

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

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
5 décembre 2002 (05.12.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/097076 A1

- (51) Classification internationale des brevets⁷ : C12N 9/08, C12P 3/00, C12N 11/00, A61L 2/16, A01N 59/24, 63/00, C12M 1/40
- (21) Numéro de la demande internationale : PCT/FR02/01844
- (22) Date de dépôt international : 31 mai 2002 (31.05.2002)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité : 01/07344 31 mai 2001 (31.05.2001) FR
- (71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : TMI EUROPE [FR/FR]; 3-11, rue de la Perlerie, F-69120 Vaulx en Velin (FR).
- (72) Inventeur; et
- (75) Inventeur/Déposant (pour US seulement) : CASEZ, Hervé [FR/FR]; 235, Ancienne Grande Rue, F-69380 Chatillon d'Azergues (FR).
- (74) Mandataire : CABINET GERMAIN & MAUREAU; 12, rue Boileau, F-69006 Lyon (FR).
- (81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasiatique (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publiée :
— avec rapport de recherche internationale
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues
- En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD FOR THE ENZYMATIC PRODUCTION OF A CURING AGENT IN ITS FLUID STATE

(54) Titre : PROCEDE DE PRODUCTION ENZYMATIQUE D'UN AGENT DE TRAITEMENT A L'ETAT FLUIDE

(57) Abstract: The invention relates to a method for the enzymatic production of a curing agent in its fluid state, e.g. liquid, comprising, in free phase, at least one oxygenated chemical species. Said method consists in bringing into contact at least: one enzymatic catalysis agent, comprising at least one peroxidase-type enzyme; an oxidisable substrate in aqueous phase that can be oxidised by the action of an oxygen donor, by catalysis by said enzymatic catalysis agent, generating said oxygenated chemical species in free phase; and said oxygen donor. The inventive method is characterised in that: e) an aqueous reaction bath is formed comprising, in addition to the oxidisable substrate and the oxygen donor, said enzymatic catalysis agent in divided solid phase, but in free phase, distributed in said bath, which may be set in motion; f) the aqueous reaction bath is separated into a fraction enriched with the enzymatic catalysis agent in divided solid phase and a fraction free from said catalysis agent, from which the curing agent is obtained.

(57) Abrégé : Procédé de production enzymatique d'un agent de traitement à l'état fluide, par exemple liquide, comprenant à l'état libre au moins une espèce chimique oxygénée, par mise en contact d'au moins: un agent de catalyse enzymatique, comprenant au moins une enzyme du type peroxydase, et un substrat oxydable en phase aqueuse susceptible d'être oxydé par action d'un donneur d'oxygène, par catalyse par ledit agent de catalyse enzymatique, en générant ladite espèce chimique oxygénée à l'état libre, ledit donneur d'oxygène, caractérisé en ce que: (e) on forme un bain réactionnel aqueux comprenant, outre le substrat oxydable et le donneur d'oxygène, ledit agent de catalyse enzymatique en phase solide et divisée, mais à l'état libre, distribué dans ledit bain, lequel est éventuellement mis en mouvement, (f) on sépare le bain réactionnel aqueux, en une fraction enrichie en agent de catalyse enzymatique en phase solide et divisée, et une fraction dépourvue en dit agent de catalyse, à partir de laquelle l'agent de traitement est obtenu.

WO 02/097076 A1

La présente invention concerne la génération d'un flux concentré et continu d'espèces chimiques oxygénées et de substrats oxydés, en phase
5 liquide, permettant d'obtenir des solutions utilisables par exemple pour le lavage, la décontamination, l'aseptisation de différents produits alimentaires dont l'eau, mais aussi de matériels industriels, ainsi que pour la dépollution et l'assainissement de fluides et pour la préparation de produits alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques.

10 L'utilisation à cette fin de systèmes enzymatiques antimicrobiens naturels, comme les oxydoréductases, par exemple le système lactoperoxydase est connu et de nombreuses applications sont décrites.

Les propriétés de ce système enzymatique sont notamment étudiées dans "The lactoperoxidase system chemistry and biological significance" (1985)
15 Marcel Dekker, Inc, New York, Chap. 8 pp 143-178.

Ce système antimicrobien lactoperoxydase / thiocyanate / peroxyde d'hydrogène comporte schématiquement trois composantes :

- une enzyme : la lactoperoxydase,
- un substrat oxydable : l'ion thiocyanate (SCN^-)
- 20 - un donneur d'oxygène : le peroxyde d'hydrogène.

Dans ce système, en milieu liquide, la lactoperoxydase catalyse la réaction d'oxydation du thiocyanate.

25 En présence de peroxyde d'hydrogène en quantité suffisante et dans des conditions de pH correctes, la réaction d'oxydation se poursuit vers des dérivés oxyacides encore plus oxydés.

Les espèces chimiques oxygénées seules ou en mélange, obtenues sont de façon non limitative, l'ion hypothiocyanate OSCN^- , les ions O_2SCN^- et O_3SCN^- , les anions superoxyde O_2^- et trioxyde O_3^- , l'ion hydroxyle OH^- , l'oxyde nitrique NO , le trioxyde dinitré N_2O_3 , le dioxyde nitré NO_2 , le
30 peroxydinitrite ONO_2 , l'hydroperoxydinitrite ONHO_2 , le dioxyde de soufre SO_2 , le trioxyde de soufre SO_3 , l'acide sulfureux HSO_3 et l'acide hypochloreux HOCl .

Les espèces chimiques oxygénées précitées sont connues pour leurs effets bactériostatique et bactéricide, notamment vis à vis de nombreux
35 microorganismes tels que bactéries, par exemple les *Pseudomonae*, les *Enterobacteriaceae*, comme *E. Coli*, *Salmonella*, les *Listeria* ou

Campylobacter, les formes sporulées et les protozoaires, les virus, les levures ou les champignons.

Ce système antimicrobien peut ainsi être utilisé pour la décontamination par action des espèces chimiques oxygénées obtenues, notamment les ions thiocyanates oxydés comme OSCN^- , O_2SCN^- , O_3SCN^- , qui sont susceptibles d'interagir avec les composants des membranes cellulaires ou d'oxyder des polluants chimiques.

En présence d'un substrat fournisseur de peroxyde d'hydrogène qui peut être le peroxyde d'hydrogène lui-même ou par exemple un peroxyde métallique ou un système enzymatique complémentaire producteur de peroxyde d'hydrogène, ce système enzymatique complémentaire étant par exemple une oxydoréductase avec un substrat oxydable et d'oxygène comme le système glucose/glucose-oxydase en milieu aqueux, l'utilisation du système complet est possible et les propriétés réactionnelles d'un tel système antimicrobien comportent schématiquement trois étapes :

- la production de peroxyde d'hydrogène par le fournisseur de peroxyde d'hydrogène,
- la réaction d'oxydation du thiocyanate,
- la décontamination par actions des espèces chimiques oxygénées obtenues.

De nombreuses applications sont décrites.

Par exemple, selon WO-A-8707838 un procédé est décrit pour conditionner sous forme sèche une composition antibactérienne contenant de la lactoperoxydase, du thiocyanate et un donneur d'oxygène natif en vue de son utilisation ultérieure.

On connaît de US-C-5403450 l'utilisation d'installations, dans lesquelles les oxydoréductases sont immobilisées, pour convertir des substances susceptibles d'être oxydées contenues à titre de pollution dans de l'eau.

JP58152486 enseigne, par exemple l'immobilisation d'enzymes sur des particules de polymères pour une utilisation répétée.

On connaît aussi des systèmes d'immobilisation d'enzymes ou de systèmes enzymatiques sur des parois de réacteurs, sur des films, des billes, et autres supports comportant une surface spécifique importante.

Toutes ces utilisations ne sont cependant pas satisfaisantes, en raison de la consommation excessive d'enzymes qu'elles entraînent :

- soit en raison de leur conditionnement, par exemple sous forme sèche, qui implique une utilisation par saupoudrage des produits à traiter, donc des quantités d'enzymes proportionnelles aux surfaces et aux volumes de produits à traiter,
- 5 – soit en raison des rendements faibles de réaction des enzymes immobilisées,
- soit en raison de la rapide dégradation des espèces chimiques oxygénées qui sont générées.

10 Le procédé selon l'invention permet de résoudre l'ensemble des inconvénients précités en ce qu'il permet de produire un agent de traitement à l'état fluide, par exemple liquide, comprenant à l'état libre au moins une espèce chimique oxygénée, stable, avec un rendement important et une endurance importante.

15

L'invention concerne :

- un procédé de production enzymatique d'un agent de traitement à l'état fluide, par exemple liquide, comprenant à l'état libre au moins une espèce chimique oxygénée, par mise en contact d'au moins :

- 20 - un agent de catalyse enzymatique, comprenant au moins une enzyme du type peroxydase,
- et un substrat oxydable en phase aqueuse susceptible d'être oxydé par action d'un donneur d'oxygène, par catalyse par ledit agent de catalyse enzymatique, en générant ladite espèce chimique oxygénée
- 25 à l'état libre,
- ledit donneur d'oxygène,

selon lequel :

- a) on forme un bain réactionnel aqueux comprenant, outre le substrat oxydable et le donneur d'oxygène, ledit agent de catalyse enzymatique en
- 30 phase solide et divisée, mais à l'état libre, distribué dans ledit bain, lequel est éventuellement mis en mouvement,
- b) on sépare le bain réactionnel aqueux, en une fraction enrichie en agent de catalyse enzymatique en phase solide et divisée, et une fraction dépourvue en dit agent de catalyse, à partir de laquelle l'agent de traitement est
- 35 obtenu.

De préférence le donneur d'oxygène est un peroxyde comme le peroxyde d'hydrogène.

On entend par une espèce chimique oxygénée à l'état libre, une espèce chimique à l'état ionique dont la constante de dissociation, au pH de la solution obtenue permet le déplacement de l'équilibre de la réaction de dissociation vers l'existence à l'état libre de ladite espèce chimique oxygénée.

L'invention présente les variantes suivantes :

- 10 - on introduit dans le bain réactionnel aqueux, le substrat oxydable, éventuellement en phase aqueuse.
- on introduit dans le bain réactionnel, l'agent de catalyse enzymatique, à l'état de phase solide et divisée ou en phase liquide.
- on évacue du bain réactionnel l'agent de catalyse enzymatique.
- 15 - le procédé est pratiqué en continu, ou de manière discontinue.
- on forme dans le bain réactionnel aqueux des agrégats de particules solides inertes vis-à-vis de l'agent de catalyse enzymatique, lesdits agrégats comprenant ou incorporant, à l'état libre, ledit agent de catalyse, et lesdits agrégats étant distribués dans le bain réactionnel aqueux, moyennant
- 20 quoi, pendant l'étape (b) on sépare ledit bain en une fraction enrichie en agrégat, et une fraction dépourvue en agrégat, à partir de laquelle l'agent de traitement est obtenu.
- les agrégats sont des flocons, et on introduit dans le bain réactionnel, un agent de floculation, par exemple anionique ou cationique.
- 25 - les agrégats sont des coagulats, et on introduit dans le bain réactionnel, un agent coagulant.
- on introduit dans le bain un agent épaississant.
- l'agent de catalyse enzymatique en phase solide est suspendu dans le bain réactionnel, sous forme d'émulsion, et éventuellement on introduit
- 30 dans ledit bain un agent émulsifiant.
- l'agent de catalyse comprend un microorganisme exprimant au moins une enzyme du type peroxydase.
- on introduit dans le bain un agent correcteur de pH.
- on introduit dans le bain un donneur d'oxygène sous forme d'un
- 35 système enzymatique complémentaire qui produit du peroxyde d'hydrogène, et

l'agent de catalyse enzymatique comprend, outre l'enzyme du type peroxydase, une enzyme du type oxydoréductase.

5 On entend par agrégat toute formulation permettant de maintenir en phase solide et divisée mais à l'état libre dans le milieu réactionnel l'agent de catalyse enzymatique par addition de coagulant, flocculant, émulsifiant en présence ou non d'épaississeur, mais permettant leur isolement dudit milieu réactionnel en fin de réaction et leur recyclage.

10 On entend par état libre un état de mise en suspension dans les agrégats sans formation de liaison ionique ou covalente entre l'agent de catalyse et lesdits agents d'agrégation.

Dans une variante de mise en œuvre les agrégats sont des flocons.

15 On entend par flocons tout agrégat de particules inertes chimiquement vis à vis de l'enzyme ou du système enzymatique, contenant sans l'immobiliser ladite enzyme, susceptible d'être obtenu par addition d'un flocculant cationique ou anionique après coagulation ou sans coagulation préliminaire, incorporé avec ou sans agent correcteur de pH.

20 Les flocculants utilisés sont choisis parmi les flocculants polymères anioniques ou cationiques, comme les polysaccharides, les hétéropolysaccharides de type anionique ou les polyacrylamines.

Avantageusement les flocculants sont additionnés au milieu réactionnel, dans des proportions variant de $0,1 \cdot 10^{-6}$ à 10 g/l de milieu réactionnel.

25 Dans une variante de mise en œuvre les agrégats sont des coagulats.

On entend par coagulat tout agrégat de particules inertes vis à vis de l'enzyme ou du système enzymatique, contenant sans l'immobiliser ladite enzyme, susceptible d'être obtenu par addition d'un agent coagulant tel que défini précédemment.

30 Avantageusement les coagulants sont additionnés au milieu réactionnel, dans des proportions variant de $0,1 \cdot 10^{-6}$ à 10 g/l de milieu réactionnel.

La formation des agrégats peut être effectuée par addition successive d'un coagulant et d'un flocculant, on a ainsi une étape de coagulation qui précède l'étape de floculation.

35 Lorsque l'étape de floculation est précédée d'une étape de coagulation, celle-ci est effectuée par l'introduction d'un agent coagulant, choisi par exemple

parmi les sels d'aluminium ou de fer, comme par exemple : sulfate d'aluminium, chlorure d'aluminium, aluminat de sodium, polyhydroxychlorure d'aluminium, polyhydroxysulfate d'aluminium, polyhydroxychlorosulfate d'aluminium, polychlorosulfate basique d'aluminium, polyhydroxychlorosilicate d'aluminium, fluorosulfate d'aluminium, sulfate ferreux, sulfate ferrique, chlorure ferrique, chlorosulfate ferrique, soude, ou des homopolymères de chlorure de diméthyl diallyl ammonium.

L'invention concerne aussi un ensemble de réactifs pour la production enzymatique d'un agent de traitement à l'état fluide comprenant à l'état libre au moins une espèce chimique oxygénée, comprenant en outre un agent de catalyse enzymatique et un agent d'agrégation en phase aqueuse et/ou un agent de floculation en phase aqueuse et/ou un agent de coagulation en phase aqueuse.

Dans un autre mode de réalisation, un agent épaississant, organique ou minéral, chimiquement compatible avec le type d'agrégat que l'on souhaite utiliser est additionné au mélange.

Selon les variantes de mise en œuvre, cet agent épaississant est introduit dans le bain simultanément à l'introduction de l'agent de catalyse enzymatique ou après formation du bain réactionnel aqueux.

Cet agent épaississant est choisi parmi les argiles, le kaolin, la silice ou des silicates ou tout autre agent minéral compatible favorisant l'entraînement de l'enzyme.

Avantageusement l'agent épaississant est additionné au milieu réactionnel, dans des proportions variant de 0,1 à 100 g/l de milieu réactionnel.

L'invention concerne aussi un ensemble de réactifs sous forme non hydratée, pour la production enzymatique d'un agent de traitement à l'état fluide comprenant à l'état libre au moins une espèce chimique oxygénée, comprenant au moins un agent de catalyse enzymatique et un agent épaississant.

Avantageusement l'ensemble de réactifs sous forme non hydratée comprend 0,005 à 10 % d'agent de catalyse enzymatique et de 90 à 99,995 % d'agent épaississant, par exemple de 5 g à 400 g de lactoperoxydase sous

forme sèche et de 1000 g à 5000 g d'argile pour un réacteur de volume utile de 2 m³.

L'ensemble de réactifs est mis en œuvre par introduction dans le réacteur à raison de 0,2 à 10 g/l de volume utile.

5

Dans un autre mode de réalisation, un agent émulsionnant est additionné au mélange..

On entend par émulsion toute suspension contenant sans l'immobiliser une enzyme, susceptible d'être obtenue par addition d'émulsifiants comme par exemple des corps gras ou de la lécithine de soja ou des hydrocarbures.

10

Dans des modes de réalisations particuliers, le pH du milieu de dispersion de l'agrégat, peut être stabilisé ou corrigé par addition d'un agent correcteur de pH, qui sera choisi parmi les acides ou bases minérales ou organiques.

15

Les agents de catalyse enzymatique sont des enzymes libres, chimiquement isolées ou associées entre elles, obtenues à partir de microorganismes isolés, de cellules d'origines végétales ou animales ou de flore polymicrobienne. Il s'agit, en particulier, des peroxydases, et tout microorganisme naturel sélectionné ou génétiquement modifié qui soit producteur d'enzyme ou générateur d'activité enzymatique.

20

Les peroxydases utilisables dans la présente invention comprennent les peroxydases d'origine végétales, comme la peroxydase du radis noir, ou de soja, la nitrate oxydoréductase-NADPH de céréale, d'origine animale ou humaine comme les peroxydase de la salive, la lactoperoxydase, la myeloperoxydase et l'eosinophile peroxydase.

25

Ces peroxydases peuvent être extraites et/ou isolées à partir d'éléments naturels comme par exemple le lait, la salive ou produites par des procédés naturels ou chimiques bien connu de l'homme de l'art. Ces peroxydases peuvent également être produites par des techniques recombinantes, elles aussi bien connues de l'homme de l'art.

30

De préférence les agents de catalyse enzymatique sont choisis parmi les peroxydases.

35

Dans un mode de réalisation préférentiel, la peroxydase est une lactoperoxydase.

Avantageusement les enzymes sont additionnées au milieu réactionnel, dans des proportions variant de 0,02 à 10 g/l de milieu réactionnel.

Les substrats oxydables sont choisis dans le groupe constitué par les halogènes chargés négativement et leurs dérivés et les pseudo halogènes chargés négativement et leurs dérivés. Le terme halogène chargé négativement fait ici référence à certains éléments chimiques sous forme d'anions qui appartiennent au groupe VII du Tableau périodique des éléments et qui sont par exemple les bromures Br^- , les chlorures Cl^- ou les iodures I^- .

Les pseudo-halogènes sont par exemple choisis dans le groupe constitué par les ions thiocyanates, les ions bisulfites, les ions hydrosulfites, les ions metabisulfites, les ions nitrites et/ou hypochlorites.

Les substrats oxydables seront choisis de préférence et en fonction de la peroxydase utilisée parmi les thiocyanates de sodium (NASCN) ou de potassium (KSCN), le bisulfite de sodium (NaHSO_3), l'hydrosulfite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), le metabisulfite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), les nitrites de sodium (NaNO_2) ou de potassium (KNO_2), l'hypochlorite de sodium (NaOCl) et l'iodure de potassium (KI).

Par exemple si la peroxydase est :

- 20 - une peroxydase de la salive on utilisera comme substrat oxydable soient les ions thiocyanates soient les ions iodures et/ou leurs mélanges,
- une lactoperoxydase on utilisera comme substrat oxydable soient les ions thiocyanates soient les ions iodures et/ou leurs mélanges.
- 25 - une myeloperoxydase on utilisera comme substrat oxydable soient les ions thiocyanates soient les ions iodures soient les ions chlorures et/ou leurs mélanges,
- une peroxydase de radis noir on utilisera comme substrat oxydable soient les ions chlorures soient les ions iodures et/ou leurs mélanges,
- 30 - une peroxydase d'origine végétale on utilisera comme substrat oxydable soient les ions thiocyanates soient les ions bromures soient les ions chlorures et/ou leurs mélanges.

Par action de ces systèmes enzymatiques en présence de peroxyde, par exemple de peroxyde d'oxygène on produit notamment des ions hypothiocyanates ou hypoallogénures.

Avantageusement les substrats enzymatiques associés sont additionnés au milieu réactionnel, dans des proportions variant de 0,05 mM à 15 mM par litre de milieu réactionnel.

5 Le donneur d'oxygène selon la présente invention peut être le peroxyde d'hydrogène et tout peroxyde inorganique comme les peroxydes métalliques, par exemple le peroxyde de magnésium ou de sodium ou des peroxydes organiques comme le benzyle peroxyde ou le peroxyde d'urée, mais également l'acide peracétique, le permanganate de potassium et les percarbonates. De
10 manière générale tout composé chimique susceptible de produire du peroxyde d'hydrogène peut être utilisé.

Avantageusement les donneurs d'oxygène sont additionnés au milieu réactionnel, dans des proportions variant de 0,05 mM à 15 mM par litre de milieu réactionnel.

15 Lorsque le donneur d'oxygène est sous forme d'un système enzymatique complémentaire qui produit du peroxyde d'oxygène celui-ci comprend un substrat oxydable et une enzyme par exemple du type oxydoréductase, spécifique de ce substrat. Ainsi lorsque les systèmes
20 enzymatiques utilisés sont des oxydoréductases, pour que l'étape de production du peroxyde d'hydrogène soit réalisée, un substrat oxydable seul ou en association est additionné au milieu, ce substrat sera choisi parmi les substances comme le glucose, le lactose, la xanthine.

On citera à titre d'exemple les systèmes enzymatiques suivants, glucose
25 oxydase/glucose, galactose oxydase/galactose, urate oxydase/urate, choline oxydase/choline, glycine oxydase/glycine, glutamate oxydase/glutamate, alcool oxydase/alcool.

Ces systèmes enzymatiques sont capables en présence d'oxygène et d'eau de produire du peroxyde d'hydrogène qui sera utilisé comme donneur
30 d'oxygène dans le système enzymatique du procédé selon l'invention.

Alternativement ce donneur d'oxygène peut être choisi parmi les microorganismes comme *Streptococcus* et/ou *Lactobacillus* qui peuvent produire du peroxyde d'hydrogène.

35 Parmi les peroxydases et/ou les oxydoréductases utilisées on peut citer à titre d'exemple :

- des enzymes d'origine végétale telles que par exemple la peroxydase du radis noir (E.C. n°1.11.1.7) ou de soja, la nitrate oxydo-réductase-NADPH (E.C. n°1.6.6.1) de céréales,

- des enzymes d'origine fongique telles que par exemple la glucose oxydase (E.C. n°1.1.3.4), la catalase (E.C. n°1.11.1.6), la betagalactosidase (E.C. n°3.2.1.23) et la nitrate oxydo-reductase-NADPH (E.C. n°1.6.6.2) d'*Aspergillus*,

- des enzymes d'origine bactérienne telles que par exemple la NADH-Peroxydase (E.C. n°11.1.1) d'*Enterococcus*, la NADPH oxydoréductase (E.C. n°1.6.99.3) de *Vibrio*, la nitrate réductase (E.C. n°1.9.6.1) de *Colibacilles*, l'oxydase lactique dismutase (E.C. n°1.1.3.2) de *Pediococcus*, la superoxyde dismutase (E.C. n°1.15.1.1) de *Colibacilles*, la peroxydase d'*Arthromyces*, (E.C. n°1.11.1.1), la betagalactosidase (E.C. n°3.2.1.23) de *Colibacille*

des enzymes d'origine animale telles que par exemple la xanthine-oxydase (E.C. n°1.1.3.22) du lait, la lactoperoxydase (E.C. n°1.11.1.7) du lait, la myeloperoxydase leucocytaire (E.C. n°1.11.1.7), l'oxyde nitrique synthétase (E.C. n°1.14.13.39) des tissus nerveux, la superoxyde dismutase (E.C. n°1.15.1.1) d'érythrocytes, la sulfite oxydase (E.C. n°1.8.3.1) d'hépatocytes.

20 La mise en œuvre de l'étape b) du procédé selon l'invention, c'est à dire l'étape de séparation du bain réactionnel aqueux, en une fraction enrichie en agent de catalyse enzymatique en phase solide et divisée et une fraction dépourvue en dit agent de catalyse, à partir de laquelle l'agent de traitement est obtenu est réalisée par des moyens de séparation et récupération des
25 agrégats ou des émulsions. Parmi les moyens mis en œuvre on citera à titre d'exemple les moyens classiquement utilisés comme la décantation, la flottation, la centrifugation pour les émulsions et la sédimentation, filtration frontale ou tangentielle ou une centrifugation pour les floculats ou coagulats et/ou la séparation cyclonique.

30

Le procédé selon l'invention permet d'obtenir un agent de traitement à l'état fluide, par exemple liquide, comprenant à l'état libre au moins une espèce chimique oxygénée stable.

35 Plus particulièrement l'espèce chimique oxygénée stable est l'ion hypothiocyanate (OSCN^-).

L'invention concerne également un agent de traitement à l'état fluide, par exemple liquide, comprenant à l'état libre au moins une espèce chimique oxygénée stable pendant plus de 10 heures.

Elle concerne plus particulièrement un agent de traitement à l'état fluide,
5 par exemple liquide, comprenant à l'état libre au moins l'ion hypothiocyanate stable pendant plus de 10 heures.

Le procédé selon l'invention permet de produire de grandes quantités de solution d'agent de traitement selon l'invention, possédant des propriétés
10 biocides, utilisables pour le nettoyage, lavage et désinfection des matériels, machines, des outils, des textiles, des récipients et tuyauteries et des locaux et établissements industriels agroalimentaires ou des établissements hospitaliers et de soins. Le procédé permet également la préparation de solutions destinées à la formulation de produits cosmétiques et pharmaceutiques
15 destinés à la santé humaine et/ou animale et de produits alimentaires.

Il permet également de produire des solutions de lavage pour la décontamination de surface des produits alimentaires par exemple fruits, légumes, feuilles mais aussi produits animaux.

Ces solutions biocides pourront être utilisées par bain, pulvérisation,
20 injection, brumisation.

Il sera également possible d'utiliser ces solutions comme constituant d'une composition de produit, par exemple eau de reconstitution de jus de fruit après déshydratation, concentration.

Le procédé permet également d'aseptiser et purifier des eaux destinées
25 à la production d'eaux de boissons pour la consommation humaine ou animale, ou des eaux thermales, des eaux de piscines, de bains.

Le procédé selon l'invention permet également le traitement des eaux polluées, eaux usées ou effluents industriels, voire effluents gazeux par circulation dans le liquide.

Les contaminants chimiques par exemple nitrates ou phosphates sont
30 ainsi oxydés, et les polluants organiques également, en fonction des débits et des concentrations en oxydoréductase, la dégradation pourra être totale ou partielle.

La mise en œuvre du procédé selon l'invention, c'est à dire un
35 procédé de production enzymatique d'un agent de traitement à l'état fluide, par exemple liquide, comprenant à l'état libre au moins une espèce chimique

oxygénée, par mise en contact d'au moins un agent de catalyse enzymatique comprenant au moins une enzyme du type peroxydase, un donneur d'oxygène et un substrat oxydable susceptible d'être oxydé par ledit agent de catalyse enzymatique, en générant ladite espèce chimique oxygénée à l'état libre, est effectuée dans un réacteur (Figure 1) constitué d'une cuve compartimentée qui peut être close en partie ou en totalité, métallique ou en matériau synthétique dotée d'un orifice de chargement (1) et de surverses et/ou de cloisons siphonides, permettant le passage d'un compartiment à l'autre (2).

Le réacteur, selon l'invention, comporte trois ou quatre compartiments dont deux ou trois sont soumis à une agitation permanente :

- le premier (3) est destiné à recevoir l'agent de catalyse enzymatique, optionnellement le coagulant et l'agent épaississant, il est soumis à une agitation à vitesse rapide,
- le second (4) reçoit optionnellement le flocculant et optionnellement le correcteur de pH, il est soumis à une agitation à vitesse lente,
- le troisième où l'apport de substrat oxydable est effectué, ainsi que l'apport en donneur d'oxygène, est le siège de la réaction enzymatique souhaitée et est également soumis à une agitation à vitesse lente,
- dans le quatrième compartiment, la séparation du bain réactionnel aqueux, en une fraction enrichie en agent de catalyse enzymatique en phase solide et divisée, et une fraction dépourvue en dit agent de catalyse, à partir de laquelle l'agent de traitement est obtenu, est effectuée sur un sédimenteur lamellaire qui comporte une alimentation basse (6), une surverse (7) reliée à l'orifice de sortie placée juste en dessous du fil de l'eau (8), un point bas d'extraction dynamique des matières solides sédimentées (9) en vue de leur évacuation (10) ou de leur reprise en vue d'un recyclage (11).

Dans une variante de réalisation, la mise en œuvre du procédé selon l'invention, c'est à dire un procédé de production enzymatique d'un agent de traitement à l'état fluide, par exemple liquide, comprenant à l'état libre au moins une espèce chimique oxygénée, par mise en contact d'au moins un agent de catalyse enzymatique comprenant au moins une enzyme du type peroxydase, un donneur d'oxygène et un substrat oxydable susceptible d'être oxydé par ledit agent de catalyse enzymatique, en générant ladite espèce chimique oxygénée à l'état libre, est effectuée dans un réacteur (Figure 2) constitué d'une cuve compartimentée qui peut être close en partie ou en totalité,

métallique ou en matériau synthétique dotée d'un orifice de chargement (1) de surverses permettant le passage d'un compartiment à l'autre comportant trois compartiments dont les deux premiers sont soumis à une agitation permanente.

- 5 - le premier dans lequel est introduit l'agent de catalyse enzymatique et l'agent émulsifiant est soumis à une agitation rapide,
- le second dans lequel l'apport de substrat oxydable est effectué et qui est le siège de la réaction enzymatique souhaitée est agité à vitesse lente ;
- le troisième compartiment est un pot de reprise (5) qui permet le
- 10 pompage en continu de l'émulsion, de la solution comprenant au moins une espèce chimique oxygénée à l'état libre et des substrats résiduels vers une unité de séparation qui peut être un coalesceur, un flottateur, une centrifugeuse (6), un filtre ou un cyclone.

 Par application du procédé selon l'invention à la production de solution

15 d'espèces chimiques oxygénées en solution par la mise en œuvre sous forme de floculat de la lactoperoxydase, en présence de 0.2 à 0.5 mM, de H₂O₂ et 0.4 à 1 mM de KSCN, on obtient une solution aqueuse qui contient entre 0.05 et 0.35 mM de d'espèces chimiques oxygénées.

 Cette solution utilisée pour le lavage et la décontamination de salades

20 par douches et bains successifs à 10°C permettent une réduction significative (2 à 5 Log en moyenne) de la population des contaminants bactériens comme les *Pseudomonas* (10⁵ CFU/ml) et une réduction significative de 1 à 2 Log sur les *Listeria* (10⁵ CFU/ml) par rapport aux salades témoins non traitées, avec un temps de contact de l'ordre de 10 minutes.

25

Exemples :

 Dans un réacteur tel que décrit à la Figure 2, 0.25 g/l de lactoperoxydase sont introduits simultanément à 10 g/l d'argile et 0.55 ml de

30 coagulant, après agitation et passage dans le compartiment réactionnel, des quantités variables de KSCN et de H₂O₂ sont introduites selon le tableau 1 ci-dessous,

Tableau 1

	1	2	3	4
KSCN (mM)	0.5	0.6	0.7	0.8
H₂O₂ (mM)	0.3	0.4	0.5	0.6

Après réaction des prélèvements sont effectués pour mesurer l'activité enzymatique et le taux d'espèces chimiques libres obtenu.

Les ions hypothiocyanates (OSCN⁻) sont capables de réagir avec les groupements sulfhydryls d'une molécule d'acide (5,5'-dithiobis) 2-nitrobenzoïque préalablement réduite en présence d'un excès de borohydrure de sodium.

Cette molécule réduite absorbe la lumière à une longueur d'onde de 412 nm.

Lorsque les ions hypothiocyanates (OSCN⁻) oxydent les groupements sulfhydryls, l'absorbance à 412 nm diminue proportionnellement à la quantité d'ions présents dans l'échantillon, ce qui permet de les quantifier.

L'ion thiocyanate (SCN⁻) est capable de réagir avec FeCl₃ en milieu acide, pour former un produit coloré dont la quantité, proportionnelle à celle du thiocyanate présent, est mesurable par photométrie à une longueur d'onde de 450 nm.

La mesure de la quantité de thiocyanate contenu dans un échantillon nécessite la réalisation d'une gamme d'étalonnage.

Tableau 2 :

		1	2	3	4
OSCN⁻	ΔDO_{412nm}	0.855 ^{1/2}	0.999 ^{1/2}	1.250 ^{1/2}	1.320 ^{1/2}
	[OSCN]mM	0.190	0.220	0.275	0.290
SCN⁻ Initial	DO_{450nm}	0.242	0.252	0.279	0.310
	[SCN⁻]mM	0.67	0.70	0.77	0.86
SCN⁻ résiduel	DO_{450nm}	0.184	0.186	0.210	0.237
	[SCN⁻]mM	0.51	0.52	0.58	0.66
pH		6.66	6.62	6.63	6.59
Qualité coagulation		3/5	3/5	3/5	2.5/5

L'activité enzymatique initiale du réacteur est contrôlée dans l'essai n°4.

Celle-ci est réalisée à partir de 50 μ l de coagulat et correspond à :

$$\Delta DO_{405nm} / 10 \text{ secondes} = 1,023$$

L'activité enzymatique est mesurée à l'aide d'un substrat chromogène le 2-
5 2' Azino-bis ou ABTS par colorimétrie à 405 nm.

La lactoperoxydase catalyse l'oxydation de l'ABTS en présence de peroxyde
d'hydrogène. La molécule d'ABTS oxydée présente la caractéristique
d'absorber à 405 nm, ce qui permet de mesurer l'activité d'une solution
enzymatique en suivant la quantité d'ABTS oxydée produite (proportionnelle à
10 la DO_{405nm} d'après la loi de Beer Lambert) par unité de temps, ceci en
mesurant en continu l'absorbance à 405 nm

Suivi de la stabilité de la solution.

15 On effectue un suivi de l'évolution de la concentration en ion
hypothiocyanate $OSCN^-$ dans les solutions en sortie de réacteur par les
méthodes décrites ci-dessus.

Les résultats obtenus sont illustrés sur les figures 3 et 4, qui représente
la courbe de l'évolution de la concentration en ion hypothiocyanate $OSCN^-$,
20 dans l'eau de sortie de réacteur sur une période de 1 jour (Figure 4) et 4 jours
(Figure 3).

Les résultats obtenus montrent (voir Figure 4) qu'après 10 heures la
concentration de $OSCN^-$ passe de 600mM à 500mM, et qu'après 20 heures
cette concentration n'a chuté que de 50 %.

25 Sur une période de 4 jours, on obtient (voir Figure 3) une courbe qui
démontre une concentration résiduelle en ion hypothiocyanate $OSCN^-$, après
80 heures, égale à 16 % de la concentration initiale.

REVENDEICATIONS

5 1. Procédé de production enzymatique d'un agent de traitement à l'état fluide, par exemple liquide, comprenant à l'état libre au moins une espèce chimique oxygénée, par mise en contact d'au moins :

- un agent de catalyse enzymatique, comprenant au moins une enzyme du type peroxydase,
- 10 - et un substrat oxydable en phase aqueuse susceptible d'être oxydé par action d'un donneur d'oxygène, par catalyse par ledit agent de catalyse enzymatique, en générant ladite espèce chimique oxygénée à l'état libre,
- ledit donneur d'oxygène,

15 caractérisé en ce que :

- c) on forme un bain réactionnel aqueux comprenant, outre le substrat oxydable et le donneur d'oxygène, ledit agent de catalyse enzymatique en phase solide et divisée, mais à l'état libre, distribué dans ledit bain, lequel est éventuellement mis en mouvement,
- 20 d) on sépare le bain réactionnel aqueux, en une fraction enrichie en agent de catalyse enzymatique en phase solide et divisée, et une fraction dépourvue en dit agent de catalyse, à partir de laquelle l'agent de traitement est obtenu.

25 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on introduit dans le bain réactionnel, l'agent de catalyse enzymatique, à l'état de phase solide et divisée.

3 Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on introduit dans le bain réactionnel, l'agent de catalyse enzymatique en phase liquide.

30 4. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on introduit dans le bain réactionnel aqueux, le substrat oxydable, éventuellement en phase aqueuse.

35 5. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on introduit dans le bain réactionnel aqueux, le donneur d'oxygène, éventuellement en phase aqueuse.

6. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on évacue du bain réactionnel l'agent de catalyse enzymatique.

7. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est pratiqué en continu, ou de manière discontinue.

5 8. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'agent de catalyse enzymatique en phase solide est suspendu dans le bain réactionnel, sous forme d'émulsion, et éventuellement on introduit dans ledit bain un agent émulsifiant.

10 9. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on forme dans le bain réactionnel aqueux des agrégats de particules solides inertes vis-à-vis de l'agent de catalyse enzymatique, lesdits agrégats comprenant ou incorporant, à l'état libre, ledit agent de catalyse, et lesdits agrégats étant distribués dans le bain réactionnel aqueux, moyennant quoi, pendant l'étape (b) on sépare ledit bain en une fraction enrichie en agrégat, et une fraction
15 dépourvue d'agrégat, à partir de laquelle l'agent de traitement est obtenu.

10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que les agrégats sont des flocons, et on introduit dans le bain réactionnel, un agent de floculation, par exemple anionique ou cationique.

20 11. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que les agrégats sont des coagulats, et on introduit dans le bain réactionnel, un agent coagulant.

12. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que on introduit dans le bain réactionnel un agent coagulant et un agent floculant.

25 13. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que on introduit dans le bain réactionnel un agent épaississant.

14. Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que l'agent épaississant est choisi parmi les argiles, le kaolin, la silice ou les silicates.

30 15. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'agent de catalyse comprend un microorganisme exprimant au moins une enzyme du type peroxydase.

16. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on introduit dans le bain un agent correcteur de pH.

35 17. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on introduit dans le bain un donneur d'oxygène sous forme d'un système enzymatique complémentaire qui produit du peroxyde d'hydrogène, et l'agent

de catalyse enzymatique comprend, outre l'enzyme du type peroxydase, une enzyme du type oxydoréductase.

18. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'agent de catalyse enzymatique est choisi
5 parmi les peroxydases.

19. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que la peroxydase est une lactoperoxydase

20. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le substrat oxydable est choisi parmi le
10 groupe constitué par les thiocyanates de sodium (NASCN) ou de potassium (KSCN), le bisulfite de sodium (NaHSO_3), l'hydrosulfite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), le métabisulfite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), les nitrites de sodium (NaNO_2) ou de potassium (KNO_2), l'hypochlorite de sodium (NaOCl) et l'iodure de potassium (KI).

21. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le donneur d'oxygène est le peroxyde
15 d'hydrogène.

22. Ensemble de réactifs pour la production enzymatique d'un agent de traitement à l'état fluide, comprenant à l'état libre au moins une
20 espèce chimique oxygénée caractérisé en ce qu'il comprend un agent de catalyse enzymatique et un agent d'agrégation en phase aqueuse.

23. Ensemble de réactifs pour la production enzymatique d'un agent de traitement à l'état fluide, comprenant à l'état libre au moins une
25 espèce chimique oxygénée caractérisé en ce qu'il comprend un agent de catalyse enzymatique et un agent de floculation en phase aqueuse.

24. Ensemble de réactifs pour la production enzymatique d'un agent de traitement à l'état fluide, comprenant à l'état libre au moins une
30 espèce chimique oxygénée caractérisé en ce qu'il comprend un agent de catalyse enzymatique et un agent de coagulation en phase aqueuse.

25. Ensemble de réactifs pour la production enzymatique d'un agent de traitement à l'état fluide, comprenant à l'état libre au moins une
35 espèce chimique oxygénée caractérisé en ce qu'il comprend un agent de catalyse enzymatique et un agent épaississant.

26. Ensemble de réactifs selon l'un quelconque des revendications
22 à 25, caractérisé en ce que l'agent de catalyse enzymatique est choisi parmi
les peroxydases.

27. Ensemble de réactifs selon la revendication 26, caractérisé en ce que la peroxydase est une lactoperoxydase.

28. Agent de traitement à l'état fluide, par exemple liquide, comprenant à l'état libre au moins une espèce chimique oxygénée stable.

5 29. Agent de traitement selon la revendication 28, caractérisé en ce que l'espèce chimique oxygénée stable est l'ion hypothiocyanate (OSCN^-).

30. Agent de traitement selon la revendication 28 ou 29, caractérisé en ce que l'espèce chimique oxygénée est stable pendant plus de 10 heures.

10 31. Réacteur, caractérisé en ce qu'il comporte trois ou quatre compartiments dont deux ou trois sont soumis à une agitation permanente :

- le premier est destiné à recevoir l'agent de catalyse enzymatique, optionnellement le coagulant et l'agent épaississant, il est soumis à une agitation à vitesse rapide,

15 - le second reçoit optionnellement le floculant et optionnellement le correcteur de pH, il est soumis à une agitation à vitesse lente,

- le troisième où l'apport de substrat oxydable est effectué, ainsi que l'apport en donneur d'oxygène, est le siège de la réaction enzymatique souhaitée et est également soumis à une agitation à vitesse lente,

20 - le quatrième compartiment, dans lequel la séparation du bain réactionnel aqueux, en une fraction enrichie en agent de catalyse enzymatique en phase solide et divisée, et une fraction dépourvue en dit agent de catalyse, à partir de laquelle l'agent de traitement est obtenu, est effectuée, comporte des moyens de séparation desdites fractions.

25 32. Réacteur selon la revendication 31, caractérisé en ce que les moyens de séparation desdites fractions sont choisis parmi la décantation, la flottation, la centrifugation, la filtration et/ou la séparation cyclonique.

FIGURE 1

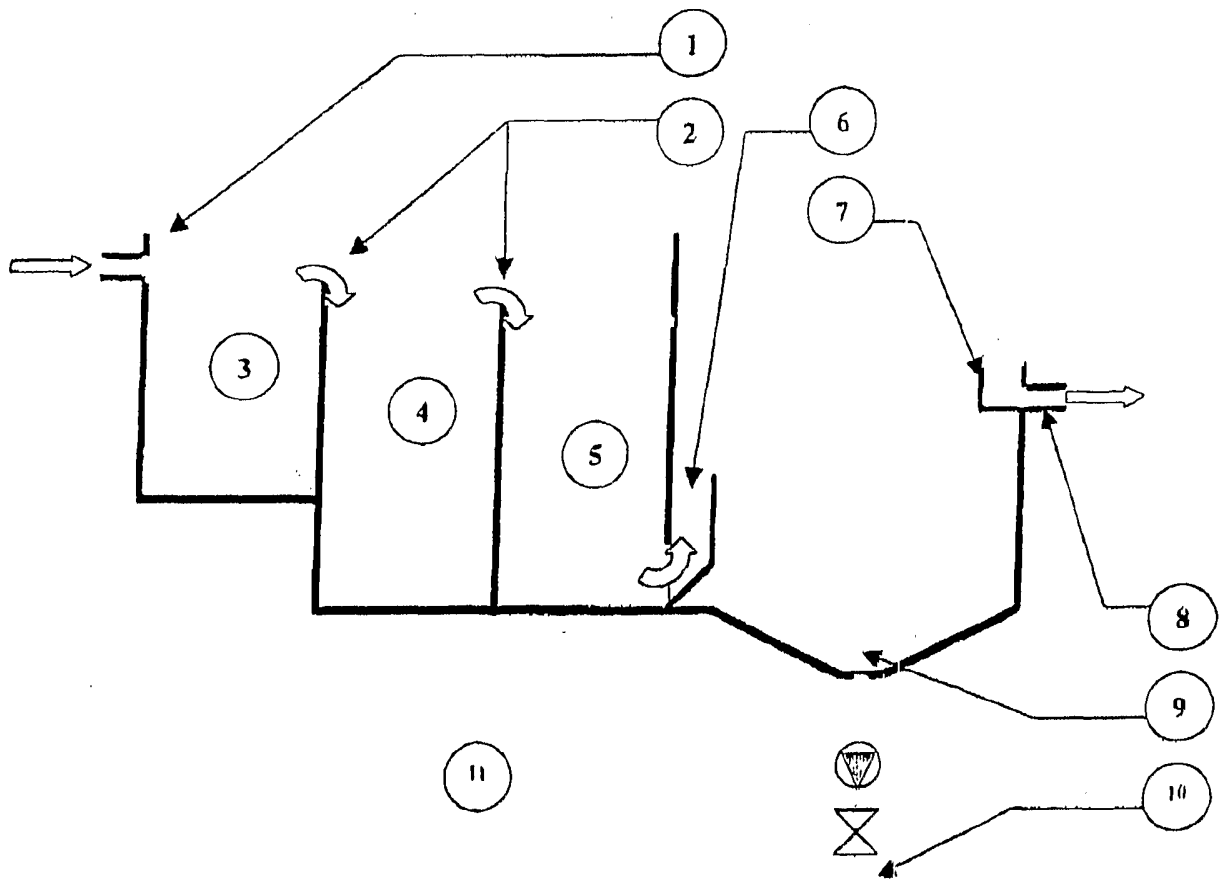


FIGURE 2

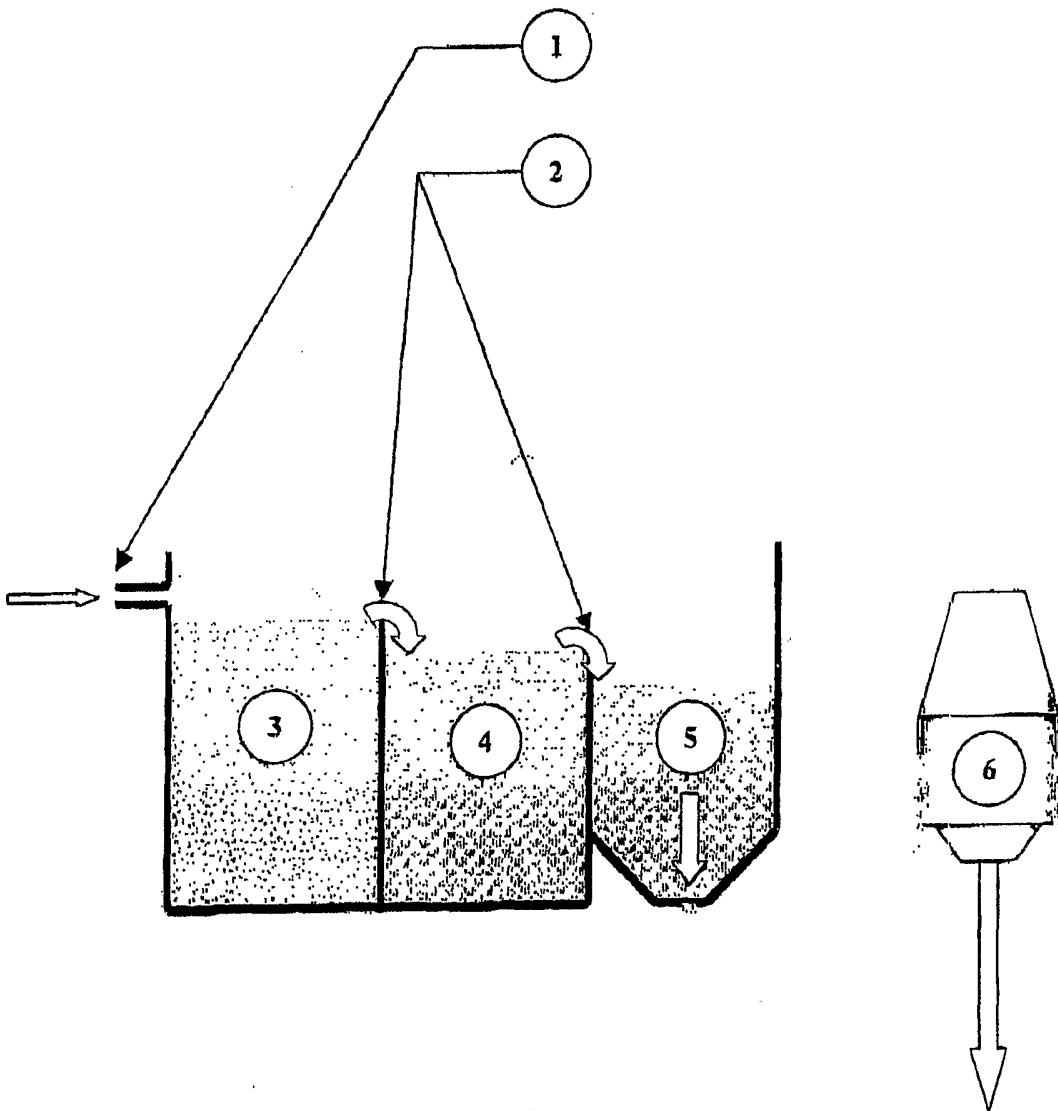


FIGURE 3

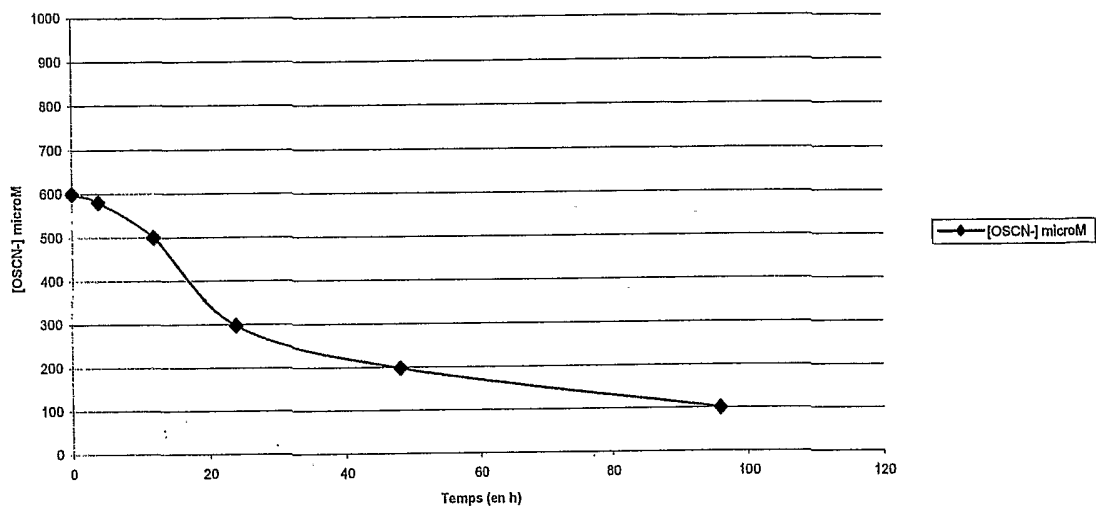
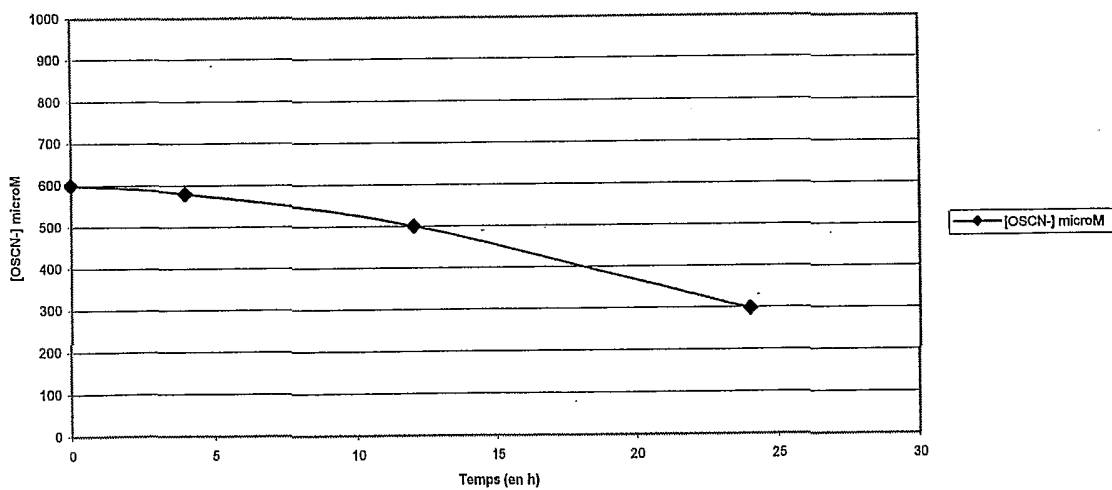


FIGURE 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/FR 02/01844

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N9/08 C12P3/00 C12N11/00 A61L2/16 A01N59/24 A01N63/00 C12M1/40		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C12P A61L A01N C12M		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, FSTA		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MARSHALL V M E ET AL: "COMPARISON OF THE ANTI BACTERIAL ACTIVITY OF THE HYPO THIO CYANITE ANION TOWARDS STREPTOCOCCUS-LACTIS AND ESCHERICHIA-COLI" JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY, vol. 120, no. 2, 1980, pages 513-516, XP001053150 ISSN: 0022-1287 page 513, last paragraph page 514, paragraphs 1,2 ---	1-7, 18-21, 28-30
A	GB 2 209 523 A (GLAVERBEL) 17 May 1989 (1989-05-17) the whole document ---	1-32
A	EP 0 397 227 A (BIO SERAE LAB) 14 November 1990 (1990-11-14) the whole document ---	1-32
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
° Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 29 October 2002		Date of mailing of the international search report 11/11/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Lejeune, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 02/01844

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 518 445 A (GIST BROCADES NV) 16 December 1992 (1992-12-16) the whole document ---	1-32
X	US 4 761 380 A (DESMONS PIERRE ET AL) 2 August 1988 (1988-08-02) the whole document ---	31, 32
A	MORENO M ET AL: "ALCOHOL FERMENTATION IN STRICT ANAEROBIOSIS IN A PLUG FLOW FERMENTOR EFFECT OF CELL RE CYCLING" BIOTECHNOLOGY LETTERS, vol. 1, no. 12, 1979, pages 483-488, XP008009708 ISSN: 0141-5492 the whole document -----	31, 32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/FR 02/01844

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB 2209523	A	17-05-1989	LU 86987 A1	06-04-1989
			AU 2171788 A	09-03-1989
			BE 1000875 A3	02-05-1989
			CA 1326209 A1	18-01-1994
			DE 3830123 A1	16-03-1989
			DK 498088 A	08-03-1989
			ES 2008620 A6	16-07-1989
			FI 884091 A ,B,	08-03-1989
			FR 2619990 A1	10-03-1989
			IT 1223794 B	29-09-1990
			JP 1093444 A	12-04-1989
			JP 2542243 B2	09-10-1996
			NL 8802169 A	03-04-1989
			NO 883945 A ,B,	08-03-1989
			SE 503238 C2	22-04-1996
SE 8803124 A	08-03-1989			
EP 0397227	A	14-11-1990	FR 2646777 A1	16-11-1990
			AT 96680 T	15-11-1993
			CA 2014847 A1	12-11-1990
			DE 69004329 D1	09-12-1993
			DE 69004329 T2	19-05-1994
			EP 0397227 A1	14-11-1990
			ES 2059990 T3	16-11-1994
			JP 3003045 B2	24-01-2000
			JP 3193708 A	23-08-1991
			KR 149997 B1	15-10-1998
			US 5206156 A	27-04-1993
EP 0518445	A	16-12-1992	AT 136740 T	15-05-1996
			AU 652279 B2	18-08-1994
			AU 2275392 A	12-01-1993
			DE 69209894 D1	23-05-1996
			DE 69209894 T2	05-09-1996
			EP 0518445 A1	16-12-1992
			IE 921889 A1	16-12-1992
			JP 6500700 T	27-01-1994
			WO 9222221 A1	23-12-1992
			NZ 243106 A	27-09-1994
			US 5747078 A	05-05-1998
US 4761380	A	02-08-1988	EP 0211109 A1	25-02-1987
			JP 62058985 A	14-03-1987

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D e Internationale No
PCT/FR 02/01844

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12N9/08 C12P3/00 C12N11/00 A61L2/16 A01N59/24
A01N63/00 C12M1/40

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N C12P A61L A01N C12M

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, FSTA

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	MARSHALL V M E ET AL: "COMPARISON OF THE ANTI BACTERIAL ACTIVITY OF THE HYPO THIO CYANITE ANION TOWARDS STREPTOCOCCUS-LACTIS AND ESCHERICHIA-COLI" JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY, vol. 120, no. 2, 1980, pages 513-516, XP001053150 ISSN: 0022-1287 page 513, dernier alinéa page 514, alinéas 1,2 ---	1-7, 18-21, 28-30
A	GB 2 209 523 A (GLAVERBEL) 17 mai 1989 (1989-05-17) le document en entier ---	1-32
A	EP 0 397 227 A (BIO SERAE LAB) 14 novembre 1990 (1990-11-14) le document en entier ---	1-32
	-/--	



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

29 octobre 2002

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

11/11/2002

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Lejeune, R

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP 0 518 445 A (GIST BROCADES NV) 16 décembre 1992 (1992-12-16) le document en entier -----	1-32
X	US 4 761 380 A (DESMONS PIERRE ET AL) 2 août 1988 (1988-08-02) le document en entier -----	31,32
A	MORENO M ET AL: "ALCOHOL FERMENTATION IN STRICT ANAEROBIOSIS IN A PLUG FLOW FERMENTOR EFFECT OF CELL RE CYCLING" BIOTECHNOLOGY LETTERS, vol. 1, no. 12, 1979, pages 483-488, XP008009708 ISSN: 0141-5492 le document en entier -----	31,32

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D...Je Internationale No

PCT/FR 02/01844

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
GB 2209523	A	17-05-1989	LU 86987 A1	06-04-1989
			AU 2171788 A	09-03-1989
			BE 1000875 A3	02-05-1989
			CA 1326209 A1	18-01-1994
			DE 3830123 A1	16-03-1989
			DK 498088 A	08-03-1989
			ES 2008620 A6	16-07-1989
			FI 884091 A ,B,	08-03-1989
			FR 2619990 A1	10-03-1989
			IT 1223794 B	29-09-1990
			JP 1093444 A	12-04-1989
			JP 2542243 B2	09-10-1996
			NL 8802169 A	03-04-1989
			NO 883945 A ,B,	08-03-1989
			SE 503238 C2	22-04-1996
SE 8803124 A	08-03-1989			
EP 0397227	A	14-11-1990	FR 2646777 A1	16-11-1990
			AT 96680 T	15-11-1993
			CA 2014847 A1	12-11-1990
			DE 69004329 D1	09-12-1993
			DE 69004329 T2	19-05-1994
			EP 0397227 A1	14-11-1990
			ES 2059990 T3	16-11-1994
			JP 3003045 B2	24-01-2000
			JP 3193708 A	23-08-1991
			KR 149997 B1	15-10-1998
			US 5206156 A	27-04-1993
EP 0518445	A	16-12-1992	AT 136740 T	15-05-1996
			AU 652279 B2	18-08-1994
			AU 2275392 A	12-01-1993
			DE 69209894 D1	23-05-1996
			DE 69209894 T2	05-09-1996
			EP 0518445 A1	16-12-1992
			IE 921889 A1	16-12-1992
			JP 6500700 T	27-01-1994
			WO 9222221 A1	23-12-1992
			NZ 243106 A	27-09-1994
			US 5747078 A	05-05-1998
US 4761380	A	02-08-1988	EP 0211109 A1	25-02-1987
			JP 62058985 A	14-03-1987