

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

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
24 juin 2010 (24.06.2010)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2010/070123 A1

- (51) Classification internationale des brevets :
C08B 15/04 (2006.01) *C08B 37/00* (2006.01)
C08B 31/18 (2006.01)
- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2009/067581
- (22) Date de dépôt international :
18 décembre 2009 (18.12.2009)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
0858778 18 décembre 2008 (18.12.2008) FR
- (71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :
KALYS [FR/FR]; 30 allée de Champrond ZA LA
BATIE, F-38330 Saint-Ismier (FR). CENTRE
NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
(CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75016 Paris
(FR).
- (72) Inventeurs; et
- (75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : NERVO,
Roberto [IT/FR]; 25 rue Bizanet, F-38000 Grenoble
(FR). HEYRAUD, Alain [FR/FR]; 6 Côte du Verdaret,
F-38113 Veurey-voiroize (FR). SAMAIN, Daniel
[FR/FR]; 11 Avenue du Vercors, F-38240 Meylan (FR).
- (74) Mandataire : TETAZ, Franck; Cabinet Regimbeau, 139
rue Vendôme, F-69477 Lyon Cedex 06 (FR).
- (81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasiatique (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Déclarations en vertu de la règle 4.17 :
— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))
- Publiée :
— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

(54) Title : NOVEL METHOD FOR THE CONTROLLED HYDROLYSIS OF POLYSACCHARIDES

(54) Titre : NOUVEAU PROCÉDE D'HYDROLYSE CONTRÔLÉE DES POLYSACCHARIDES

(57) Abstract : The invention relates to a novel method for the controlled hydrolysis of a polysaccharide in the solid state in the presence of an acidic gas such as NO₂. The invention also relates to a novel method for obtaining oligosaccharides by depolymerization of natural polysaccharides. This method is carried out by means of a heterogeneous chemical reaction which takes place in a gaseous medium under the action of nitrogen dioxide (NO₂ and N₂O₄) or other acidic gases. In particular, by controlling various parameters, against all expectations, the reaction results in functionalized or unfunctionalized oligosaccharides of defined and reproducible size and DO (degree of oxidation).

(57) Abrégé : Procédé d'hydrolyse contrôlée d'un polysaccharide à l'état solide en présence d'un gaz acide tel que du NO₂. L'invention concerne un nouveau procédé d'obtention d'oligosaccharides par dépolymérisation de polysaccharides naturels. Ce procédé est conduit par une réaction chimique hétérogène qui a lieu en milieu gazeux sous l'action de dioxyde d'azote (NO₂ et N₂O₄) ou autres gaz acides. En particulier avec la maîtrise de différents paramètres la réaction conduit contre toutes attentes à des oligosaccharides fonctionnalisés ou pas, de taille et DO (degré d'oxydation) définis et reproductibles.



WO 2010/070123 A1

NOUVEAU PROCÉDE D'HYDROLYSE CONTRÔLÉE DES POLYSACCHARIDES

La présente invention concerne un procédé d'hydrolyse contrôlée de polysaccharides à l'aide d'un acide à l'état gazeux.

5 Les polysaccharides constituent une famille importante de molécules présentant un intérêt pour l'alimentation humaine mais aussi pour l'industrie qui transforme les polysaccharides par des procédés chimiques ou biologiques.

En dehors de l'amidon et de son rôle alimentaire, la plupart des polysaccharides neutres ne sont pas métabolisables par les mammifères et ne sont pas dotés d'activités biologiques clairement identifiées. Leur large utilisation dans l'industrie agroalimentaire est due principalement à l'exploitation de leurs propriétés en tant qu'agents de texture. Les glucomannanes, polysaccharides constituant entre 60 et 90% de la farine extraite de tubercules d'espèces d'*Amorphophallus sp.*, en sont un exemple caractéristique. Cette farine, connue sous le nom de Konjac, est utilisée depuis des centaines d'années en Asie pour préparer des pâtes viscoélastiques consommées en période de disette. Depuis quelques années, cette farine est employée en Occident comme additif alimentaire (E425) : soit en tant qu'épaississant, seul ou en synergie avec d'autres polysaccharides, soit en tant que gélifiant.

A côté de cette utilisation pour ces propriétés d'agents de texture, d'autres applications sont envisageables en alimentaire (substituts de matière grasse, de gélatine, de boyaux, fibres solubles non fermentescibles dans des produits coupe-faim ou stabilisant pour limiter l'activité de l'eau), ou dans d'autres domaines (films alimentaires, peaux artificielles suite à brûlures, modification de l'activité hydrique en cosmétique...). Considérant sa structure moléculaire, le glucomannane d'*Amorphophallus sp.* est un polymère de haute masse molaire (2×10^5 à 10^6 g mol⁻¹) constitué de résidus D-glucose (G) et D-mannose (M) liés en β -(1-4) avec une structure primaire non homogène. Le ratio M/G, caractéristique de ce type de polysaccharide, est de 1,6 et la distribution des résidus est aléatoire. Les résidus présentent des substituants de type acétyle (3 à 11 %) en C2, C3 ou C6 du mannose et le polymère peut être faiblement ramifié (< 8%). Si ces détails structuraux régissent les propriétés en solution et les aptitudes à la gélification des glucomannanes, sur un plan purement alimentaire, ils peuvent aussi avoir un rôle prépondérant. La masse molaire, par exemple, entraîne des différences de fond selon les applications : ainsi des molécules de faible masse molaire montreront des résultats macroscopiques très différents, comme la solubilité, la transparence, la sensation en

bouche ou en goût. En outre, les polysaccharides peuvent produire différents effets en fonction de leurs caractéristiques structurales et de leur masse molaire lors de leur fermentation dans l'intestin. Certains ne sont pas métabolisés du tout mais d'autres peuvent être dégradés pour obtenir des molécules intermédiaires bénéfiques ou indésirables.

5 Une voie de valorisation des polysaccharides est donc leur transformation par des réactions chimiques et notamment leur hydrolyse à condition que cette réaction de dépolymérisation puisse être contrôlée pour obtenir un mélange d'oligosaccharides de structure et de taille parfaitement ciblées. L'hydrolyse contrôlée des polysaccharides conduit donc à toute une série de composés ayant des nombreuses applications potentielles
10 dans des domaines variés.

Les voies classiques d'obtention d'oligosaccharides à partir de polysaccharides sont l'hydrolyse par catalyse enzymatique ou acide en milieu aqueux.

L'hydrolyse enzymatique de glucomannanes tels que le Konjac a ainsi été décrite par Cescutti *et al.* (2002).

15 EP 0 268 885 décrit un procédé d'hydrolyse de glycosaminoglycanes en présence d'acide hypochlorique.

Cependant, l'hydrolyse en milieu aqueux des polysaccharides conduit à plusieurs problèmes techniques. La mise en solution est très difficile à mettre en œuvre car elle nécessite de grandes quantités de liquide, d'un réacteur de très grand volume et dans
20 certains cas quasiment impossible car dépend fortement de la solubilité des polysaccharides à hydrolyser. De plus les solutions de polysaccharides deviennent rapidement très visqueuses en limitant l'agitation mécanique. Ensuite, la récupération des produits après la réaction n'est pas toujours aisée. Il y a la nécessité d'atomiser ou de lyophiliser l'hydrolysate liquide contenant le produit final. En outre, les distributions
25 d'oligosaccharides obtenues notamment avec une hydrolyse enzymatique ou acide en milieu aqueux présentent une accumulation de mono-, di-, trisaccharides et molécules indésirables. Cela nécessite donc des étapes ultérieures de purification par ultrafiltration ou chromatographie liquide.

Une alternative à l'hydrolyse de polysaccharides est la synthèse d'oligosaccharides.
30 Dans l'industrie celle-ci produit essentiellement des maltodextrines et des oligofructanes. En outre, elle nécessite des glycosyltransférases spécifiques selon l'oligosaccharide à synthétiser.

Une autre voie de valorisation des polysaccharides est une réaction bien connue permettant la modification chimique sélective des polysaccharides est l'oxydation.

L'oxydation de l'amidon avec du dioxyde d'azote NO_2 est par exemple décrite dès 1945 dans le brevet US 2,472,590. L'amidon est oxydé dans un solvant organique comprenant du NO_2 ou traité avec du NO_2 à l'état gazeux.

5 US 5,821,360 décrit l'oxydation de polysaccharides pour l'obtention de polycarboxylates dans des lits fluidisés en présence de NO_2 gazeux.

US 5856470, US 5541316 et US 5959101 décrivent également des procédés de préparation de polycarboxylates.

DE4426443 concerne également la fabrication de polycarboxylates par l'oxydation de polysaccharides.

10 FR2 873 700 concerne un procédé d'oxydation contrôlée de polysaccharides dans lequel on réalise la réaction dans un gaz inerte à l'état supercritique.

GB779820 concerne également l'oxydation de cellulose en présence de NO_2 .

15 US2003/0073663 concerne des dispositifs médicaux composés de polysaccharides oxydés. Du METHOCEL est dissout dans de l'eau, congelé puis l'oxydation est effectuée avec du NO_2 gazeux.

Butrim *et al.* (2001) décrivent la cinétique d'oxydation de l'amidon par du N_2O_4 dans du CCl_4 en phase liquide.

20 WO2006/018552 décrit un procédé d'oxydation contrôlée de polysaccharides à l'aide d'un agent oxydant tel que le NO_2 dans lequel on réalise la réaction d'oxydation dans un fluide densifié inerte vis-à-vis des agents oxydants mis en œuvre.

25 Il a été constaté que ces réactions d'oxydation de polysaccharides notamment avec du NO_2 peuvent s'accompagner d'une hydrolyse des polysaccharides. Cependant, cette réaction d'hydrolyse n'est pas du tout contrôlée, et mal comprise ainsi elle est en général considérée comme une réaction secondaire ou parallèle que l'on cherche absolument à éviter lors de l'oxydation des polysaccharides.

30 A ce jour, les oligosaccharides sont essentiellement produits soit par voies de synthèse soit par dépolymérisation acide ou enzymatique en milieu liquide aqueux ou organique. Cependant, les méthodes existantes sont limitées car elles nécessitent beaucoup d'étapes et ne sont pas économes. Les produits n'ont pas une distribution de la masse molaire toujours convenable pour les applications envisagées. L'hydrolyse acide est difficile à contrôler, les DP atteints sont très faibles, les températures assez élevées et le volume du réacteur important surtout en vue d'applications industrielles. L'hydrolyse enzymatique nécessite une enzyme spécifique, pas toujours commerciale, et difficile à

trouver car spécifique du type de liaison glycosidique qui caractérise la structure du polysaccharide à traiter.

Il existe donc un besoin important de procédés d'hydrolyse contrôlée de polysaccharides.

5 Il a maintenant été trouvé qu'il est possible d'hydrolyser de manière contrôlée des polysaccharides en présence d'un gaz acide tel que le NO_2 , le SO_2 , le SO_3 ou l' HCl par exemple.

L'invention concerne un nouveau procédé d'obtention d'oligosaccharides par dépolymérisation de polysaccharides naturels. Ce procédé est conduit par une réaction chimique hétérogène qui a lieu en milieu gazeux sous l'action de dioxyde d'azote (NO_2 et N_2O_4) ou autres gaz acides. En particulier avec la maîtrise de différents paramètres (temps, température, réactifs, pression, humidité) la réaction conduit contre toutes attentes à des oligosaccharides fonctionnalisés ou pas, de taille et DS (degré de substitution) définis et reproductibles.

15 Cette réaction, qui comprend seulement une étape, permet à la fois de fabriquer des oligosaccharides et d'obtenir des structures nouvelles. Il s'avère aussi qu'elle permet de s'affranchir de l'accumulation de mono-, di- et trisaccharides, typique des méthodes concurrentes existantes. Le procédé se termine par un lavage et un séchage.

Les applications envisagées se situent dans des domaines aussi variés que l'industrie agroalimentaire, la pharmaceutique, les biotechnologies végétales, la cosmétique, la nutraceutique et l'infectiologie.

Grâce au contrôle de l'hydrolyse dans les procédés selon la présente invention, il est possible d'obtenir une distribution originale de la masse molaire des produits obtenus.

Avantageusement, les procédés d'hydrolyse contrôlée des polysaccharides selon l'invention permettent d'hydrolyser les chaînes primaires ou principales des polysaccharides sans hydrolyser les chaînes latérales. Ce sont donc majoritairement les liaisons glycosidiques de la chaîne principale du polysaccharide qui sont hydrolysés dans les procédés selon l'invention. La structure primaire du polysaccharide de départ qui peut être ramifiée ou comporter des sucres en groupements latéraux ou des substituants est donc conservée.

La structure primaire ramifiée du polysaccharide de départ est donc conservée.

Avantageusement, les procédés d'hydrolyse contrôlée des polysaccharides selon l'invention permettent d'hydrolyser les polysaccharides sans modifier les groupes substituants portés par les polysaccharides. En particulier, les groupes substituants

pyruvate ne sont pas affectés alors que ces groupements sont modifiés lors de l'hydrolyse acide en milieu aqueux.

Avantageusement, les procédés selon l'invention font appel à une technologie ne réclamant pas de préparation préalable du polysaccharide à modifier. En particulier, il n'y a pas de problèmes de solubilisation ni de problèmes de dispersion. Tout type de produit peut être modifié par le procédé selon l'invention, que ce soit un produit brut ou purifié.

Les procédés selon l'invention n'ont pas un besoin d'énergie élevée pour mettre en œuvre l'agitation (diffusion gazeuse), il y a peu de risques de colmatage des réacteurs ou de blocage des parties mobiles.

L'obtention du produit final ne nécessite pas de séchage par atomiseur ou lyophilisation.

Le large choix de conditions expérimentales de mise en œuvre permet d'adapter la réaction aux besoins en temps, énergie, à des cibles commerciales différentes.

Les procédés selon l'invention font appel à une technologie économe en réactifs et donc assez propre par rapport à une forme classique en milieux aqueux.

L'obtention de produits ayant les degrés de polymérisation (DP) recherchés permet de s'affranchir d'étapes de séparation par ultrafiltration ou chromatographie.

Les oligosaccharides et les polyosides obtenus par dépolymérisation contrôlée ont de nombreuses applications dans le domaine alimentaire mais aussi dans des domaines variés comme le domaine pharmaceutique, le domaine biomédical et la cosmétique.

Description de l'invention

L'invention se rapporte donc à un procédé d'hydrolyse contrôlée d'un polysaccharide comprenant les étapes suivantes :

- on dispose d'un polysaccharide à l'état solide,
- on ajuste la teneur en eau initiale du polysaccharide à une teneur comprise entre 5% et 30% w/w,
- on hydrolyse le polysaccharide en présence d'un gaz acide à une température inférieure à 50°C,

Dans un mode de réalisation préféré, le procédé comprend les étapes suivantes :

- on dispose d'un polysaccharide à l'état solide,
- on ajuste la teneur en eau initiale du polysaccharide à une teneur comprise entre 5% et 30% w/w,

- on hydrolyse le polysaccharide en présence d'un gaz acide à une température inférieure à 50°C,
- on élimine le gaz acide,
- on lave le polysaccharide hydrolysé avec un solvant alcoolique,
- 5 - on neutralise le polysaccharide hydrolysé,
- on sèche le polysaccharide hydrolysé.

Avantageusement, lors de l'étape d'hydrolyse du polysaccharide en présence d'un gaz acide la teneur en eau du polysaccharide est maintenue entre 5% et 30%w/w.

De préférence, on ajuste la teneur en eau initiale du polysaccharide à une teneur
10 comprise entre 10% et 20% w/w et/ou lors de l'étape d'hydrolyse du polysaccharide en présence d'un gaz acide la teneur en eau du polysaccharide est maintenue ou ajustée entre 5% et 30%w/w.

De préférence, on ajuste la teneur en eau initiale du polysaccharide et/ou lors de l'étape d'hydrolyse du polysaccharide en présence d'un gaz acide la teneur en eau du
15 polysaccharide est maintenue de façon à obtenir un produit d'hydrolyse dont le DP est compris entre 5 et 200.

De préférence, on ajuste la teneur en eau initiale du polysaccharide et/ou lors de l'étape d'hydrolyse du polysaccharide en présence d'un gaz acide la teneur en eau du polysaccharide est maintenue de façon à obtenir un produit d'hydrolyse dont le DO est
20 compris entre 20 et 100%.

Avantageusement, l'étape d'hydrolyse du polysaccharide en présence d'un gaz acide s'effectue à une température inférieure à 40°C.

De préférence, on effectue l'hydrolyse en présence d'un gaz acide à une température comprise entre 20 °C et 40°C.

De préférence, le rapport molaire entre le gaz acide et le polysaccharide est
25 inférieur à 1.5.

De préférence, l'étape d'hydrolyse du polysaccharide en présence d'un gaz acide s'effectue à une pression inférieure à 10 bars.

Avantageusement, le gaz acide est du NO₂.

30 Dans d'autres modes de réalisation, le gaz acide est du HCl, SO₂, ou SO₃

Le polysaccharide est par exemple choisi parmi les glucomannanes, les dextrans, les alginates, la cellulose, l'amidon, les galactomannanes et les xanthanes.

Dans un mode de réalisation préféré, le polysaccharide est un glucomannane de Konjac extrait de tubercules d'*Amorphophallus sp.*

Dans un mode de réalisation, le gaz acide est du NO₂ et le procédé d'hydrolyse s'accompagne d'une oxydation des hydroxyles primaires -CH₂OH du polysaccharide.

L'invention a également pour objet un produit d'hydrolyse d'un polysaccharide obtenu par le procédé selon l'invention. De préférence, ce produit a un DP compris entre 6
5 et 15.

L'invention a aussi pour objet un produit d'hydrolyse de glucomannanes de Konjac extrait de tubercules d'*Amorphophallus sp.* dans lequel plus de 50% du produit a un degré de polymérisation compris entre 4 et 30, un degré d'oxydation compris entre 50 et 100% et un indice de polydispersité compris entre 1 et 1.2.

10 L'invention se rapporte aussi à un produit d'hydrolyse d'un polysaccharide choisi parmi les glucomannanes, les galactomannanes, le dextrane, le xanthane, d'un alginat, de cellulose, d'un amidon ou d'un polymannane, dans lequel plus de 50% du produit a un degré de polymérisation compris entre 4 et 30, un degré d'oxydation compris entre 50 et 100% et un indice de polydispersité compris entre 1 et 2.

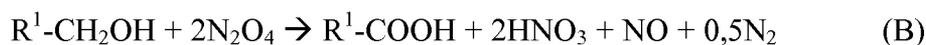
15

L'invention concerne donc un procédé d'hydrolyse contrôlée ou de dépolymérisation contrôlée de polysaccharides tels que les glucomannanes, les dextrans, les alginates, la cellulose, l'amidon, les galactomannanes et le xanthane.

20 La réaction d'hydrolyse des polysaccharides s'effectue selon le schéma réactionnel suivant en présence des ions H⁺ qui sont catalyseurs (R est un morceau de chaîne de polysaccharide):



25 Cette réaction d'hydrolyse peut s'accompagner d'une réaction d'oxydation des groupes hydroxyles primaires libres qui sont éventuellement présents sur le polysaccharide. Cette réaction d'oxydation s'effectue selon le schéma suivant :



30

Le tableau ci-après indique pour différents polysaccharides les réactions susceptibles d'être obtenues :

Polysaccharide	Origine	Structure	Réactions
Glucomannane	Extrait de tubercules (<i>Amorphophallus sp.</i>)	chaîne linéaire de $\beta(1-4)$ -D-glucose et $\beta(1-4)$ -D-mannose	A+B
Dextrane	Bactérienne (<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Streptococcus mutans</i>)	$\alpha(1-6)$ -D-glucose et $\alpha(1-3)$ -D-glucose ramifié	A faible % de B sur la ramification
Alginate	Algue (<i>Phaeophycota</i>)	$\alpha(1-4)$ -L-gulonate- $\beta(1-4)$ -D-mannuronate	A
Cellulose	Plante	$\beta(1-4)$ -D-glucose	A+B
Amidon	Céréales et pomme de terre	<ul style="list-style-type: none"> • Amylose $\alpha(1-4)$-D-glucose • Amylopectine $\alpha(1-6)$-D-glucose ramifié 	A+B
Galactomannane	Graine de plante (Guar, Caroube, Locust Bean et Tara)	$\beta(1-4)$ -D-mannose et α -D-galactose ramifié en O-6	A+B
Xanthane	Fermentation bactérienne (<i>Xanthomonas campestris</i>)	$\beta(1-4)$ -D-glucose et $\beta(1-4)$ -D-mannose, acide $\beta(1-2)$ -D-glucuronique, $\alpha(1-3)$ -D-mannose ramifié (1-3) sur le glucose	A+B

Par polysaccharide, on entend des polymères formés d'un certain nombre d'oses (ou monosaccharides) liés entre eux par des liaisons O-osidiques. Le terme oligosaccharide désigne des molécules comprenant entre 2 et 40 oses. Dans la présente, le terme polysaccharide peut désigner à la fois les polysaccharides et les oligosaccharides.

Les polysaccharides peuvent se présenter sous forme linéaire ou sous forme ramifiée et peuvent présenter des groupements latéraux ou des substituants.

Les procédés de la présente invention permettent l'hydrolyse de tout type de polysaccharide quels que soient les types de liaisons glycosidiques qui le forment.

Les procédés d'hydrolyse de la présente invention permettent d'obtenir des oligosaccharides ayant un DP faible ainsi que des polysaccharides ayant un degré de polymérisation (DP) inférieur au polysaccharide de départ. Le degré de polymérisation est défini comme le nombre de monomères liés formant la chaîne principale d'un polysaccharide ou d'un oligosaccharide.

Avantageusement, le procédé d'hydrolyse de la présente invention permet de contrôler le DP du produit final obtenu notamment en ajustant précisément la teneur en eau du polysaccharide de départ. Avantageusement, la teneur en eau du polysaccharide est maintenue dans une fourchette pendant toute l'étape d'hydrolyse. Dans ces modes de réalisation, la teneur en eau du polysaccharide est contrôlée pendant toute l'hydrolyse en présence de gaz acide. D'autres paramètres tels que le temps, la température, le rapport molaire gaz acide sur polysaccharide et la pression peuvent également être utilisés dans les procédés de la présente invention pour contrôler la réaction d'hydrolyse.

Cette réaction, qui comprend seulement une étape, permet à la fois de fabriquer des oligosaccharides et d'obtenir des structures nouvelles. Il s'avère aussi qu'elle permet de s'affranchir de l'accumulation de mono-, di- et tri-saccharides, typique des procédés de l'état de la technique.

Au cours de la réaction d'hydrolyse, les oligosaccharides et polysaccharides obtenus peuvent également être fonctionnalisés (oxydés) ou pas en fonction de la présence de groupes hydroxyles primaires sur le polysaccharide de départ et selon les conditions de réactions utilisées.

Le contrôle de la teneur en eau du polysaccharide est également un moyen de contrôler le degré d'oxydation (DO) du polysaccharide obtenu à l'issue du procédé d'hydrolyse lorsque celui-ci est associé à une réaction d'oxydation du polysaccharide. Le degré d'oxydation est défini comme le nombre de groupements -COOH présents dans la molécule en rapport au DP (valeur en pourcentage).

Le choix du gaz acide est un moyen d'effectuer une réaction d'hydrolyse et d'oxydation ou une réaction d'hydrolyse seule selon le type de polysaccharide traité. En présence d'un gaz acide tel que l'acide chlorhydrique (HCl), seulement la réaction d'hydrolyse se produira.

Les procédés de la présente invention permettent de contrôler l'hydrolyse et le cas échéant l'oxydation conduisant à des oligosaccharides et polysaccharides fonctionnalisés ou pas, de DP et de DO définis et reproductibles.

Il est alors possible d'obtenir en une seule étape des oligosaccharides et/ou des polysaccharides qui présentent une distribution de la masse molaire représentée par des courbes beaucoup plus étroites autour d'une taille de sucres standards sans besoin de séparation par chromatographie. Cette nouvelle distribution des produits d'hydrolyse
5 obtenus est illustrée dans la figure 9 ainsi que dans les exemples.

Les procédés d'hydrolyse de la présente invention permettent d'obtenir des oligosaccharides ayant un indice de polydispersité faible. L'indice de polydispersité est le rapport entre la masse molaire moyenne en nombre (M_n) et en poids (M_w).

L'invention a donc pour objet un procédé d'hydrolyse contrôlée de polysaccharides
10 en présence d'un gaz acide. La réaction s'effectue en phase hétérogène avec un polysaccharide à l'état solide et un acide à l'état gazeux.

De préférence, le gaz acide utilisé dans les procédés de la présente invention est du NO_2 . Par NO_2 ou dioxyde d'azote, on entend du NO_2 du N_2O_4 (peroxyde d'azote) et leurs mélanges.

15 Dans un autre mode de réalisation préféré, le gaz acide est de l'acide chlorhydrique (HCl). En présence d'HCl à l'état gazeux, seule la réaction d'hydrolyse du polysaccharide se produit.

Dans un autre mode de réalisation préféré, le gaz acide est du SO_2 , du SO_3 ou leurs mélanges.

20 Préalablement, la teneur en eau initiale du polysaccharide est ajustée à une valeur entre 3, 5, 10, 15, 20, 25 et 30% w/w d'eau. Il peut aussi être avantageux de maintenir la teneur en eau du polysaccharide entre 3, 5, 10, 15, 20, 25 et 30% w/w d'eau lors de l'étape d'hydrolyse en présence d'un gaz acide. La teneur en eau du polysaccharide est donc ajustée et/ou maintenue à une teneur comprise entre 3%-30%, entre 5% et 30%, entre 8%
25 et 30%, entre 10% et 30%, entre 15% et 30% et plus préférentiellement entre 10% et 20%.

Le polysaccharide est par exemple humidifié avec de la vapeur d'eau dans une enceinte fermée jusqu'à l'obtention de la teneur en eau désirée. La teneur en eau du polysaccharide est un paramètre très important, en effet avec le contrôle de la quantité d'eau disponible sous forme d'humidité dans le polysaccharide, il est possible de limiter ou
30 de favoriser l'hydrolyse tout en contrôlant parfaitement sa cinétique.

Afin de contrôler l'hydrolyse de façon satisfaisante, la réaction avec le gaz acide est effectué à une température inférieure à 50°C , de préférence inférieure à 40°C et de préférence comprise entre 20°C - 50°C , 25°C - 50°C , 25°C - 40°C ou entre 20°C - 40°C .

Pour le contrôle de la réaction d'hydrolyse du polysaccharide, la réaction s'effectue typiquement à une pression inférieure à 10, 5, 2 ou 1 bar.

Avantageusement, le rapport molaire gaz acide (en particulier NO₂) sur polysaccharide est inférieur à 1.5, 1.4, 1.3, 1.2, 1.1, 1, 0.8, 0.6 ou 0.5 afin de mieux maîtriser l'hydrolyse. L'hydrolyse par le gaz acide s'effectue en présence d'une quantité stœchiométrique de gaz ou en présence de gaz acide légèrement en excès par rapport au polysaccharide.

Le temps de la réaction d'hydrolyse est de préférence inférieur à 5, 4, 3 ou 2 heures.

La réaction d'hydrolyse s'effectue au contact du gaz acide. Le polysaccharide placé dans un réacteur adéquat doit être accessible au gaz acide par des phénomènes de diffusion.

Nature du réactif	NO ₂	SO ₂	HCl
Température (°C) (de préférence)	20-50 (20)	30-80 (70)	30-80 (70)
Pression (bar) (de préférence)	1-10 (2)	5-25 (15)	10-200 (130)
Temps (min.) (de préférence)	5-240 (120)	5-180 (80)	5-360 (120)

Après élimination du gaz acide, la réaction est stoppée par balayage avec un gaz inerte tel que par exemple de l'azote.

De préférence, on effectue également un lavage avec un solvant alcoolique tel qu'un mélange d'eau et d'isopropanol 50% v/v ou avec de l'éthanol. Il est également possible, si nécessaire, d'effectuer un deuxième lavage pour neutraliser le produit. Ce lavage s'effectue par exemple avec l'éthylate de sodium (C₂H₅NaO).

De préférence, on effectue donc une étape de neutralisation et également une étape finale de séchage.

Une solubilisation dans l'eau et lyophilisation du produit final obtenu par le procédé est également envisageable.

Le procédé selon l'invention permet notamment d'obtenir un produit d'hydrolyse de glucomannanes du Konjac extrait de tubercules d'*Amorphophallus sp.* ayant un DP, un DO et un indice de polydispersité prédéterminés. En particulier, le produit d'hydrolyse du Konjac a un degré de polymérisation (DP) compris entre 4, 5, 10, 15, 20 et 30, de préférence compris entre 5 et 15 et encore plus préférentiellement entre 6 et 15. De façon avantageuse, le DP est égal à 8. Le degré d'oxydation (DO) est compris entre 50, 60, 70,

80, 90 et 100%, de préférence le DO est compris entre 80% et 100% et encore plus préférentiellement le DO est de 100%.

Les procédés selon l'invention permettent de contrôler étroitement le DP des polysaccharides/oligosaccharides obtenus par hydrolyse. Les produits d'hydrolyse du
5 Konjac obtenus par les procédés selon l'invention ont ainsi avantageusement un indice de polydispersité compris entre 1 et 2, de préférence compris entre 1 et 1,2, plus avantageusement un indice de polydispersité de 1,11. Avantageusement, les produits d'hydrolyse du Konjac ne comportent pas de mono-, di- et trisaccharides car ceux-ci ne s'accumulent pas dans les procédés d'hydrolyse selon la présente invention.

10 Le Konjac a un ratio M/G (D-mannose/D-glucose) de 1,6 caractéristique de ce type de polysaccharide. Avantageusement, les procédés d'hydrolyse de la présente invention permettent l'hydrolyse du Konjac sans modifier ce ratio M/G. De préférence, les produits d'hydrolyse du Konjac ont donc un ratio M/G de 1,6.

De façon plus générale, l'invention permet avantageusement l'hydrolyse contrôlée
15 de polysaccharides et en particulier de galactomannanes sans modifier le rapport M/G.

L'invention se rapporte aussi à un produit d'hydrolyse du dextrane dans lequel plus de 50% du produit a un degré de polymérisation compris entre 4 et 30, le degré d'oxydation est compris entre 50 et 100% et l'indice de polydispersité est compris entre 1 et 2.

20 De préférence, les produits d'hydrolyse ont une structure moléculaire ramifiée comme le dextrane de départ.

De façon plus générale, le procédé d'hydrolyse contrôlée selon la présente invention permet d'hydrolyser la chaîne principale du polysaccharide sans hydrolyser les chaînes latérales. Ainsi, la structure primaire des polysaccharides est conservée dans les
25 procédés d'hydrolyse de la présente invention.

L'invention se rapporte aussi à un produit d'hydrolyse du xanthane dans lequel plus de 50% du produit a un degré de polymérisation compris entre 4 et 30, le degré d'oxydation est compris entre 50 et 100% et l'indice de polydispersité est compris entre 1 et 2. De préférence, les produits d'hydrolyse présentent le même taux de groupements
30 pyruvates que le xanthane de départ.

De façon plus générale, les procédés de la présente invention permettent l'hydrolyse contrôlée de polysaccharides sans affecter les groupes substituants des polysaccharides. Le taux de groupes substituants est donc identique avant et après hydrolyse.

Avantageusement, l'invention permet donc l'hydrolyse d'un polysaccharide sans affecter les groupes pyruvates portés par ce polysaccharide.

L'invention se rapporte aussi à un produit d'hydrolyse d'un alginate dans lequel plus de 50% du produit a un degré de polymérisation compris entre 4 et 30, le degré d'oxydation est compris entre 50 et 100% et l'indice de polydispersité est compris entre 1 et 2.

L'invention se rapporte aussi à un produit d'hydrolyse de la cellulose dans lequel plus de 50% du produit a un degré de polymérisation compris entre 4 et 30, le degré d'oxydation est compris entre 50 et 100% et l'indice de polydispersité est compris entre 1 et 2.

L'invention se rapporte aussi à un produit d'hydrolyse de l'amidon dans lequel plus de 50% du produit a un degré de polymérisation compris entre 4 et 30, le degré d'oxydation est compris entre 50 et 100% et l'indice de polydispersité est compris entre 1 et 2.

L'invention se rapporte aussi à un produit d'hydrolyse d'un polymannane dans lequel plus de 50% du produit a un degré de polymérisation compris entre 4 et 30, le degré d'oxydation est compris entre 50 et 100% et l'indice de polydispersité est compris entre 1 et 2.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans les exemples et figures ci-dessous. Les figures et exemples sont donnés à titre non limitatif.

Figures

- Figure 1 : Effet du taux d'hydratation sur le Degré d'oxydation : % du COOH en fonction du temps et du taux d'hydratation (% w/w)
- Figure 2 : Effet du taux d'hydratation sur le Degré de Polymérisation : DP en fonction du temps et taux d'hydratation $NO_2/K_{jc} = 1,35$ (mol/mol)
- Figure 3 : Effet cinétique du rapport NO_2 / Produit sur le DP : DP en fonction du temps
- Figure 4 : Effet cinétique du rapport NO_2 / Produit sur le DP : DO en fonction du temps
- Figure 5 : Chromatographie Dionex. Hydrolyse de Konjac M1HCO1 par acide HCl pour différents temps de réaction
- Figure 6 : Chromatographie Biogel P2. Hydrolyse de Konjac M1HCO1 par Cellulase

Figure 7 : Chromatographie GPC. Hydrolyse de Konjac M1HCO1 en phase gazeuse

Figure 8 : Distribution de la masse molaire d'oligosaccharides de Konjac M1HCO1 obtenus en phase gazeuse.

Figure 9 : Schéma comparatif de la dépolymérisation selon l'invention et la
5 dépolymérisation enzymatique ou acide en milieu liquide

Exemples

Exemple 1 : Description du matériel nécessaire

10

Réacteur

La réaction a lieu dans un simple réacteur double enveloppe pour réactions chimiques en inox de volume interne égal à 250 ml. Le réacteur thermostaté avec de l'eau en circuit fermé, est équipé d'un capteur de température et de pression. Il est relié à une bouteille de
15 NO₂ ou d'autre gaz, par un injecteur mécanique et il est aussi relié à un circuit d'azote.

Système d'injection du gaz

Le NO₂ à l'état liquide est injecté à l'aide d'un injecteur double enveloppe réfrigéré et piloté par air comprimé.

Porte échantillon

20 L'échantillon sous forme de poudre est placé dans un sachet en Téflon[®] poreux. La poudre doit être accessible au gaz par des phénomènes de diffusion et le porte échantillon doit être chimiquement inerte.

Exemple 2 : Protocole expérimental (PE)

25

Préparation de l'échantillon

L'échantillon est humidifié préalablement dans une enceinte fermée avec la teneur en vapeur d'eau choisie. Ensuite il est placé dans un sachet de Téflon[®] et introduit dans le réacteur sur un support. La température du système doit être stable à la valeur choisie.

Injection du gaz

30 Nous effectuons une injection de la quantité choisie de gaz par dépression à l'ouverture de la vanne d'entrée dans le réacteur. Le gaz est ainsi déposé au fond du réacteur.

Fin de la réaction

Pour terminer la réaction après l'ouverture de la vanne de sortie du réacteur nous effectuons un balayage en gaz pour vider le réacteur et remplacer jusqu'à 4 fois le volume total par de l'azote. La réaction s'arrête définitivement avec l'étape de lavage.

5 Lavage et neutralisation

Le lavage s'effectue avec un mélange d'eau et d'isopropanol 50/50 % v/v, ensuite un deuxième lavage avec l'éthanolate de sodium est nécessaire pour neutraliser le produit et simplifier l'étape de séchage. L'éthanolate de sodium est préparé à partir d'un mélange d'éthanol et de NaOH/Eau avec une concentration globale 2 M. Dans ce mélange l'eau est indispensable pour effectuer l'échange avec les ions Na⁺.

Séchage

On laisse la poudre sécher à l'air ou dans une étuve à vide pendant quelques jours. Pour éviter toute trace alcoolique dans le produit final une solubilisation dans l'eau suivie d'une lyophilisation ou atomisation peut être réalisée.

15 Caractérisation des produits de la réaction

Une fois les produits séchés nous pouvons les caractériser avec les techniques classiques de caractérisation physico-chimiques des oligo- et polysaccharides suivantes:

- GPC (Distribution de la masse molaire, DP et Masse molaire moyenne),
- Dosage acide base par une mesure de conductivité (Degré d'oxydation, DO),
- 20 • RMN ¹H, ¹³C (Sélectivité de la réaction, Présence de produits secondaires, Qualité du lavage et du séchage).

Analyse thermogravimétrique (ATG ou TGA)

L'analyse thermogravimétrique est une technique d'analyse thermique permettant de mesurer la quantité et la vitesse de variation de masse d'un échantillon en fonction de la température et du temps. Elle permet d'évaluer toute perte de masse ou des changements de phase lorsque le produit se décompose, se déshydrate ou s'oxyde. Dans notre cas, l'ATG a été utilisée pour évaluer la teneur en eau des substrats osidiques, après stabilisation en atmosphère contrôlée ou en conditions ambiantes. Les appareils utilisés sont une thermo-balance Setaram TGA-92-12 et SDT Q600.

30 Nous avons utilisé environ 10 mg d'échantillon et le cycle de température suivant :

- montée de 20 à 120 °C à 3 °C/min.,
- palier à 120 °C de 10 min.,
- descente en température à 3 °C/min. de 120 à 20 °C.

La teneur en eau, dans un prélèvement initiale, est définie comme suit :

$$T_e = \frac{(M_i - M_{sec})}{M_i} 100$$

avec T_e : teneur en eau (%) contenue dans l'échantillon initiale, M_i : la masse initiale de l'échantillon, M_{sec} : la masse de l'échantillon sec.

- 5 Cette équation nous permet d'accéder à la masse d'échantillon sec pour un prélèvement donné. La teneur en eau dépendra des conditions d'humidité de l'environnement et de l'activité de l'eau de solutions saturées de sels que nous avons utilisées pour stabiliser les polysaccharides en poudre.

Chromatographie d'exclusion stérique pour la détermination des masses molaires

10 (SEC)

Cette technique est utilisée pour séparer des molécules de masses molaires allant de quelques milliers à $2 \cdot 10^6$ g.mol⁻¹. Nous l'avons choisie pour déterminer les masses molaires des polysaccharides ou des oligosaccharides grâce à un système de multi-détection.

- 15 Les échantillons à analyser sont solubilisés à une concentration variant de 0,5 à 5 g/L selon le cas dans du nitrate de sodium (NaNO₃) 0,1 M. Avant injection, les solutions sont filtrées sur une membrane Sartorius en nitrate de cellulose de porosité 0,22 µm.

<i>Waters Alliance GPC V2000</i>	
colonnes :	Shodex OHpak SB-804 HQ et SB-805 HQ montées en série (masses molaires élevées) ou Shodex OHpak SB-802 HQ et SB-803 HQ montées en série (masses molaires faibles)
éluant :	NaNO ₃ 0,1 M + NaN ₃ 0,02% (w/w) dans l'eau
débit :	0,5 mL/min.
température :	30°C
volume d'injection :	108 µl (injection automatisée)
concentration :	0,5 à 5 g.L ⁻¹
3 détecteurs en série :	détecteur par diffusion de la lumière multi-angles Wyatt (Dawn DSP-F) réfractomètre différentiel et viscosimètre Waters

Tableau : Système chromatographique d'exclusion stérique (SEC) multi-détection.

Le *réfractomètre différentiel* mesure la concentration C_i réelle de la solution à la sortie des colonnes au volume V_i .

Le *viscosimètre* est composé de trois capillaires ; des capteurs de pression situés aux bornes de ces derniers permettent de calculer le rapport entre la tension due à la différence
5 de pression lors du passage de la solution de polymère et du solvant.

On mesure ainsi la viscosité relative $\eta_{rel.}$:

$$\eta_{rel.i} = \frac{\Delta P}{\Delta P_0}$$

pour le volume d'élution V_i et ΔP_0 la valeur du solvant pur.

Connaissant la concentration C en polymère mesurée, la viscosité réduite $\eta_{red.}$ est calculée :

$$10 \quad \eta_{red.} = \frac{(\eta_{rel} - 1)}{C}$$

La concentration en polymère dans les colonnes est très faible, et la viscosité réduite calculée est assimilée à une viscosité intrinsèque.

Le détecteur par *diffusion de la lumière multi-angles* permet la détermination du rayon de giration R_{gi} et de la masse molaire M_i à partir de l'équation de Zimm, qui présente
15 l'évolution de $KC/R(\theta)$ en fonction de $\sin^2(\theta/2)$. L'équation suivante est une version simplifiée correspondant à l'extrapolation à concentration et angle θ nuls :

$$\left(\frac{KC}{\Delta R\theta} \right)_{\substack{C \rightarrow 0 \\ \theta \rightarrow 0}} = \frac{1}{M_w}$$

C est la concentration de la solution en g.mL^{-1} .

$$K = 2\pi^2 n^2 \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 \frac{(1 + \cos^2 \theta)}{\lambda^4 N}$$

20 N est le nombre d'Avogadro, λ est la longueur d'onde de la source lumineuse, (dn/dc) est l'incrément de l'indice de réfraction n en fonction de la concentration.

$$R(\theta) = G(\theta) D \frac{(\sigma', l')^{-1}}{G_0}$$

D est la transmittance ; cette valeur est liée à la position des atténuateurs pour chaque mesure G_0 faite dans l'appareil tenant compte de $G(\theta)$, qui est le signal du
25 photomultiplicateur pour la lumière diffusée. $(\sigma', l')^{-1}$ dépendent des caractéristiques de l'appareil.

Le logiciel utilisé (Astra IV) permet la double extrapolation, à concentration et angle nuls, pour obtenir la masse molaire et la fonction angulaire à concentration nulle pour obtenir le

rayon de giration. Ce logiciel calcule la masse M_i et la viscosité réduite de chaque fraction éluee (i) qui peut être considérée comme monodispersée. Il permet également le calcul des masses molaires moyennes en nombre M_n et en masse M_w ainsi que la relation $R_{gi} = f(M_i)$ c'est-à-dire la variation du rayon de giration R_{gi} en fonction de la masse molaire M_i . Nous
5 obtenons également la distribution des masses molaires et l'indice de polymolécularité.

Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire à haute résolution (RMN)

La RMN est une technique de spectroscopie à grandes ondes, largement utilisée pour déterminer la structure des polysaccharides et des oligosaccharides en solution mais aussi en phase solide. Elle permet d'obtenir des informations sur l'environnement électronique
10 des noyaux dont les spins ont des moments magnétiques non nuls comme par exemple le ^1H , le ^{13}C ou le ^{31}P .

L'échantillon en solution est placé dans un champ magnétique intense maintenu constant, entraînant le maintien des noyaux dans le même état d'énergie et permettant de régénérer les 2 niveaux quantifiés des spins nucléaires. Dans le cas de la RMN à transformée de
15 Fourier, ils sont ensuite excités par une impulsion électromagnétique, de courte durée de forte puissance et de fréquence caractéristique selon le type de noyau étudié. L'absorption d'énergie par les noyaux provoque leur transition vers un état excité et leur retour à l'état d'énergie initial ou la relaxation s'accompagne de l'émission d'une fréquence de résonance caractéristique de l'environnement chimique du noyau.

20 Le spectre RMN ainsi obtenu présente donc autant de signaux qu'il y a de noyaux à environnements chimiques différents et l'intensité de chaque signal est proportionnelle au nombre de noyaux avec le même environnement chimique. La position des signaux par rapport à une substance de référence (TMS) est nommée déplacement chimique (mesuré en ppm) et permet de comparer les spectres entre eux.

25 Nous pouvons utiliser la spectrométrie de RMN pour son aspect à la fois qualitatif et quantitatif :

- pour doser la quantité de polymère contenue dans une poudre (à condition qu'elle soit complètement soluble),
- pour caractériser la structure (par exemple la localisation des groupements acétyles,
30 le type de résidu et le carbone substitué).

Les expériences ont été réalisées sur les spectromètres :

- Bruker AC 300 (300 MHz) équipé d'une sonde mixte $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ et d'une unité de contrôle de température,

- Bruker Avance 400 (400 MHz) équipé d'une sonde QNP ou bbiz, de 5 mm, d'un gradient Z et d'une unité de contrôle de température.

Les échantillons (1 à 30 mg) sont solubilisés dans 0,5 mL d'eau deutérée (D₂O). L'acquisition et le traitement des spectres sont effectués grâce au logiciel NTNMR, XWINNMR et MestReC. Nous avons observé les noyaux ¹H et ¹³C avec des analyses à une dimension.

Mesure du degré d'oxydation

Le degré d'oxydation (DO) des polysaccharides modifiés, exprimé en pourcentage (nombre de fonctions carboxyliques pour 100 unités sucre), est déterminé à partir d'un dosage de type acide/base suivi par mesure de conductivité

Préparation des échantillons

Une masse de 30 mg de polysaccharide est introduite dans 5 mL de NaOH à 0,05 M conduisant à une solubilisation totale, après 30 min. d'agitation, on effectue une dilution jusqu'à un volume de 250 mL. Un premier dosage est effectué (aller) avec une solution commerciale de HCl 0,05 M avec des ajouts de 0,1 mL suivi d'un deuxième dosage (retour) par de la soude 0,05 M.

Étalonnage de l'acide et de la base

L'acide et la base sont étalonnés pour trouver le facteur exact de correction f_c (mL) qui nous servira pour les calculs du degré d'oxydation.

20 *Calcul du degré d'oxydation*

Une fois le facteur de conversion connu le degré d'oxydation, en pourcentage de résidus oxydés sur la totalité, est calculé par la formule suivante:

$$\text{DO}(\%) = \frac{162V_d 0,05(f_c)10^{-3}}{10^{-3}M_s - 14V_d 0,05(f_c)10^{-3}}100$$

avec V_d le volume dosé, f_c le facteur de conversion et M_s la masse sèche à doser.

25 Le volume V_a' correspond à la différence entre le volume totale (V_{tot}) et le volume d'acide en excès obtenu au retour (V_a):

$$V_a' = V_{tot} - V_a$$

Le volume dosé (V_d) est calculé par différence entre le volume de soude en excès obtenu à l'aller (V_s) et V_a' :

30
$$V_d = V_a' - V_s$$

Le deuxième dosage (retour) par la soude est effectué pour vérifier la position correcte de V_a' , le deuxième virage de la courbe en excès d'acide (aller), une fois les carboxyles dosés, n'étant pas net.

5 Exemple 3

2g de glucomannane de Konjac sous forme de poudre fine sont introduits dans le réacteur (PE) et 3 g de NO_2 sont injectés (PE). La poudre est préalablement équilibrée avec une teneur en eau de 10% w/w et la température du système est fixée à 30°C. Le temps de réaction varie de 5 à 300 minutes.

10 Nous obtenons des oligosaccharides de Konjac avec des DP de 170 à 8 et un DO de 15 à 100 %.

Exemple 4

15 2g de glucomannane de Konjac sous forme de poudre fine sont introduits dans le réacteur (PE) et 3 g de NO_2 sont injectés (PE). La poudre est préalablement équilibrée avec une teneur en eau de 6% w/w et la température du système est fixée à 30°C. Le temps de réaction varie de 15 à 180 minutes.

Nous obtenons des oligosaccharides de Konjac avec des DP de 241 à 21 et un DO de 32 à 82 %.

20

Exemple 5

25 2g de glucomannane de Konjac sous forme de poudre fine sont introduits dans le réacteur (PE) et 3 g de NO_2 sont injectés (PE). La poudre est préalablement équilibrée avec une teneur en eau de 16% w/w et la température du système est fixée à 30°C. Le temps de réaction varie de 15 à 180 minutes. Nous obtenons des oligosaccharides de Konjac avec des DP de 48 à 17 et un DO de 32 à 82 %.

Exemple 6

30 2g de glucomannane de Konjac sous forme de poudre fine sont introduits dans le réacteur (PE) et 3 g de NO_2 sont injectés (PE). La poudre est préalablement équilibrée avec une teneur en eau de 22% w/w et la température du système est fixée à 30°C. Le temps de réaction varie de 15 à 180 minutes.

Nous obtenons des oligosaccharides de Konjac avec des DP de 26 à 5 et un DO de 49 à 96 %.

Exemple 7

2g de Guar sous forme de poudre fine sont introduits dans le réacteur (PE) et 3 g de NO₂ sont injectés (PE). La poudre est préalablement équilibrée avec une teneur en eau de 10%
5 w/w et la température du système est fixée à 30°C. Le temps de réaction varie de 15 à 180 minutes. Nous obtenons des oligosaccharides avec des DP de 80 à 48 et un DO de 15 à 100 %.

Exemple 8

10 2g d'Amidon sous forme de poudre fine sont introduits dans le réacteur (PE) et 3 g de NO₂ sont injectés (PE). La poudre est préalablement équilibrée avec une teneur en eau de 10% w/w et la température du système est fixée à 30°C. Le temps de réaction varie de 15 à 180 minutes. Nous obtenons des oligosaccharides avec des DP de 30 à 10 et un DO de 15 à 100 %.

15

Exemple 9

2g de Dextrane sous forme de poudre fine sont introduits dans le réacteur (PE) et 3 g de NO₂ sont injectés (PE). La poudre est préalablement équilibrée avec une teneur en eau de 10% w/w et la température du système est fixée à 30°C. Le temps de réaction varie de 15 à
20 180 minutes. Nous obtenons des oligosaccharides avec des DP de 300 à 15.

Exemple 10

2g d'Alginate sous forme de poudre fine sont introduits dans le réacteur (PE) et 3 g de NO₂ sont injectés (PE). La poudre est préalablement équilibrée avec une teneur en eau de 10%
25 w/w et la température du système est fixée à 30°C. Le temps de réaction varie de 15 à 180 minutes. Nous obtenons des oligosaccharides d'Alginate avec des DP de 83 à 11.

Exemple 11

2g de Xanthane sous forme de poudre fine sont introduits dans le réacteur (PE) et 3 g de
30 NO₂ sont injectés (PE). La poudre est préalablement équilibrée avec une teneur en eau de 10% w/w et la température du système est fixée à 30°C. Le temps de réaction varie de 15 à 180 minutes. Nous obtenons des oligosaccharides avec des DP de 170 à 17 et un DO de 15 à 100 %.

Exemple 12

2g de gomme de Tara sous forme de poudre fine sont introduits dans le réacteur (PE) et 3 g de NO₂ sont injectés (PE). La poudre est préalablement équilibrée avec une teneur en eau de 10% w/w et la température du système est fixée à 30°C. Le temps de réaction varie de 5 15 à 180 minutes. Nous obtenons des oligosaccharides avec des DP de 100 à 40 et un DO de 15 à 100 %.

Exemple 13

2g de cellulose (Cotton Linter) sous forme de poudre fine sont introduits dans le réacteur 10 (PE) et 3 g de NO₂ sont injectés (PE). La poudre est préalablement équilibrée avec une teneur en eau de 10% w/w et la température du système est fixée à 30°C. Le temps de réaction varie de 15 à 180 minutes.

Exemple 14 : Comparatif hydrolyse acide, enzymatique et hydrolyse gaz

15

Le même produit hydrolysé avec trois méthodes différentes (acide, enzyme et gaz) en conditions optimales nous montre que dans le cas d'une hydrolyse selon l'invention en phase gazeuse nous obtenons une distribution de DP très étroite entre 8 et 15 selon le cas (valeurs moyennes) alors que dans le cas d'une dépolymérisation classique nous observons 20 au cours de la réaction toujours une accumulation de monomères, dimères et trimères principalement. Les résultats comparatifs obtenus sont montrés aux figures 5 à 7.

REFERENCES

S. M. Butrim et al. « Kinetics of Starch Oxidation in the System Nitrogen(IV) Oxide – Tetrachloromethane ». Russian Journal of Applied Chemistry, Vol. 74, No. 12, 2001, p. 2106-2110. Translated from Zhurnal Prikladnoi Khimii, Vol. 74, No. 12, 2001, p. 2046-2050.

5 Paola Cescutti et al. « Structure of the oligomers obtained by enzymatic hydrolysis of the glucomannan produced by the plant *Amorphophallus konjac* ». Carbohydrate Research 337 (2002) p. 2505-2511.

10

REFERENCES BREVET

EP-A2-0 268 885
US 2,472,590
15 US 5,821,360
WO 2006/018552
US 5,856,470
US 5,541,316
US 5,959,101
20 GB 779820
FR 2873700
DE 4426443
US 2003/0073663

REVENDICATIONS

1. Procédé d'hydrolyse contrôlée d'un polysaccharide caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
 - 5 - on dispose d'un polysaccharide à l'état solide,
 - on ajuste la teneur en eau initiale du polysaccharide à une teneur comprise entre 5% et 30% w/w,
 - on hydrolyse le polysaccharide en présence d'un gaz acide à une température inférieure à 50°C.
- 10 2. Procédé d'hydrolyse contrôlée d'un polysaccharide selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
 - on dispose d'un polysaccharide à l'état solide,
 - on ajuste la teneur en eau initiale du polysaccharide à une teneur comprise entre 5%
15 et 30% w/w,
 - on hydrolyse le polysaccharide en présence d'un gaz acide à une température inférieure à 50°C,
 - on élimine le gaz acide,
 - on lave le polysaccharide hydrolysé avec un solvant alcoolique,
 - 20 - on neutralise le polysaccharide hydrolysé,
 - on sèche le polysaccharide hydrolysé.
3. Procédé d'hydrolyse contrôlée d'un polysaccharide selon l'une des revendications 1-2 caractérisé en ce que lors de l'étape d'hydrolyse du polysaccharide en présence d'un
25 gaz acide la teneur en eau du polysaccharide est maintenue entre 5% et 30%w/w.
4. Procédé d'hydrolyse contrôlée d'un polysaccharide selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que l'on ajuste la teneur en eau initiale du polysaccharide à une teneur comprise entre 10% et 20% w/w et/ou lors de l'étape d'hydrolyse du
30 polysaccharide en présence d'un gaz acide la teneur en eau du polysaccharide est maintenue entre 10%et 20%w/w.

5. Procédé d'hydrolyse contrôlée d'un polysaccharide selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que l'étape d'hydrolyse du polysaccharide en présence d'un gaz acide s'effectue à une température inférieure à 40°C.
- 5 6. Procédé d'hydrolyse contrôlée d'un polysaccharide selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que lors de l'étape d'hydrolyse du polysaccharide le rapport molaire entre le gaz acide et le polysaccharide est inférieur à 1.5.
7. Procédé d'hydrolyse contrôlée d'un polysaccharide selon l'une des revendications
10 précédentes caractérisé en ce que l'étape d'hydrolyse du polysaccharide en présence d'un gaz acide s'effectue à une pression inférieure à 10 bars.
8. Procédé d'hydrolyse contrôlée d'un polysaccharide selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que ledit gaz acide est du NO₂.
- 15 9. Procédé d'hydrolyse contrôlée d'un polysaccharide selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que ledit gaz acide est du SO₂, ou SO₃.
10. Procédé d'hydrolyse contrôlée d'un polysaccharide selon l'une des revendications
20 précédentes caractérisé en ce que ledit gaz acide est du HCl.
11. Procédé d'hydrolyse contrôlée d'un polysaccharide selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que le polysaccharide est choisi parmi les glucomannanes, les dextranes, les alginates, la cellulose, l'amidon, les
25 galactomannanes et les xanthanes.
12. Procédé d'hydrolyse contrôlée d'un polysaccharide selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que le polysaccharide est un glucomannane de Konjac extrait de tubercules d'*Amorphophallus sp.*
- 30 13. Procédé d'hydrolyse contrôlée d'un polysaccharide selon l'une des revendications 1-8 et 11-12 caractérisé en ce que le gaz acide est du NO₂ et le procédé d'hydrolyse s'accompagne d'une oxydation des hydroxyles primaires -CH₂OH du polysaccharide.

14. Produit d'hydrolyse de glucomannanes de Konjac extrait de tubercules d'*Amorphophallus sp.* caractérisé en ce que plus de 50% du produit a un degré de polymérisation compris entre 4 et 30, un degré d'oxydation compris entre 50 et 100%
5 et un indice de polydispersité compris entre 1 et 1.2.
15. Produit d'hydrolyse d'un polysaccharide choisi parmi les glucomannanes, les galactomannanes, le dextrane, le xanthane, d'un alginat, de cellulose, d'un amidon ou
10 d'un polymannane dans lequel plus de 50% du produit a un degré de polymérisation compris entre 4 et 30, un degré d'oxydation compris entre 50 et 100% et un indice de polydispersité compris entre 1 et 2.

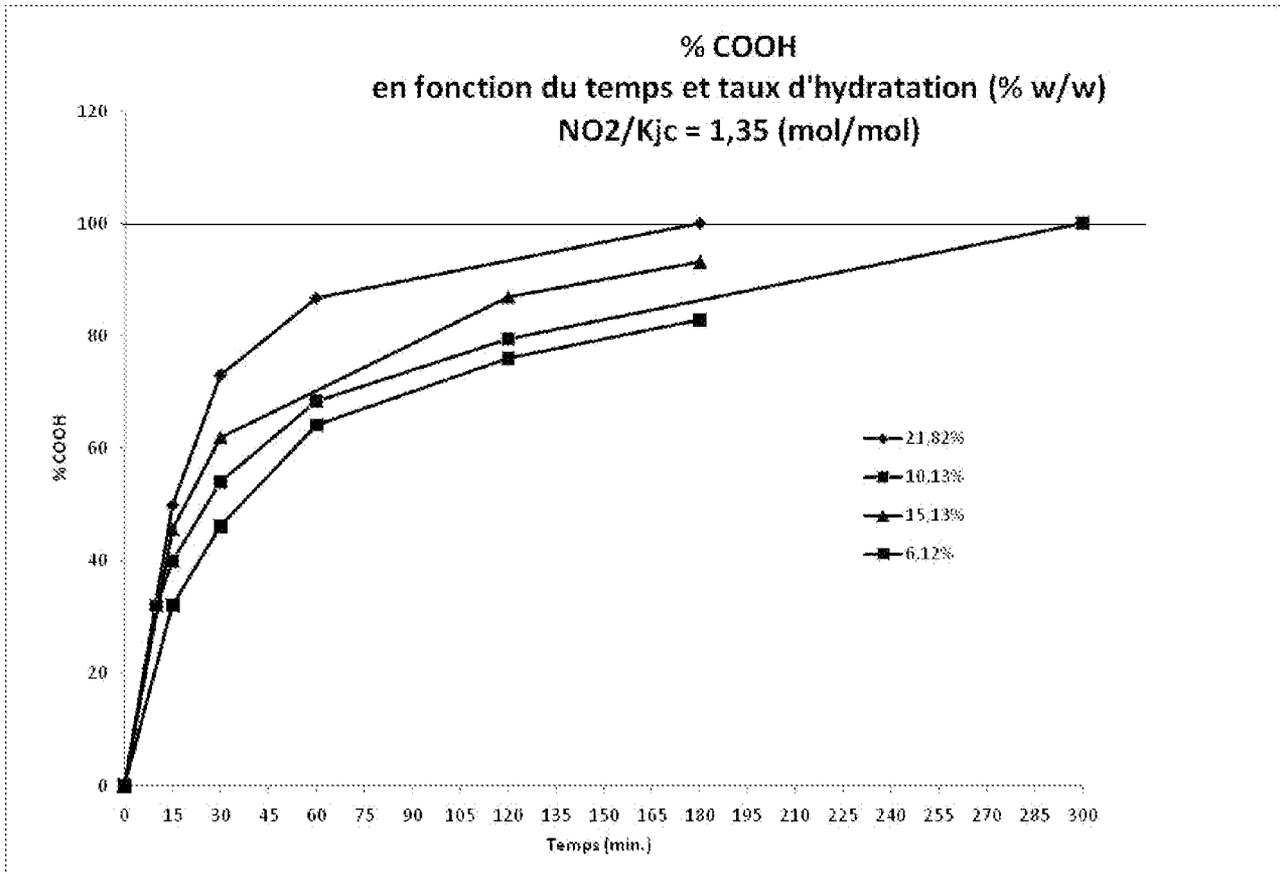


FIG. 1

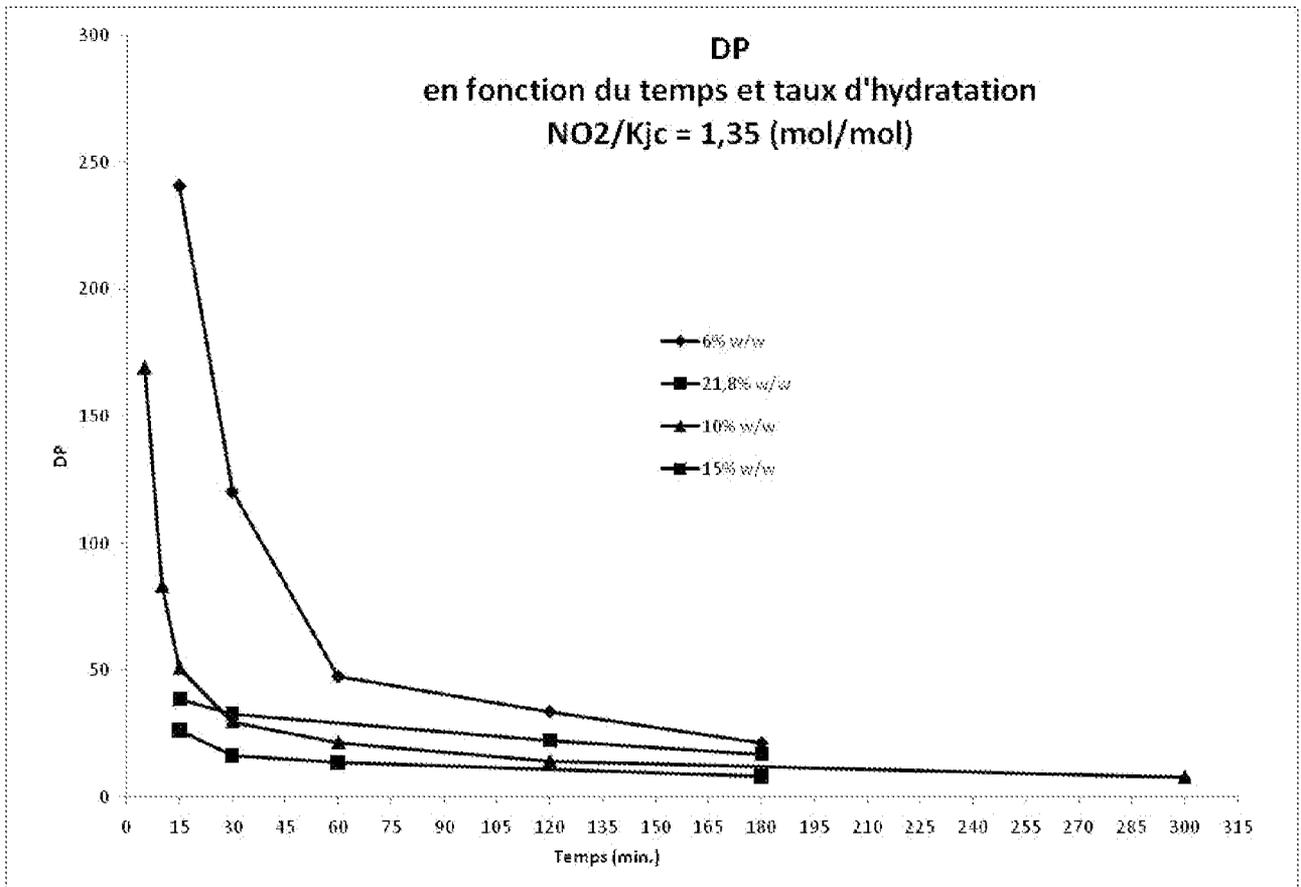


FIG. 2

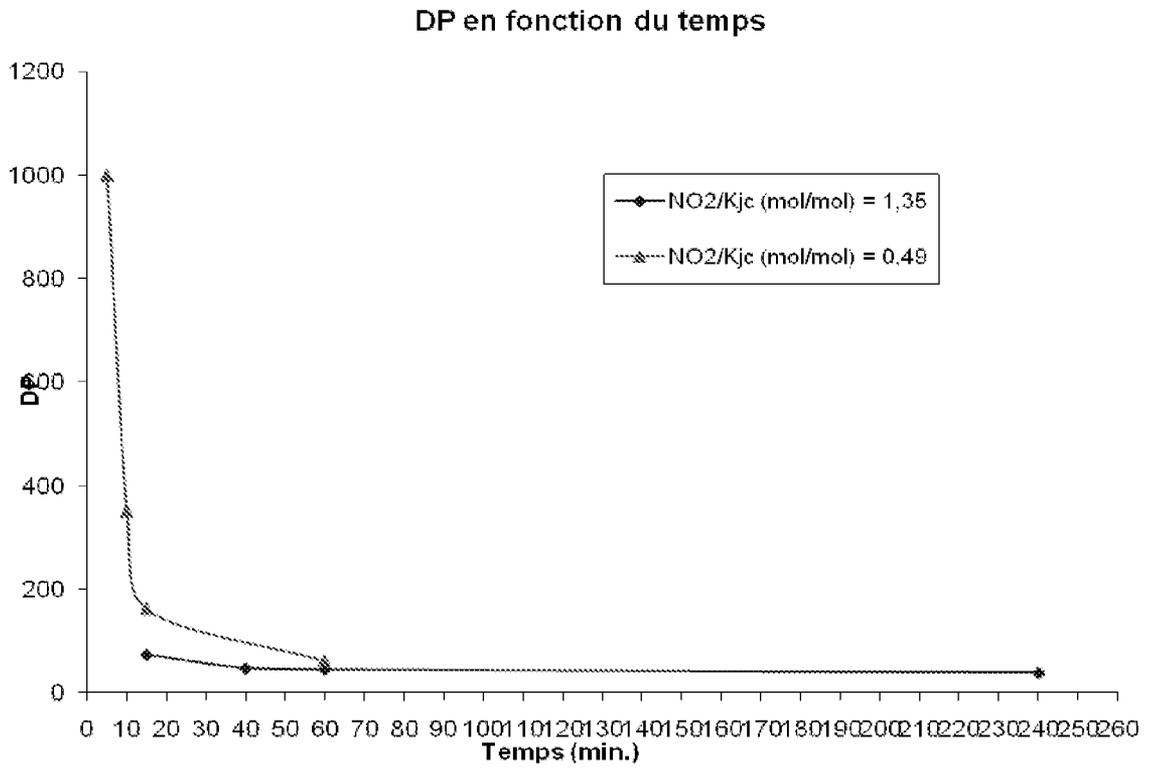


FIG. 3

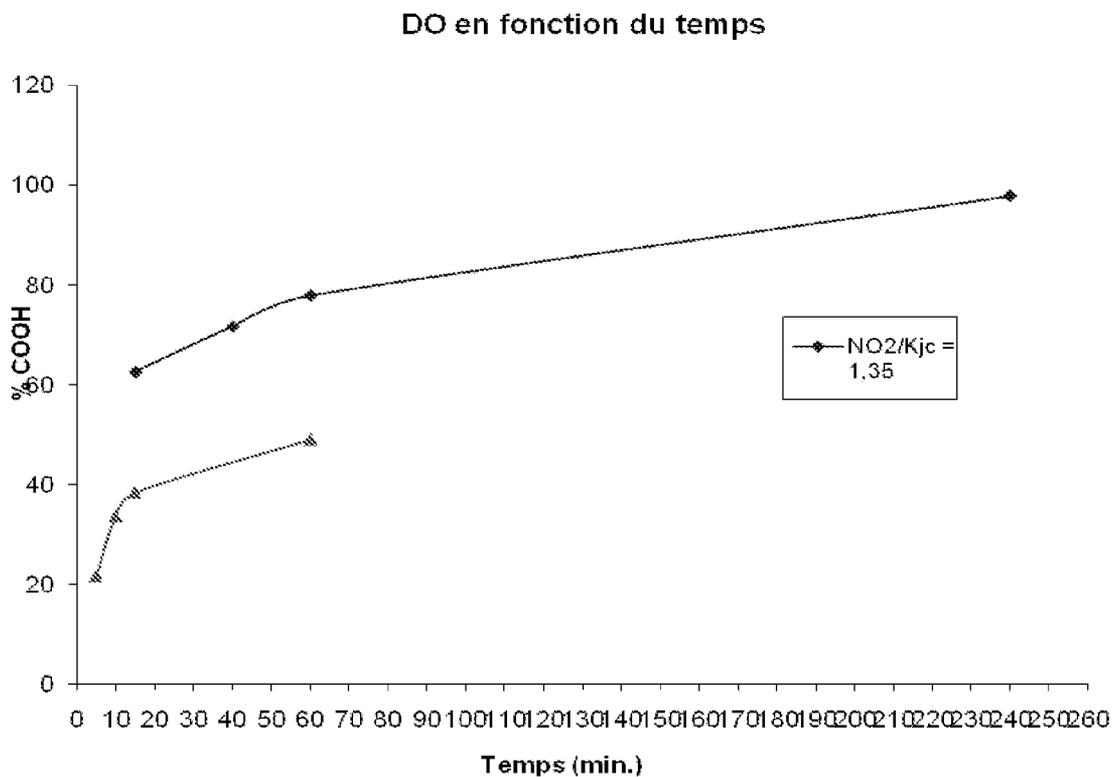


FIG. 4

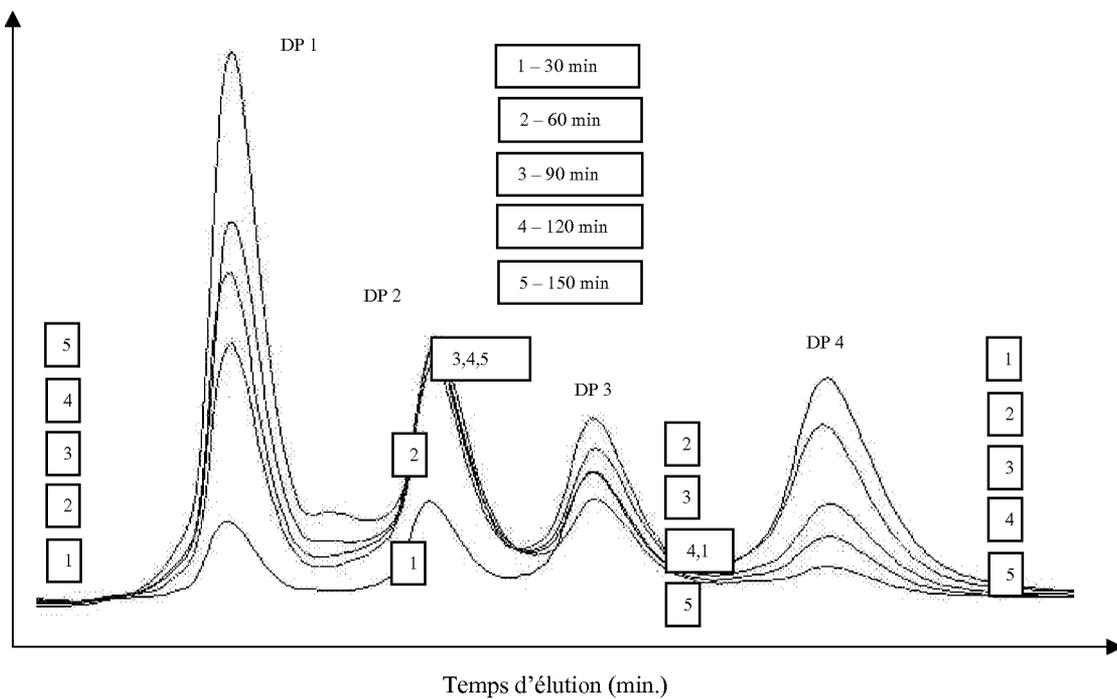


FIG. 5

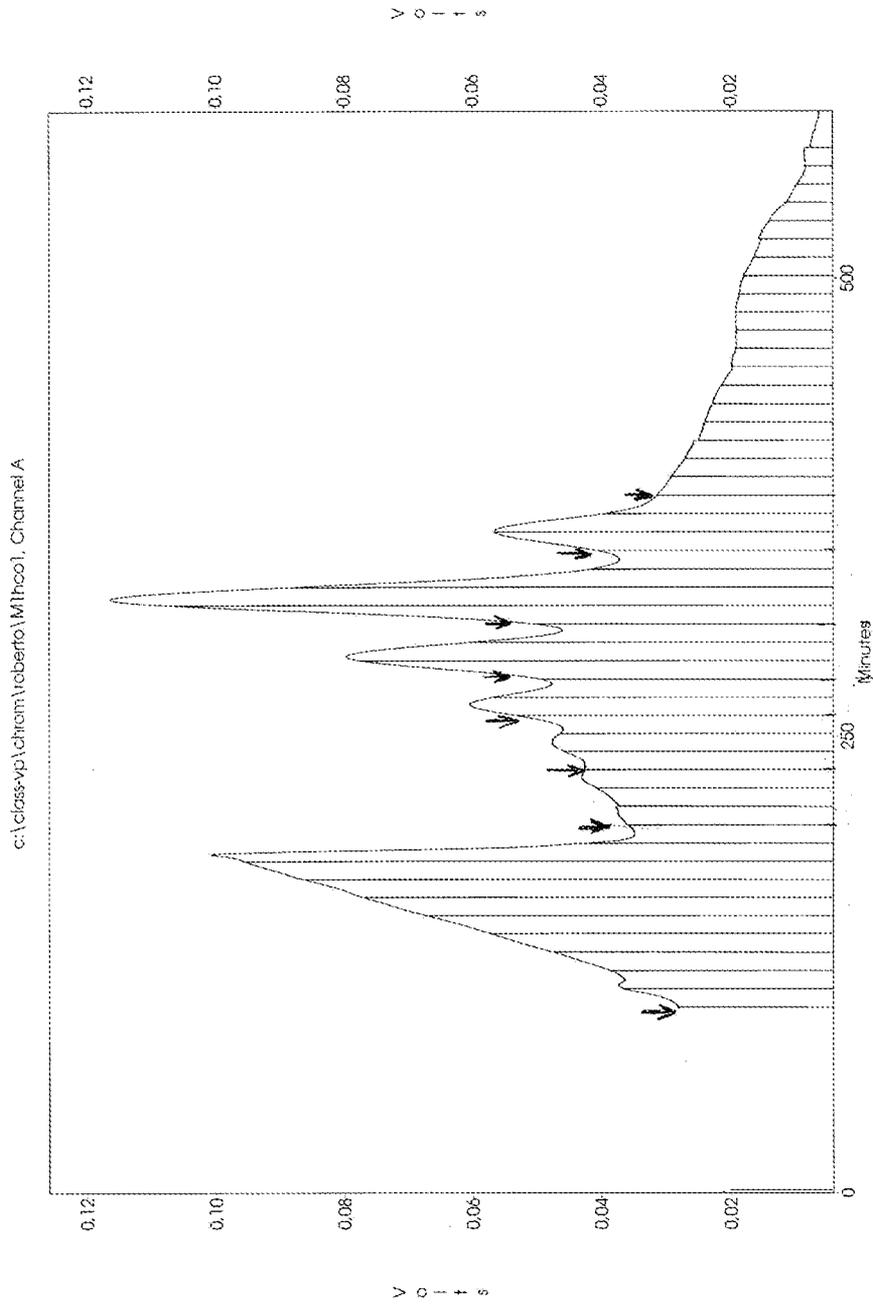


FIG. 6

7/8

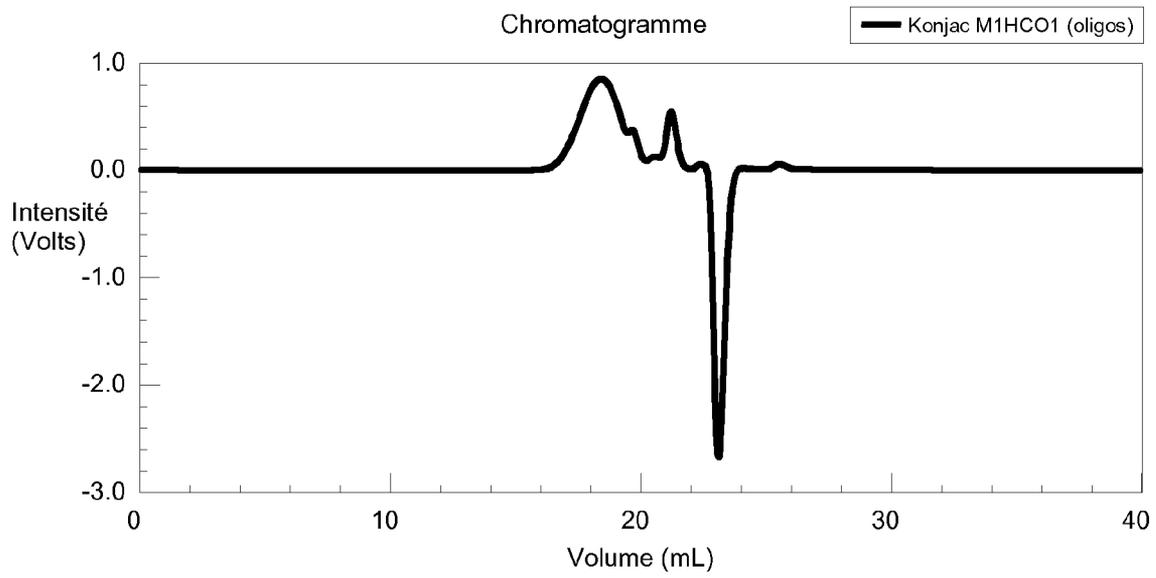


FIG. 7

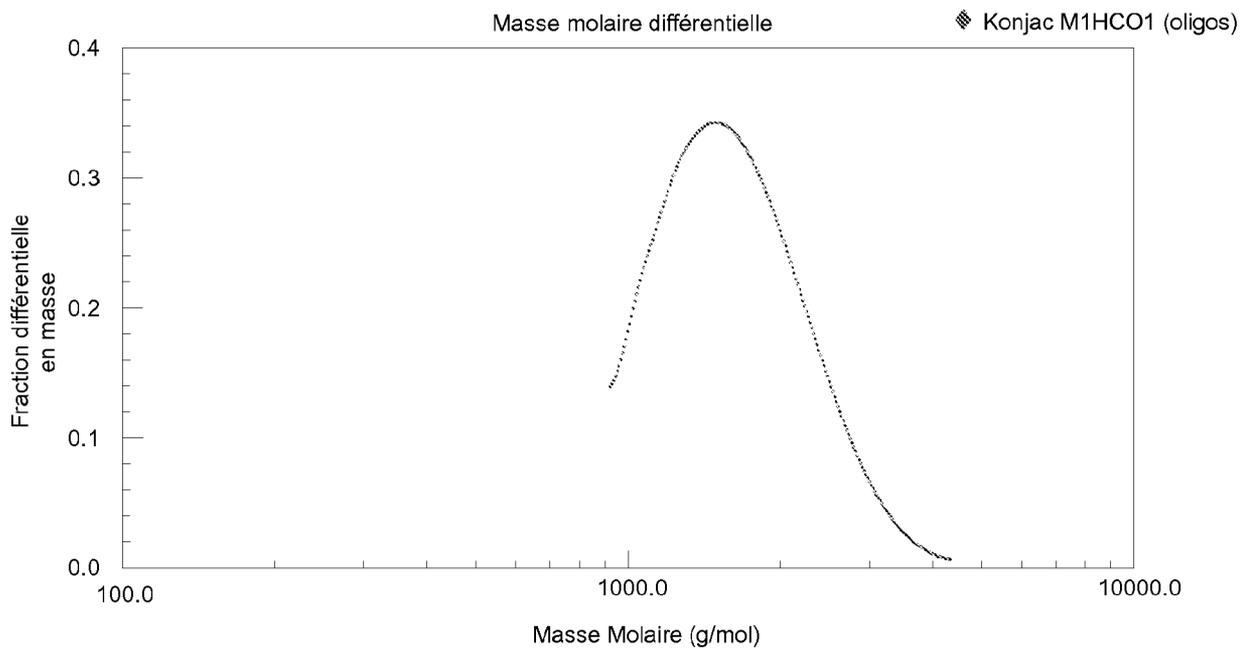


FIG. 8

8/8

Quantité

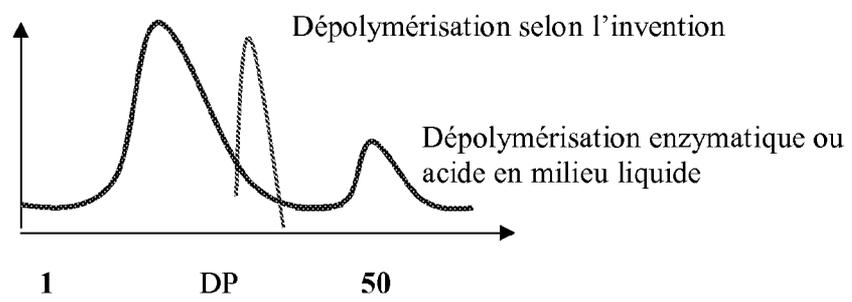


FIG. 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/067581

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C08B15/04 C08B31/18 C08B37/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C08B		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 821 360 A (ENGELSKIRCHEN KONRAD [DE] ET AL) 13 October 1998 (1998-10-13) cited in the application claims; examples -----	1-11,13, 15
X	US 5 541 316 A (ENGELSKIRCHEN KONRAD [DE] ET AL) 30 July 1996 (1996-07-30) cited in the application claims; examples -----	1-11,13, 15
X	US 5 856 470 A (MOELLER THOMAS [DE] ET AL) 5 January 1999 (1999-01-05) cited in the application claims; examples -----	1-11,13, 15
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
16 March 2010	24/03/2010	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Vaccaro, Eleonora	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/067581

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 44 26 443 A1 (HENKEL KGAA [DE]) 1 February 1996 (1996-02-01) cited in the application claims; examples 1,2 -----	1-11,13, 15
A	CESCUTTI P ET AL: "Structure of the oligomers obtained by enzymatic hydrolysis of the glucomannan produced by the plant Amorphophallus konjac" CARBOHYDRATE RESEARCH, PERGAMON, GB, vol. 337, no. 24, 29 November 2002 (2002-11-29), pages 2505-2511, XP004398937 ISSN: 0008-6215 cited in the application the whole document -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/EP2009/067581

Patent document cited in search report	A	Publication date		Patent family member(s)	Publication date
US 5821360	A	13-10-1998	DE	4402851 A1	03-08-1995
			WO	9520608 A1	03-08-1995
			EP	0742797 A1	20-11-1996
			ES	2135698 T3	01-11-1999
			JP	9508168 T	19-08-1997
US 5541316	A	30-07-1996	DE	4203923 A1	12-08-1993
			WO	9316110 A1	19-08-1993
			EP	0625992 A1	30-11-1994
			ES	2101332 T3	01-07-1997
			JP	7503495 T	13-04-1995
US 5856470	A	05-01-1999	AT	198897 T	15-02-2001
			DE	19510313 A1	26-09-1996
			WO	9629351 A1	26-09-1996
			EP	0815143 A1	07-01-1998
			ES	2154808 T3	16-04-2001
			JP	11502247 T	23-02-1999
DE 4426443	A1	01-02-1996	WO	9603439 A1	08-02-1996

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2009/067581

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

INV. C08B15/04 C08B31/18 C08B37/00

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

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

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

C08B

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

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

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 5 821 360 A (ENGELSKIRCHEN KONRAD [DE] ET AL) 13 octobre 1998 (1998-10-13) cité dans la demande revendications; exemples -----	1-11,13, 15
X	US 5 541 316 A (ENGELSKIRCHEN KONRAD [DE] ET AL) 30 juillet 1996 (1996-07-30) cité dans la demande revendications; exemples -----	1-11,13, 15
X	US 5 856 470 A (MOELLER THOMAS [DE] ET AL) 5 janvier 1999 (1999-01-05) cité dans la demande revendications; exemples -----	1-11,13, 15
	-/--	

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

 Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

16 mars 2010

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

24/03/2010

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

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

Fonctionnaire autorisé

Vaccaro, Eleonora

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/EP2009/067581

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	DE 44 26 443 A1 (HENKEL KGAA [DE]) 1 février 1996 (1996-02-01) cité dans la demande revendications; exemples 1,2 -----	1-11,13, 15
A	CESCUTTI P ET AL: "Structure of the oligomers obtained by enzymatic hydrolysis of the glucomannan produced by the plant Amorphophallus konjac" CARBOHYDRATE RESEARCH, PERGAMON, GB, vol. 337, no. 24, 29 novembre 2002 (2002-11-29), pages 2505-2511, XP004398937 ISSN: 0008-6215 cité dans la demande le document en entier -----	1-15

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2009/067581

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
US 5821360	A	13-10-1998	DE	4402851 A1	03-08-1995
			WO	9520608 A1	03-08-1995
			EP	0742797 A1	20-11-1996
			ES	2135698 T3	01-11-1999
			JP	9508168 T	19-08-1997
US 5541316	A	30-07-1996	DE	4203923 A1	12-08-1993
			WO	9316110 A1	19-08-1993
			EP	0625992 A1	30-11-1994
			ES	2101332 T3	01-07-1997
			JP	7503495 T	13-04-1995
US 5856470	A	05-01-1999	AT	198897 T	15-02-2001
			DE	19510313 A1	26-09-1996
			WO	9629351 A1	26-09-1996
			EP	0815143 A1	07-01-1998
			ES	2154808 T3	16-04-2001
			JP	11502247 T	23-02-1999
DE 4426443	A1	01-02-1996	WO	9603439 A1	08-02-1996