

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication :

(A n'utiliser que pour les
commandes de reproduction).

2 465 000

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21) **N° 80 19244**

(54) Hétéropolysaccharide S-130.

(51) Classification internationale (Int. Cl.³). C 12 P 19/04 // C 09 K 7/02; C 12 R 1/05.

(22) Date de dépôt..... 5 septembre 1980.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : EUA, 7 septembre 1979, n° 073.573.

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande B.O.P.I. — « Listes » n° 12 du 20-3-1981.

(71) Déposant : MERCK & CO., INC., résidant aux EUA.

(72) Invention de : Kenneth S. Kang et George T. Veeder.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Regimbeau, Corre, Martin et Schrimpf,
26, av. Kléber, 75116 Paris.

La présente invention concerne un hétéropolysaccharide dénommé hétéropolysaccharide S-130.

Le produit S-130 peut être préparé par fermentation d'un milieu nutritif approprié avec un organisme n'ayant pas été décrit jusqu'à présent, d'après des études taxonomiques poussées, qui est une espèce d'Alcaligenes non-dénommée. Un dépôt permanent sans restriction de cet organisme utilisé dans la production du présent hétéropolysaccharide a été effectué avec l'American Type Culture Collection le 27 août 1979 sous le numéro d'inscription ATCC 31555.

Les considérations suivantes rendent justifiée et nécessaire que cet organisme soit considéré comme une nouvelle espèce d'Alcaligenes.

15 Description de la souche

A. Caractéristiques de morphologie des colonies

Sur gélose nutritive, de petites colonies jaunes apparaissent en un jour à 30°C, le diamètre atteignant environ 1,5 mm après 5 jours d'incubation. Les colonies sont rondes, lisses, convexes, mucoïdiennes et opaques. La couleur jaune devient plus foncée et la texture des colonies devient dure après incubation prolongée.

Sur gélose YM, de petites colonies jaunes mucoïdiennes apparaissent en un jour et le diamètre atteint environ 3 mm après 5 jours d'incubation. Les colonies sont rondes, lisses, convexes et opaques, mais le dessus des colonies est plat. On n'observe pas de texture dure membraneuse.

30 B. Caractéristiques de morphologie des cellules

La souche S-130 est une bactérie Gram-

négative en forme de bâtonnet. Sur gélose nutritive, la grosseur moyenne des cellules est d'environ 0,5-0,6 sur 1,2-1,6 μm ; les extrémités des cellules sont amincies et on observe souvent une courbure. Les dimensions et la forme des cellules ne changent pas notablement après incubation prolongée.

Sur gélose YM, les dimensions moyennes des cellules sont de 0,6-0,8 sur 1,6-2,0 μm , mais la cellule devient plus longue (3-4 μm); l'accumulation de PHB est importante. La motilité est positive. Les colorations des flagelles (méthode au nitrate d'argent modifiée) montrent que la souche a une flagellation mixte, c'est-à-dire des flagelles polaires et latéraux, aussi bien que des flagelles périthriches.

15 C. Caractéristiques physiologiques et biochimiques

On donne ci-après les résultats d'essais effectués :

Résultat faible ou négatif avec la cytochrome-oxydase; positif avec la catalase.

20 L'organisme est capable de développement à 37 et à 41°C, mais pas à 43°C.

Tolérance à 3,0 % de NaCl, mais pas à 6,5 % de NaCl.

Développement à des pH compris entre 5 et 25 12.

De l'acide, mais pas de gaz, est produit dans des conditions aérobies à partir de divers hydrates de carbone, tels que les suivants :

	D-xylose	lactose
30	L-arabinose	maltose
	D-glucose	mélibiose
	fructose	sucrose
	galactose	tréhalose
	mannose	raffinose
35	Le lait tournesolé	est réduit, mais pas

peptonisé.

Les résultats sont positifs avec ADH, mais pas avec LDC, ODC et PDA.

5 Les résultats sont positifs avec MR, mais négatifs avec VP, l'indole et l'uréase.

La gélatine d'esculine et Tween 80 sont faiblement hydrolysés, mais pas la caséine, l'amidon, la cellulose et la pectine.

10 Pas de phosphatase, et hémolyse négative.
Pas d'inhibition par 0,1 % de chlorure de triphényltétrazolium.

15 Survie à 60°C pendant 30 minutes.
Les organismes se développent sur la gélose EMB et sur Tellurite Blood, mais pas sur les géloses SS et MacConkey.

D. Essai de sensibilité aux antibiotiques

La souche S-130 est sensible aux antibiotiques suivants :

20	Kanamycine	30 µg
	Néomycine	30 µg
	Chlorotétracycline	5 µg
	Novobiocine	30 µg
	Erythromycine.....	15 µg
	Tétracycline	30 µg
25	Gentamicine	10 µg
	Carbénicilline.....	50 µg

et n'est pas sensible à :

30	Pénicilline	10 unités
	Streptomycine	10 µg
	Colistine	10 µg
	Polymyxine B	300 unités

E. Caractéristiques de nutrition

Des facteurs organiques de développement ne sont pas nécessaires et des sels d'ammonium servent de seule source d'azote. Un total de 30 composés

organiques sont utilisés comme seule source de carbone et d'énergie. La plupart des hydrates de carbone sont utilisés.

F. Teneur en G+C de l'ADN

5 On n'a pas effectué d'analyse de l'ADN.

G. Identification par le système API

La souche n'a pas pu être identifiée par ce système.

H. Identification

10 La souche S-130 est un organisme aérobie Gram-négatif en forme de bâtonnet. Le mode de flagellation de l'organisme est mixte; on observe des flagelles polaires et périthriches (peut-être des flagelles dégénérés). Selon le Bergey's Manual (8ème
15 édition), ces organismes appartiennent au genre Alcaligenes.

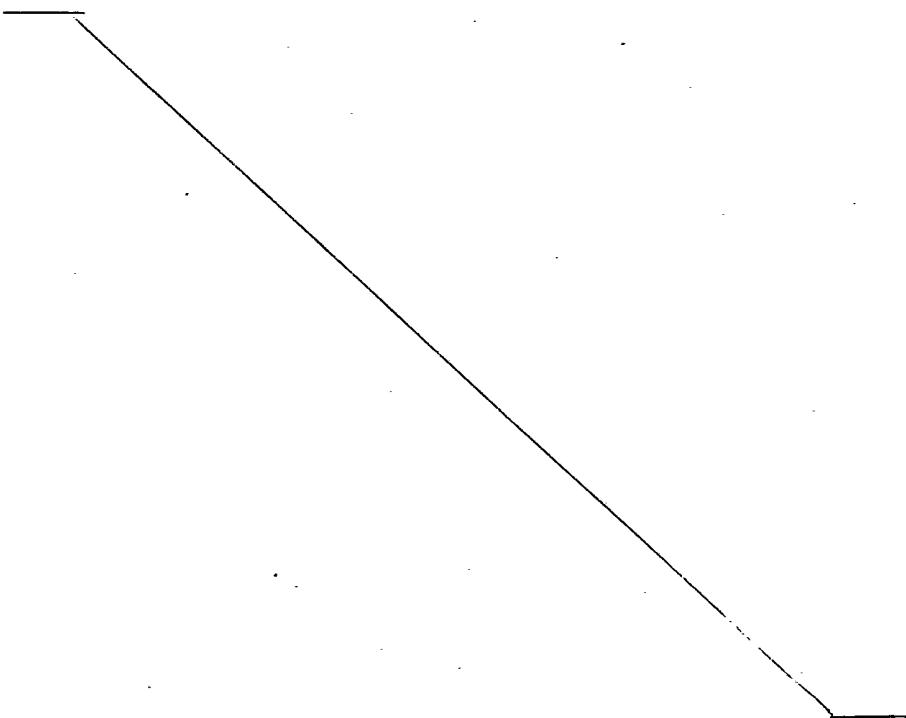


TABLEAU I : Essais biochimiques et autres essais divers utilisés pour la souche S-130

Oxydase :	de Kovac	+ (faible)	Hydrolyse de Gélatine	+ (faible)
Catalase	Pathotech	+ (faible)	Caséine	-
Milieu CF :	oxydant fermentatif	-	Amidon	- (faible)
Gaz à partir de glucose	-	-	Tween 80	-
Production H ₂ S :	TSI	-	Pectine	NT
à partir de cystine	-	-	Alginate	-
Ammonium à partir de peptone	±	-	Cellulose	-
β-galactosidase (ONPG)	+	-	Chitine	-
Arginine dihydrolase	-	-	ADN	NT
Lysine décarboxylase	-	-	Esculine	+
Ornithine décarboxylase	-	-	Développement sur divers milieux :	
Tryptophane désaminase	-	-	Gélose EMB	+
Phénylalanine désaminase	-	-	Gélose MacConkey	-
Uréase	-	-	Gélose SS	-
Indole	-	-	Gélose TCBS	-
Essai MR	-	-	Gélose au sang et au tellurite de Finsdale	+
Essai VP	-	-	Gélose Pseudosel	NT
Réduction de nitrate	-	-	Production de pigment :	
Réduction de nitrite	-	-	Millieu King A	-
Dénitrification	-	-	Millieu King B	-
Fixation de N ₂	-	-	Développement dans	
	-	-	milieu de Burk	
	-	-	Activité de nitrogénase	NT
	-	-	Malonate (oxydation)	-
	-	-	Phosphatase	-
	-	-	Réaction de colorants :	
	-	-	Rouge Congo	-

-6-

TABLEAU I (suite)

Hémolyse (sang de mouton)	-	-
Lait tournesolé : acide, réduction seulement	-	-
Production de β -catolactose	-	-
Survie à 60°C pend. 30 min.	+	-
TSI : Culture inclinée	Acide	Pas de développement
"Butte"		
Gaz	-	-
Réaction au jaune d'oeuf	-	-

+ = positif
- = négatif
NT = pas essayé

Conditions de fermentation

L'hétéropolysaccharide S-130 est produit durant la fermentation aérobie de milieux nutritifs aqueux appropriés dans des conditions contrôlées par
5 inoculation de l'organisme de l'espèce non-dénommée d'Alcaligenes. Les milieux sont des milieux usuels, contenant une source de carbone, d'azote et de sels inorganiques.

En général, les hydrates de carbone (par exemple le glucose, le fructose, le maltose, le sucre, le xylose, le mannitol, etc) peuvent être utilisés isolément ou en combinaison comme sources de carbone assimilable dans le milieu nutritif. La quantité exacte de la source ou des sources hydrate de carbone qu'on utilise dans le milieu dépend en partie des autres ingrédients dans le milieu, mais, en général, la quantité d'hydrate de carbone varie habituellement entre 2 et 4 % environ du poids du milieu. De préférence, on utilise 3 % de glucose. Ces sources de carbone peuvent être utilisées individuellement ou plusieurs de ces sources de carbone peuvent être combinées dans le milieu. En général, de nombreuses matières protéiques peuvent être utilisées comme sources d'azote dans la fermentation. Des sources d'azote utilisables sont, par exemple, des hydrolysats de levures, de la levure primaire, de la farine de soja, de la farine de graines de coton, des hydrolysats de caséine, de la liqueur de macération de maïs, des résidus solubles de distillation, de la pâte de tomates, etc.
20 25 30 35 Les sources d'azote, isolément ou en combinaison, sont utilisées à raison de 0,05 à 0,4 % environ du poids du milieu aqueux.

Parmi les sels inorganiques nutritifs qui peuvent être incorporés dans les milieux de culture, se trouvent les sels usuels capables de donner des

ions de sodium, de potassium, d'ammonium, de calcium et des ions phosphate, sulfate, chlorure, carbonate, etc. Sont inclus aussi des métaux présents en quantités de l'ordre de traces comme le cobalt, le manganèse, 5 le fer et le magnésium.

Il y a lieu de noter que les milieux décrits dans les exemples sont seulement illustratifs de la grande variété de milieux pouvant être utilisés, et ne doivent pas être considérés comme limitatifs.

10 Une caractéristique importante des milieux est que quand la souche S-130 est cultivée dans des conditions de basse teneur en Ca^{++} , c'est-à-dire dans de l'eau désionisée ou dans un système aqueux ayant moins de 200 ppm d'ions Ca^{++} , la gomme résultante a 15 des propriétés améliorées de dissolution.

La fermentation est effectuée à des températures comprises entre 25 et 35°C environ; toutefois, pour les meilleurs résultats, il est préférable de conduire la fermentation à des températures comprises 20 entre 28 et 32°C environ. Le pH des milieux nutritifs pour le développement de la culture d'Alcaligenes et pour la production du polysaccharide S-130 peut varier entre 6 et 8 environ, de préférence entre 6,5 et 7,5.

Bien que le polysaccharide S-130 soit produit 25 par culture tant en surface qu'immégrée, il est préféré de conduire la fermentation à l'état immégré.

On effectue commodément une fermentation à petite échelle en inoculant un milieu nutritif approprié avec la culture et, après transfert à un milieu 30 de production, en permettant à la fermentation de s'effectuer à une température constante de 30°C environ sur une secoueuse pendant plusieurs jours.

La fermentation est commencée dans un flacon stérilisé de milieu par une ou plusieurs étapes de 35 développement de germes. Le milieu nutritif pour l'é-

tape de développement de germes peut être une combinaison appropriée quelconque de sources de carbone et d'azote. Le flacon de développement de germes est secoué dans une chambre à une température constante de
5 30°C environ pendant 1 à 2 jours, ou jusqu'à ce que le développement soit satisfaisant, et on utilise un peu du développement végétatif résultant pour inoculer un deuxième étage de développement de germes ou le milieu de production. Les flacons des étages intermédiaires
10 de développement de germes, quand on les utilise, sont développés essentiellement de la même manière; c'est-à-dire qu'une partie du contenu du flacon du dernier étage de développement de germes est utilisée pour inoculer le milieu de production. Les flacons inoculés
15 sont secoués à une température constante pendant plusieurs jours et à la fin de la période d'incubation les contenus des flacons sont recueillis par précipitation par un alcool approprié comme l'isopropanol.

Pour un travail à grande échelle, il est
20 préférable de conduire la fermentation dans des réservoirs appropriés équipés d'un agitateur et d'un moyen pour aérer le milieu de fermentation. Selon ce procédé, le milieu nutritif est préparé dans le réservoir et stérilisé par chauffage à des températures
25 allant jusqu'à 121°C environ. Après refroidissement, le milieu stérilisé est inoculé avec des germes obtenus précédemment de la culture productrice et on laisse s'effectuer la fermentation pendant un laps de temps de, par exemple, 2 à 4 jours tout en agitant et/ou en aérant le milieu nutritif et en maintenant
30 la température à 30°C environ. Ce procédé de production du S-130 convient particulièrement bien pour la préparation de grandes quantités.

Le produit est recueilli à partir du milieu
35 de fermentation par précipitation par un alcool appro-

-10-

prié, comme l'isopropanol.

Hétéropolysaccharide S-130

L'hétéropolysaccharide produit par une espèce non dénommée d'Alcaligenes est composé principalement d'hydrates de carbone avec 3-5 % de groupes acétyle comme l'ester à liaison O-glycosidique.

La portion hydrate de carbone du polysaccharide S-130 contient 10-20 % d'acide glucuronique; 10-25 % de mannose; 20-40 % de glucose; et 30-60 % de rhamnose.

La teneur en groupes acétyle de 5-10 % a été déterminée en traitant une solution aqueuse à 0,2 % de gomme S-130 par un réactif alcalin, l'hydroxylamine, cela étant suivi d'un traitement par un réactif chlorure ferrique acide [S. Hestrin (1949) J. Biol. Chem. 180, pages 249-261].

Les sucres neutres du polysaccharide S-130 ont été déterminés en dissolvant 10 mg du produit dans 2 cm³ de solution 2N de H₂SO₄ et en chauffant le mélange à 100°C pendant 4 heures. La solution résultante a été refroidie, neutralisée par l'hydroxyde de baryum et on a porté le pH à 5-6 au moyen d'anhydride carbonique solide. Le précipité résultant de sulfure de baryum a été éliminé par centrifugation et le liquide surnageant a été concentré à l'état d'un sirop sous pression réduite. On a tenté d'identifier les sucres dans l'hydrolysat par chromatographie gaz-liquide de leurs dérivés aldononitrile acétate sur un chromatographe modèle 5750 de Hewlett-Packard en utilisant 3 % en poids d'OV-225 sur Gas Chrom Q en particules de 0,149 à 0,177 mm à 210°C. On a identifié et déterminé quantitativement les sucres par comparaison avec des étalons authentiques [J.K. Baird, M.J. Holroyde, et D.C. Ellwood (1973) Carbohydr. Res. 27 pages 464-467].

Les divers sucres neutres des polysaccharides ont été caractérisés aussi par utilisation de chromatographie descendante sur papier sur du papier pour chromatographie Whatman N° 1 en utilisant comme solvant la couche supérieure d'un mélange pyridine : acétate d'éthyle : eau (2:5:5). On a coloré les chromatogrammes en utilisant une immersion dans le nitrate d'argent et un réactif pour pulvérisation phtalate d'alanine acide. Les sucres constituants ont été identifiés par co-chromatographie avec des étalons de sucres et par la réaction de couleur spécifique avec le réactif phtalate d'alanine.

La teneur en acide glucuronique du polysaccharide a été déterminée par deux méthodes séparées. Dans une méthode, l'échantillon a été décarboxyillé par de l'acide chlorhydrique à 19 % et l'anhydride carbonique libéré a été recueilli dans de l'hydroxyde de sodium normal et on a effectué des déterminations par titrage en retour [B.L. Browning (1967) Methods of Wood Chemistry II, pages 632-633] et par la méthode colorimétrique au carbazole [T. Bitter et H.M. Muir (1962) Anal. Biochem. 4 pages 330-334].

On a utilisé une électrophorèse sur papier pour la séparation et la tentative d'identification de l'acide glucuronique présent dans l'hydrolysat acide neutralisé décrit ci-dessus. Des portions aliquotes de ce dernier et des étalons connus d'acide glucuronique ont été appliqués sur du papier pour électrophorèse Camag N° 68-011 et on a effectué une électrophorèse pendant 2,0 heures dans un tampon au pH 2,7 en utilisant un appareil d'électrophorèse Camag modèle HVE. Les chromatogrammes ont été colorés avec le réactif pour immersion au nitrate d'argent afin de localiser les acides glucuroniques séparés.

Le polysaccharide S-130 donne de la viscosité

à un milieu aqueux quand il est dissous dans l'eau à de faibles concentrations. Pour cette raison et aussi pour sa sensibilité au cisaillement et sa rhéologie d'ensemble, il est utile comme épaississant, agent 5 de suspension, émulsionnant, stabilisant, lubrifiant, agent filmogène ou liant, spécialement dans des systèmes aqueux. En particulier, il a des utilisations dans les applications suivantes ou les produits suivants : adhésifs, ciments pour joints de murs, mortiers liquides et mortiers retenant l'eau, enduits pour bouchage de fissures, étanchéité des boîtes de conserve, produits pour chaudières, crémage du latex, fondants pour baguettes de soudure, pâtes à braser, vernis céramiques et extrusions, produits de nettoyage 10 et de brillantage, jouets, émulsions (latex, asphalte, silicone), récupération de l'argent, enrobages de semences, réglage de la pulvérisation pour pesticides ou herbicides, pesticides et herbicides fluides et concentrés émulsionnables, liants pour tabac, encres 15 à base d'eau, solutions pour distributeurs lithographiques, produits de finition pour cuir, hydro-paillage et hydro-semis, impression et finition de tissus, additifs pour papier à ajouter dans la partie humide, adjuant de rétention et de formation pour papier à 20 ajouter dans la partie humide, produits anti-adhésifs, agents de démoulage, résines liquides, explosifs en bouillie et emballés, boues de forage pour puits de pétrole et puits d'eau, fluides de stimulation pour pétrole, produits de beauté, suspensions et émulsions 25 pharmaceutiques.

De plus, cette gomme est utile dans des produits alimentaires tels que des gelées et d'autres produits d'une haute teneur en sucre, des boissons comprenant des boissons à base d'acide citrique, des 30 produits laitiers comprenant la crème glacée et le 35

yaourt, des assaisonnements pour salade, des mélanges secs, des glaçages, des sirops, les gâteaux dits puddings, des aliments farineux, des aliments en boîtes de conserve et passés à l'autoclave et des 5 produits de remplissage pour boulangerie.

Une utilité particulièrement intéressante se trouve dans le domaine des boues de forage pour puits de pétrole et puits d'eau. On trouvera ci-après 10 des exemples plus détaillés illustrant cette utilisation préférée.

Bien que la gomme S-130 possède une propriété générale consistant à donner de la viscosité, son profil particulier de propriétés en solution est une caractéristique distinctive qui permet de la distinguer 15 des autres hétéropolysaccharides.

Brièvement, la gomme est d'une haute viscosité en présence de 0,1 % de KCl (1650 cPo) et d'eau DI (1470 cPo). Elle présente une excellente stabilité à l'acide acétique à chaud (+36 %) et à la chaleur 20 (-1 %). Un gel se forme en présence de chaleur et de 1 % de NaOH. Cette gomme est réactive à KCl, présentant un accroissement de viscosité de plus de 16 % en présence de 0,1 % et de 2,5 % de KCl. Il se forme un film fragile, d'une faible résistance à la traction. 25

Les propriétés suivantes de la gomme : bonne viscosité dans la saumure (KCl et NaCl) et dans l'eau de mer, bonne stabilité aux acides et à la chaleur, viscosité constante dans des plages de pH de 1,5 à 30 12,1 et bonne stabilité au cisaillement, la rendent spécialement utilisable pour des applications industrielles comme dans des fluides de forage et des fluides pour l'industrie du pétrole. Spécialement, la gomme S-130 a une excellente stabilité à la chaleur 35 et il ne se produit pas de perte de viscosité lors

d'un passage à l'autoclave à 121°C et à 1,05 kg/cm²
pendant 15-20 minutes.

1. Viscosité et cisaillement

A. Brookfield

5

1.	<u>1,0 %</u> à 60 tpm	<u>DI H₂O</u>	<u>DI H₂O + 0,1 % KCl</u>
	à 6 tpm	<u>1470</u> cPo	<u>1650</u> cPo
		<u>10 400</u> cPo	

Rotor N° 3

10

2. 0,1 % (adaptateur UL)^a

45 cPo 30 cPo

3. 0,5 % Wells-Brookfield
à 9,6 s⁻¹

680 cPo 1180 cPo

B. Cisaillement^b

15

1.	<u>n à 19,2 s⁻¹</u>	<u>10 110</u> cPo
2.	<u>n à 9,6 s⁻¹</u>	<u>2 200</u> cPo
3.	<u>n à 76,8 s⁻¹</u>	<u>320</u> cPo
4.	<u>n à 384 s⁻¹</u>	<u>60</u> cPo
5.	<u>n à 384² s⁻¹</u>	<u>60</u> cPo
6.	<u>n à 9,6 s⁻¹</u>	<u>1 800</u> cPo

20

C. Stockage à 4,4°C

2050 cPo à 60 tpm avec rotor N° 4, écoulement très saccadé, accroissement de viscosité de 39 % par rapport à la viscosité à la température ambiante.

2. Stabilité aux acides, aux bases et à la chaleur

25

A. Stabilité

1. Acide acétique plus chaleur

valeur initiale de n : 2500 cPo

valeur finale de n : 3600 cPo

% de changement : +36

30

2. 1 % HCl plus chaleur

valeur initiale de n : 1230 cPo

valeur finale de n : perte totale

% de changement : perte totale

3. 1 % NaOH plus chaleur

valeur initiale de n : 1380 cPo

35

valeur finale de n : Gel

% de changement : Gel

4. Chaleur seulement

valeur initiale de n : 2130 cPo

5 valeur finale de n : 2100 cPo

% de changement : -1

B. Effet du pH

1. Acide acétique à 5 % pH 2,71 2560 cPo^c

2. NH₄OH à 5 % pH 11,09 2070 cPo^c

10 3. Compatibilité avec les sels et les colorants

A. Sels

1. CaCl₂ (saturé) compatible

2. Polyphosphate d'ammonium précipité

3. NH₄NO₃ à 60 % compatible

15 4. 1 % Al₂O₃(SO₄)₃.18H₂O compatible

5. 1 % CaCl₂.2H₂O compatible

6. 1 % KCl compatible

7. 0,1 % KCl 2560 cPo

8. 2,5 % KCl 2560 cPo

20 B. Colorants

1. Vert "Milling" compatible

2. Bleu de méthylène précipité

4. Propriétés texture/écoulement

Gomme d'une haute viscosité, écoulement saccadé, pas de gélification, gommeux au toucher.

25 5. Synergie et enzymes^c

		n à 1%	à 0 heure du mélange	à 2 heures du mélange
	A. Guar	<u>2320 cPo</u>	<u>2560 cPo</u>	<u>2560 cPo</u>
30	B. H.P. Guar	<u>1960 cPo</u>	<u>1950 cPo</u>	<u>2560 cPo</u>
	C. CMC	<u>870 cPo</u>	<u>1310 cPo</u>	<u>970 cPo</u>
	D. HEC	<u>440 cPo</u>	<u>870 cPo</u>	<u>1180 cPo</u>
	E. SMS 47-6	<u>2130 cPo</u>		

	<u>Viscosité prévisible</u>	<u>Synergie</u>
A.	Guar <u>2230</u> cPo	+15 %
B.	H.P. Guar <u>2050</u> cPo	+25 %
5 C.	CMC <u>1360</u> cPo	0 %
D.	HEC <u>970</u> cPo	+22 %

6. Réactivité avec le lait

- A. Dispersion : excellent
- B. Séparation du petit-lait : 1er jour
- 10 C. Autres observations :

7. Formation de film

S'étend de manière irrégulièrre; un film se forme, non plastique, très fragile, faible résistance à la traction.

15 ^aViscosité mesurée sur un viscosimètre Brookfield modèle LVF à 6 tpm avec le rotor N° 1 et un adaptateur UL.

^bToutes mesures effectuées sur un viscosimètre Wells-Brookfield modèle RVT-c/p.

20 ^cViscosité mesurée sur un micro-viscosimètre Wells-Brookfield modèle RVT-c/p à $9,6 \text{ s}^{-1}$.

Exemple 1

Procédé de fermentation pour la production d'hétéropolysaccharide S-130

25 A. Entretien de la culture

L'organisme Alcaligenes non-dénommé, ATCC 31555, pousse très bien sur gélose NA, avec une bonne morphologie des colonies. La température d'incubation est de 30°C. L'organisme produit un pigment jaune.

30 B. Préparation de germes

Des germes en ballons sont préparés dans du bouillon YM mis à incuber à 30°C pendant 24 heures, puis utilisés pour inoculer un milieu de production de germes qui est le même que dans le fermenteur

final. On utilise un inoculum à 5 % pour le fermenteur de 14 litres.

C. Milieu dans le fermenteur final

Le milieu suivant donne des résultats acceptables dans le fermenteur de 14 litres et peut être utilisé pour des fermentateurs de plus grande capacité, de 20 litres et de 70 litres :

	Glucose	3,0 %
	K ₂ HPO ₄	0,05 %
10	Promosoy	0,05 %
	NH ₄ NO ₃	0,09 %
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 %
	Fe ⁺⁺	1 ppm
	Sels HoLe	1 ml/L

On règle le pH entre 6,5 et 7,5. À 0 heure, le pH est de 7,3 et la quantité de source de carbone résiduelle mesurée est de 3,07 %. Après 25,5 heures, le pH est de 7,0 et la viscosité mesurée de la bière est de 2350. Après 63,5 heures, le pH est de 6,3 et la viscosité de la bière de 3950 et on arrête la réaction en ajoutant 4 % d'isopropanol.

Les sels HoLe sont une solution d'oligo-éléments contenant du tartrate, du molybdate de magnésium, CoCl₃, ZnCl₂, CuCl₂, de l'acide borique, du chlorure de manganèse et du sulfate ferreux.

Les vitesses initiales d'agitation et d'aération sont de 400 tpm et de 3L/M, respectivement. L'aération reste constante pendant toute la fermentation. On augmente l'agitation suivant le bescin durant la fermentation pour assurer un bon mélange. L'agitation maximale est de 1600 tpm.

Quand on désire un produit d'une basse teneur en calcium, on utilise le milieu ci-dessus avec de l'eau désionisée.

D. Recueil

La bière de fermentation est pasteurisée à 75°C pendant 10-15 minutes. De bonnes fibres sont produites dans des conditions de précipitation donnant 5 58-60 % d'IPA usé.

E. Séchage

Le produit est recueilli après séchage à 50-55°C pendant une heure environ dans un séchoir à plateaux à air forcé.

10 Le produit préparé dans cet exemple présente une viscosité à 1 % de 1490 dans l'eau désionisée et de 2400 à 1 % dans de l'eau DI contenant 1 % de KCl ajouté. Il contient d'après l'analyse 12 % de l'acide glucuronique, 28 % de glucose, 13 % de mannose, 15 59 % de rhamnose, 3,5 % de groupes acétyle et pas de pyruvate.

20 Les mesures sur cette gomme indiquent un excellent développement de la viscosité dans KCl à 2 %, avec une excellente stabilité à NaCl et une excellente conservation de la viscosité jusqu'à au moins 149°C; on observe une légère gélification de la gomme dans KCl à 2 %.

Exemple 2**Composition de boue à l'eau de mer**

25 S-130 est utile dans des boues utilisées pour le forage de puits de pétrole. Une formule et des résultats pour une boue à base d'eau de mer sont les suivants :

	S-130	1,0 kg
30	Eau de mer	350 litres
Résultats de viscosité Fann		
	Vitesse (tpm)	3 6 100 200 300 600
	Lecture sur le cadran	3,4 3,8 8,5 11,0 13,2 17,2
	pH =	7,1

Exemple 3Composition d'un fluide de fracturation hydraulique

Exemple de fluide de fracturation hydraulique - pour températures élevées (au-dessus de 93°C) :

5 pour 1000 litres :

H₂O

5% de méthanol ou 500 ppm de sulfite
de sodium

2% KCl

19,8 kg

10 Persulfate d'ammonium 1,20 kg
S-130 4,80 kg

Viscosité du fluide ci-dessus :

Fann 35 tpm 600 300 200 100 6 3

Viscosité, cPo 15,0 24,2 33,4 53,3 450 813

-20-

- REVENDICATIONS -

1 - Hétéropolysaccharide S-130 contenant
10-20 % d'acide glucuronique; 10-25 % de mannose;
20-40 % de glucose; 30-60 % de rhamnose; et 3-5 %
5 de groupes acétyle, préparé par fermentation dans des
conditions contrôlées d'une culture de ATCC 31555,
une espèce d'Alcaligenes.

2 - Produit selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il contient moins de 200 ppm d'ions
10 Ca^{++} .