Office de la Propriété Intellectuelle du Canada
Un organisme d'Industrie Canada

Canadian Intellectual Property Office
An agency of Industry Canada

CA 2281594 C 2012/09/25

(11)(21) 2 281 594

(12) BREVET CANADIEN
CANADIAN PATENT

(13) C

(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 1998/02/12
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 1998/08/20
(45) Date de délivrance/Issue Date: 2012/09/25
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 1999/08/09
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 1998/000269
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 1998/035993
(30) Priorité/Priority: 1997/02/12 (FR97/01624)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C12N 1/20* (2006.01), *A23L 1/054* (2006.01), *A23L 1/187* (2006.01), *A61K 47/36* (2006.01), *A61K 8/73* (2006.01), *A61Q 1/14* (2006.01), *A61Q 19/00* (2006.01), *C08B 37/00* (2006.01), *C11D 7/22* (2006.01), *C12P 19/04* (2006.01)

(72) Inventeurs/Inventors:
ALAMI, YOUNES, FR;
HEULIN, THIERRY, FR;
MILAS, MICHEL, FR;
DE BAYNAST, REGIS, FR;
...

(73) Propriétaires/Owners:

(54) Titre : POLYSACCHARIDE, MICRO-ORGANISME ET PROCEDE POUR SON OBTENTION, COMPOSITION LE CONTENANT ET APPLICATION

(54) Title: POLYSACCHARIDE, MICRO-ORGANISM AND METHOD FOR OBTAINING SAME, COMPOSITION CONTAINING IT AND APPLICATION

(57) Abrégé/Abstract:
Polysaccharide ayant une unité de répétition qui possède une chaîne latérale et comprend six sucres neutres dont le glucose et le galactose et un sucre acide, une solution supérieure à 0,2 % en poids dudit polysaccharide formant un gel élastique et transparent. Application dans le domaine des industries cosmétiques, alimentaires, pharmaceutiques, pétrolières.

CA 2281594 C 2012/09/25

(11)(21) 2 281 594

(13) C

(72) Inventeurs(suite)/Inventors(continued): HEYRAUD, ALAIN, FR; VILLAIN, AGNES, FR

(73) Propriétaires(suite)/Owners(continued):AGRO INDUSTRIE RECHERCHES ET DEVELOPPEMENT (A.R.D.), FR; CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS), FR

(74) Agent: ROBIC

PCT ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 6 : **C08B 37/00, C12P 19/04**

A1

(11) Numéro de publication internationale: **WO 98/35993**

(43) Date de publication internationale: 20 août 1998 (20.08.98)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/00269

(22) Date de dépôt international: 12 février 1998 (12.02.98)

(30) Données relatives à la priorité:
97/01624 12 février 1997 (12.02.97) FR

(71) Déposants *(pour tous les Etats désignés sauf US)*: AGRO INDUSTRIE RECHERCHES ET DEVELOPPEMENT (A.R.D.) SOCIETE ANONYME [FR/FR]; Route de Bazancourt, F–51110 Pomacle (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel–Ange, F–75794 Paris Cedex 16 (FR).

(72) Inventeurs; et
(75) Inventeurs/Déposants *(US seulement)*: ALAMI, Younes [FR/FR]; Résidence Les Facultés "F", Appartement 394, 22, rue Le Corbusier, F–13090 Aix en Provence (FR). HEULIN, Thierry [FR/FR]; Bastide Sainte Anne, 2, boulevard du Petit Lavandou, F–13100 Aix en Provence (FR). MILAS, Michel [FR/FR]; Le Vial, F–38320 Herbeys (FR). DE BAYNAST, Régis [FR/FR]; 35, rue de l'Ermitage, F–78000 Versailles (FR). HEYRAUD, Alain [FR/FR]; 6, Côte de Verdaret, F–38113 Veurey–Voroize (FR). VILLAIN, Agnès [FR/FR]; 47, rue Lachmann, F–38000 Grenoble (FR).

(74) Mandataire: HAMMOND, William; Cabinet Hammond, 33, rue Vaneau, F–75007 Paris (FR).

(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Publiée
Avec rapport de recherche internationale.

(54) Title: POLYSACCHARIDE, MICRO–ORGANISM AND METHOD FOR OBTAINING SAME, COMPOSITION CONTAINING IT AND APPLICATION

(54) Titre: POLYSACCHARIDE, MICRO–ORGANISME ET PROCEDE POUR SON OBTENTION, COMPOSITION LE CONTENANT ET APPLICATION

(57) Abstract

The invention concerns a polysaccharide with a repeat unit having a lateral chain and comprising six neutral sugars among which glucose and galactose and an acid sugar, a solution greater than 0.2 % by weight of said polysaccharide forming a transparent and elastic gel. The invention is applicable in the cosmetic, food, pharmaceutical and oil industries.

(57) Abrégé

Polysaccharide ayant une unité de répétition qui possède une chaîne latérale et comprend six sucres neutres dont le glucose et le galactose et un sucre acide, une solution supérieure à 0,2 % en poids dudit polysaccharide formant un gel élastique et transparent. Application dans le domaine des industries cosmétiques, alimentaires, pharmaceutiques, pétrolières.

POLYSACCHARIDE, MICRO-ORGANISME ET PROCÉDÉ POUR SON OBTENTION, COMPOSITION LE CONTENANT ET APPLICATION

La présente invention concerne un nouveau polysaccharide, micro-organisme et procédé pour son obtention, composition le contenant et application.

On sait que les populations microbiennes constituent un large réservoir pour la mise en oeuvre de nouvelles molécules. La description des bactéries présentes dans les rhizosphères de plantes céréalières a d'abord permis de mettre en évidence des espèces fixatrices d'azote pour la plupart associées aux racines de blé, tournesol, riz et maïs. L'isolement de ces espèces a nécessité la mise au point de méthodes d'isolement spécifiques : « le modèle spermosphère » permettant de sélectionner les bactéries les plus adaptées à la rhizosphère et l'immunopiégeage utilisant les anticorps spécifiques de certaines espèces. Ces bactéries sont aussi impliquées dans les mécanismes d'attachement et de colonisation des racines.

Depuis plusieurs années, les recherches se sont focalisées sur la capacité de la plupart des bactéries, présentes à la surface des racines et dans la rhizosphère, à produire des exopolysaccharides (EPS). Il a largement été démontré que ces polymères jouent un rôle dans la colonisation des racines par les bactéries et l'agrégation des sols autour des racines.

De récents travaux s'intéressent à l'étude de souches pour leur capacité à stimuler l'agrégation du sol autour des racines de tournesol et de blé.

La présente invention concerne donc un polysaccharide ayant une unité de répétition qui possède une chaîne latérale et est constitué par six sucres neutres dont le glucose et le galactose et un sucre acide, des substituants pyruvates et acétates étant présents, ledit polysaccharide formant un gel élastique et transparent lorsqu'il est présent dans une solution à une quantité d'au moins 2 g/l.

Un objet de la présente invention est de fournir un micro-organisme produisant des exopolysaccharides sur milieu gélosé, à croissance rapide sur des milieux de culture peu exigeants à base de matières premières agricoles (hydrolysats de son de blé, peptides de blé, sirops de glucose, hydrolysats de co-

produits d'amidonnerie par exemple), faciles à mettre en oeuvre et bien entendu non-pathogènes et génétiquement stables.

Ainsi, a été mise en évidence, une souche dont la cartographie et le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S indiquent qu'elle appartient à la famille des Rhizobiacées (subdivision alpha des Protéobactéries). Le pourcentage de similarité des acides nucléiques de cette région du chromosome (ADNr 16S) de la souche YAS34 est de 97,2 % avec *Rhizobium etli* et de 96,2 % avec *Rhizobium leguminosarum* (souche LMG 9518). Une hybridation sur colonies de YAS34 avec une sonde oligonucléotidique spécifique des *Rhizobium (sensu lato)* dans le gène nodD s'est révélée positive (communication personnelle G. Laguerre, INRA, Dijon).

La présence du gène nodD et les pourcentages de similarité du gène codant pour l'ARNr 16S avec des espèces appartenant au genre *Rhizobium* sont autant d'éléments permettant d'affirmer que la souche YAS34 est un *Rhizobium*.

L'empreinte génotypique de la souche YAS34 par rep-PCR en utilisant trois différents jeux d'amorce (REP, ERIC et BOX) est disponible.

YAS34 a été déposée sous le n° I-1809 à la CNCM de l'Institut Pasteur le 15 janvier 1997.

Cette souche YAS 34 a été isolée de la surface des racines (rhizoplan) d'un tournesol (Helianthus annuus cv Albena) prélevé au stade quatre feuilles. Les semences utilisées n'avaient pas été traitées à l'aide de produits phytosanitaires et avaient été stérilisées avant le semis. Le sol était de type limoneux dont le cation échangeable majoritaire est le calcium.

Cette souche YAS 34 est une bactérie Gram négative, aérobie catalase positive et oxydase négative. Il s'agit d'un bâtonnet mobile formant des colonies élastiques, translucides de couleur blanche sur milieu RCV-glucose (4 g/l).

La souche YAS 34 réalise la biosynthèse de polysaccharide par fermentation en présence d'un milieu de culture contenant une source de carbone préférentiellement assimilée.

Il a été mis en évidence que les sources carbonées, les plus performantes en terme de croissance et de production de polysaccharides, sont le glucose, le fructose, le saccharose et le galactose.

Cette aptitude à assimiler de nombreux glucides a conduit à étudier la capacité fermentaire de cette souche sur différents milieux d'origine végétale issus du fractionnement de matières agricoles comme le blé, la pomme de terre et le raisin. Dans le tableau I ci-après, sont regroupés les différents milieux testés, tandis que le tableau II indique les résultats obtenus.

TABLEAU I

PRODUITS AGRICOLES	MILIEUX TESTES	COMPOSITIONS SUCRES ET MATIERES AZOTEES
Pomme de terre	JCII ED : jus clair II électrodialysé	
Son de Blé	JPAS : jus de presse après saccharification	
	FAM : filtrat après microfiltration	Glucose : 12 à 15 g/L Matière azotée : 5,25 g/L
Raisin	JRB 033 ED LD : jus de presse de marc de raisin après électrodialyse	Glucose : 10 g/L Fructose : 10 g/L Matière azotée : traces

TABLEAU II

5

SUBSTRATS NATURELS	µ max (h-1)	DO à 600 nm max	VISCOSITE (cps à 25°C , 26 s-1)		CONSOMM. TOTALE GLUCOSE (g/L)
			à 52 h	à 140 h	
Pomme de terre					
JCII ED	0,21	7,6	238	273	5,6
JCII ED1/2	0,26	6,04	197	193	3,8
Son de Blé					
JPAS 2/3	0,17	3,9	267	374	9,5
FAM	0,47	2,9	280	356	5,6
Marc de raisin					
JRB 03 ED LD1/2	nd		9	36	1,8

Le milieu dénommé FAM issu du son de blé, qui renferme simultanément 12 g/L de glucose et 5,25 g/L de matière azotée, s'avère être le plus perfor-

mant à la fois pour la croissance de la souche (μ max 0,47 h-1) et la biosynthèse de polysaccharide (viscosité proche de 400 cps en fin de culture).

Il a été étudié différents milieux de synthèse dont notamment ceux de composition ci-après :

RCVs		
	Glucose	20 g
	Extrait de levure	1,72 g
	Solution tampon (2)	15 ml
	Solution minérale (1)	50 ml
	Eau osmosée	qsp 1 l
DSM		
	Glucose	20 g
	Corn steep	5 g
	NaNO3	2 g
	K_2HPO_4	1 g
	$MgSO_4, 7H_2O$	1,5 g
	Solution E (3)	2,5 ml
	Eau osmosée	qsp 1 l

Composition des solutions minérale (1), tampon (2) et E (3)

(1) Solution minérale

EDTA (tritriplex II)	0,4 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2 g
$CaCl_2, 2H_2O$	2 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,44 g
Solution éléments	20 ml
Eau osmosée	qsp 1 l

Solutions éléments

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	430 mg
$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	1300 mg
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	750 mg
H_3BO_3	2800 mg
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	22,5 mg
$CoSO_4 \cdot 7H_2O$	70 mg

Eau osmosée qsp 1 l

(2) Solution tampon

KH_2PO_4	40 g
K_2HPO_4	60 g
Eau osmosée	qsp 1 l

(3) Solution E

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	3 g
FeIII nitrate	1 g
$MnSO_4$	0,2 g
$ZnCl_2$	0,1 g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025 g
$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$	0,02 g
$CaCl_2$	0,004 g
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,01 g
Eau osmosée	qsp 1 l

NA

Extrait de viande	3 g
Peptone	5 g
Eau osmosée	qsp 1 l

Le tableau III regroupe les résultats obtenus.

TABLEAU III

Milieu	Rapport C/N	DO à 600 nm max	µ max (h-1)	Viscosité finale à 26s-1, 20°C (cps)
RCV s	50	2,70	0,28	227
DSM+	8	6,20	0,38	254
NA	0,1	1,91	0,35	7

On peut remarquer d'après ce tableau III que les milieux riches en azote et carencés en carbone (C/N faible) tel que le milieu NA favorisent la croissance de la souche mais ne permettent pas la production de polysaccharides. Par contre, les milieux RCV et DSM riches en substrats azotés et carbonés, réalisent le meilleur compromis en permettant à la fois une bonne croissance de la souche et la synthèse de polysaccharides. Ces essais ont également mis en évidence qu'il est possible de dissocier la croissance de la souche de la production de polysaccharides.

Il a été ainsi déterminé un milieu de préculture optimisé pour la croissance de la souche, dont la composition est pour un inoculum de 7,5 %.

Opt2_ns

Glucose (stérilisé séparément)	20 g
Extrait de levure	2,5 g
Sulfate d'ammonium	1 g
Sol. Minérale (1)	70 ml
Sol. Tampon (2)	20 ml
Eau osmosée	qsp 1 l
Inoculum	7,5 %

De même, il a été étudié la mise au point d'un milieu optimisé pour la production d'exopolysaccharide, afin de maximiser la productivité en polymère. La composition, ci-après dénommée MP1, a donc été définie comme la plus performante.

MP1

Glucose	20 g
Extrait de levure	1,7 g
Sol. Minérale (1)	70 ml
Eau osmosée	qsp 1 l

Dans le tableau IV, on a regroupé les résultats de croissance et de production en utilisant le milieu RCVs seul (référence) ou les deux milieux optimisés ci-dessus Opt2_ns et MP1.

TABLEAU IV

		CYCLE REFERENCE	CYCLE OPTIMISE
PRECULTURE	**Milieu**	**RCVs**	**Opt2_ns**
	% inoculum	0,22	0,37
	DO corrigée 600 nm finale	0,6	1,6
	Durée	20 heures	15 heures
PRODUCTION	**Milieu**	**RCVs**	**MP1**
	µ max (h-1)	0,28	0,29
	DO corrigée 600 nm finale	8,9	9,2
	Concentration finale en EPS	10,1 g/l	10,2 g/l
	dS/dt Consommation en glucose	0,25 g/l.h	0,30 g/l.h
	dP/dt Productivité en EPS (phase de production)	0,27 g/l.h	0,36 g/l.h
	Viscosité à 25°C	1500 cps à $26s^{-1}$	1560 cps à $26s^{-1}$
	Durée fermentation Durée phase production	73 heures 38 heures	63 heures 28 heures
	Durée totale du cycle	93 heures	78 heures

Pour récupérer le polysaccharide produit par la souche par fermentation comme explicité ci-dessus, deux méthodes peuvent être utilisées.

Selon une première méthode, le moût brut est soumis à une précipitation à l'éthanol puis à un séchage sous vide pour obtenir un produit sec contenant le polysaccharide brut. Le produit obtenu, remis en solution à 1 %, a des propriétés viscosifiantes. Cette solution, chauffée à une température comprise entre

70 et 95°C (de préférence entre 85 et 95°C), présente les mêmes propriétés gélifiantes que la solution préparée à partir du polysaccharide purifié, qui est obtenu selon la seconde méthode ci-après.

Selon cette seconde méthode, on soutire le moût de fermentation et on le dilue entre 1 et 1/20, de préférence entre 1 et 1/10. Puis, on porte la solution obtenue à une température comprise entre 70 et 95°C ; de préférence, ce traitement thermique est réalisé, entre 85 et 95°C. En effet, un traitement thermique à une température de 90°C provoque une liquéfaction du moût de fermentation, même après refroidissement à température ambiante. Pour un traitement à 90°C pendant environ une heure, la température de gélification ou refroidissement est inférieure à 20°C.

Si le traitement thermique est réalisé à une température inférieure à 90°C, celui-ci conduit après refroidissement à l'obtention d'un produit plus visqueux que le moût initial.

Ainsi, il apparaît que de tels traitements thermiques permettent de faciliter la séparation cellules/polymères, notamment par centrifugation.

On centrifuge le produit issu du traitement thermique par exemple à 13000 g ou on le soumet à une filtration tangentielle.

Le surnageant ainsi obtenu est soumis à une filtration frontale à 0,2 µm sur un filtre à plaques. Une telle filtration frontale permet en effet d'obtenir un filtrat extrêmement pur présentant des densités optiques (DO) à 600 nm pratiquement nulles (Tableau V).

TABLEAU V

Seuil de coupure (µm)	**DO à 600 nm du Filtrat**
0,8	0,02
0,45	0,005
0,8 puis 0,45	0,007
0,8 puis 0,22	0,003
0,45 puis 0,22	0,002

Pression appliquée : 2.10^5 Pascals

Le filtrat récupéré est traité de façon connue : il est concentré, soumis à une précipitation à l'éthanol puis à un séchage sous vide pour obtenir un produit sec comprenant un exopolysaccharide purifié.

Ainsi qu'il a été dit plus haut, cet exopolysaccharide est nouveau tant par sa nature que par ses propriétés.

La détermination de la structure du polysaccharide ainsi obtenu par spectre RMN est l'objet des figures 1 et 2. Ceci a permis de déterminer que l'unité de répétition, qui possède une chaîne latérale, est composée majoritairement de 7 sucres :

- 6 sucres neutres dont le glucose et le galactose
- 1 sucre acide

Il a été également mis en évidence la présence de substituants pyruvates et acétates. Les charges pyruvates et sucres acides confèrent à ce polysaccharide les propriétés de polyélectrolyte.

Lors de l'utilisation, pour des concentrations en polysaccharide de l'invention supérieures à 2 g/l, les solutions de ce dernier se transforment en gel. L'obtention du gel se fera par mise en solution dans l'eau ou dans toute solution aqueuse saline. Cette mise en solution est favorisée par un chauffage de la solution du polysaccharide de l'invention, de préférence supérieur à 60°C.

Le polysaccharide, selon la présente invention, présente en solution à 1 % une limpidité parfaite, de « qualité cristal », ce qui lui confère une position privilégiée par rapport à des produits connus tels que ceux commercialisés sous la marque AMIGEL par la société A. MULLER, ou sous la dénomination commerciale CURDLAN par la société TAKEDA, les xanthanes commercialisées par la société KELCO et alginates de sodium proposés par la société SANOFI (cf. Tableau VI ci-après).

TABLEAU VI

Produit	Coloration DO à 420 nm	Trouble DO à 600 nm	Do à 860 nm
Gel de l'invention	0,060	0,031	0,020
Amigel	1,200	0,958	0,742
Curdlan	1,232	1,601	1,629
Xanthane LT	0,302	0,187	0,124
Alginates de sodium	0,216	0,133	0,091

Par ailleurs, le polysaccharide selon l'invention présente par rapport à ceux connus une remise en solution la plus rapide (Tableau VII).

TABLEAU VII

Produit	Type de poudre	Durée de remise en solution
Gel de l'invention	non mouillable	Qlq minutes
Amigel	mouillable	Qlq heures
Xanthane	non mouillable	Qlq dizaines de minutes

L'étude des propriétés mécaniques des gels de polysaccharide selon l'invention a permis de montrer la forte élasticité de ce gel : la figure 3 est relative à l'influence de la fréquence (Hz) sur les modules élastiques G' et de perte G" et sur la viscosité complexe n* d'un gel de polysaccharide selon l'invention (la concentration en polysaccharide est de 0,10 g/l et celle de NaCl de 0,1 M).

De même, il a été étudié l'incidence de la force ionique sur le module élastique des gels à 1% (poids/poids) en polysaccharide : la figure 4 est relative à l'influence de la concentration en sel (NaCl) sur le module élastique, mesuré à la fréquence de 0,13 Hz, d'un gel de polysaccharide selon l'invention à une concentration de 10 g/l.

On constate qu'à partir d'une concentration en NaCl supérieure à 0,04 M, on obtient un gel élastique dont les caractéristiques ne varient quasiment plus avec la concentration en sel au moins jusqu'à 0,4 M. Des modules très voisins sont

obtenus en présence de $CaCl_2$. Les gels formés sont thermoréversibles pour des traitements thermiques inférieurs à 90°C : la figure 5 est relative à l'influence de la température sur les modules élastiques G' et de perte G" et sur la viscosité complexe n* d'un gel de polysaccharide selon l'invention (la concentration en polysaccharide étant de 10g/l et celle en NaCl de 0,10 M).

Les résultats obtenus sont cependant fonction de la température et du temps de traitement, avec une possible destruction du gel pour des températures et/ou des temps de traitement trop élevés. La température de fusion du gel dépend très peu de la force ionique et de la nature des ions (Na^+, Ca^{2+} par exemple).

Ce comportement rhéologique en milieu salé est extrêmement intéressant, car il offre des perspectives d'applications dans de nombreux secteurs de l'industrie reliés aux 3 milieux naturellement salés :

- le goût (env. 1,5 g sel/L) :	domaine alimentaire,
- l'eau physiologique (env. 7,5 g sel/L) :	secteur de l'agriculture, la cosmétique, la pharmacie...,
- le milieu marin (env. 25 g sel/L) :	industries pétrochimiques, cosmétique (gamme marine), etc...

Afin d'illustrer ces différents domaines, des exemples d'application et de formulation du polysaccharide selon la présente invention sont indiqués ci-après sans toutefois présenter un caractère limitatif.

I. Cosmétique

Le polysaccharide selon la présente invention trouve des applications en tant que :

- agent hydratant, seul ou en mélange avec des hydratants déjà connus, tels que l'acide hyaluronique, dans des crèmes et des laits,
- agent épaississant et agent de texture dans des lotions, des toniques, des crèmes et des laits (cosmétique blanche),
- agent de suspension et agent texturant dans des gels gommants, des filtres solaires,
- agent gélifiant dans des gels coiffants, des gels avant et après rasage, des gels lavants (shampooings et bains moussants).

Ci-après sont indiqués quelques types d'application.

Crème hydratante (% pds/pds matière sèche)

- émulsifiant	4 %

- conservateur	0,5 %
- glycérol	5 %
- polysaccharide de l'ivention	0,25 %
- NaCl	0,5 %
- eau QSP	100 %

Pour cette application, le polysaccharide de l'invention apporte des propriétés particulièrement intéressantes par rapport à certains produits concurrents, au niveau de l'onctuosité, de la facilité d'étalement et de la fraîcheur. Des effets notables sur la diminution du pouvoir filant, du pouvoir collant, de l'effet filmogène, de la brillance de la peau et de la fluidité ont été observés, ainsi que le montre la figure 6.

Lotion démaquillante (% pds/pds matière sèche)

- Dodécyl-tétradécyl galacturonate de sodium	0,5 %
- Hyaluronate de sodium	0,2 %
- Polysaccharide de l'Invention	0,4 %
- Eau de bleuet	5,0 %
- Conservateur	QS
- Parfum, colorant	QS
- Eau QSP	100,0 %

Gel gommant (% pds/pds matière sèche)

- Polysaccharide de l'invention	0,75 %
- NaCl	0,5 %
- Carboxyméthylcellulose	0,5 %
- Noyau d'abricot broyé	2,0 %
- Conservateur, colorant, parfum	QS
- Eau QSP	100,0 %

Gel Lavant (% pds/pds matière sèche)

- Décyl-dodécyl galacturonate de sodium	4,0 %
- Lauryl bétaine	3,0 %
- Laureth(2)sulfate	3,0 %
- Acylat peptides (C12)	2,0 %
- Mono/oliglycéride d'acide capric/caprilique éthoxylé	1,0 %

- Disodium lauryl sulforsuccinate	1,0 %
- Polysaccharide de l'invention	0,5 %
- NaCl	0,25 %
- Conservateur, parfum, colorant	QS
- Eau QSP	100,0 %

II-Détergents

Le polysaccharide selon la présente invention, trouve des applications en tant que :

* agent texturant et agent de suspension dans des crèmes et des gels récurants.
* agent gélifiant dans des gels déodorants et désinfectants.
* agent de texture dans des liquides vaisselle.

Dans le cas d'une crème récurante, une formulation possible est :

- Polysaccharide de l'invention	1,0 %
- NaCl	0,5 %
- Silicate d'aluminium calciné	25,0 %
- Sodium laurylsulfate	5,0 %
- Capryloamphopropionate	1,0 %
- Conservateur, colorant, parfum	QS
- Eau QSP	100,0 %

III-Alimentation

Le polysaccharide, selon la présente invention, trouve des applications en tant que :

* agent de texture, agent gélifiant et agent de suspension dans les desserts lactés, les vinaigrettes, les sauces (mayonnaise ou autres), les gelées et confitures, les aspics et terrines.
* agent texturant dans les boissons diététiques, les confiseries.

Par exemple, une formulation pour réaliser un flan chocolaté à froid (% pds/pds matière sèche) est :

- Lait UHT	83,0 %
- Polysaccharide de l'invention	1,2 %
- NaCl	0,1 %
- Sucre	8,0 %

- Cacao	3,0 %
- Lait écrémé en poudre	2,0 %
- Huile végétale	0,7 %
- Arôme vanille	QS
- Oeufs	2,0 %

IV-Fermentation

Dans ce domaine, le polysaccharide, selon la présente invention, apporte la texture gélifiée à des milieux de culture gélosés semi-solides. Un exemple de formulation pour milieu gélosé semi-solide est en % pds/pds de matière sèche :

- Peptones	1 %
- Glucose	0,5 %
- NaCl	0,5 %
- Polysaccharide de l'invention	0,75 %
- Eau QSP	100 %

V-Agriculture

En agriculture, le polysaccharide, selon la présente invention, trouve des applications en tant que :

* agent d'agrégation des sols,

* agent rétenteur d'eau, contribution au maintien du potentiel hydrique des sols et agent de protection de la sécheresse,

* agent d'enrobage de semences.

Ainsi, l'inoculation de la souche Rhizobium sur des semences de tournesol permet d'obtenir une forte colonisation des racines que le sol ait été ou non préalablement stérilisé (respectivement 90 % et 10 % de la microflore totale). Les conséquences de cette inoculation concernent l'augmentation de la masse de sol adhérant aux racines (+ 50 %) et la modification de la porosité de ce sol rhizosphérique (augmentation de la macroporosité). Ces résultats semblent indiquer que l'exopolysaccharide produit par la souche YAS 34, d'une part, contribue à l'assemblage des agrégats du sol (effet « collant ») et de ce fait augmente la fréquence des pores de transfert de l'eau vers la plante et, d'autre part, retient l'eau dans une phase polysaccharide gélifiée.

Pour confirmer le rôle rétenteur d'eau du polymère, des mélanges « sol + 1 % polysaccharide purifié » ont été réalisés. Les résultats montrent que à pF 2,5

(capacité au champ), le polysaccharide augmente de 50 % la rétention d'eau du sol et de la même façon, l'apport de polymère (1 %) se traduit par la nécessité d'appliquer deux fois plus d'énergie pour déshydrater le sol.

Les figures ci-après sont jointes en annexe :

Figure 1 - Polysaccharide de l'invention désacétylé. Spectre RMN^{1}H (300 MHz), solution dans D_2O, T = 358°K

Figure 2 - Polysaccharide de l'invention. Spectre RMN^{1}H (300 MHz), solution dans D_2O, T = 358°K

Figure 3 - Influence de la fréquence sur les modules élastique (G') et de perte (G'') et sur la viscosité complexe n* du gel du polysaccharide de l'invention. Concentration en polysaccharide 10 g/L, concentration en NaCl 0,1 M.

Figure 4 - Influence de la concentration en sel (NaCl) sur le module élastique, mesuré à la fréquence 0,13 Hz, d'un gel du polysaccharide de l'invention à la concentration de 10 g/L.

Figure 5 - Influence de la température sur les modules élastique (G') et de perte (G '') et sur la viscosité complexe n* du gel du polysaccharide de l'invention. Concentration en polysaccharide 10 g/L, concentration en NaCl 0,1 M.

Figure 6 - Test sensoriel comparatif entre une formule de crème hydratante de l'art antérieur (art antérieur) et une formule de crème hydratante de l'invention (invention) comprenant 0,25 % d'un polysaccharide de l'invention et du chlorure de sodium.

Enfin, le polysaccharide, selon la présente invention, trouve aussi des applications en tant qu'agent texturant, agent épaississant et agent de suspension dans les peintures.

REVENDICATIONS

1. Polysaccharide ayant une unité de répétition qui possède une chaîne latérale et est constitué par six sucres neutres dont le glucose et le galactose, et par un sucre acide, des substituants pyruvates et acétates étant présents, ledit polysaccharide formant un gel élastique et transparent lorsqu'il est présent dans une solution à une quantité d'au moins 2 g/l.

2. Polysaccharide selon la revendication 1, caractérisé par le fait que la solution d'au moins 2 g/l dudit polysaccharide, en présence de chlorure de sodium (NaCl) à une concentration supérieure à 0,04 M et après chauffage à au moins 60° C, forme un gel élastique et transparent.

3. Polysaccharide selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'en solution dans l'eau à une concentration de 2g/l et en présence de sel, il forme un gel élastique, transparent et suspensif.

4. Micro-organisme capable de synthétiser un polysaccharide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 caractérisé par le fait qu'il est un Rhizobium déposé sous le n° I-1809 auprès de la CNCM.

5. Procédé pour la production d'un polysaccharide selon l'une quelconque des revendications 1 ou 3, caractérisé par le fait qu'il comprend les étapes suivantes :

a) culture d'un micro-organisme selon la revendication 4 sur un milieu riche en glucose et en matière azotée,

b) récupération du moût de fermentation, et

c) obtention directe du polysaccharide brut par précipitation.

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé par le fait que le moût de fermentation issu de l'étape b) est traité comme suit :

d) traitement thermique dudit moût après dilution, à une température comprise entre 70 et 95°C,

e) centrifugation,

f) filtration du surnageant issu de l'étape e) par filtration frontale, et

g) traitement du filtrat pour obtenir le polysaccharide sous forme sèche.

7. Procédé selon la revendication 5, caractérisé par le fait qu'à l'étape a), on utilise deux milieux de culture, l'un dit de préculture et l'autre dit de production.

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé par le fait que le milieu dit de préculture a pour composition :

Glucose (stérilisé séparément)	20 g
Extrait de levure	2,5 g
Sulfate d'ammonium	1 g
Solution Minérale	70 ml
Solution Tampon	20 ml
Eau osmosée	qsp 1 l et
Inoculum	7,5 %

la solution minérale ayant pour composition :

EDTA (tritriplex II)	0,4 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2 g
$CaCl_2, 2H_2O$	2 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,44 g
Solution éléments	20 ml et
Eau osmosée	qsq 1l

la solution éléments comprenant

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	430 mg

$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	1300 mg
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	750 mg
H_3BO_3	2800 mg
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	22,5 mg
$CoSO_4 \cdot 7H_2O$	70 mg
Eau osmosée	qsp 1 l

la solution tampon ayant pour composition :

KH_2PO_4	40 g
K_2HPO_4	60 g
Eau osmosée	qsp 1 l.

9. Procédé selon la revendication 7, caractérisé par le fait que le milieu dit de production a pour composition :

Glucose	20 g
Extrait de levure	1,7 g
Sol. Minérale	70 ml
Eau osmosée	qsp 1 l

la solution minérale ayant pour composition:

EDTA (tritriplex II)	0,4 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2 g
$CaCl_2, 2H_2O$	2 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,44 g
Solution éléments	20 ml
Eau osmosée	qsq 1 l

la solution éléments comprenant

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	430 mg
$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	1300 mg
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	750 mg
H_3BO_3	2800 mg

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	22,5 mg
$CoSO_4 \cdot 7H_2O$	70 mg
Eau osmosée	qsp 1 l.

10. Utilisation du polysaccharide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, en tant qu'agent hydratant, agent épaississant, agent gélifiant ou agent de suspension dans le domaine de la cosmétique.

11. Utilisation du polysaccharide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, en tant qu'agent gélifiant ou agent de suspension dans le domaine de la détergence.

12. Utilisation du polysaccharide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 en tant qu'agent texturant ou agent de suspension dans les produits alimentaires.

13. Utilisation du polysaccharide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 en tant qu'agent gélifiant dans des milieux de fermentation gélosés.

14. Utilisation du polysaccharide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 en tant qu'agent d'agrégation des sols, agent rétenteur d'eau ou agent d'enrobages de semences dans le domaine de l'agriculture.

15. Utilisation du polysaccharide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 en tant qu'agent texturant, agent épaississant ou agent de suspension dans les peintures.

16. Utilisation du polysaccharide selon la revendication 3, en tant qu'agent épaississant, agent gélifiant, agent de suspension, agent texturant ou agent rétenteur d'eau.

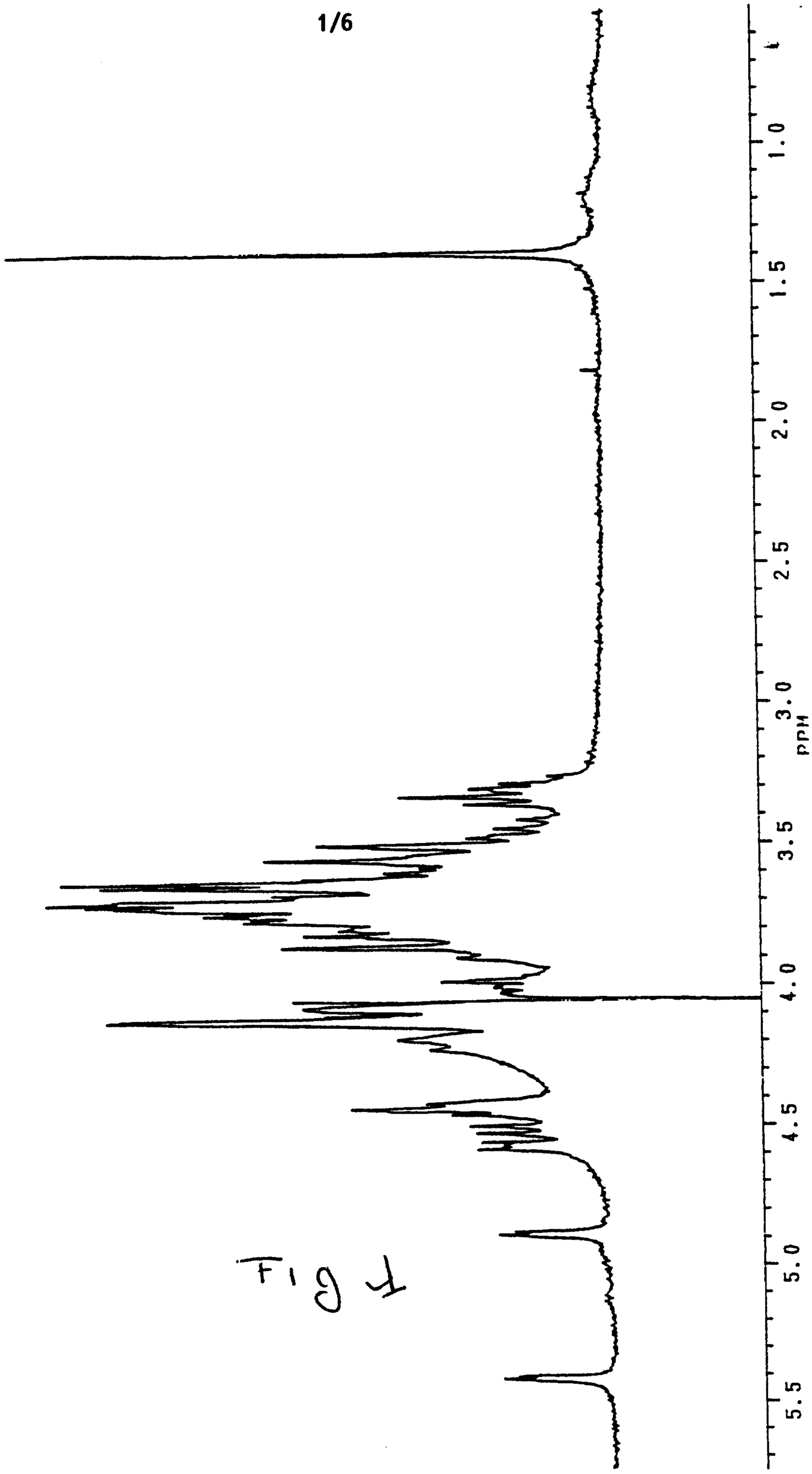


Fig 1

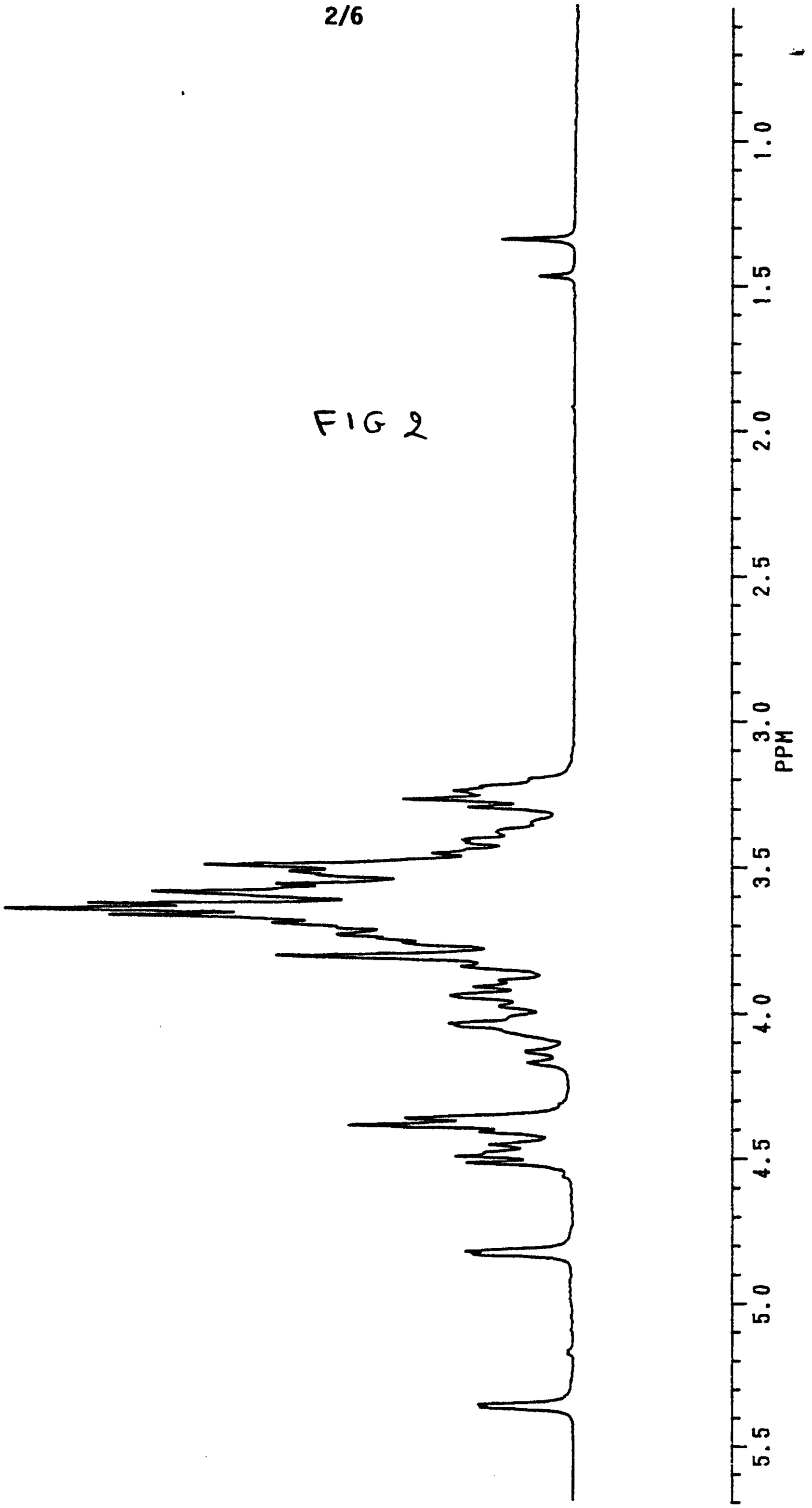


FIG 2

FIGURE 3

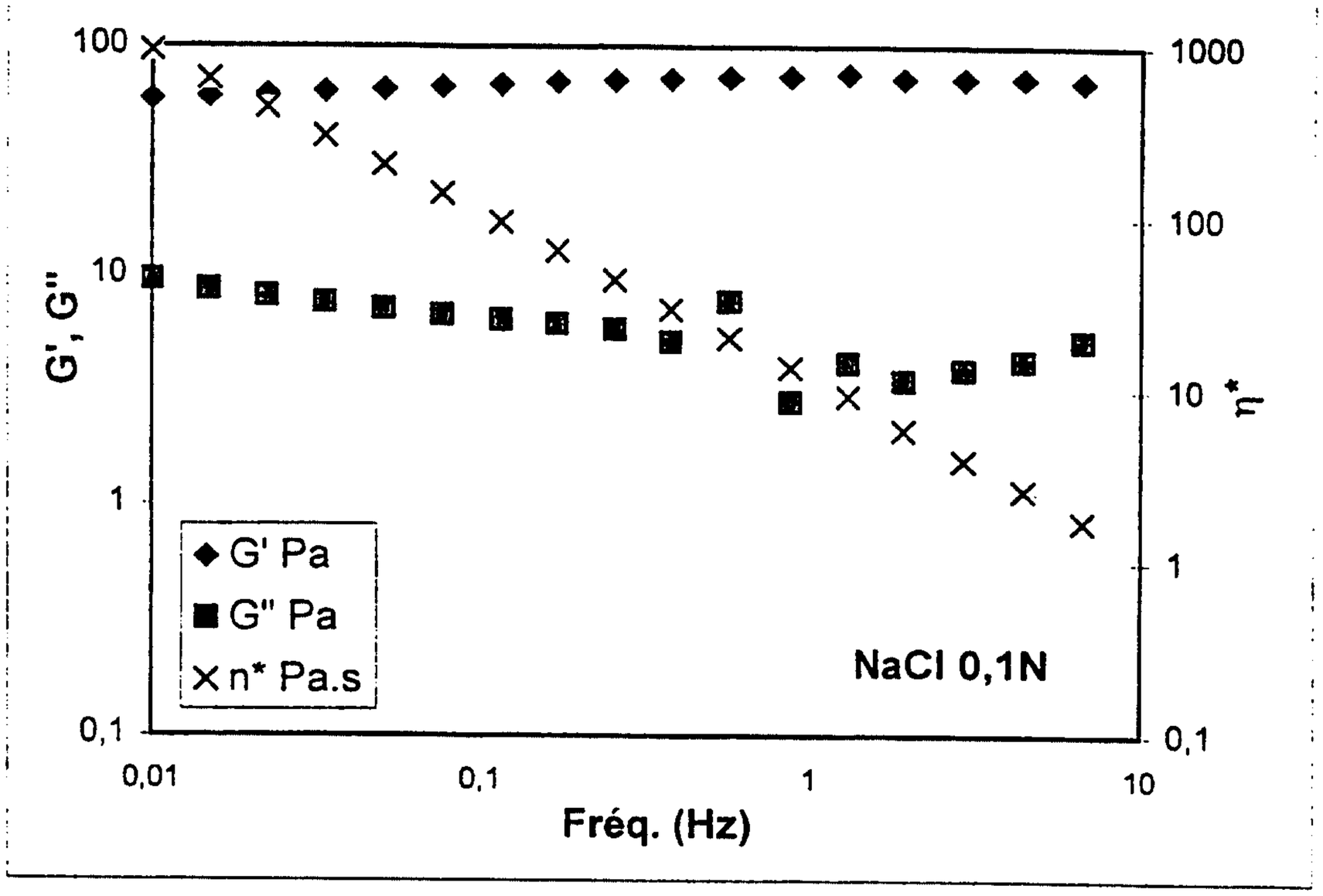

100
10
1
0,1
G', G''
1000
100
10
1
0,1
η*
G' Pa
G'' Pa
n* Pa.s
NaCl 0,1N
0,01
0,1
1
10
Fréq. (Hz)

FIGURE 4

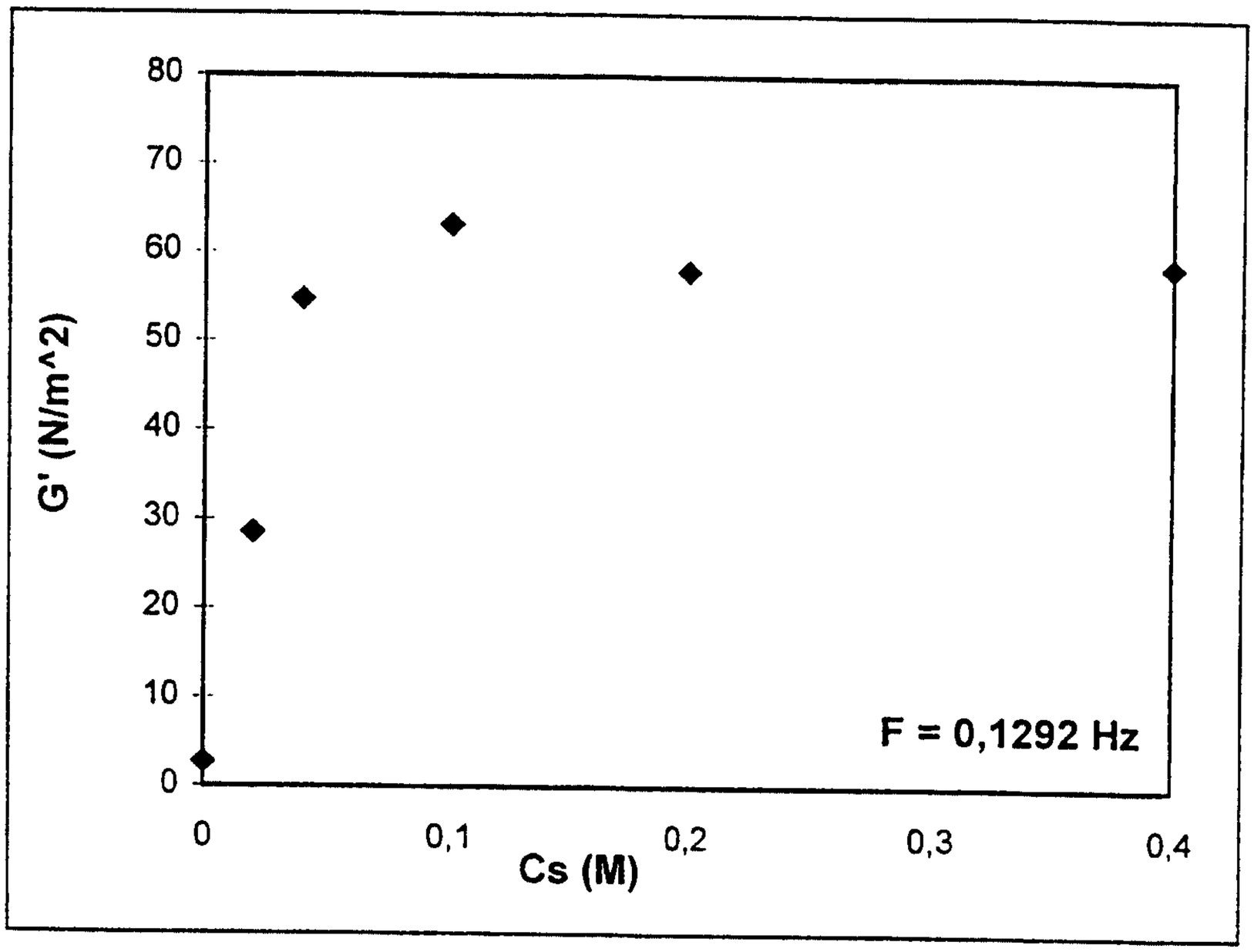


FIGURE 5

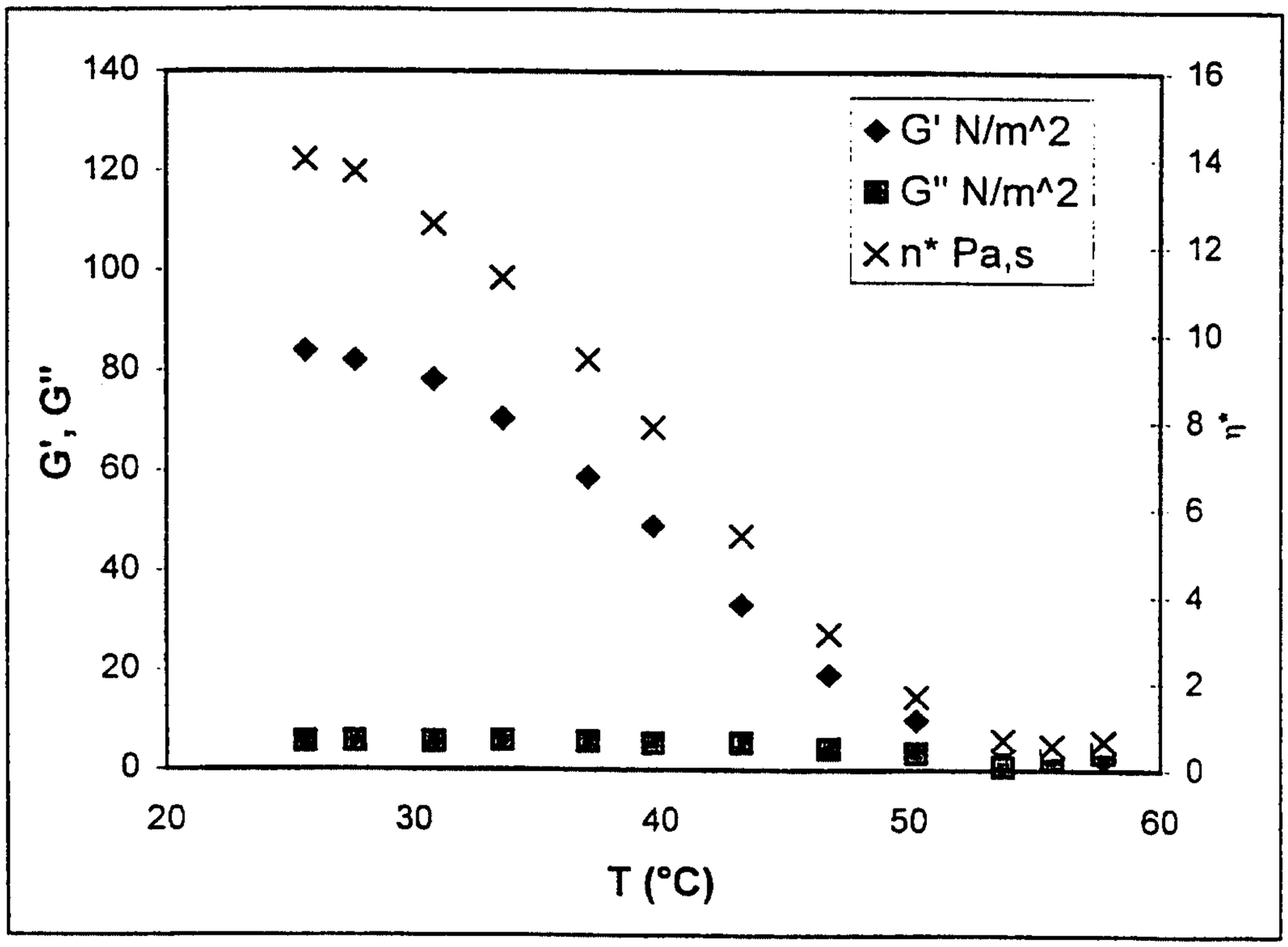
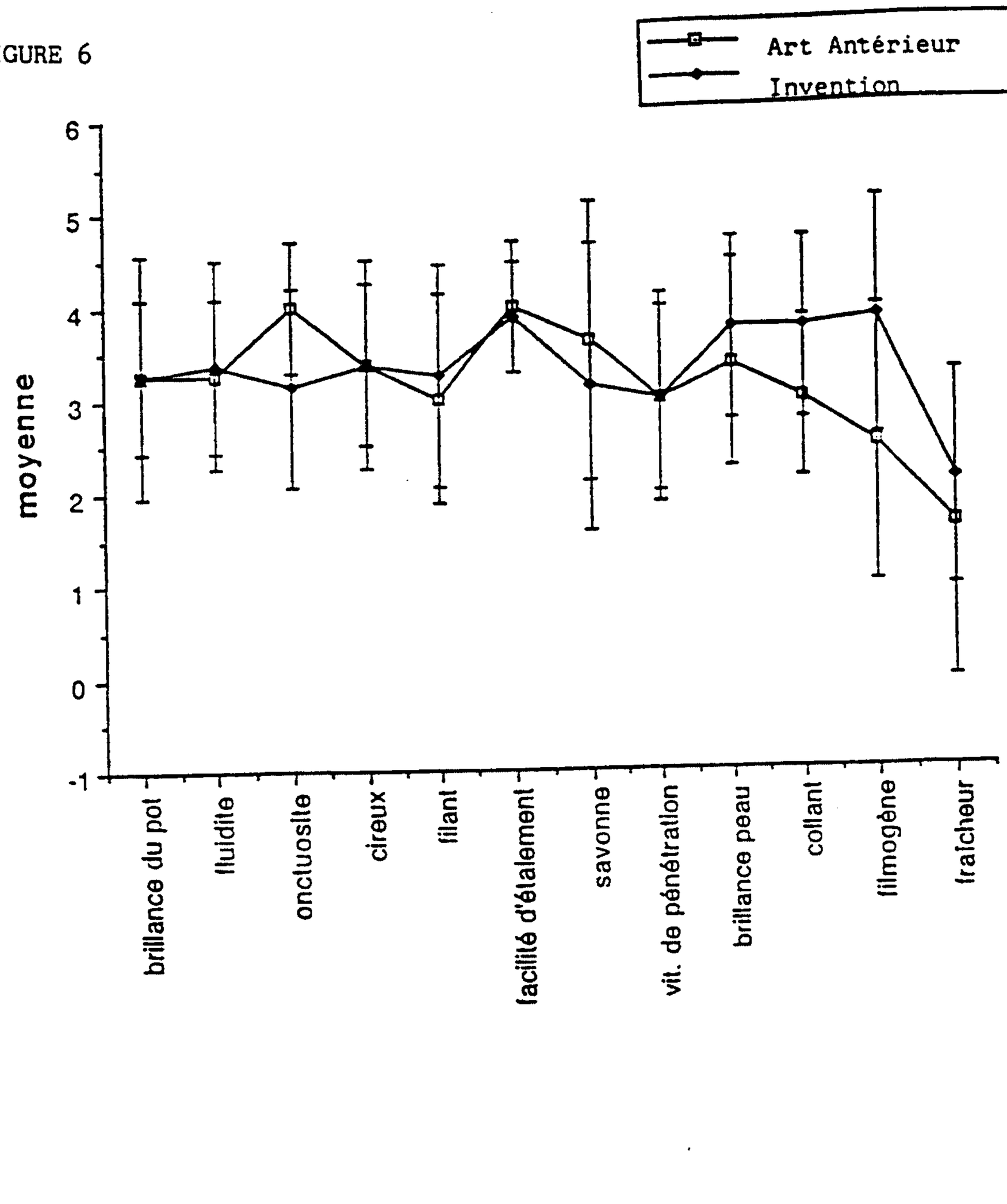

G' N/m^2
G" N/m^2
n* Pa,s
G', G"
η*
T (°C)
0
20
40
60
80
100
120
140
2
4
6
8
10
12
14
16
20
30
40
50
60

FIGURE 6


Art Antérieur
Invention
moyenne
6
5
4
3
2
1
0
-1
brillance du pot
fluidité
onctuosité
cireux
filant
facilité d'étalement
savonne
vit. de pénétration
brillance peau
collant
filmogène
fraîcheur