

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 10 avril 1984.

③0 Priorité : SE, 11 avril 1983, n° 8301975-2.

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 41 du 12 octobre 1984.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

⑦1 Demandeur(s) : Société dite : PERSTORP AB. — SE.

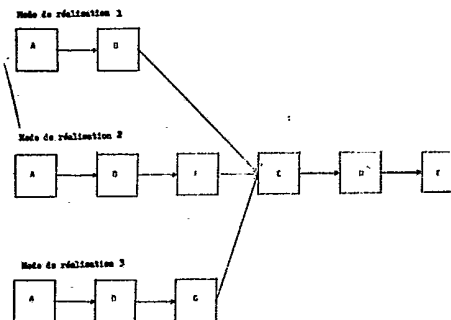
⑦2 Inventeur(s) : Nils Ludvig Molin, Bengt Anders Norberg
et Lars Ingvar Wiberger.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : D. A. Casalonga.

⑤4 Procédé de préparation de polysaccharides par voie bactériologique.

⑤7 Ce procédé qui est réalisé à l'aide de la bactérie *Zoogloea ramigera* souche 115 consiste A à développer la *Zoogloea ramigera* dans un milieu aqueux stérile contenant une source de carbone, une source d'azote, des sels nutritifs et un sel de fer, à une concentration de 0,15 à 45 mg/l, de préférence 0,5 à 5 mg/l, une suspension dense de ladite bactérie étant obtenue, et B à transférer ladite suspension dans un fermenteur contenant un milieu aqueux stérile ayant la composition ci-dessus, où la bactérie est abandonnée pendant environ 20 à 60 heures, pour consommer principalement toute la source de carbone ajoutée à une concentration initiale d'environ 10 à 50 g de source de carbone par litre, un produit faiblement visqueux contenant 10 à 35 g/l de polymère étant obtenu sous la forme de capsules.



Procédé de préparation de polysaccharides par voie
bactériologique.

La présente invention concerne un procédé pour la
préparation de polysaccharides par voie bactériologique à
5 l'aide de la bactérie Zoogloea ramigera, souche 115.

D'après la littérature, on connaît déjà la façon de
préparer des polysaccharides à l'échelle du laboratoire à
l'aide de la bactérie Zoogloea ramigera, souche 115. Toute-
fois, il faut une durée de culture très longue. De plus, on
10 n'a pas pu obtenir une concentration élevée de polymères. Il
existe également un problème concernant la viscosité élevée
du milieu de culture.

Les inconvénients dus à une durée de culture longue
sont, par exemple, l'infection du récipient de la culture et
15 la faible productivité.

La concentration faible de polymères obtenue avec
les procédés antérieurs a entraîné par exemple des coûts de
récupération élevés.

Une viscosité élevée du milieu de culture soulève
20 de grandes difficultés, particulièrement en ce qui concerne le
transfert de l'oxygène à la bactérie.

Ceci est extrêmement sérieux, car la bactérie en
question a un métabolisme aérobie.

Par suite des inconvénients mentionnés ci-dessus
25 des procédés antérieurs connus, il est devenu rapidement impos-
sible de produire des polysaccharides à l'échelle industrielle
avec la bactérie Zoogloea ramigera, souche 115.

Selon la présente invention, il est devenu possible
d'une façon tout à fait surprenante de pallier les inconvé-
nients mentionnés liés aux procédés antérieurs connus et de
30 fournir un procédé de préparation des polysaccharides par
voie bactériologique à l'aide de la bactérie Zoogloea ramigera,
souche 115. Le procédé consiste (A) à développer la Zoogloea
ramegera dans un milieu aqueux stérile contenant une source
35 de carbone telle que glucose, amidon ou pommes de terre, une

source d'azote telle que chlorure d'ammonium, nitrate d'ammonium ou nitrate de potassium, des sels nutritifs tels que phosphates et sulfates, et un sel de fer tel que FeCl_3 ou $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ à une concentration de 0,15 à 45 mg/l, de
5 préférence 0,5 à 5 mg/l, une suspension dense de ladite bactérie étant obtenue, et (B) à transférer ladite suspension dans un fermenteur contenant un milieu aqueux stérile avec la composition ci-dessus, fermenteur dans lequel la bactérie est abandonnée pendant environ 20 à 60 heures, de préfé-
10 rence 30 à 50 heures, pour qu'elle consomme principalement la totalité de la source de carbone ajoutée, à une concentration initiale d'environ 10 à 50 g de source de carbone par litre, un produit faiblement visqueux contenant 10 à 35 g/l de polymère étant obtenu, ledit polymère étant présent
15 sous la forme de capsules.

La souche 115 connue de la bactérie *Zoogloea ramigera* utilisée selon la présente invention, est déposée à The American Type Culture Collection, USA sous le N° ATCC 25935.

20 Le polysaccharide obtenu par le procédé conforme à l'invention est constitué habituellement, entre autres choses, par du glucose, du galactose et de l'acide pyruvique.

L'addition de sel de fer au milieu de culture s'est révélée fortement favorable à l'augmentation de la
25 vitesse de croissance de la bactérie. De préférence, on utilise une solution de fer stérile filtrée. La quantité de sel de fer calculée en Fe^{3+} , doit être au moins de 0,15 mg/l et au maximum de 45 mg/l du milieu de culture; De préférence, elle est au moins de 0,5 mg/l et au maximum de 5 mg/l.

30 Le pH du milieu de culture doit normalement être au moins de 6,0 et pas supérieure à 8,0, de préférence il est compris entre 6,5 et 7,5.

Pendant le premier stade de la culture, la croissance de la bactérie est stipulée. La croissance s'arrêtera
35 quand la quantité d'azote initialement ajoutée sera consommée,

puisque l'azote est l'élément qui limite la croissance.

Le stade suivant de la culture consiste à produire le polysaccharide qui est stocké sous la forme de capsules volumineuses environnant la bactérie.

5 Il faut qu'une source de carbone soit présente dans le milieu de culture au moment de la production du polysaccharide, d'une part pour fournir à l'organisme la matière de départ qui est transformée en blocs constitutifs qui sont inclus dans le polysaccharide, d'autre part, pour satis-
10 faire le besoin en énergie de la bactérie.

Selon un mode de réalisation de la présente invention, la concentration en polymère du produit faiblement visqueux provenant du stade (B) ci-dessus peut être encore augmenté par une addition contrôlée successive d'une quantité
15 supplémentaire de source de carbone dans un stade ultérieur (F).

Selon un autre mode de réalisation de la présente invention, la concentration en polymère du produit faiblement visqueux provenant du stade (B) peut être encore augmentée par une addition contrôlée successive de quantités
20 supplémentaires de source de carbone et de source d'azote dans un stade ultérieur (G).

Quand la source de carbone ajoutée initialement dans le stade (B) est consommée, l'addition de quantité supplémentaire de source de carbone dans les stades (F) et (G),
25 respectivement, est réalisée convenablement à partir d'un récipient séparé à l'aide d'une pompe qui est commandée par un signal provenant d'un analyseur de CO_2 . L'analyseur contrôle continuellement le taux de CO_2 dans le gaz sortant
30 du fermenteur.

Quand l'addition de la source de carbone au milieu de culture est effectuée, le taux de CO_2 dans le gaz sortant du fermenteur augmente jusqu'à ce que la quantité de substrat envoyé dans le fermenteur par une pompe soit consommée.
35 Ensuite, le taux de CO_2 diminue rapidement et l'addition de

la source de carbone est répétée. Grâce à ce procédé unique, l'addition de la source de carbone peut être contrôlée, de sorte que la concentration de la source de carbone sera maintenue dans un intervalle désiré pendant la phase où le polysaccharide est synthétisé.

Un taux de CO_2 approprié est au moins de 0,2 et au maximum de 3,0 %, de préférence il est compris entre 0,7 et 1,3 %.

Aux modes de réalisation ci-dessus qui comprennent les stades (F) et (G) respectivement, où davantage de source de carbone, et davantage de source de carbone et de source d'azote sont respectivement ajoutées, la concentration totale de source de carbone dans les stades (B) plus (F) et (B) plus (G), respectivement, est de 15 à 75 g/l, de préférence de 20 à 50 g par litre.

Comme source de carbone dans les stades (F) et (G), respectivement, on peut utiliser par exemple le lactose, le glucose, l'amidon ou les pommes de terre.

Les stades (B) plus (F) et (B) plus (G) sont respectivement terminés de préférence en l'espace de 30 à 48 heures.

Grâce à une combinaison de l'addition de source de carbone et de source d'azote dans le stade (G), on obtient un avantage supplémentaire d'une production de polysaccharide uniforme et élevée pendant tout le stade (G).

Selon un mode de réalisation approprié de l'invention, on utilise l'amidon comme source de carbone, le chlorure d'ammonium comme source d'azote et FeCl_3 comme sel de fer.

Normalement, la récupération du polysaccharide et de la bactérie dans le stade (C) est effectuée par précipitation en ajoutant un alcool tel que l'éthanol ou l'isopropanol. On recueille ensuite le précipité obtenu d'une façon appropriée par centrifugation (D) puis séchage usuel (E) pour avoir le produit fini.

Les stades (C), (D) et (E) peuvent toutefois être réalisés par d'autres voies, par exemple selon l'utilisation

du produit fini.

On va maintenant expliquer l'invention en détail en se référant à la figure unique ci-jointe, qui montre un schéma du procédé pour la préparation de polysaccharides selon la présente invention, et à l'aide des exemples de réalisation ci-après, parmi lesquels : les exemples 1 à 5 concernent des essais comparatifs n'appartenant pas à la présente invention, tandis que les exemples 6 à 11 concernent le procédé de la présente invention.

Sur la figure unique sont représentés trois modes de réalisation différents de l'invention. Les différents repères avec des lettres sur la figure ont la signification suivante :

A. Stade de développement dans lequel on laisse se développer la bactérie dans un milieu aqueux contenant une source de carbone, une source d'azote, des sels nutritifs et un sel de fer, selon la présente invention.

B. Stade de culture dans fermenteur où se réalise la production de polysaccharides.

C. Stade de récupération comprenant par exemple un stade de précipitation où le polysaccharide et la bactérie sont précipités.

D. Stade de centrifugation où le produit précipité est recueilli.

E. Stade de séchage.

F. Stade de culture dans un fermenteur où a lieu une addition successive supplémentaire de source de carbone.

G. Stade de culture dans un fermenteur où a lieu une addition successive supplémentaire de source de carbone et de source d'azote.

La présente invention est illustrée par les exemples descriptifs et non limitatifs ci-après.

Exemple 1

On transfère une colonie de la bactérie Zoogloea ramigera, souche 115, d'une plaque d'agar-agar dans une

fiolle erlenmeyer munie d'un réducteur de diamètre de 2 litres (A) contenant 250 ml d'un milieu stérile constitué par

		g/litre de la solution aqueuse
5	Glucose	25
	K_2HPO_4	2
	KH_2PO_4	1
	NH_4Cl	1
10	$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,2
	Extrait de levure (Difco)	0,01

On place ensuite le ballon pendant 18 heures sur une secoueuse rotative (100 à 300 tours/minute) ayant une température de 26°C. On utilise la suspension de bactéries obtenue pour inoculer (B) un milieu stérilisé dans un fermenteur. Le milieu a la même composition que celle mentionnée ci-dessus. On insuffle dans le fermenteur, 0,5 litre d'air par litre de milieu et par minute, tout en agitant à environ 800 tours/minute. La température du fermenteur est de 26°C. Le pH du milieu est réglé à 7,0 par un titrage automatique avec NaOH.

Le glucose est consommé après 95 heures de culture et la concentration de polysaccharide est de 11,5 g/l.

25 Exemple 2

On répète le procédé de l'exemple 1, sauf qu'au stade (B) on ajoute une solution de $CaCl_2$ au milieu. La quantité totale de calcium ajoutée est de 3 mg/l du milieu de culture. Le glucose est consommé après 95 heures et la concentration de polysaccharide est de 10,1 g/l.

30 Exemple 3

On répète le procédé de l'exemple 1, sauf qu'au stade (B) on ajoute une solution de $MnSO_4$ au milieu. La quantité totale de manganèse ajoutée est de 3 mg/l du milieu de culture. Le glucose est consommé après 85 heures

et la concentration de polysaccharide est de 10,2 g/l.

Exemple 4

On répète le procédé de l'exemple 1, sauf qu'au stade (B) on ajoute une solution de CuCl_4 . La quantité totale de cuivre ajoutée est de 3 mg/l du milieu de culture. Le glucose est consommé après 88 heures et la concentration de polysaccharide est de 11,0 g/l.

Exemple 5

On répète le procédé de l'exemple 1, sauf qu'au stade (B) on ajoute une solution de ZnCl_2 . La quantité totale de zinc ajoutée est de 3 mg/l du milieu de culture. Le glucose est consommé après 90 heures et la concentration de polysaccharide est de 9,2 g/l.

Exemple 6

On répète le procédé de l'exemple 1, sauf qu'aux stades (A) et (B) on ajoute une solution de FeCl_3 au milieu. La quantité totale de fer ajoutée est de 3 mg/l du milieu de culture. Le glucose est consommé déjà après 45 heures et la concentration de polysaccharide est de 13,2 g/l. La viscosité est de 40 centipoises (0,04 Pa.s).

Exemple 7

On établit le rapport optimal C/N d'un milieu de culture pour la production de polysaccharide extracellulaire avec la souche 115 de *Zoogloea ramigera* dans des cultures discontinues séparées sans système d'alimentation. On utilise pour les essais une concentration de glucose d'environ 25 g/l. En faisant varier la quantité de source d'azote ajoutée (0,25-4 g de $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{l}$) au milieu pour les différentes cultures, on a établi que la production optimale de polysaccharides à partir du glucose ajouté est obtenue habituellement pour 0,5 à 2 g de $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{l}$. La durée totale de la culture est souvent de 36 à 60 heures.

Exemple 8

Le rapport optimal C/N d'un milieu de culture, quand on produit du polysaccharide avec la souche 115 de

Zoogloea ramigera dans un système discontinu qui, grâce à un système d'alimentation est approvisionné en source de carbone supplémentaire par addition de glucose, a été établi en général comme étant compris entre 10 et 25. En 5 tolérant une teneur en azote supérieure pendant le processus initial discontinu, il se développe une masse de cellules supérieure à la normale. Une fois le glucose initial consommé, l'addition du glucose commence. La masse de cellules existante transforme efficacement le glucose ajouté en 10 polymère. Le dosage du glucose est contrôlé automatiquement au moyen d'une valeur de signal provenant de l'analyseur de CO_2 qui mesure le taux de CO_2 dans le gaz sortant du fermenteur. L'addition du glucose commence quand la valeur de signal diminue au-dessous d'une valeur affichée. 15 La durée de culture nécessaire est généralement d'environ 36 à 54 heures.

Exemple 9

On établit le taux optimal de O_2 dissous dans un milieu de culture avec la souche 115 de Zoogloea ramigera 20 dans des cultures en discontinu. On fait varier la vitesse d'aération dans des essais séparés. L'agitation qui influence également le taux d' O_2 dissous est maintenue constante à 800 tours par minute. Si le débit d'air traversant le fermenteur est maintenu à 0,25-1,5 vvm (volume d'air par 25 volume de milieu et par minute) les meilleures conditions pour convertir le glucose en polymère sont obtenues. Le taux de O_2 dissous n'est jamais inférieur à 20 % de la valeur de saturation pour les essais qui donnent une bonne conversion du glucose en polymère.

Exemple 10

Selon la présente invention, on a établi que le fer était un élément nécessaire à l'état de traces pour une production efficace du polymère avec la Zoogloea ramigera. Il faut ajouter du fer pendant la phase de croissance de 35 la bactérie. D'une façon appropriée, cette addition est

effectuée en ajoutant par dose dans le milieu du fermenteur une solution de fer (à environ 0,01 M) au début de la culture. Le taux de sel de fer dans le milieu du fermenteur doit être de 0,15 à 45 mg/l, de préférence de 0,5 à 5 mg/l, calculé en fer. Les exemples 7 à 9 ci-dessus sont effectués en ajoutant du fer au milieu sous la forme d'une solution de FeCl_3 à une concentration de 2,5 mg/l de milieu du fermenteur. L'addition de fer donne comme résultat que la durée totale du procédé peut être ramenée de la durée normale d'environ 100 heures à environ 36-60 heures.

Exemple 11

Description de la culture avec apport de glucose, où le rapport C/N est établi.

Essai 1 : La concentration initiale du glucose est de 25 g/l et la concentration d'azote est de 0,26 g/l.

En outre le milieu contient également les composés suivants (g/l) :

	K_2HPO_4 ,	2
	KH_2PO_4 ,	1
20	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,2
	extrait de	
	levure (Difco)	0,01

On ajoute par dose 2,5 mg/l de $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$. Le glucose ajouté au départ est consommé en 50 heures. Une addition supplémentaire de glucose (5 g/l) dans le milieu du fermenteur entraîne une concentration accrue du polymère, mais la synthèse du polymère est ralentie.

Concentration finale du polymère : 18 g/l
Masse de cellules finale : 2,3 g/l
Viscosité : 250 cP. (0,25 Pa.s)

Essai 2 : La concentration en azote du milieu de culture est de 0,52 g/l, mais le reste est conforme à l'essai 1. La production de la masse de cellules

est arrêtée après 14 heures. La quantité initiale de glucose est consommée après 22 heures. L'addition de glucose frais entraîne une conversion rapide du glucose en polymère. A la fin de la culture (48 heures), la concentration du polymère est de 32 g/l. La concentration de la masse de cellules est de 4,3 g/l. La viscosité est de 225 cP. (0,225 Pa.s).

Essai 3 : La concentration en azote du milieu de culture est de 1,04 g/l, mais le reste est inchangé conformément à l'essai 1. La production de la masse de cellules est arrêtée après 18 heures. Le glucose ajouté au départ est consommé après 20 heures. L'addition de glucose frais entraîne une conversion très rapide du glucose en polymère mais de grandes quantités de glucose sont perdues dans ce cas sous forme de CO_2 . A la fin de la culture (45 heures) la concentration du polymère est de 25 g/l. La masse de cellules est de 9,8 g/l. La viscosité est de 230 cP (0,23 Pa.s).

Les modes de réalisation ci-dessus montrent que l'absence de fer dans le milieu de culture, ou l'utilisation d'autres sels métalliques tels qu'un sel de calcium, un sel de manganèse, un sel de cuivre ou un sel de zinc, donne une durée de culture bien plus longue que le procédé selon l'invention, où une quantité spécifique de sel de fer est utilisée.

Il doit être bien entendu que la description qui précède n'a été donnée qu'à titre purement illustratif et non limitatif et que toute variante ou modification peut y être apportée sans sortir pour autant du cadre général de la présente invention, tel que défini dans les revendications ci-annexées.

REVENDICATIONS

1. Procédé pour la préparation de polysaccharides par voie bactériologique à l'aide de la bactérie *Zoogloea ramigera* souche 115, qui consiste (A) à développer le

5 *Zoogloea ramigera* dans un milieu aqueux stérile contenant une source de carbone telle que glucose, amidon ou pommes de terre, une source d'azote telle que chlorure d'ammonium, nitrate d'ammonium ou nitrate de potassium, des sels nutritifs tels que phosphates et sulfates, et un sel de

10 fer tel que FeCl_3 ou $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ à une concentration de 0,15-45 mg/l, de préférence 0,5 à 5 mg/l, une suspension dense de ladite bactérie étant obtenue, et (B) à transférer ladite suspension dans un fermenteur contenant un

15 milieu aqueux stérile ayant la composition ci-dessus, fermenteur dans lequel la bactérie est abandonnée pendant environ 20 à 60 heures, de préférence 30 à 50 heures, pour qu'elle consomme principalement toute la source de carbone ajoutée, à une concentration initiale d'environ 10 à 50 g

20 de source de carbone par litre, un produit faiblement visqueux contenant 10 à 35 g/l de polymère étant obtenu, ledit polymère étant présent sous la forme de capsules.

2. Procédé selon la revendication 1, qui consiste (C) à récupérer le produit à partir du stade (B), ladite

25 récupération comprenant une précipitation avec un alcool, par exemple l'éthanol ou l'isopropanol, (D) un stade de séparation mettant en oeuvre la centrifugation afin de recueillir le précipité obtenu et (E) de préférence, le séchage du produit séparé pour avoir un produit fini.

3. Procédé selon les revendications 1 ou 2, qui

30 consiste à augmenter encore la concentration du polymère du produit faiblement visqueux provenant du stade (B), par (F) une addition contrôlée successive de source de carbone.

4. Procédé selon les revendications 1 ou 2, qui

35 consiste à augmenter encore la concentration du polymère du produit faiblement visqueux provenant du stade (B) par

(G) une addition contrôlée successive de source de carbone et de source d'azote.

5 5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, qui consiste à utiliser de l'amidon comme source de carbone, du chlorure d'ammonium comme source d'azote et FeCl_3 comme sel de fer.

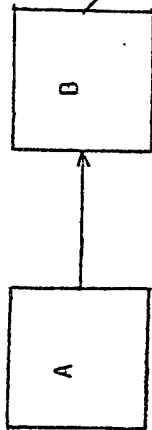
6. Procédé selon la revendication 3, caractérisé par le fait que les stades (B) et (F) sont ensemble terminés en l'espace de 30 à 48 heures.

10 7. Procédé selon la revendication 4, caractérisé par le fait que les stades (B) et (G) sont ensemble terminés en l'espace de 30 à 48 heures.

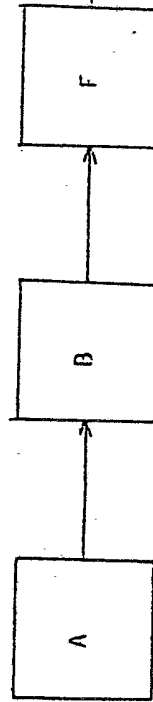
15 8. Procédé selon les revendications 3 ou 4, caractérisé par le fait que le lactose est ajouté comme source de carbone dans les stades (F) et (G) respectivement.

9. Procédé selon les revendications 3 ou 4, caractérisé par le fait que l'addition successive de source de carbone dans les stades (F) et (G) est commandée, respectivement, par un signal provenant d'un analyseur de CO_2 .

Mode de réalisation 1



Mode de réalisation 2



Mode de réalisation 3

