une colonisation par ladite souche fongique du substrat fibreux,
 - une croissance de ladite souche fongique
 - une production de biomolécule choisies parmi le groupes formés des protéases, amylases, cellulases, chitinases, xylanases, les oxydoréductases (dont entre autres les laccases, manganèse peroxydases, lignine peroxydases),
25 les lipases.
- 30

- une extraction de biomolécule, et
- une collecte de ladite biomolécule.

Comme on peut le constater le procédé selon la présente invention présente l'avantage de partir d'un substrat fibreux déchiqueté
5 tissé, non tissé, ou aggloméré, récupéré de matière recyclée, ou de déchets textiles en fin de vie ou encore de déchets textiles pour lesquels il n'existe pas de voie de valorisation pour la production de molécules, les biomolécules à haute valeur ajoutée.

Avantageusement, dans le procédé selon la présente
10 invention, ladite collecte est suivie d'une étape de purification agencée pour obtenir un lot purifié de biomolécules.

Dans un mode de réalisation préférentiel du procédé selon l'invention, ladite extraction est choisie parmi une extraction à partir de la biomasse fongique obtenue ou une série de rinçage du milieu de
15 culture par une phase aqueuse, permettant de récolter une phase aqueuse enrichie en biomolécule.

Plus particulièrement, selon la présente invention, la série de rinçage comprend 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou plus rinçage, chaque rinçage étant effectué à intervalle de 5, 6, 7, 8, 9, 10 jours. Cette série de rinçage
20 permet avantageusement la récupération des biomolécules produites, lesquelles sont sécrétées par la souche fongique.

Dans un autre mode de réalisation préférentiel du procédé selon la présente invention, ladite croissance de ladite souche fongique est simultanée à la production de biomolécule.

25 Dans une variante du procédé selon la présente invention, ladite croissance de ladite souche fongique a lieu avant la production de biomolécule.

Selon la présente invention, la production de biomolécules peut se produire pendant la colonisation (croissance de la souche fongique), après la colonisation du substrat fibreux ou encore pendant la colonisation et se poursuivre après la colonisation du substrat fibreux.

5 Plus particulièrement, dans le procédé selon la présente invention, le substrat fibreux décheté aggloméré, tissé ou non tissé comprend des fibres choisies parmi des fibres textiles naturelles végétales ou animales, des fibres textiles semi-synthétiques ou des fibres textiles polymère, des fibres lignocellulosiques.

10 Par les termes fibres textiles naturelles végétales, on entend au sens de la présente invention, des fibres textiles naturelles d'abaca, de bagasse, de bambou, de coco, de coton, de lin, de chanvre, de jute, de raphia, de Ramie, de Rotin, de bois, de Furcraea andina, de Ceiba pentandra, d'Agave sisalana, de Kénaf, de Pina, et analogues.

15 Par les termes fibres textiles naturelles animales, on entend des fibres textiles naturelles d'alpaga, d'angora, de Byssus, de poil de chameau, de cachemire, de catgut, de guanaco, de poil ou de cheveux, de lama, de mohair, de pashmina, de qiviuk, de soie, éventuellement de soie d'araignée, de tendon, de laine, de vigogne de
20 yack et analogues.

Par les termes fibres semi-synthétiques, on entend au sens de la présente invention, des fibres d'acétate de cellulose, de diacétate de cellulose, de triacétate de cellulose, de lyocell, de Modal et analogue.

25 Par les termes fibres textiles polymère, on entend les fibres acryliques, les fibres aramide (Twaron, Kevlar, Nomex, Technora), les microfibres, les fibres polyamide, les fibres polyester, les fibres polyoléfinés, les fibres à base de polyéthylène de haut poids moléculaires, les fibres elastannes, les fibres vectran, les fibres vinalon, les fibres zylon et analogue.

Cette classification a été publiée par Weidmann en 2010.

Par les termes fibres lignocellulosiques, on entend au sens de la présente invention, des fibres composées de lignine, d'hémicellulose et de cellulose en proportions variables, issue d'exploitations forestières, agricoles ainsi que de déchets (bois d'ameublement, aggloméré, etc.).

Par les termes "substrat fibreux déchiquetés, formés desdites fibres sous forme agglomérées, tissées ou non tissées", ou par les termes "substrat fibreux sous forme de morceaux ou de granulés formés desdites fibres sous forme agglomérées, tissées, ou non tissées", on entend des fibres agglomérées, tissées ou non tissées, typiquement textile ou lignocellulosique, qui ont subi une étape de réduction de taille pour former des morceaux. Cette réduction de taille peut comprendre un broyage par un broyeur à ciseaux, un découpeur de type guillotine, un déchiqueteur, un broyeur à mâchoires, voire même un effilocheur. Cette étape de broyage est préalable à la fourniture de substrat fibreux. Dans certains cas, avant l'étape d'humidification, la présente invention envisage également d'effectuer une étape additionnelle de réduction de taille si celle-ci s'avère utile, par exemple lorsque le substrat fibreux sous forme de morceaux ou de granulé formé desdites fibres présentent une distribution de taille trop large ou lorsque la taille moyenne des morceaux est trop élevée.

De manière préférentielle, selon la présente invention, le substrat fibreux déchiqueté aggloméré, tissé ou non tissé est un résidu de broyage de textiles recyclés, plus particulièrement de textiles d'ameublement recyclés, de matelas recyclés, de linges de toilettes ou de couchages, de textiles de l'habillement, de chutes ou de déchets textiles de production, de rembourrés et leurs mélanges.

De manière plus particulière, selon la présente invention, ledit substrat fibreux sous forme agglomérées, tissées ou non tissées est un

résidu de broyage de textiles recyclés choisis parmi les textiles d'ameublement, de matelas et de rembourrés et présente une teneur en mousse synthétique comprise entre 10 et 80%.

5 Plus particulièrement encore, dans un mode de réalisation du procédé selon la présente invention, ledit substrat fibreux sous forme agglomérées, tissées ou non tissée est un résidu de broyage d'éléments lignocellulosique, comme par exemple des résidus de broyage de bois aggloméré.

10 Dans encore un mode de réalisation préférentiel selon la présente invention, dans lequel ladite étape de conditionnement est réalisée de manière à obtenir un substrat fibreux conditionné contenant de 60 à 80% en poids d'eau par rapport au poids de substrat fibreux conditionné, et est suivie des étapes de

- 15
- hygiénisation dudit substrat fibreux conditionné pour former un substrat fibreux conditionné hygiénisé,
 - Refroidissement du substrat fibreux conditionné hygiénisé pendant une période de temps comprise entre 12 et 24 heures.

20 Dans une forme de réalisation préférentielle du procédé selon la présente invention, ladite hygiénisation est une pasteurisation à la vapeur pour obtenir un substrat fibreux conditionné hygiénisé pendant une durée d'au moins 3 heures, de préférence d'au moins 4 heures, plus préférentiellement d'au moins 5 heures à une température supérieure ou égale à 72°C.

25 Dans une forme de réalisation encore plus préférentielle du procédé selon la présente invention, la pasteurisation est effectuée à température croissante jusqu'à obtenir un pic de température supérieur à 85°C, plus particulièrement à 88°C, plus particulièrement à 90°C, maintenu

pendant une période de temps comprise entre 5 et 50 minutes, plus particulièrement comprise entre 30 et 40 min.

Dans une autre forme de réalisation préférentielle du procédé selon la présente invention, ladite hygiénisation du substrat fibreux conditionné est un compostage comprenant au moins un cycle de compostage comprenant une étape de montée en température jusqu'à obtention d'une température comprise entre 55 et 80 °C, plus préférentiellement jusqu'à obtention d'une température comprise entre 58 et 65°C, pendant une période de temps comprise entre 6h et 5 jours, suivi d'une étape d'aération dudit substrat fibreux pour maintenir une température comprise entre 46 et 49°C pendant 3 à 7 jours, éventuellement par retournement du substrat fibreux.

Plus particulièrement, selon la présente invention, ladite étape de conditionnement dudit substrat fibreux pour obtenir un substrat fibreux conditionné comprend une humidification du substrat fibreux et/ou un lavage dudit substrat fibreux suivi éventuellement d'un égouttage ou d'un séchage.

Dans encore une autre forme de réalisation du procédé selon la présente invention, ladite étape de conditionnement dudit substrat fibreux comprend une étape supplémentaire de supplémentation en éléments essentiels, comme par exemple en minéraux (calcium, magnésium) en phosphore, en sources de carbone et azote, typiquement pour obtenir un substrat fibreux dont le ratio carbone : azote est compris entre 10 et 30, préférentiellement entre 15 et 20, par exemple par ajout de grains.

Plus particulièrement, selon la présente invention, ladite inoculation du substrat fibreux à l'aide d'une souche fongique comprend un ensemencement dudit substrat fibreux conditionné hygiénisé à l'aide de blanc mycélien issu de ladite souche fongique sur graines par addition

d'au moins un blanc mycélien sur graines au dit substrat fibreux conditionné hygiénisé à raison de 0,5% à 10% en poids, plus particulièrement de 1 à 7%, plus particulièrement encore de 3 à 5% en poids de blanc mycélien par rapport au poids de substrat fibreux conditionné hygiénisé, plus particulièrement de 4 à 8% en poids de blanc mycélien, avec obtention de substrat fibreux conditionné hygiénisé ensemencé.

Avantageusement, ladite croissance de la dite souche fongique est réalisée sur le substrat fibreux conditionné hygiénisé et ensemencé, préalablement mélangé et comporte une incubation dudit substrat fibreux conditionné hygiénisé ensemencé homogénéisé pendant une période de temps comprise entre 1 et 6 semaines, plus particulièrement entre 2 et 5 semaines, dans une enceinte présentant une humidité relative comprise entre 65 et 85%, plus particulièrement entre 70 et 80%.

Plus particulièrement encore, ledit ensemencement est réalisé en sac de culture ou sur convoyeur.

De préférence, le mélange est réalisé par retournement de sac de culture, retournement sur convoyeur, mélange dans un mélangeur à rubans, ou encore dans un mélangeur à pales.

Dans un mode préféré selon la présente invention, ladite souche fongique est choisie parmi les souches *Agrocybe* sp., *Ganoderma* sp., *G. applanatum*, *G. boninense*, *G. lucidum*, *G. resinaceum*, *G. sessile*, *Trametes* sp. ; *Trametes hirsuta*, *T. pubescens*, *T. suaveolens*, *T. versicolor*, *Pycnoporus sanguineus*, *Pleurotus* sp., *P. albidus*, *P. citrinopileatus*, *P. djamor*, *P. eryngii*, *P. ostreatus*, *P. ostraceus florida*, *P. ostraceus saiorcaju caju*, *P. salmoneo-stramineus*, *Fomes fomentarius*, *Fomitopsis pinicola*, *Irpex lacteus*, *Laetiporus sulphureus*, *Inonotus obliquus*, *Lentinula edodes*; *Lentinus lepideus*, *L. giganteus*, *L. squarrosulus* and *L. tigrinus*, *Fusarium* sp.,

Fusarium culmorum, Fusarium solani, Aspergillus sp., Aspergillus oryzae, Aspergillus niger, Aspergillus flavus, Aspergillus fumigatus, Aspergillus terreus, Trichoderma sp., Trichoderma reesei, Trichoderma viride, Trichoderma longibrachiatum, Cladosporium sp., Chaetomium sp.,
5 Chaetomium globosum.

D'autres formes de réalisation du procédé suivant l'invention sont indiquées dans les revendications annexées.

D'autres caractéristiques, détails et avantages de l'invention ressortiront de la description donnée ci-après, à titre non limitatif et en
10 faisant référence à la figure unique (Fig. 1).

La figure unique représente l'Activité laccase produite par *T. versicolor*, en fonction du temps et du type de substrat utilisé.

Exemples.-

Exemple 1.- Réalisation des cultures mères

- 15 On a réalisé des cultures mères de la manière suivante :
- Préparation du milieu gélosé : mise en solution (eau déminéralisée) des ingrédients suivants :
 - o 2% d'extrait de malt (20 g/L)
 - o 2% d'agar (20 g/L)
 - 20 o 0,2% d'extrait de levure (2 g/L)
 - Stérilisation de la préparation liquide par autoclavage
 - Répartition de la préparation liquide stérilisée dans des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre et refroidissement en conditions stériles.
- 25 Les boîtes contenant le milieu gélosé ont ensuite été inoculées avec une souche de champignon de la division des basidiomycètes, plus particulièrement de la souche *Trametes versicolor*.

Les boîtes ainsiensemencées ont ensuite été incubées pendant 5 à 8 jours, en conditions de température comprises entre 20°C et 28°C. Des carrés d'agar de dimensions 1,5 x 1,5 cm ont été découpés à l'aide d'un scalpel préalablement stérilisé, la zone de prélèvement de
5 tissus fongiques se situant vers le front de migration du mycélium.

Exemple 2.- Réalisation d'un blanc mycélien de première génération.

On a préparé un mélange contenant 1 part de graines avec 1 part de grains de blé, 1 part de grains d'avoine, et 1 part d'un mélange
10 de graines pour canari contenant 65% de graines d'alpiste, 20% de graines niger, 5% de graines de chanvre et 5% de graines de lin.

Les graines sont ensuite immergées dans de l'eau pendant 24H et ensuite récupérées et stérilisées en autoclave à 121°C pendant 40 minutes.

15 Pour former le blanc mycélien de première génération des souches indiquées au tableau 1, on ajoute un carré d'agar colonisé par la souche de champignons à 100 g de graines stérilisées telles que décrites ci-dessus et on place la quantité souhaitée de graines inoculées à l'aide de carrés d'agar colonisé selon la proportion indiquée ci-dessus dans un
20 sac de culture. Le sac de culture est ensuite incubé dans une chambre de culture à température ambiante sous atmosphère contenant environ 75% d'humidité et à l'abri de la lumière pendant 21 jours. Une fois les graines colonisées, c'est-à-dire recouvertes de mycélium, on obtient le blanc mycélien de première génération.

25

Exemple 3.- Réalisation d'un blanc mycélien de cinquième génération

On mélange des graines stérilisées telles qu'obtenues à l'exemple 2 avec des graines colonisées selon une proportion de 19/1 pour obtenir la génération suivante tel qu'indiqué au tableau 1.

Tableau 1.-

Génération	Proportion de Graines stérilisées	Proportion de Graines colonisées	Génération de graines colonisées utilisée
2	19 parties en poids	1 partie en poids	Première génération
3	19 parties en poids	1 partie en poids	Deuxième génération
4	19 parties en poids	1 partie en poids	Troisième génération
5	19 parties en poids	1 partie en poids	Quatrième génération

Exemple 4.- Préparation du substrat fibreux

A partir d'une balle de déchets textiles déchiquetés en petits morceaux (d50 compris entre 2 et 8 cm), on a réalisé une humidification du substrat fibreux. Le déchet textile comprenait des coutils de matelas, des morceaux de mousse PU de matelas et d'autres textiles d'ameublement.

L'humidification a été réalisée jusqu'à obtenir une teneur en eau d'environ 65%. Le substrat fibreux humidifié a ensuite été pasteurisé

pendant 5 heures à une température supérieure à 72°C et placé dans un sac de culture.

Le substrat fibreux humidifié et pasteurisé a ensuite été refroidi pendant une durée de 18 heures.

5 **Exemple 5.- Fermentation solide du substrat fibreux par des champignons de la division des Basidiomycètes**

On a inoculé le substrat fibreux humidifié et pasteurisé par du blanc de mycélium, de la souche de champignon *T. versicolor* sur graines issu de l'exemple 2 en ajoutant 5% en poids de blanc de mycélium par rapport au poids de substrat fibreux humidifié et pasteurisé et on a placé le sac de culture contenant le blanc de mycélium et le substrat fibreux humidifié et pasteurisé dans une chambre de culture à température ambiante et contenant une humidité relative de 75%.

Après 3 semaines, on observe une colonisation complète du substrat fibreux.

On a préparé différents substrats fibreux selon le protocole de l'exemple 4. Les substrats fibreux sont présentés au tableau 2.

Tableau 2.-

Substrat fibreux	Composition	Taille moyenne
1	Coutils de matelas	d50 compris entre 2 et 8 cm
2	Mélange de textile et bois issus du broyage de meubles	d50 compris entre 1 et 20 cm
3	Mélange de textile et bois issus du broyage de meubles (65%)	d50 compris entre 1 et 20 cm

	supplémenté de sciure de bois (35%)	
4	Sciure de bois 47,5%, paille 47,5% et son de blé 5%	d50 compris entre 1 et 20 cm

Le substrat fibreux 4 est considéré comme un contrôle positif, il s'agit d'un substrat noble dont les nutriments sont aisément accessibles à la souche de champignon.

5 Pendant la croissance de la souche de champignon *Trametes versicolor*, l'activité laccase a été mesurée en fonction du temps. La laccase est extraite en agitant une quantité fixe de substrat colonisé pendant 1h à 150 RPM avec un tampon potassium phosphate à 0,1M (15 litres de tampon phosphate comme phase aqueuse/kg de substrat. La quantification de l'activité laccase est réalisée par spectrophotométrie avec de l'ABTS comme réactif. L'activité enzymatique de la laccase a été utilisée comme traceur de la croissance des champignons.

15 Les résultats sont présentés à la figure unique. Comme on peut le constater, on observe un début plus précoce de la production de laccase lorsque *T. versicolor* est cultivé sur les coutils. Le rendement observé de fermentation solide sur coutils est 5 fois plus élevé que sur un substrat noble.

20 Ces résultats montrent que la fermentation solide à partir de déchets textiles comme substrat fibreux par différentes souches de champignon permet la croissance de biomasse, la réduction de la quantité de déchet et/ou encore la possibilité de produire des biomolécules dans un ordre de grandeur similaire à d'autres techniques

optimisées et publiées pour la production industrielle de biomolécules, comme la laccase.

Il est bien entendu que la présente invention n'est en aucune façon limitée aux formes de réalisations décrites ci-dessus et que bien des
5 modifications peuvent y être apportées sans sortir du cadre des revendications annexées.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de fermentation solide pour la production de biomolécule à partir d'un substrat fibreux comprenant :

- 5 - une fourniture d'un substrat fibreux déchiqueté, tissé, non-tissé ou aggloméré
- un conditionnement dudit substrat fibreux pour obtenir un substrat fibreux conditionné contenant de 60 à 80% en poids d'eau par rapport au poids de substrat fibreux conditionné,
- 10 - une inoculation du substrat fibreux à l'aide d'une à l'aide d'une souche fongique filamenteuse, plus particulièrement une souche fongique filamenteuse saprophyte, encore plus particulièrement choisie parmi les divisions des Basidiomycètes et des Ascomycètes et
15 préférentiellement choisie parmi des souche fongique choisie parmi des souches appartenant au genre des Agrocybe, Ganoderma, Trametes, Pycnoporus, Pleurotus, Fomes, Fomitopsis, Irpex, Laetiporus, Inonotus, Lentinula, Fusarium, Aspergillus, Trichoderma, Penicillium,
20 Cladosporium, Chaetomium, Acremonium, Ganoderma, Inonotus, Trametes, Pycnoporus, Pleurotus, Grifola, Fomes, Fusarium, pour permettre une colonisation par ladite souche fongique du substrat fibreux,
- une croissance de ladite souche fongique
- 25 - une production de biomolécule choisie parmi le groupe formés des protéases, des laccases, des amylases, des cellulases, des chitinases, des xylanases, des oxydoréductases (dont entre autres les laccases,

manganèse peroxydases, lignine peroxydases), des lipases,

- une extraction de ladite biomolécule et
- une collecte de ladite biomolécule.

5 2. Procédé de fermentation solide pour la production de biomolécules à partir d'un substrat fibreux selon la revendication 1, dans lequel ladite collecte est suivie d'une étape de purification agencée pour obtenir un lot purifié de biomolécules.

10 3. Procédé de fermentation solide pour la production de biomolécules selon la revendication 1 ou la revendication 2, dans lequel ladite extraction est choisie parmi une extraction à partir de la biomasse fongique obtenue ou une série de rinçage du milieu de culture par une phase aqueuse, permettant de récolter une phase aqueuse enrichie en biomolécule.

15 4. Procédé de fermentation solide pour la production de biomolécules selon la revendication 3, dans lequel la série de rinçage comprend 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou plus rinçages, chaque rinçage étant effectué à intervalle de 5, 6, 7, 8, 9, 10 jours.

20 5. Procédé de fermentation solide pour la production de biomolécules à partir d'un substrat fibreux selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel ladite croissance de ladite souche fongique est simultanée à la production de biomolécules.

25 6. Procédé de fermentation solide pour la production de biomolécule à partir d'un substrat fibreux selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel ladite croissance de ladite souche fongique a lieu avant la production de biomolécule.

30 7. Procédé de fermentation solide pour la production de biomolécule à partir d'un substrat fibreux selon l'une quelconque des revendications précédentes dans lequel le substrat fibreux déchiqueté aggloméré, tissé ou non tissé comprend des fibres choisies parmi des fibres

textiles naturelles végétales ou animales, des fibres textiles semi-synthétiques ou des fibres textiles polymère, des fibres lignocellulosiques.

5 8. Procédé de fermentation solide pour la production de biomolécule à partir d'un substrat fibreux selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le substrat fibreux déchiqueté aggloméré, tissé ou non tissé est un résidu de broyage de textiles recyclés ou en fin de vie, plus particulièrement de textiles d'ameublement recyclés, de matelas recyclés, de linges de toilettes ou de couchages, de textiles de l'habillement, de chutes ou de déchets textiles de production,
10 de rembourrés et leurs mélanges.

9. Procédé de fermentation solide pour la production de biomolécule à partir d'un substrat fibreux selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel ledit substrat fibreux sous forme agglomérées, tissées ou non tissées est un résidu de broyage de textiles
15 recyclés choisis parmi les textiles d'ameublement, de matelas et de rembourrés et présente une teneur en mousse synthétique comprise entre 10 et 80%.

10. Procédé de fermentation solide pour la production de biomolécule à partir d'un substrat fibreux selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel ledit substrat fibreux sous forme
20 agglomérées, tissées ou non tissée est un résidu de broyage d'éléments lignocellulosique, comme par exemple des résidus de broyage de bois aggloméré.

11. Procédé de fermentation solide pour la production de biomolécule à partir d'un substrat fibreux selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel ladite étape de
25 conditionnement est réalisée de manière à obtenir un substrat fibreux conditionné contenant de 60 à 80% en poids d'eau par rapport au poids de substrat fibreux conditionné, et est suivie des étapes de

- hygiénisation dudit substrat fibreux conditionné pour former un substrat fibreux conditionné hygiénisé,
- Refroidissement du substrat fibreux conditionné hygiénisé pendant une période de temps comprise entre 12 et 24 heures.

5

12. Procédé de fermentation solide pour la production de biomolécules à partir d'un substrat fibreux selon la revendication 11, dans lequel ladite hygiénisation est une pasteurisation à la vapeur pour obtenir un substrat fibreux conditionné hygiénisé pendant une durée d'au moins 3 heures, de préférence d'au moins 4 heures, plus préférentiellement d'au moins 5 heures à une température supérieure ou égale à 72°C.

10

13. Procédé de fermentation solide pour la production de biomolécules à partir d'un substrat fibreux selon la revendication 12, dans lequel la pasteurisation est effectuée à température croissante jusqu'à obtenir un pic de température supérieur à 85°C, plus particulièrement à 88°C, plus particulièrement à 90°C, maintenu pendant une période de temps comprise entre 5 et 50 minutes, plus particulièrement comprise entre 30 et 40 min.

15

14. Procédé de fermentation solide pour la production de biomolécules à partir d'un substrat fibreux selon l'une quelconque des revendications 11 à 13, dans lequel ladite hygiénisation du substrat fibreux conditionné est un compostage comprenant au moins un cycle de compostage comprenant une étape de montée en température jusqu'à obtention d'une température comprise entre 55 et 80 °C, plus préférentiellement jusqu'à obtention d'une température comprise entre 58 et 65°C, pendant une période de temps comprise entre 6h et 5 jours, suivi d'une étape d'aération dudit substrat fibreux pour maintenir une température comprise entre 46 et 49°C pendant 3 à 7 jours, éventuellement par retournement du substrat fibreux.

25

15. Procédé de fermentation solide pour la production de biomolécules à partir d'un substrat fibreux selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel ladite étape de conditionnement dudit substrat fibreux pour obtenir un substrat fibreux conditionné comprend une humidification du substrat fibreux et/ou un lavage dudit substrat fibreux suivi éventuellement d'un égouttage ou d'un séchage.

16. Procédé de fermentation solide pour la production de biomolécules à partir d'un substrat fibreux selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel ladite étape de conditionnement dudit substrat fibreux comprend une étape supplémentaire de supplémentation en éléments essentiels, comme par exemple en minéraux (calcium, magnésium) en phosphore, en sources de carbone et azote, typiquement pour obtenir un substrat fibreux dont le ratio carbone : azote est compris entre 10 et 30, préférentiellement entre 15 et 20, par exemple par ajout de grains.

17. Procédé de fermentation solide pour la production de biomolécules à partir d'un substrat fibreux selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel ladite souche fongique est choisie parmi les souches *Agrocybe* sp., *Ganoderma* sp., *G. applanatum*, *G. boninense*, *G. lucidum*, *G. resinaceum*, *G. sessile*, *Trametes* sp. ; *Trametes hirsuta*, *T. pubescens*, *T. suaveolens*, *T. versicolor*, *Pycnoporus sanguineus*, *Pleurotus* sp., *P. albidus*, *P. citrinopileatus*, *P. djamor*, *P. eryngii*, *P. ostreatus*, *P. ostraceus florida*, *P. ostraceus saiorcaju caju*, *P. salmoneo-stramineus*, *Fomes fomentarius*, *Fomitopsis pinicola*, *Irpex lacteus*, *Laetiporus sulphureus*, *Inonotus obliquus*, *Lentinula edodes*; *Lentinus lepideus*, *L. giganteus*, *L. squarrosulus* and *L. tigrinus*, *Fusarium* sp., *Fusarium culmorum*, *Fusarium solani*, *Aspergillus* sp., *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Trichoderma* sp., *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma*

longibrachiatum, Cladosporum sp., Chaetomium sp., Chaetomium
globosum.

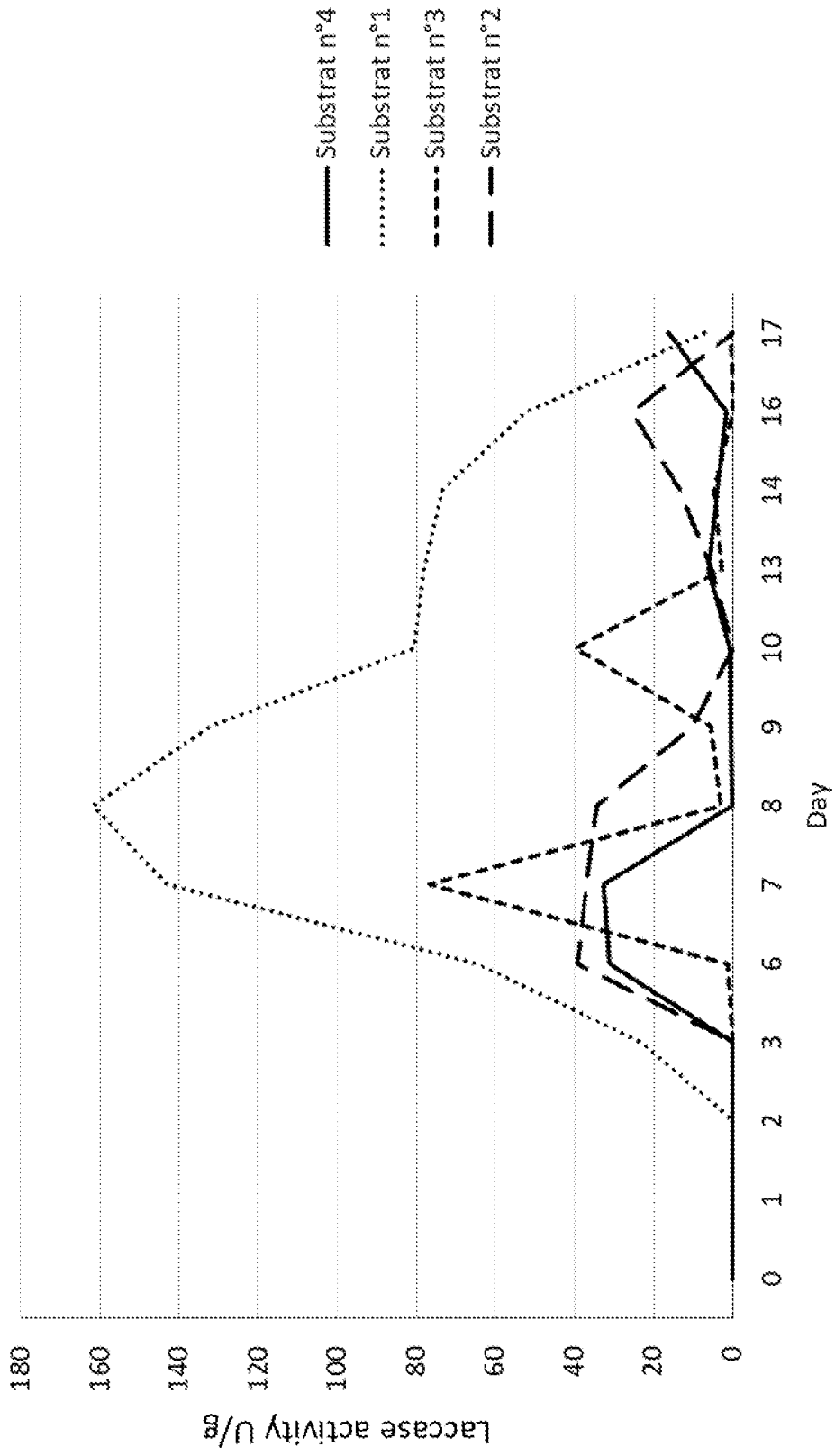


Fig.1

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 PAT-20499-BE00
Demande nationale belge n° 202305207	Date du dépôt 20-03-2023
	Date de priorité revendiquée
Déposant (Nom) NOVOBIOM	
Date de la requête d'une recherche de type international 01-04-2023	Numéro attribué par l'administration chargée de la recherche internationale à la requête d'une recherche de type international SN83585
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 REVENDICATIONS 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. C12N1/14 C12N1/22 C12P7/10 ADD. C12R1/645</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) C12N C12P</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</p>				
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</p>				
Catégorie °	Documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées		
X	<p>HU YUNZI ET AL: "Valorisation of textile waste by fungal solid state fermentation: An example of circular waste-based biorefinery", RESOURCES, CONSERVATION AND RECYCLING, vol. 129, 1 février 2018 (2018-02-01), pages 27-35, XP093080421, AMSTERDAM, NL ISSN: 0921-3449, DOI: 10.1016/j.resconrec.2017.09.024 * abrégé; page 28, par. 2.3-2.5; page 34, Conclusions *</p> <p style="text-align:center;">----- -/--</p>	1-17		
<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>			
<p>Date à laquelle la recherche de type international a été effectivement achevée</p> <p style="text-align:center;">12 octobre 2023</p>		<p>Date d'expédition du rapport de recherche de type international</p>		
<p>Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale</p> <p>Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016</p>		<p>Fonctionnaire autorisé</p> <p style="text-align:center;">Dumont, Elisabeth</p>		

C.(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie °	Documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>NURIKA IRNIA ET AL: "Biotransformation of Tropical Lignocellulosic Feedstock Using the Brown rot Fungus <i>Serpula lacrymans</i>", WASTE AND BIOMASS VALORIZATION</p> <p>, vol. 11, no. 6 8 janvier 2019 (2019-01-08), pages 2689-2700, XP093090757, NL ISSN: 1877-2641, DOI: 10.1007/s12649-019-00581-5 Extrait de l'Internet: URL:http://link.springer.com/article/10.1007/s12649-019-00581-5/fulltext.html * abrégé; page 2690, dernier par. ; page 2691, par. 1; page 2692-2693, "Total reducing sugar"; page 2697, Conclusion *</p> <p>-----</p>	1-17
A	<p>ABDESHAHIAN PEYMAN ET AL: "Valorization of Lignocellulosic Biomass and Agri-food Processing Wastes for Production of Glucan Polymer", WASTE AND BIOMASS VALORIZATION, SPRINGER NETHERLANDS, NL,</p> <p>vol. 12, no. 6, 15 octobre 2020 (2020-10-15), pages 2915-2931, XP037451691, ISSN: 1877-2641, DOI: 10.1007/s12649-020-01267-z [extrait le 2020-10-15] * abrégé; introduction; page 2917, col. 2, dernier par. ; Table 1; page 2921, col. 2, par. 1.; Fig. 2 *</p> <p>-----</p>	1-17
A	<p>JI SU BIN ET AL: "Coproduction of Enzymes and Beta-Glucan by <i>Aspergillus oryzae</i> Using Solid-State Fermentation of Brown Rice", JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY,</p> <p>vol. 31, no. 7, 28 juillet 2021 (2021-07-28), pages 1028-1034, XP093090351, Korea ISSN: 1017-7825, DOI: 10.4014/jmb.2105.05005 * abrégé; page 1029, par. 3; page 1033, Conclusion. *</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-17

C.(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie °	Documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p> ROUSTA NEDA ET AL: "Effects of fungal based bioactive compounds on human health: Review paper", CRITICAL REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND NUTRITION, 15 février 2023 (2023-02-15), pages 1-24, XP093090363, USA ISSN: 1040-8398, DOI: 10.1080/10408398.2023.2178379 * Abrégé; Table 1; pages 5-6, "beta-glucans" * ----- </p>	1-17



OPINION ÉCRITE

Dossier N° SN83585	Date du dépôt(<i>jour/mois/année</i>) 20.03.2023	Date de priorité (<i>jour/mois/année</i>)	Demande n° BE202305207
Classification internationale des brevets (CIB) INV. C12N1/14 C12N1/22 C12P7/10 ADD. C12R1/645			
Déposant NOVOBIOM			

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 Dumont, Elisabeth
--	--------------------------------

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	2, 4, 11-14, 16
	Non : Revendications	1, 3, 5-10, 15, 17
Activité inventive	Oui : Revendications	
	Non : Revendications	1-17
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications	1-17
	Non : Revendications	

2. Citations et explications

voir feuille séparée

Cadre n° VIII Observations relatives à la demande

voir feuille séparée

L'invention se rapporte à un procédé de fermentation solide pour la production de biomolécules (enzymes) à partir d'un substrat fibreux provenant de déchets textiles et inoculé à l'aide d'une souche fongique. Dans les exemples, un substrat fibreux constitué de déchets textiles déchiquetés est humidifié, pasteurisé, puis inoculé par une souche fongique *Trametes versicolor*. Le substrat inoculé est placé dans une chambre de culture à température ambiante et contenant une humidité relative de 75%. Après 3 semaines, on observe une colonisation complète du substrat fibreux. L'activité laccase est mesurée en fonction du temps et est utilisée comme traceur de croissance des champignons. Les exemples montrent un rendement de fermentation (activité laccase) 5 fois plus élevé sur un substrat constitué de coutils de matelas, que sur un substrat noble constitué de sciure de bois, paille et son de blé (cf. exemples 4 et 5 et Fig. 1).

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

- 1 Il est fait référence aux documents suivants :
- D1 HU YUNZI ET AL: "Valorisation of textile waste by fungal solid state fermentation: An example of circular waste-based biorefinery", RESOURCES, CONSERVATION AND RECYCLING, vol. 129, 1 février 2018 (2018-02-01), pages 27-35, XP093080421
 - D2 NURIKA IRNIA ET AL: "Biotransformation of Tropical Lignocellulosic Feedstock Using the Brown rot Fungus *Serpula lacrymans*", WASTE AND BIOMASS VALORIZATION, vol. 11, no. 6 8 janvier 2019 (2019-01-08), pages 2689-2700, XP093090757
 - D3 ABDESHAHIAN PEYMAN ET AL: "Valorization of Lignocellulosic Biomass and Agri-food Processing Wastes for Production of Glucan Polymer", WASTE AND BIOMASS VALORIZATION, SPRINGER NETHERLANDS, NL, vol. 12, no. 6, 15 octobre 2020 (2020-10-15), pages 2915-2931, XP037451691

- D4 JI SU BIN ET AL: "Coproduction of Enzymes and Beta-Glucan by *Aspergillus oryzae* Using Solid-State Fermentation of Brown Rice", JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 31, no. 7, 28 juillet 2021 (2021-07-28), pages 1028-1034, XP093090351
- D5 ROUSTA NEDA ET AL: "Effects of fungal based bioactive compounds on human health: Review paper", CRITICAL REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND NUTRITION, 15 février 2023 (2023-02-15), pages 1-24, XP093090363

- 1.1 **D1** décrit l'utilisation de déchets textiles (coton et polyester) comme matière première pour la production de cellulase par fermentation solide. Les déchets textiles sont prétraités par l'ajout d'une solution minérale et un autoclavage à 121°C pendant 15 minutes. Les déchets textiles sont ensuite inoculés avec une suspension de spores fongiques (entre autres, *Aspergillus niger* et *Trichoderma reesei*). De l'eau est ajoutée au substrat pour ajuster le taux d'humidité initial à 65%-85%. La fermentation solide est réalisée dans un incubateur à 28°C pendant 7 à 9 jours en condition statique. À la fin de l'incubation, l'enzyme fongique (cellulase) est extraite et collectée: pour cela, le substrat fermenté est mélangé à un tampon de citrate de sodium puis centrifugé à 4°C, pendant 3 min pour collecter le surnageant clair sous forme de solution enzymatique brute (abrégé; page 28, par. 2.3-2.5; page 34, Conclusions).
- 1.2 **D2** décrit un procédé de fermentation solide de la paille de riz, de la rafle de maïs ou de la cosse de cacao, respectivement coupées en petits segments. Le substrat respectif est humidifié (10 g de substrat + 13 ml d'eau), autoclavé (121°C pendant 1h) et inoculé avec du blanc mycélien de *Serpula lacrymans*. Après 21 jours d'incubation, une solution aqueuse est utilisée pour extraire les sucres et les composés phénoliques solubles. La biomasse est séparée et l'échantillon aqueux est centrifugé et filtré (abrégé; introduction; page 2917, col. 2, dernier par. ; Table 1; page 2921, col. 2, par. 1.; Fig. 2).
- 1.3 **D3** passe en revue l'utilisation de déchets de l'agroalimentaire et de biomasse lignocellulosique comme sources alternatives pour la production microbienne de biopolymères glucaniques. Les micro-organismes tels que les cellules fongiques sont largement utilisés pour la production extracellulaire de glucanes (abrégé; introduction; page 2917, col. 2, dernier par. ; Table 1; page 2921, col. 2, par. 1.; Fig. 2)

- 1.4 **D4** décrit la production d'enzymes et de bêta-glucanes destinés à diverses applications par fermentation solide avec *Aspergillus* sur du riz brun (abrégé; page 1029, par. 3; page 1033, Conclusion).
- 1.5 **D5** passe en revue les composés bioactifs produits par des souches fongiques et leurs effets bénéfiques sur la santé (Abrégé; Table 1; pages 5-6, "beta-glucans").
- 2 Nouveauté**
- 2.1 **D1** divulgue toutes les étapes des revendications 1, 3, 5-10, 15 et 17. Les substrats textiles utilisés dans D1 (voir paragraphe 1.1.) tombent sous la définition de substrat fibreux selon les revendications 1, 7-10. L'incubation dans D1 dure 7-9 jours et on peut assumer que la croissance de la souche fongique a lieu aussi bien avant la production d'enzymes, que simultanément à la production d'enzymes (rev. 5 et 6).
- 2.2 L'objet des revendications 2, 4, 11-14, 16 est considéré comme étant nouveau par rapport aux documents cités.
- 3 Activité inventive**
- 3.1 **D1** est considéré comme le document d'art antérieur le plus proche.
- 3.2 Les caractéristiques supplémentaires des revendications 2 (étape de purification après la collecte d'enzyme) 4 (série de rinçage), 11 (refroidissement de 12-24h après hygiénisation), 12 et 13 (pasteurisation), 14 (hygiénisation par compostage), et 16 (supplémentation en éléments essentiels) ne sont pas divulguées dans D1.
- 3.3 Aucun effet technique particulier de ces caractéristiques respectives n'a été démontré dans la demande. Le problème objectif à résoudre par rapport à D1 dans chacune des revendications est donc la fourniture d'un procédé alternatif.
- 3.4 Les solutions respectives apportées dans chacune des revendications (cf. paragraphe 3.2) sont considérées comme des options normales à la portée de la personne du métier, parmi lesquelles celle-ci choisirait, en fonction des circonstances, sans faire preuve d'activité inventive. Ces caractéristiques ne suffisent donc pas en soi à justifier une contribution inventive par rapport à **D1**.

Ad point VIII

4 Certaines observations relatives à la demande

- 4.1 Les termes suivants employés dans la revendication 1 sont vagues et imprécis, et laissent subsister un doute quant à la signification des caractéristiques techniques auxquelles ils se rapportent, au point que l'objet de ladite revendication n'est pas clairement défini:
- un "substrat fibreux" (de quel type de substrat s'agit-il?)
 - un "conditionnement" (comment cette étape est-elle effectuée?)
 - une "production de biomolécule" (comment la production est-elle réalisée?)
- 4.2 De même, dans la revendication 2, une étape de purification "agencée pour obtenir un lot purifié" n'indique pas les caractéristiques techniques nécessaires pour parvenir à ce résultat.
- 4.3 Les caractéristiques techniques de l'extraction selon la revendication 3 ne sont pas claires. L'homme du métier ne sait pas comment obtenir la biomasse fongique, et encore moins comment en extraire les biomolécules. L'homme du métier ne sait pas non plus comment rincer le milieu de culture. Il est signalé qu'aucune mention d'un milieu de culture n'est faite dans les revendications précédentes.
- 4.4 La revendication 10 manque de clarté dans la mesure où elle se rapporte aux revendications 8 et 9, car il semble contradictoire que le substrat fibreux soit à la fois un résidu de broyage de textiles recyclés (rev. 8, 9) et un résidu de broyage de bois aggloméré (rev. 10).
- 4.5 La revendication 11 manque de clarté car elle ne définit pas les caractéristiques techniques de l'étape d'"hygiénisation".
- 4.6 La revendication 14 manque de clarté dans la mesure où elle se rapporte aux revendications 12 et 13, car il semble que l'étape d'hygiénisation ne peut être à la fois une pasteurisation (rev.12, 13) et un compostage (rev. 14).
- 4.7 Il est signalé que les caractéristiques précédées du terme "particulièrement" dans les revendications 1, 8, 13 sont considérées comme entièrement facultatives et n'ont pas d'effet limitatif sur la portée des revendications.