



**HAL**  
open science

**Procédé par lequel on modifie la viabilité d'un  
microorganisme lyophilisé par conditionnement de son  
milieu de croissance par des gaz**

Rémy Cachon, Carole Delbeau, Gilles Feron, Henry Ledon

► **To cite this version:**

Rémy Cachon, Carole Delbeau, Gilles Feron, Henry Ledon. Procédé par lequel on modifie la viabilité d'un microorganisme lyophilisé par conditionnement de son milieu de croissance par des gaz. N° de brevet: 2006-08-25 (BOPI 2006-34). 2005, 21 p. hal-02819271

**HAL Id: hal-02819271**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02819271>**

Submitted on 6 Jun 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/FR2006/050140

International filing date: 16 February 2006 (16.02.2006)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: FR  
Number: 0550483  
Filing date: 22 February 2005 (22.02.2005)

Date of receipt at the International Bureau: 18 April 2006 (18.04.2006)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)





# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 22 MARS 2006

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Planche', is written over a horizontal line.

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr





**BREVET D'INVENTION**  
**CERTIFICAT D'UTILITÉ**



26bis, rue de Saint-Pétersbourg  
75800 Paris Cédex 08  
Téléphone: 01 53.04.53.04 Télécopie: 01.53.04.52.65

Code de la propriété intellectuelle-livre VI

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

DATE DE REMISE DES PIÈCES: N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL: DÉPARTEMENT DE DÉPÔT: DATE DE DÉPÔT:	Sylvie MELLUL-BENDELAC L'AIR LIQUIDE SA 75 quai d'Orsay 75321 PARIS CEDEX 07 France
Vos références pour ce dossier: S6749SMBMR	

<b>1 NATURE DE LA DEMANDE</b>	
Demande de brevet	
<b>2 TITRE DE L'INVENTION</b>	
PROCEDE PAR LEQUEL ON MODIFIE LA VIABILITE D'UN MICROORGANISME LYOPHILISE PAR CONDITIONNEMENT DE SON MILIEU DE CROISSANCE PAR DES GAZ	
<b>3 DECLARATION DE PRIORITE OU REQUETE DU BENEFICE DE LA DATE DE DEPOT D'UNE DEMANDE ANTERIEURE FRANCAISE</b>	Pays ou organisation      Date      N°
<b>4-1 DEMANDEUR</b>	
Nom Suivi par Rue Code postal et ville Pays Nationalité Forme juridique N° SIREN N° de téléphone N° de télécopie Courrier électronique	L'AIR LIQUIDE-SOCIÉTÉ ANONYME À DIRECTOIRE ET CONSEIL DE SURVEILLANCE Sylvie MELLUL-BENDELAC 75, Quai d'Orsay 75007 PARIS France France Société anonyme 552 096 281 0140625753 01 40 62 56 95 sylvie.mellul-bendelac@airliquide.com

5A MANDATAIRE					
Nom	MELLUL-BENDELAC				
Prénom	Sylvie				
Qualité	Liste spéciale, Pouvoir général: 10568				
Cabinet ou Société	L'AIR LIQUIDE SA				
Rue	75 quai d'Orsay				
Code postal et ville	75321 PARIS CEDEX 07				
N° de téléphone	0140625753				
N° de télécopie	01 40 62 56 95				
Courrier électronique	sylvie.mellul-bendelac@airliquide.com				
6 DOCUMENTS ET FICHIERS JOINTS		Fichier électronique	Pages	Détails	
Texte du brevet		textebrevet.pdf	14	D 11, R 2, AB	
Désignation d'inventeurs		Design.PDF			
Pouvoir général					
7 MODE DE PAIEMENT					
Mode de paiement		Prélèvement du compte courant			
Numéro du compte client		516			
8 RAPPORT DE RECHERCHE					
Établissement immédiat					
9 REDEVANCES JOINTES		Devise	Taux	Quantité	Montant à payer
062 Dépôt		EURO	0.00	1.00	0.00
063 Rapport de recherche (R.R.)		EURO	320.00	1.00	320.00
068 Revendication à partir de la 11ème		EURO	15.00	1.00	15.00
Total à acquitter		EURO			335.00

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

**Signé par**

Signataire: FR, L' Air Liquide SA, S.Mellul-Bendelac  
 Emetteur du certificat: DE, D-Trust GmbH, D-Trust for EPO 2.0

**Fonction**

Mandataire agréé (Mandataire 1)



## BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

### Réception électronique de la soumission

Il est certifié par la présente qu'une demande de brevet (ou de certificat d'utilité) a été reçue par le biais du dépôt électronique sécurisé de l'INPI. Après réception, un numéro d'enregistrement et une date de réception ont été attribués automatiquement.

Demande de brevet: X

Demande de CU:

<b>DATE DE RECEPTION</b>	22 février 2005	<b>Dépôt en ligne: X</b>
<b>TYPE DE DEPOT</b>	INPI (PARIS) - Dépôt électronique	
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>	0550483	<b>Dépôt sur support CD:</b>
<b>ATTRIBUE PAR L'INPI</b>		
<b>Vos références pour ce dossier</b>	S6749SMBMR	

**DEMANDEUR**

Nom ou dénomination sociale	L'AIR LIQUIDE-SOCIÉTÉ ANONYME À DIRECTOIRE ET CONSEIL DE SURVEILLANCE
Nombre de demandeur	1
Pays	FR

**TITRE DE L'INVENTION**

PROCEDE PAR LEQUEL ON MODIFIE LA VIABILITE D'UN MICROORGANISME LYOPHILISE PAR  
CONDITIONNEMENT DE SON MILIEU DE CROISSANCE PAR DES GAZ

**DOCUMENTS ENVOYES**

Comment.PDF	ValidLog.PDF	package-data.xml
Design.PDF	application-body.xml	request.xml
FR-office-specific-info.xml	fee-sheet.xml	textebrevet.pdf
Requetefr.PDF	indication-bio-deposit.xml	

**EFFECTUE PAR**

Effectué par:	CN=S.Mellul-Bendelac,O=L' Air Liquide SA,C=FR
Date et heure de réception électronique:	22 février 2005 11:17:58
Empreinte officielle du dépôt	D4:D6:97:83:F0:C6:23:EF:54:23:DE:BF:CA:8A:3F:C2:65:1E:CE:FA

/ PARIS, Section Dépôt /

La présente invention concerne le domaine de la fabrication des microorganismes lyophilisés, notamment des bactéries lyophilisées, et elle s'intéresse en particulier aux bactéries lactiques lyophilisées, en s'attachant à proposer de nouvelles conditions opératoires permettant  
5 d'augmenter la viabilité des microorganismes lyophilisés au cours de leur conservation ultérieure.

Rappelons que tous les types de micro-organismes (bactéries, levures, moisissures...) sont a priori lyophilisables, la lyophilisation est utilisée notamment pour conserver les souches dans les collections de  
10 micro-organismes. La lyophilisation est par exemple pratiquée sur des bactéries lactiques, des souches probiotiques, des levures, et pour des utilisations industrielles très diverses.

Rappelons également que l'on utilise des microorganismes en particulier pour la bio-transformation de matières premières dans le cadre  
15 de :

- la fabrication d'un produit fini (fromage, yaourt, vin, bière, pain...)
- la fabrication de biomasse destinée à l'alimentation humaine ou animale (extrait et poudre de levure, de probiotiques...)
- 20 - la production de molécules spécifiques d'intérêt (enzymes, antibiotiques, acides aminés, arômes ...)
- l'épuration des effluents industriels, traitement des déchets organiques...  
etc...

25 En considérant dans ce qui suit l'exemple des bactéries lactiques, l'exploitation industrielle des bactéries lactiques comme levains et cultures probiotiques dépend fortement des technologies de préservation employées afin de garantir des cultures stables c'est-à-dire viables et actives à long terme. La congélation et la lyophilisation sont  
30 communément utilisées dans ce but, mais ces techniques apportent des effets secondaires indésirables qui sont la dénaturation des protéines et la diminution de la viabilité cellulaire. Des recherches menées chez



*Lactobacillus bulgaricus* (*Lb. bulgaricus*) durant le séchage et la conservation ont identifié des facteurs tels que la température et l'activité de l'eau des poudres séchées comme des paramètres critiques qui pouvaient affecter la survie (voir notamment le travail de Castro et al paru 5 en 1995 dans *Applied Microbiology and Biotechnology*. 44:172-176). La perte de viabilité des poudres est la conséquence de dommages cellulaires ; les cibles préférentielles sont la paroi cellulaire, la membrane cellulaire et l'ADN, ainsi que l'oxydation des lipides membranaires (voir l'article de Carvalho *et al* paru en 2004, dans *International Dairy Journal*. 10 14 : 835-847).

L'optimisation de la survie des cultures de bactéries lactiques congelées ou lyophilisées et leur conservation pendant de longues périodes revêtent donc une importance certaine, à la fois technologique et économique.

15 Rappelons que la production de souches lyophilisées s'effectue à partir d'une souche mère et comprend en général 4 étapes : ensemencement, culture en cuve, concentration, conservation. On se reportera par exemple aux ouvrages suivants : « Freeze Drying and Advanced Food Technology », Goldblith et al, Academic Press en 1975, 20 ou encore « Traité de Lyophilisation », Louis Rey, paru chez Hermann en 1960.

L'ensemencement s'effectue à partir d'une culture concentrée et dans un état physiologique optimal. Plusieurs techniques peuvent être utilisées parmi lesquelles :

- 25
- l'utilisation de pied de cuve,
  - la méthode par repiquages successifs,
  - l'ensemencement direct,
  - l'ensemencement en continu.

L'étape de culture proprement dite a lieu en cuve, sous 30 agitation ou non, dans un milieu de culture dont la composition est adaptée aux besoins spécifiques de chaque micro-organisme. Comme on le verra par exemple dans les ouvrages cités ci-dessus, la composition du

milieu de culture peut être extrêmement variée, mais on cite couramment la présence d'un ou plusieurs éléments parmi les polysaccharides, le glycérol, le lait, le glucose etc...

De même les paramètres tels que par exemple le pH, la  
5 température, la pression d'oxygène dissous peuvent être réglés.

Il existe différents types de culture :

- la culture discontinue ou batch, utilisée notamment pour la production de ferments lactiques ou de levure de panification,

- la culture semi-continue ou « fed-batch », utilisée par  
10 exemple pour la production de ferments sensibles à un produit de la fermentation ou pour la production de biomasse sensible à l'inhibition par le substrat de la fermentation,

la culture continue sans ou avec recyclage, cette dernière étant utilisée notamment pour la production de ferments, de  
15 molécules d'intérêt, et pour l'épuration biologique d'eaux résiduaires.

L'étape de conservation peut se faire sous forme liquide, par congélation, par cryo-conservation, par lyophilisation ou par séchage. Des agents protecteurs sont utilisés pour préserver les micro-organismes des effets néfastes des traitements de conservation.

20 La lyophilisation est on le sait une opération de déshydratation à basse température qui consiste à éliminer par sublimation, la majeure partie de l'eau contenue dans le produit après congélation.

On sait par ailleurs que le potentiel redox (souvent appelé dans la littérature Eh) est un paramètre physico-chimique qui, de par sa nature,  
25 est présent dans tous les milieux, pourvu que ceux-ci contiennent au moins une molécule qui puisse passer d'un état oxydé à réduit et vice versa. C'est pourquoi son effet est perceptible sur toutes les fonctions cellulaires. Son action a été montrée sur différents types de microorganismes et notamment de souches bactériennes :

30 - L'ajout de réducteurs chimiques dans les milieux de culture a déjà permis de modifier significativement la croissance et les flux

métaboliques chez *Corynebacterium glutamicum*,  
*Clostridium acetobutylicum*, *Sporidiobolus*, et *Escherichia coli*.

5 - Un Eh réducteur fixé par des gaz a permis de modifier les flux métaboliques chez *Saccharomyces cerevisiae* avec une augmentation du ratio glycérol/éthanol et l'accumulation des sucres de réserve avec augmentation de la survie des levures lors de la conservation à l'état liquide (on se reportera au document FR-2 811 331 au nom de la Demanderesse).

10 En milieu industriel, le Eh est déjà indirectement pris en compte au travers de l'oxygène dont l'effet inhibiteur sur les bactéries lactiques est bien identifié. Cet effet est dû à leur incapacité à synthétiser des cytochromes et les enzymes à noyau hème.

15 Il est aussi possible en agissant sur le Eh de modifier la survie des ferments probiotiques, les flux métaboliques, la production et/ou la stabilité des molécules d'arômes. L'ensemble de ces résultats a été obtenu suite à une modification du Eh par les microorganismes eux-mêmes, par des molécules oxydo-réductrices ou par traitement thermique.

20 La survie de microorganismes après lyophilisation et durant la conservation est dépendante de nombreux facteurs incluant la concentration initiale en microorganismes, les conditions de croissance, le milieu de croissance, le milieu de séchage et les conditions de réhydratation.

25 Dans les procédés de conservation de type congélation ou lyophilisation, le milieu de croissance est donc un paramètre important à contrôler, chacun des constituants du milieu peut offrir une protection, notamment en permettant l'accumulation de solutés, la production d'exopolysaccharides et la modification du profil lipidique membranaire, notamment en augmentant le ratio acides gras insaturés/acides gras saturés.

30

Des travaux précédents ont montré que les dommages cellulaires apparaissaient durant les procédés de lyophilisation et que des

antioxydants ajoutés au milieu de lyophilisation permettaient de protéger les lipides membranaires contre ces dommages, et ont montré l'intérêt de rajouter à un concentré de bactéries lactiques (après culture i.e dans le milieu de lyophilisation ou de congélation) des molécules chimiques antioxydantes afin de protéger les lipides membranaires contre l'oxydation qui peut se produire au cours de la lyophilisation ou au cours du stockage (on se reportera par exemple au document WO 03/018778 ou encore aux travaux de Fonseca *et al parus en 2003 dans International Dairy Journal*. 13 : 917-926).

10 On conçoit dès lors qu'il existe un réel besoin de pouvoir proposer un nouveau procédé de fabrication de microorganismes lyophilisés, et notamment de bactéries lyophilisées, permettant d'améliorer la viabilité d'une souche à la lyophilisation.

Et dans la perspective d'une application alimentaire pharmaceutique ou vétérinaire, la variation du Eh doit faire intervenir des composés ne modifiant pas les caractéristiques du produit et préservant l'innocuité des produits.

Comme on le verra plus en détail dans ce qui suit, on propose selon la présente invention de procéder à la modification du potentiel redox du milieu de culture de la souche par l'utilisation d'un gaz de traitement comportant un gaz neutre et/ou un gaz réducteur, et ce avant ensemencement.

Selon l'invention on procède donc au traitement du milieu de culture par un gaz de traitement comportant un gaz neutre tel que l'azote, l'argon, l'hélium, le dioxyde de carbone ou un mélange de gaz neutres ou un gaz réducteur tel que l'hydrogène, ou un mélange de tels gaz neutre et réducteur, pour obtenir une valeur du potentiel redox Eh inférieure à la valeur qui est obtenue quand le mélange est en équilibre avec l'air, ceci avant l'étape d'ensemencement du milieu.

30 Le traitement, c'est à dire le contact gaz / liquide peut être effectué selon l'un des procédés par ailleurs bien connus de l'homme du métier, tel que bullage au travers du milieu à l'aide d'un fritté, d'une

membrane ou d'un poreux, agitation par une turbine à arbre creux, utilisation d'un hydro-injecteur,... etc...

La présente invention concerne alors un procédé de fabrication de microorganismes lyophilisés, notamment de bactéries lyophilisées, en particulier de bactéries lactiques lyophilisées, du type où l'on procède durant l'une des étapes du procédé de fabrication à un ensemencement d'un milieu de culture avec une ou plusieurs souches de microorganismes, et se caractérisant en ce que l'on procède, avant l'étape d'ensemencement, au traitement du milieu de culture par un gaz de traitement comportant un gaz neutre ou un gaz réducteur ou un mélange de tels gaz pour obtenir une valeur du potentiel redox Eh du milieu déterminée, qui soit inférieure à la valeur obtenue quand le milieu est en équilibre avec l'air.

Dans des modes de réalisation préférés de l'invention, on peut éventuellement avoir recours en outre à l'une et/ou à l'autre des dispositions suivantes :

- ladite valeur du potentiel redox désirée est inférieure d'au moins 100 mV à la valeur obtenue quand le milieu est en équilibre avec l'air.
- ladite valeur du potentiel redox désirée est négative.
- l'ensemencement est effectué de manière indirecte par le fait que l'on procède au préalable à une pré-culture, qui est utilisée ultérieurement pour ledit ensemencement, et ce que l'on procède, avant ensemencement de la pré-culture, au traitement du milieu de pré-culture par un gaz de pré-traitement comportant un gaz neutre ou un gaz réducteur ou un mélange de tels gaz, pour obtenir une valeur du potentiel redox Eh du milieu de pré-culture déterminée, qui soit inférieure à la valeur obtenue quand le milieu de pré-culture est en équilibre avec l'air.
- ledit gaz de traitement ou de pré-traitement est de l'hydrogène ou comporte de l'hydrogène.
- ledit gaz de traitement ou de pré-traitement est de l'azote ou comporte de l'azote.

- ledit gaz de traitement ou de pré-traitement est un mélange d'hydrogène et d'azote.

- ledit gaz de traitement ou de pré-traitement est de l'argon ou comporte de l'argon.

5 - ledit gaz de traitement ou de pré-traitement comprend de l'hydrogène et/ou de l'azote et un gaz complémentaire acceptable du point de vue de l'utilisation ultérieure des microorganismes lyophilisés ainsi fabriqués

10 - ledit gaz de traitement ou de pré-traitement comprend de plus un gaz complémentaire qui est choisi parmi les gaz inertes, notamment hélium, et parmi l'oxygène, le dioxyde de carbone et le protoxyde d'azote et leurs mélanges en toutes proportions, de préférence parmi le dioxyde de carbone et l'oxygène ainsi que leurs mélanges.

15 - ledit gaz de traitement ou de pré-traitement est un mélange d'hydrogène et de dioxyde de carbone.

Et comme on le verra également en détail ci-dessous, les microorganismes lyophilisés ainsi obtenus présentent des propriétés améliorées, notamment en terme de résistance de la souche à la lyophilisation et de résistance au cours de sa conservation ultérieure.

20 D'autres caractéristiques et avantages de l'invention ressortiront des exemples ci-dessous détaillés qui concernent le domaine des bactéries lactiques.

25 Du lait écrémé stérile (4,5 litres) a été traité pendant 1 heure dans un flacon Schott modifié de 5 litres par bullage de deux gaz différents à un débit de 150 ml/min; une condition témoin sans bullage a également été réalisée :

- Témoin (référence) ;

- Azote (selon l'invention) ;

- Mélange azote/hydrogène 96/4 en volume (selon l'invention).

30 Trois essais pour chaque condition ont été effectués.

Les valeurs du potentiel redox ainsi atteintes, ramenées au pH7 (par des formules bien connues de l'homme du métier comme l'équation

de Leistner et Mirna qui permet de ramener le Eh d'un milieu de pH = x à sa valeur à pH7) selon le gaz utilisé, mesurées avec une sonde Mettler Toledo sont les suivantes :

Témoin	Azote	Azote/Hydrogène
+300 mV	+200 mV	-305 mV

5 Les milieux (lait écrémé stérile) ont alors étéensemencés par une souche probiotique *Lactobacillus Casei* puis placés à l'étuve à 37°C pendant 72 heures.

Après 72 heures de croissance, les cultures sont récupérées et des lestes de lyophilisation (de type classique tels qu'évoqués plus haut dans la présente description) sont ajoutés. Le mélange est neutralisé à l'aide d'une solution d'hydroxyde de calcium. La préparation ainsi obtenue est placée dans des plateaux afin de subir la lyophilisation.

10 On procède alors au dénombrement des bactéries dans le milieu de culture, après 72 heures de croissance et ajout des lestes de lyophilisation. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 1 ci-après.

15 Le traitement statistique est réalisé sur les numérations obtenues pour les 3 conditionnements. « ns » indique que les différences observées sont non significatives (Test de Newman-Keuls à 5%).

20 On en conclut qu'il n'y a pas de différence significative de production de biomasse entre les deux mélanges gazeux de conditionnement étudiés.

25

Tableau 1 : Biomasse de *Lb. casei* exprimée en UFC/ml et obtenue en milieu liquide après 72 heures de croissance et ajout de lestes sous les 3 conditionnements du milieu de culture (moyenne de 3 essais dans chaque cas) :

Conditionnement du milieu de culture	Biomasse	Pourcentage de biomasse acquis par rapport au témoin
	UFC/ml	%
Témoin	6,67.10 <sup>8</sup> (ns)	
N <sub>2</sub>	8,33.10 <sup>8</sup> (ns)	+25%
N <sub>2</sub> /H <sub>2</sub>	8,67.10 <sup>8</sup> (ns)	+30%

Examinons maintenant ci-dessous les dénombrements obtenus sur la poudre lyophilisée à J+1, soit conservée 1 jour après son obtention i.e les dénombrements sont réalisés le jour qui a suivi l'obtention de la poudre.

Ces résultats sont présentés dans le tableau 2 ci-après.

Un traitement statistique a été réalisé sur les numérations obtenues pour les 3 conditionnements, il montre que les différences observées entre le conditionnement N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> d'une part et les conditionnements N<sub>2</sub> et témoin d'autre part sont significatives (Test de Newman-Keuls à 5 %).

On constate donc une numération supérieure pour les poudres obtenues à partir des cultures réalisées sur milieu conditionné sous azote-hydrogène par rapport à celles réalisées sous témoin et N<sub>2</sub>. On note que



les résultats obtenus sous azote montrent déjà une augmentation sensible par rapport au témoin.

Une augmentation de la résistance des souches à la lyophilisation est donc observée pour les cellules cultivées sous N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> mettant en évidence un effet positif du conditionnement du milieu de culture sur la résistance de la souche à la lyophilisation.

Tableau 2 : Biomasse de *Lb. casei* exprimée en UFC/g de poudre en fonction du conditionnement initial du milieu de croissance après 1 jour (moyenne de 3 essais par cas)

Conditionnement du milieu de culture	Biomasse	Pourcentage de biomasse acquis par rapport au témoin
	UFC/g de poudre	%
Témoin	6,88.10 <sup>8</sup>	
N <sub>2</sub>	8,41.10 <sup>8</sup>	+22%
N <sub>2</sub> /H <sub>2</sub>	1,04.10 <sup>9</sup>	+52%

Examinons maintenant dans ce qui suit les résultats de dénombrement obtenus sur la poudre à J+60 (soit conservée 60 jours après son obtention). Ils sont présentés dans le tableau 3 ci-après.

Tableau 3: Biomasse de *Lb. casei* exprimée en UFC/g de poudre en fonction du conditionnement initial du milieu de croissance, après 60 jours de conservation à température ambiante (moyenne de 3 essais par cas)

Conditionnement du milieu de culture	Biomasse	Pourcentage de biomasse acquis par rapport au témoin
	UFC/g de poudre	%
Témoin	$1,24 \cdot 10^7$	
N <sub>2</sub>	$2,17 \cdot 10^7$	+75%
N <sub>2</sub> /H <sub>2</sub>	$4,02 \cdot 10^7$	+223%

Ici encore un traitement statistique a été réalisé sur les numérations obtenues pour les 3 conditionnements, il montre des différences significatives entre les trois différents conditionnements (Test de Newman-Keuls à 5 %).

Ces résultats indiquent une numération supérieure pour les cellules cultivées sur milieu conditionné sous N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> par rapport à celles cultivées sous N<sub>2</sub> dont la numération est également significativement supérieure à celle obtenue sous témoin.

On peut conclure clairement que l'effet positif du conditionnement initial du milieu de croissance de la souche sous N<sub>2</sub> et N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> sur sa résistance à la lyophilisation est confirmé et même amplifié au cours de la conservation. Ceci montre l'intérêt de l'utilisation des gaz pour modifier le Eh du milieu de croissance avant l'étape d'ensemencement proprement dite sur la résistance de la souche à la lyophilisation et sur sa résistance au cours de sa conservation.

-----

### REVENDEICATIONS

1. Procédé de fabrication de microorganismes lyophilisés, notamment de bactéries lyophilisées, procédé du type où l'on procède durant l'une des étapes du procédé de fabrication à un  
5 ensemencement d'un milieu de culture avec une ou plusieurs souches de microorganismes, et se caractérisant en ce que l'on procède, avant l'étape d'ensemencement, au traitement du milieu de culture par un gaz de traitement comportant un gaz neutre ou un gaz réducteur ou un  
10 mélange de tels gaz, pour obtenir une valeur du potentiel redox Eh du milieu déterminée, qui soit inférieure à la valeur obtenue quand le milieu est en équilibre avec l'air.

2. Procédé de fabrication selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite valeur du potentiel redox désirée est inférieure  
15 d'au moins 100 mV à la valeur obtenue quand le milieu est en équilibre avec l'air.

3. Procédé de fabrication selon la revendication 2, caractérisé en ce que ladite valeur du potentiel redox désirée est négative.

20 4. Procédé de fabrication selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'ensemencement est effectué de manière indirecte par le fait que l'on procède au préalable à une pré-culture, qui est utilisée ultérieurement pour ledit ensemencement, et ce que l'on procède, avant ensemencement de la pré-culture, au traitement  
25 du milieu de pré-culture par un gaz de pré-traitement comportant un gaz neutre ou un gaz réducteur ou un mélange de tels gaz, pour obtenir une valeur du potentiel redox Eh du milieu de pré-culture déterminée, qui soit inférieure à la valeur obtenue quand le milieu de pré-culture est en équilibre avec l'air.

30 5. Procédé de fabrication selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que ledit gaz de traitement ou de pré-traitement est de l'hydrogène ou comporte de l'hydrogène.

6. Procédé de fabrication selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que ledit gaz de traitement ou de pré-traitement est de l'azote ou comporte de l'azote.

5 7. Procédé de fabrication selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que ledit gaz de traitement ou de pré-traitement est un mélange d'hydrogène et d'azote.

8. Procédé de fabrication selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que ledit gaz de traitement ou de pré-traitement est de l'argon ou comporte de l'argon.

10 9. Procédé de fabrication selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que ledit gaz de traitement ou de pré-traitement comprend de l'hydrogène et/ou de l'azote et un gaz complémentaire acceptable du point de vue de l'utilisation ultérieure des microorganismes lyophilisés ainsi fabriqués

15 10. Procédé de fabrication selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que le gaz de traitement ou de pré-traitement comprend de plus un gaz complémentaire qui est choisi parmi les gaz inertes, notamment hélium, et parmi l'oxygène, le dioxyde de carbone et le protoxyde d'azote et leurs mélanges en toutes proportions, de préférence  
20 parmi le dioxyde de carbone et l'oxygène ainsi que leurs mélanges.

11. Procédé de fabrication selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que ledit gaz de traitement ou de pré-traitement est un mélange d'hydrogène et de dioxyde de carbone.



**BREVET D'INVENTION**  
**CERTIFICAT D'UTILITÉ**



**Désignation de l'inventeur**

Vos références pour ce dossier	S6749SMBMR
N°D'ENREGISTREMENT NATIONAL	
TITRE DE L'INVENTION	
	PROCEDE PAR LEQUEL ON MODIFIE LA VIABILITE D'UN MICROORGANISME LYOPHILISE PAR CONDITIONNEMENT DE SON MILIEU DE CROISSANCE PAR DES GAZ
LE(S) DEMANDEUR(S) OU LE(S) MANDATAIRE(S):	
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S):	
Inventeur 1	
Nom	CACHON
Prénoms	REMY
Rue	11, avenue des Grandes Bergeries
Code postal et ville	21000 DIJON
Société d'appartenance	
Inventeur 2	
Nom	DELBEAU
Prénoms	CAROLE
Rue	13 B, rue de la Boudronnée
Code postal et ville	21000 DIJON
Société d'appartenance	
Inventeur 3	
Nom	FERON
Prénoms	GILLES
Rue	41, rue du Paquier du Bois
Code postal et ville	21270 PONTAILLER-SUR-SAONE
Société d'appartenance	
Inventeur 4	
Nom	LEDON
Prénoms	HENRY
Rue	1 bis, Rue de l'Assemblée Nationale
Code postal et ville	78000 VERSAILLES
Société d'appartenance	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

