



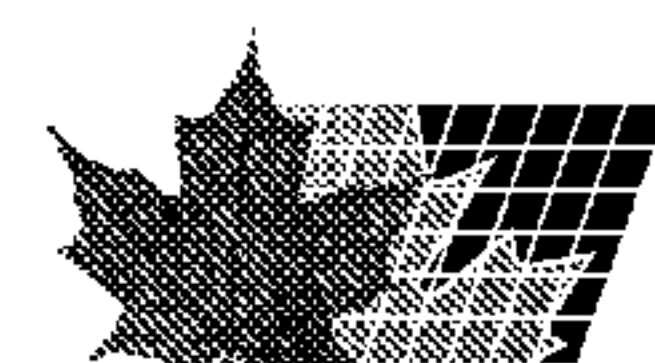
(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2012/10/11
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2013/04/18
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2014/04/09
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: EP 2012/070184
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2013/053838
(30) Priorités/Priorities: 2011/10/11 (FR11 59196);
2011/10/18 (US61/548454)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C08B 37/00* (2006.01),
A23K 1/18 (2006.01), *A61K 31/716* (2006.01),
A61K 8/73 (2006.01)
(71) Demandeur/Applicant:
KITOZYME, BE
(72) Inventeurs/Inventors:
VAESEN, PHILIPPE RICHARD, BE;
BAUM, OLIVIER YVETTE MARCEL, BE
(74) Agent: ROBIC

(54) Titre : PROCEDE DE PREPARATION DE GLUCANS A PARTIR D'ASPERGILLUS NIGER
(54) Title: METHOD FOR PREPARING GLUCANS FROM ASPERGILLUS NIGER

(57) **Abrégé/Abstract:**

La présente demande concerne une méthode de préparation du glucan issu d'*Aspergillus niger* caractérisée en ce qu'elle comprend (i) la déacétylation au moins partielle de mycélium d'*Aspergillus niger*; (ii) un traitement acide du mycélium déacétylé ou partiellement déacétylé, de préférence après purification et/ou lavage, pour obtenir du glucan insoluble et du chitosane soluble, ledit traitement acide comprenant la mise en contact du mycélium déacétylé avec une solution acide; (iii) la séparation du chitosane soluble d'une part, et d'autre part du glucan; (iv) un traitement alcalin du glucan comprenant la mise en contact du glucan avec une solution alcaline pour faire flocculer les glucans; et (v) le séchage des glucans flocculés pour obtenir une poudre de glucan. La présente invention concerne également les glucans ainsi obtenus, des compositions les comprenant, et leurs utilisations. Les glucans de l'invention peuvent être utilisés comme agents immunostimulants.



(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
18 avril 2013 (18.04.2013)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2013/053838 A1

(51) Classification internationale des brevets :

C08B 37/00 (2006.01) *A61K 8/73* (2006.01)
A23K 1/18 (2006.01) *A61K 31/716* (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/EP2012/070184

(22) Date de dépôt international :

11 octobre 2012 (11.10.2012)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

11 59196 11 octobre 2011 (11.10.2011) FR
 61/548454 18 octobre 2011 (18.10.2011) US

(71) **Déposant** : KITOZYME [BE/BE]; Rue Haute Claire 4,
Parc Industriel des Hauts Sarts Zone 2, B-4040 Herstal
(BE).(72) **Inventeurs** : VAESEN, Philippe, Richard; Voie des
fosses 31, B-4672 Saint Remy (BE). BAUM, Olivier,
Yvette, Marcel; 14 rue fond du moulin, B-4130 Tilff (BE).(74) **Mandataires** : DOMENEGO, Bertrand et al.; Cabinet
Lavoix, 2, place d'Estienne d'Orves, F-75009 Paris (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, BN, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU,
RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), européen (AL, 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, RS, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).**Publiée :**

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

(54) **Title** : METHOD FOR PREPARING GLUCANS FROM *ASPERGILLUS NIGER*(54) **Titre** : PROCÉDÉ DE PRÉPARATION DE GLUCANS À PARTIR D'*ASPERGILLUS NIGER*(57) **Abstract** : The present application relates to a method for preparing glucans from *Aspergillus niger*, characterized in that it includes: (i) at least partially deacetylating the mycelium of the *Aspergillus niger*; (ii) treating the deacetylated or partially deacetylated mycelium with acid, preferably after purification and/or washing, in order to obtain insoluble glucans and soluble chitosan, wherein said acid treatment includes contacting the deacetylated mycelium with an acid solution; (iii) separating the soluble chitosan from the glucans; (iv) treating the glucans with an alkali, which includes contacting the glucans with an alkali solution so as to flocculate the glucans; and (v) drying the flocculated glucans in order to obtain a glucan powder. The present invention further relates to the resulting glucans, to compositions including said glucans, and to the uses thereof. The glucans of the invention can be used as immunostimulants.(57) **Abrégé** : La présente demande concerne une méthode de préparation du glucan issu d'*Aspergillus niger* caractérisée en ce qu'elle comprend (i) la déacétylation au moins partielle de mycélium d'*Aspergillus niger*; (ii) un traitement acide du mycélium déacétylé ou partiellement déacétylé, de préférence après purification et/ou lavage, pour obtenir du glucan insoluble et du chitosane soluble, ledit traitement acide comprenant la mise en contact du mycélium déacétylé avec une solution acide; (iii) la séparation du chitosane soluble d'une part, et d'autre part du glucan; (iv) un traitement alcalin du glucan comprenant la mise en contact du glucan avec une solution alcaline pour faire flocculer les glucans; et (v) le séchage des glucans flocculés pour obtenir une poudre de glucan. La présente invention concerne également les glucans ainsi obtenus, des compositions les comprenant, et leurs utilisations. Les glucans de l'invention peuvent être utilisés comme agents immunostimulants.

WO 2013/053838 A1

Procédé de préparation de glucans à partir d'*Aspergillus niger*

La présente invention concerne un procédé préparation de glucans à partir d'*Aspergillus Niger*, les Beta-glucans ainsi obtenus, et leurs utilisations.

5 Il est connu depuis bien longtemps de préparer des beta-glucans à partir de différents substrats d'origine naturelle, par exemple des beta(1,4)glucans issus de céréales, beta(1,3)(1,6)glucans issus de levure et de champignons. Notamment, il est particulièrement connu de préparer les glucans à partir de levures, comme typiquement *Saccharomyces cerevisiae*. Le brevet EP 0759 089 décrit que les glucans dérivés de
10 *Saccharomyces cerevisiae* procurent des effets bénéfiques variés aux poissons et à d'autres animaux. Différents traitements chimiques ou biochimiques sont réalisés pour éliminer les chaînes de glucans à liaisons beta-(1-6), notamment grâce à un traitement par une beta-(1-6)-glucanase. Ces traitements sont envisagés pour améliorer l'activité immunostimulante des glucans en augmentant la proportion des glucans à liaisons du
15 type beta(1-3), qui seraient liés à l'activité précitée. Cependant la littérature évoque les fortes divergences de structure selon l'origine des glucans. On peut typiquement se reporter à l'article de Novak (Novak et al., Development of Views on Beta-Glucan Composition and Structure, Biology and Chemistry of Beta Glucans, vol. 01, 2011, 1-9). Cet article enseigne que les préparations de glucans sont hétérogènes selon l'organisme
20 employé pour les extraire. Du fait de cette hétérogénéité, il est difficile de connaître exactement la structure des glucans et de tirer toute conclusion hâtive relativement à leurs propriétés, notamment biologique. En particulier le degré de branchements de chaînons latéraux sur le squelette beta-glucan dépend du genre, de l'espèce, et de la souche de l'organisme considéré. Or le degré de branchements est important pour la
25 structure macromoléculaire des glucans qui est liée aux propriétés immunostimulantes.

Aspergillus niger est connu principalement comme source de chitine pour produire du chitosane. Le mycélium d'*Aspergillus niger* est un sous-produit de la fermentation de *A. niger* pour la production d'acide citrique. Des procédés d'obtention de chitosane à partir d'*A. niger* sont par exemple décrits dans la demande internationale de KitoZyme
30 WO03068824. Les glucans sont un sous-produit insoluble obtenu lors de la préparation de chitosane. Les glucans résultants de la préparation de chitosane sont écartés. On peut le constater de l'enseignement des demandes internationales WO0168714 et WO03086281, qui n'envisagent pas le traitement ultérieur des glucans insolubles.

A priori il n'existe pas d'étude spécifique concernant les glucans obtenus à partir
35 d'*Aspergillus niger*. Or comme décrit ci-dessus, la structure complexe des glucans ne permet pas de s'avancer sur les propriétés immunostimulantes des glucans d'origine

d'*Aspergillus niger*. Toute conclusion dans ce sens ne serait qu'une pure spéculation.

D'autre part, si les glucans peuvent être obtenu comme sous-produit insoluble lors de la préparation de chitosane, les procédés connus à ce jour ne permettent pas une exploitation industrielle des glucans coproduits avec le chitosane obtenu à partir de chitine. De plus le degré de pureté des glucans n'est généralement pas satisfaisant. Le procédé de préparation de chitosane de la demande internationale WO03068824 de KitoZyme ne permet pas l'obtention de glucans avec une pureté satisfaisante puisque les glucans sont sous forme de copolymères chitine-glucans. Cette demande internationale indique qu'un copolymère chitine-glucans peut posséder de 30 à 50% (m/m) de chitine et entre 50 et 70% de beta-glucans. Cependant il s'agit d'un copolymère possédant des liaisons entre la chitine et les glucans. Ce produit des glucans liés à la chitine sous forme de copolymère. Pour la production de chitosane à partir de chitine, la chitine est transformée en utilisant une solution alcaline dans des conditions « agressives » afin de déacétyler la chitine. Or ces conditions laissent penser que les glucans obtenus comme sous-produit présenteront une structure suffisamment détériorée pour que l'on n'envisage pas de les utiliser comme glucans immunostimulants, ce qui explique que l'art antérieur écarte cette fraction.

Dans la présente demande :

Par « glucans d'*Aspergillus niger* » ou « glucans à partir d'*Aspergillus niger* », ou « glucans d'origine *Aspergillus niger* », ou « glucans issus d'*Aspergillus niger* », on entend des beta-glucans obtenus ou susceptibles d'être obtenus à partir de l'organisme *Aspergillus niger*, et en particulier à partir de mycélium d'*Aspergillus niger*. Cette appellation est transposable à d'autres produits que les glucans, comme au chitosane ou à la chitine.

D'autre part il est fait référence à des « glucans » selon la présente invention, mais cette désignation concerne plus précisément un extrait d'*Aspergillus niger* comprenant majoritairement en masse des glucans, le reste de l'extrait étant constituée par des impuretés au sens de l'invention, c'est-à-dire des composés autres que les glucans.

Les termes « glucans » ou de « beta-glucans » sont utilisés ici comme synonymes.

Par « glucans immunostimulants » on entend des glucans présentant des propriétés favorisant l'immunostimulation d'au moins un marqueur de référence du système immunitaire, comme par exemple les neutrophiles du système immunitaire inné.

La présente invention a pour but de fournir un procédé industriel de préparation de glucans à partir d'*Aspergillus niger*.

La présente invention a en particulier pour but d'améliorer le rendement d'un procédé de préparation de glucans à partir d'*Aspergillus niger*. La présente invention a

notamment pour but d'améliorer le rendement d'un procédé de préparation de glucans à partir d'*Aspergillus niger* avec la coproduction de chitosane. La présente invention a aussi pour but de purifier des glucans à partir d'*Aspergillus niger* selon un procédé industriel.

La présente invention a encore pour but d'obtenir ou de préparer des glucans immunostimulants notamment pour la stimulation du système immunitaire d'un animal ou d'un être humain, notamment par nutrition orale, application sur la peau, etc....

Il a été découvert de manière surprenante que les buts ci-dessus peuvent être satisfaits par la présente invention.

L'invention concerne en particulier un procédé ou une méthode de préparation de glucan issu du mycélium d'*Aspergillus niger*, ladite méthode comprenant : (i) la déacétylation au moins partielle de mycélium d'*Aspergillus niger* ; (ii) un traitement acide du mycélium déacétylé ou partiellement déacétylé, de préférence après purification et/ou lavage, pour obtenir du glucan insoluble et du chitosane soluble, ledit traitement acide comprenant la mise en contact du mycélium déacétylé avec une solution acide ; (iii) la séparation du chitosane soluble d'une part, et d'autre part du glucan insoluble, ; (iv) un traitement alcalin du glucan comprenant la mise en contact du glucan avec une solution alcaline pour faire flocculer le glucan ; et (v) le séchage du glucan flocculé pour obtenir une poudre de glucan.

Le glucan de l'invention n'est jamais pur à 100 %, mais comprend des substances secondaires. Parmi les substances secondaires on peut relever la présence de cendres, de lipides, de chitine et/ou de chitosane ou autres polysaccharides (par exemple le mannane), que l'on cherche à minimiser, en vue d'en améliorer la pureté en adéquation avec l'utilisation envisagée. Par « déacétylation de la chitine » on entend la déacétylation totale ou partielle de la chitine car le chitosane peut comprendre un degré d'acétylation plus ou moins élevé.

Étape (i) de déacétylation

Avantageusement, la déacétylation (étape (i)) est effectuée par une mise en contact du mycélium avec une matière alcaline, de préférence apportant des ions hydroxyde, et de préférence avec de l'hydroxyde de sodium (NaOH), à une concentration, à une température, et pendant une durée suffisante pour déacétyler la chitine en chitosane avec de préférence un rendement minimum de 4% en chitosane, et de préférence supérieur à 9% et obtenir un chitosane présentant de préférence un degré d'acétylation, c'est-à-dire une proportion molaire d'unités N-acétyl-D-glucosamine le long des chaînes de chitosane, de 0 à 50%, et de préférence de 10 à 25%. Selon un mode préféré, la solution alcaline comprend une concentration supérieure à 40%

(masse/volume) de matière alcaline apportant des ions hydroxyle par rapport à la masse totale de la solution alcaline. On entend par rendement : le rapport massique exprimé en % de la masse sèche de la fraction contenant le chitosane (chitosane et ses impuretés) sur la masse sèche de mycélium de départ. On utilise par exemple une solution de d'hydroxyde de sodium de concentration 50% (masse/volume).

Selon une variante, le mycélium d'*Aspergillus niger* est mélangé avec une solution alcaline concentrée. De préférence la solution alcaline est choisie parmi une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium ou de potassium, le carbonate ou bicarbonate de soude. Avantageusement le ratio en masse de la matière alcaline par rapport à la chitine est compris entre 0,1 à 5, et de préférence entre 0,3 à 3, et encore de préférence de 0,5 à 1,5 (m/m).

De préférence le traitement par la solution alcaline du mycélium d'*Aspergillus niger* se réalise à une température comprise entre 50 et 120 °C, et encore de préférence entre 80 et 120 °C.

On peut dans un premier temps mettre en contact le mycélium avec la solution alcaline, puis réaliser une montée en température progressive. Par exemple la température atteint 110 °C en 2 heures, puis on maintient la température pendant 6 heures, puis on transfère la suspension obtenue vers l'étape suivante en 1 heure, la température diminue jusqu'à la température ambiante.

Selon un autre mode préféré, l'étape de déacétylation en elle-même est réalisée pendant une période comprise entre 30 minutes et 10 heures, et de préférence entre 3 et 8 heures.

Il est préférable de réaliser une déacétylation poussée en température et en durée de réaction pour augmenter le rendement en chitosane (conformément au tableau 3 des exemples). On peut par exemple réaliser la déacétylation par la mise en contact du mycélium avec la solution alcaline pendant une durée comprise entre 4 et 7 heures, puis augmenter la température avec un maintien à une température comprise entre 50 et 120 °C, et encore de préférence entre 80 et 120 °C.

La fraction insoluble en milieu alcalin peut-être séparée de la fraction soluble par filtration et/ou centrifugation.

La fraction alcaline insoluble obtenue après déacétylation est de préférence mise en suspension, puis diluée, filtrée et lavée à l'eau. Cette ou ces étapes sont typiquement réalisées autant que nécessaire.

De préférence la solution alcaline est récupérée après cette première étape, concentrée, recyclée et réutilisée pour la déacétylation de la chitine.

5

Avant l'étape de déacétylation, la méthode de l'invention peut comprendre le traitement préalable du mycélium d'*Aspergillus niger*. Le mycélium est de préférence lavé, et concentré et/ou séché. Ceci permet selon une variante d'utiliser un mycélium totalement ou partiellement décoloré. La couleur blanche ou beige peut-être avantageuse pour des applications comme en pharmacie, nutraceutique, cosmétique, ou dans l'industrie alimentaire. Un mycélium filtré/lavé apporte avantageusement une amélioration du rendement en chitosane et/ou en glucan.

Étape (ii) de traitement acide

Cette étape s'effectue dans des conditions permettant l'obtention d'une fraction soluble et d'une fraction insoluble. La fraction insoluble en milieu alcalin est mise en contact avec une solution acide selon l'étape (ii), le pH étant avantageusement ajusté à une valeur inférieure à 6,5, et de préférence inférieur à 5,5, par l'ajout d'un acide comme par exemple choisi parmi l'acide chlorhydrique, lactique, formique, glutamique, phtalique, succinique, glycolique, citrique, et de préférence l'acide acétique. La réaction peut par exemple être réalisée à température ambiante ou tout autre température favorisant la séparation de la fraction soluble contenant le chitosane de la fraction insoluble contenant le glucan.

On peut utiliser comme solution acide une solution acide présentant une concentration comprise entre 0,1 à 1N. On utilise par exemple une solution à 80% d'acide acétique.

Avantageusement, le traitement acide de l'étape (ii) comprend l'ajout d'un acide organique jusqu'à l'obtention d'un pH compris entre 3 et 5,5, et de préférence entre 3,5 et 4,5.

De préférence le traitement acide de l'étape (ii) comprend ou consiste en l'ajout d'acide acétique au mycélium déacétylé obtenu à l'étape (i), éventuellement lavé, séché et/ou concentré.

De préférence, préalablement à l'étape (ii) le résidu alcalin est éliminé par plusieurs lavages à l'eau.

Étape (iii) de séparation du glucan et du chitosane

De préférence, la séparation selon l'étape (iii) est effectuée par une séparation à l'aide d'une centrifugeuse continue à buses. Plus particulièrement, on peut utiliser pour cette étape de centrifugation une centrifugeuse à assiettes de type séparateur à buses ou de type auto-débourbeur (par ex. NA7), ou une centrifugeuse à assiettes de type séparateur à buses vortex haute performance BTUX (ces deux types de centrifugeuse

NA7 ou BTUX étant respectivement commercialisées par les sociétés Westfalia et AlfaLaval).

Selon une variante, la méthode de l'invention peut comprendre une étape supplémentaire (iiia) de traitement du chitosane soluble obtenu à l'étape (iii) pour séparer le glucan insoluble, cette étape supplémentaire pouvant être éventuellement répétée une ou plusieurs fois. Le glucan insoluble obtenu selon cette étape supplémentaire (iiia) peut être ajouté au glucan insoluble récupéré à l'étape (iii).

Selon une variante préférée, l'étape (iiia) met en œuvre un décanteur avec force centrifuge (par exemple un Sédicant commercialisé par Flottweg, qui par rapport à un décanteur traditionnel présente un bol biconique et une vitesse centrifuge plus élevée qu'un décanteur classique). Un tel décanteur comprend une centrifugeuse à bol plein et une vis convoyeuse. Il peut développer typiquement une force centrifuge de 6 000 à 10,000g. La vitesse du bol, la vitesse de la vis ainsi que la hauteur de couche sont fixés par l'homme du métier pour optimiser les performances de la machine.

Étape (iv) de séparation du chitosane et de « conditionnement par floculation » du glucan

Le glucan selon l'invention est insoluble dans l'eau à température ambiante et à pH acide, inférieur à 7. Le chitosane est soluble dans ces conditions. L'insolubilité des glucans permet de les purifier. L'étape de floculation permet avantageusement de séparer les glucans par des moyens industriels et en un temps permettant une exploitation industrielle rentable.

Il a été découvert de manière surprenante dans la présente invention qu'un simple traitement avec une solution d'hydroxyde de sodium avant séchage ne permet pas une séparation du liquide satisfaisante. En particulier il a été découvert que le produit, obtenu par mise en contact de l'extrait insoluble obtenu selon l'étape (iii), n'est pas suffisamment résistant mécaniquement pour réaliser une séparation solide/liquide satisfaisante. Le produit se dénature et l'on ne peut pas récupérer un pourcentage satisfaisant de glucan dans l'extrait final. En réalisant l'étape de floculation selon la présente invention, on rend le produit plus résistant mécaniquement à une étape de séparation solide-liquide. On peut déshydrater au moins partiellement les glucans, éliminer l'eau plus facilement, et ainsi récupérer extrait final avec un contenu en cendres plus faible et donc un contenu en glucan plus élevé.

De préférence la solution alcaline utilisée à l'étape (iv) de floculation comprend ou est constituée de chaux, par exemple sous forme de lait de chaux à 30% ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) (hydroxyde de calcium), qui précipite en un solide facilement récupérable et qui résiste

aux contraintes mécaniques de conditionnement en permettant une récupération des glucans avec un degré de pureté *in fine* satisfaisant.

Selon une variante, la solution alcaline de l'étape (iv) de floculation comprend ou est constituée d'un mélange de d'hydroxyde de sodium (NaOH) et de lait de chaux (Ca(OH)₂). Lorsqu'on utilise un tel mélange hydroxyde de sodium/chaux (hydroxyde de calcium), on préfère un rapport massique hydroxyde de sodium/chaux (hydroxyde de calcium) de 1/2 à 1/10, et de préférence d'environ 1/2 à 1/6 (de préférence environ 1/3,5).

Cette étape est de préférence suivie ou contrôlée par pHmétrie. On préfère arrêter l'ajout de solution alcaline lorsque le pH devient supérieur à 9 et de préférence supérieur à 10.

La floculation du glucan est importante pour permettre une séparation facilement exploitable industriellement. Il est préféré d'utiliser un mélange hydroxyde de sodium /hydroxyde de calcium afin de limiter l'apport d'ions calcium dans les glucans pour éviter de générer des cendres en excès. La présence de chaux permet avantageusement de conférer une texture des glucans facilitant leur séparation dans un équipement industriel. Ceci permet en outre une diminution des temps de séparation ce qui est industriellement très intéressant.

Il est important de réaliser l'étape de floculation pour améliorer la productivité et la pureté des glucans résultants. Cette étape de floculation est également importante pour permettre un séchage du glucan (par l'intermédiaire d'un sécheur de type « flash dryer ») sous forme de poudre.

Généralement après l'étape de floculation le glucan se présente sous la forme d'une suspension alcaline (pH compris supérieur à 10).

Étape (iva) de purification supplémentaire des glucans

Le glucan obtenu à l'étape (iv) peut éventuellement/optionnellement être de nouveau purifiés avant l'étape de séchage, en vue d'adapter la pureté du glucan à l'utilisation envisagée, en particulier d'augmenter la pureté, par exemple en diminuant la teneur en cendres résiduelle dans le glucan. Cette étape supplémentaire comprend la mise en contact des glucans avec une solution pour solubiliser le chitosane puis éliminer le chitosane solubilisé par séparation.

Cette étape de purification supplémentaire est avantageuse si l'on souhaite augmenter la proportion en masse du glucan au-delà de 80% par rapport à la masse totale du produit final.

L'étape de purification supplémentaire comprend de préférence la mise en contact des glucans floculés avec une solution acide.

De préférence la solution acide considérée présente un pH compris supérieur à 5 et inférieur à 7, et encore de préférence entre 6 et 6,6. On utilise de préférence l'acide acétique pour préparer cette solution acide.

On peut réaliser une séparation au filtre-presse ou au décanteur, centrifugeuse à panier, décanteur à force centrifuge élevée (Sédicanteur®), ou filtre à bande.

On peut ensuite sécher le glucan obtenu conformément à l'étape (v).

Étape (v) de séchage du glucan

Cette étape est avantageusement réalisée en introduisant le glucan obtenu à l'étape précédente (étape (iv) ou (iva)) dans un dispositif de séchage pour éliminer les liquides résiduels.

Ces dispositifs sont connus de l'homme du métier.

Avantageusement, on peut utiliser un séchage du glucan (« flash dryer »), en vue d'obtenir une poudre fine de couleur beige à légèrement brune.

Ce séchage peut éventuellement être suivi d'une granulation. Le produit final est ensuite emballé.

Entre chaque étape décrite ci-dessus, c'est-à-dire entre les étapes (i) et (ii), (ii) et (iii), (iii) et (iv), et/ou (iv) et (v), il est possible de réaliser différents traitements. Ces traitements peuvent par exemple consister en un ou plusieurs lavages, purifications, concentrations, séparations, et/ou un ou plusieurs autres traitements destinés à améliorer le rendement et/ou la purification des produits obtenus selon le procédé de l'invention.

Selon une variante, le procédé de l'invention ne comprend pas d'étape d'oxydation du glucan.

Le procédé de la présente invention permet d'améliorer le rendement en chitosane, en transformant une quantité maximale de chitine en chitosan (« déacétylation ») tout en récupérant du glucan de manière satisfaisante, et de préférence afin de pouvoir les valoriser comme agent immunostimulant.

Selon un autre aspect, la présente invention concerne une méthode de co-préparation de chitosane et du glucan à partir d'*Aspergillus niger*, ladite méthode comprenant la préparation de glucan selon la méthode de préparation décrite précédemment, incluant toute variante et tout mode de réalisation particulier, éventuellement combinés entre eux, et la préparation de chitosane.

L'invention concerne notamment selon un autre aspect une méthode pour la production de chitosane et de glucans à partir de chitine d'origine d'*Aspergillus niger* comprenant les étapes subséquentes: (a) la mise en contact de chitine avec une solution basique pour déacétyler au moins partiellement la chitine et récupérer une fraction soluble

en milieu alcalin et une fraction insoluble en milieu alcalin, (b) la mise en contact de la fraction insoluble en milieu alcalin avec une solution acide, pour obtenir une fraction soluble de chitosane, plus ou moins acétylé, et une fraction insoluble comprenant des glucans, puis (c) le traitement ultérieur de chitosane pour le laver, le purifier, et éventuellement le sécher, ladite méthode comprenant également le traitement des glucans obtenus à l'étape (b) pour les laver, les purifier, et éventuellement les sécher.

Les différentes étapes (i) à (v), y compris leurs variantes s'appliquent à cet aspect également.

La fraction soluble en milieu alcalin obtenue après l'étape (a) est généralement écartée car elle contient différents sels, des protéines, et des glucans hydrolysés solubles.

Selon une variante, le chitosane soluble obtenu à l'étape (b) peut être mis en contact avec une enzyme du type chitine déacétylase pour obtenir le chitosane.

Le chitosane préparé peut-être de haute masse moléculaire. Le chitosane peut être également de masse moléculaire moyen faible ou moyen.

Par masse moléculaire moyen faible, on entend masse moléculaire moyenne inférieure à 100.000. Par haute masse moléculaire moyenne on entend un chitosane présentant une masse moléculaire moyenne supérieure à 100.000. De préférence le chitosane est de très faible masse moléculaire moyenne, c'est-à-dire inférieure à 50.000. De préférence le chitosane possède une masse moléculaire moyenne comprise entre 10.000 et 50.000. Les masses moléculaires moyennes sont déterminées par mesure avec un viscosimètre capillaire de type Ubbelohde ou par chromatographie d'exclusion stérique avec détection par diffusion de lumière (SEC-MALLS) ou par triple détection (par exemple avec le Viscotek Triple Detector Array max system). Il est possible d'hydrolyser le chitosane afin de diminuer sa masse moléculaire.

Avantageusement, le chitosane est obtenu en contrôlant le degré d'acétylation. Par les termes « chitosane ayant un degré d'acétylation contrôlé » on entend un produit dont le degré d'acétylation, c'est-à-dire la proportion des unités N-acétyl-glucosamine peut être ajustée de manière contrôlée.

Pour le traitement du chitosane, on peut se reporter notamment aux conditions décrites dans la demande WO03068824 de KitoZyme.

Il est également intéressant de souligner que, selon un mode de réalisation préféré, le procédé de l'invention d'extraction du glucan et du chitosane à partir du mycélium d'*Aspergillus niger* dure moins de 12 heures, et de préférence moins de 10 heures.

Beta-glucan

L'invention concerne selon un autre aspect le beta-glucan issu d'*Aspergillus niger* susceptible d'être obtenu par une méthode telle que définie selon l'invention, incluant toute variante et tout mode de réalisation particulier, éventuellement combinés entre eux.

Selon une variante, le glucan de l'invention est adapté à l'alimentation animale, notamment que sa composition est adaptée à l'alimentation animale. En particulier, le glucan présente une teneur en glucan supérieure à 50%, de préférence supérieure à 55%, et de préférence encore supérieure à 60%, notamment pour l'alimentation animale.

Selon une autre variante, le glucan de l'invention est adapté à une application chez l'homme, notamment pour son administration orale ou application sur la peau, et en particulier de qualité alimentaire, cosmétique et/ou pharmaceutique. De préférence, le glucan présente une pureté supérieure à 70%, de préférence supérieure à 75%, et de préférence encore supérieure à 80%, notamment pour des applications chez l'homme. Ces pourcentages sont exprimés en masse de glucan par rapport à la masse totale de produit humide. On entend par produit humide, le produit fini avec sa teneur en eau résiduelle, qui est selon une variante préférée de 4 à 10 %.

Il a été constaté après l'analyse du glucan obtenus qu'il présente en majorité des liaisons glycosidiques entre les unités glucose de type beta-(1,3). Il a été notamment constaté de manière très surprenante que le procédé de l'invention préserve la bioactivité du glucan obtenu, c'est-à-dire sa capacité à moduler le système immunitaire. Comme mentionné ci-dessus, la littérature montre que l'activité du beta(1,3)-glucan dépend fortement de sa structure (liaisons glycosidique, branchements, etc...), qui peut être affectée par les traitements qu'il subit. Contrairement à ce que l'on pouvait penser, malgré les conditions très hydrolysantes utilisées pour la déacétylation de la chitine en chitosane, le glucan obtenu selon le procédé de l'invention présente une activité de modulation du système immunitaire, comme démontré par administration orale chez le poisson *Pimephales promelas* dont on étudie les paramètres du système immunitaire inné.

De préférence le glucan obtenu présente une forte proportion de liaisons glycosidiques de type beta-(1-3), comme par exemple supérieure à 70% par rapport au nombre total de liaisons des glucans. Il est connu que plus la proportion de liaisons de type beta-(1-3) est importante, meilleure seront les propriétés immunostimulantes.

Ce glucan est obtenu avantageusement sans l'utilisation d'une enzyme du type beta-glucanase.

De préférence le glucan de l'invention comprend moins de 15% en masse de chitosane par rapport à la masse totale de produit humide. De tels glucans sont satisfaisants pour l'administration orale chez l'animal. Selon un mode de réalisation, le

glucan comprend moins de 10% en masse de chitosane par rapport à la masse de produit humide. Ces glucans sont adaptés à l'administration chez l'homme, orale ou sur la peau.

On peut analyser le pourcentage en masse de chitosane présent dans le glucan selon la méthode d'extraction du chitosane par précipitation/lavage/pesée.

5 De préférence, le glucan de l'invention comprend moins de 10% de cendres. Il est également possible d'obtenir 5% de cendres, et éventuellement moins de 3% de cendres par rapport à la masse de produit humide.

De préférence, le glucan de l'invention comprend moins de 5% de lipides, et moins de 1% de protéines par rapport à la masse humide humide.

10 De préférence, le glucan de l'invention ne comprend pas de chitine détectable. On peut chercher à détecter la présence de chitine par la méthode de dosage des sucres après hydrolyse et dérivatisation (« derivatization » en anglais), telle que décrite dans les exemples.

15 Propriétés immunomodulantes

L'invention concerne encore le beta-glucan issu d'*Aspergillus niger* pour la modulation du système immunitaire d'un être humain ou d'un animal.

Un animal auquel peut être administré le-glucan de l'invention est typiquement choisi parmi les animaux de rente, les animaux de course (chevaux, chiens), les animaux
20 de compagnie, et les poissons d'aquaculture.

Selon une variante, le-glucan est destiné à l'amélioration des fonctions du système immunitaire, par exemple les neutrophiles en ce qui concerne l'administration orale, et les cellules de Langerhans en ce qui concerne l'application sur la peau.

25 Selon une autre variante, le glucan est destiné à augmenter la capacité de dégranulation et l'activité des neutrophiles.

L'invention couvre encore une composition de complément alimentaire pour l'être humain ou l'animal, comprenant du glucan issu d'*Aspergillus niger* tel que défini précédemment incluant toute variante et tout mode de réalisation particulier, éventuellement combinés entre eux.

30 La présente invention couvre également une nourriture solide pour poissons, caractérisée en ce qu'elle comprend du glucan issu d'*Aspergillus niger* tel que défini précédemment. Typiquement, une telle nourriture comprend une substance apportant de l'amidon, une substance apportant des protéines, une substance apportant des lipides, éventuellement un mélange d'antibiotiques, et éventuellement un mélange de minéraux et
35 de vitamines, éventuellement des substances antioxydantes, éventuellement des enzymes digestives, éventuellement des microorganismes à activité probiotique,

éventuellement des fibres à activité prébiotique. Les substances apportant de l'amidon sont généralement dérivées de céréales comme par exemple de soja, maïs, blé, avoine, ou orge. Les substances apportant des protéines sont par exemple une farine de poisson, un tourteau de soja, ou un lactosérum déshydraté, des protéines de soja, une farine de soja, une farine de sang, des protéines plasmatiques, un lait écrémé déshydraté, un concentré de protéines de lactosérum, une farine de colza, une farine de gluten de maïs, une farine de gluten de blé, des levures, une farine de tournesol. Les substances apportant des lipides sont généralement choisies parmi l'huile de soja, la lécithine, l'huile de coco, des lipides de lactosérum, l'huile de lard, ou le suif de mouton.

La présente invention couvre encore une composition pharmaceutique comprenant du glucan issu d'*Aspergillus niger* tel que défini précédemment.

L'invention couvre aussi une composition pharmaceutique comprenant du glucan issu d'*Aspergillus Niger* tel que défini précédemment.

L'invention couvre aussi une composition cosmétique comprenant du glucan issu d'*Aspergillus niger* tel que défini précédemment.

Selon un autre aspect, l'invention concerne l'utilisation de glucans pour des applications dans le domaine médical, pharmaceutique, nutraceutique, cosmétique, l'agriculture, l'agroalimentaire, textile, et/ou environnementale.

Utilisation générale du chitosane et du glucan - Formulations

Le chitosane obtenu selon le procédé de l'invention peut être utilisé dans différentes applications, et typiquement comme celles décrites dans la demande WO03068824 de KitoZyme.

Le chitosane et le glucan obtenus selon le procédé de l'invention peuvent être utilisés sous forme de micro-, milli- ou nano-particules, qui peuvent être préparées par des techniques connues de l'homme du métier (par exemple : Polymeric Biomaterials, S Dimitriu ED, Marcel Dekker, 2002, Chap. 1).

Le glucan de la présente invention est essentiellement insoluble directement dans tout solvant à 25°C à la pression atmosphérique. Le glucan peut être préparé sous forme de poudre ou fibres lyophilisées.

Le glucan de l'invention peut être mélangé avec une ou plusieurs substances actives, et un ou plusieurs excipients. Ainsi l'invention couvre également une formulation comprenant le glucan de l'invention.

Le glucan de l'invention peut être préparé sous forme de gélules, comprimés, poudre, gel, film, émulsion, ou suspension. Le glucan peut être également inclus dans des systèmes de délivrance, comme des vecteurs par exemple pour être délivré au niveau de

l'intestin grêle. Le glucan peut être inclus dans des matrices alimentaires comme par exemple des barres, des boissons, des produits de boulangerie, ou des produits laitiers.

Selon une variante, le glucan de l'invention peut être formulé dans une composition applicable par voie topique. Il peut s'agir en particulier de compositions cosmétiques ou pharmaceutiques applicables par voie topique (appliquée sur une matière kératinique, par exemple la peau). De telles compositions peuvent comprendre des ingrédients cosmétiquement ou pharmaceutiquement actifs (principes actifs) et/ou des excipients acceptables topiquement, connus de l'homme du métier du domaine des cosmétiques ou de la pharmacie. Des exemples particuliers de formulations selon l'invention comprenant le glucan sont les émulsions huile-dans-eau et eau-dans-huile. L'invention couvre les rouges à lèvres et les baumes à lèvres contenant le glucan.

Pour une meilleure formulation dans des compositions applicables sur la peau et permettre un ressenti agréable d'une composition homogène et sans particules solides détectables à l'œil nu ou par la peau, le glucan selon la présente invention est de préférence micronisé, c'est-à-dire subi une réduction de la taille des particules de glucan ou contenant le glucan à une dimension inférieure au millimètre et de préférence inférieure à 500 microns (μm). Il est avantageux que le diamètre de 70%, et de préférence de 90%, des particules soit inférieur à 350 microns ($d(0.7) < 355 \mu\text{m}$, de préférence $d(0.9) < 355 \mu\text{m}$), de préférence inférieur à 100 microns, en particulier pour des formulations du type émulsions huile-dans-eau et eau-dans-huile, et de préférence inférieur à 50 microns pour des rouges à lèvres et baume à lèvres. La granulométrie est celle obtenue par diffractométrie au laser.

Selon une variante, le glucan peut être utilisé après tamisage.

Par exemple, une composition alimentaire pour poisson est formulée sous forme d'un gel comprenant un pré-mélange de poudre avec 50% de protéines et de vitamine C mélangée avec de l'eau chaude (90°C) dans un rapport 1:1, auquel on ajoute les composés de l'invention par exemple à une concentration de 0,1 à 5 g/kg de nourriture. Le gel formé après mélange est typiquement granulé (0,1-1 mm) juste avant utilisation pour nourrir les poissons.

Sur les figures :

- La figure 1 représente un diagramme schématique d'une variante du procédé de l'invention comprenant les étapes (i) à (v) ;
- la figure 2 représente un diagramme schématique d'une autre variante du procédé de l'invention comprenant les étapes (i) à (v), et une purification supplémentaire des glucans selon l'étape (iva);

14

- la figure 3 représente un histogramme de dégranulation des granules primaires de neutrophiles après supplémentation des poissons avec les beta-glucans L11 (5g/kg de nourriture), L15 (4g/kg) et les beta-glucans issus de levure (glucan = L04, 5g/kg) pendant 8 jours, sans appliquer de stress aux poissons ;
- 5 - la figure 4 représente un histogramme de l'indice de burst oxydatif après supplémentation des poissons avec les beta-glucans L11 (5g/kg de nourriture), L15 (4g/kg) et les beta-glucans issus de levure (glucan = L04, 5g/kg) pendant 8 jours, avec un stress appliqué aux poissons après le jour 7 ;
- la figure 5 représente l'évolution du marqueur CD54 dans une population de monocytes en fonction de la concentration de beta-glucan dans le milieu ;
- 10 - la figure 6 représente l'évolution du marqueur CD54 dans une population de cellules dendritiques plasmacytoïdes en fonction de la concentration de beta-glucan dans le milieu ;
- la figure 7 représente la production d'Interleukin 6 (IL-6) en fonction de la concentration de beta-glucan ;
- 15 - la figure 8 représente la production de Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α) en fonction de la concentration de beta-glucan ;
- la figure 9 représente la production de Macrophage Inflammatory protein 1 alpha (MIP-1 α) en fonction de la concentration de beta-glucan.

20

D'autres buts, caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront clairement à l'homme de l'art suite à la lecture de la description explicative qui fait référence à des exemples qui sont donnés seulement à titre d'illustration et qui ne sauraient en aucune façon limiter la portée de l'invention.

25

Les exemples font partie intégrante de la présente invention et toute caractéristique apparaissant nouvelle par rapport à un état de la technique antérieure quelconque à partir de la description prise dans son ensemble, incluant les exemples, fait partie intégrante de l'invention dans sa fonction et dans sa généralité.

Ainsi, chaque exemple a une portée générale.

30

D'autre part, dans les exemples, tous les pourcentages sont donnés en poids, sauf indication contraire, et la température est exprimée en degré Celsius sauf indication contraire, et la pression est la pression atmosphérique, sauf indication contraire.

35

EXEMPLES

Méthodes analytiques

5 Dosage du contenu en beta-glucan

La teneur en beta-glucan est déterminée en utilisant une méthode enzymatique, selon une méthode adaptée de la méthode du kit de Megazyme (référence K-EBHLG). La validation de la méthode réalisée à l'aide du logiciel E-noval (Arlenda) a calculé une incertitude de $\pm 3\%$ sur la valeur et une limite d'acceptance de $\pm 10\%$.

10 1- Une quantité de 20mg ± 0.1 mg de poudre de beta-glucan est suspendue dans un volume de 0.4 ml de solution d'hydroxyde de potassium 2N sous agitation pendant 30 minutes dans un bain glacé.

2- Le pH de la suspension est ensuite ajusté à 4.0 à 4.5 par ajout d'une solution d'acétate de sodium de concentration 1.2M à pH 7.

15 3- Le mélange est incubé avec un mélange d'enzymes exo-1,3- β -glucanase, endo-1,3- β -glucanase, β -glucosidase et chitinase en suspension (Megazyme) pendant 16 heures à 40 °C.

20 4- Après dilution et centrifugation, un aliquote est recueilli pour déterminer la teneur en glucose avec le réactif GOPOD (composé de glucose oxidase plus peroxidase and 4-aminoantipyrine dilué dans un tampon composé d'acide p-hydroxybenzoïque et d'azide de sodium).

Une calibration externe est établie avec une solution de glucans issus de levures, Megazyme) de concentration 0, 5, 10, 15, 20 et 25mg dans un volume V de solution d'hydroxyde de sodium 2N et ayant subi les étapes 1 à 4 ci-dessus.

25 Le contenu en beta-glucan est déterminé par la mesure de l'absorbance par spectrométrie UV, par comparaison avec la courbe de calibration.

Le contenu en beta-glucan est exprimé en g de beta-glucan pour 100g de beta-glucan humide.

30 Dosage du contenu en eau

La perte à la dessiccation est déterminée en utilisant une méthode thermogravimétrique basée sur la méthode de la Pharmacopée Européenne 2.2.32 (« Perte à la dessiccation »), avec une précision de $\pm 0.15\%$ de la valeur. La modification par rapport à la méthode de la Pharmacopée porte dans le choix de l'équipement
35 (analyseur d'humidité au lieu d'une étuve), sans que cela n'ait un impact significatif sur la valeur et l'obtention des résultats.

En bref, une quantité connue de poudre de beta-glucan est chauffée à 105°C, et la perte de masse est mesurée en continu en utilisant un analyseur d'humidité calibré (Ohaus MB 45) jusqu'à atteindre une valeur inférieure à 1mg par 90 secondes. Lorsque
5 cette valeur est atteinte, le poids de la perte à la dessiccation est calculé en soustrayant la valeur de la matière sèche de la masse totale.

Le contenu en eau est exprimé en g d'eau pour 100g de beta-glucan humide.

Dosage du contenu en cendres

10 La méthode d'analyse du contenu en cendres est basée sur celle de la Pharmacopée Européenne 2.4.16. Un creuset de porcelaine est pesé. Une quantité connue de beta-glucan est placée dans le creuset de porcelaine et chauffé pendant 10h à 600 °C dans un four à moufle calibré (Carbolite, 201). Après combustion, le creuset en porcelaine contenant le beta-glucan de l'échantillon est pesé. Le contenu en cendres est
15 exprimé en g d'eau pour 100g de produit humide. Le contenu en cendres est exprimé en g de cendres pour 100g de produit humide.

Dosage du contenu en protéines

Le contenu en protéines est déterminé selon une méthode basée sur l'hydrolyse
20 totale des protéines et dosage spectrophotométrique, selon les étapes :

1- 1g de poudre de beta-glucan est mise en suspension dans un volume de 10ml de solution d'hydroxyde de sodium concentrée (10N) préparée à partir d'hydroxyde de sodium R (Pharmacopée Européenne), à 130°C pendant 90 minutes.

2- La solution de beta-glucan ainsi hydrolysé est alors neutralisée à pH 6.9-7.1 et le
25 volume total ajusté à 50ml.

3- 100µl de cette solution sont prélevés et 1ml de tampon acétate 0,5 M à pH 5,1 sont ajoutés.

4- 1ml de solution ninhydrine/hydrindantine (500 mg de ninhydrine et 150 mg de hydrindantine dans 100ml d'éther monoéthylique de l'éthylèneglycol) est ensuite
30 ajouté à la solution préparée lors de l'étape 3 (1,1 ml) pour former un complexe absorbant à la longueur d'onde 570nm.

5- L'absorbance de cette solution est mesurée par spectrophotométrie avec un spectrophotomètre calibré selon la Pharmacopée Européenne 2.2.25
35 (« Spectrophotométrie d'absorption, l'ultraviolet et visible »).

Une courbe de calibration externe est établie avec une solution d'albumine sérique bovine (BSA, BioChemika, fraction V, lot n ° S41084, Fluka) aux concentrations 0, 2, 4, 6 et 8mg ayant subi les mêmes étapes 1 à 5 que le beta glucan.

Le contenu en protéines est exprimé en g d'eau pour 100g de produit humide.

- 5 La validation de la méthode est réalisée à l'aide du logiciel E-novalet donne une incertitude sur la méthode de $\pm 10\%$ de la valeur et une limite d'acceptance de $\pm 25\%$.

Dosage du contenu en lipides

- 10 La détermination de la quantité de lipides est basé sur la réglementation (CE) N°152/2009 du 27-01-2009. L'incertitude sur la valeur est de $\pm 0.7\%$. Le contenu en lipides est exprimé en g d'eau pour 100g de produit humide.

Caractérisation des proportions en unité de répétition de type sucre

- 15 La composition des sucres est réalisée par chromatographie gazeuse des sucres après solubilisation par hydrolyse totale du beta-glucan et dérivatisation des sucres selon les méthodes décrites dans *Merkle and Poppe (1994) Methods Enzymol. 230 : 1-15 et York, et al. (1985) Methods Enzymol. 118 :3-40*.

- 1- 0.3mg de poudre de beta-glucan sont méthanolysés avec de l'acide chlorydrique 1M dans du méthanol à 80°C pendant 16 heures.
- 20 2- Les échantillons sont ensuite traités par traitement avec du Tri-Sil (Pierce) à 80°C pendant 30 minutes.

Les dérivés résultants (per-O-trimethylsilyl-TMS) sont analysés par chromatographie gazeuse par comparaison avec une courbe de calibration externe faite avec un standard pour chaque sucre.

- 25 La teneur en sucres est exprimée en g de sucre pour 100g de beta-glucan humide ayant été solubilisé par hydrolyse.

Caractérisation des enchaînements entre les unités de répétition

- 30 L'analyse des enchaînements glycosidiques entre les unités glucose a été réalisé selon la méthode décrite par York et al (1985)- *Methods Enzymol. 118 :3-40*.

- 1- 3mg de poudre de beta-glucan sont solubilisés dans le diméthylsulfoxyde
- 2- Les échantillons sont ensuite partiellement méthylés selon la méthode décrite par Ciukan and Kerek (1984) dans *Carbohydr. Res. 131 :209-217*, avec du butyl-lithium et iodure de méthyle : les échantillons sont soumis à un traitement
- 35 avec de l'hydroxyde de sodium pendant 15 minutes suivi d'un traitement à l'iodure de méthyle pendant 45 minutes (ce procédé est réalisé deux fois).

18

3- Le complexe est alors hydrolysé dans par réaction avec de l'acide trifluoroacétique 2M (2 heures à 121 °C)

4- Le complexe est ensuite acétylé en utilisant un mélange acide trifluoroacétique/anhydride acétique

5- La concentration en complexe est déterminée par chromatographie gazeuse avec détection par spectrométrie de masse, par comparaison avec une courbe de calibration externe faite avec un standard pour chaque sucre.

Les enchaînements glycosidiques entre les unités glucose sont exprimés en g pour 100g de chaque sucre individuel humide identifié (dans ce cas, le glucose).

10

Exemple 1 : préparation du mycélium d'*Aspergillus niger*

Le mycélium d'*Aspergillus niger* est un sous-produit de la fermentation d'acide citrique.

15

Après l'étape de fermentation, le mycélium est passé sur un filtre à bande pressante afin d'être pressé et lavé. Le mycélium en sortie de filtre à bande pressante possède un pourcentage en matière sèche de 18% en masse. Le mycélium est ensuite séché dans un sécheur rotatif (de type « rotary dryer ») et puis dans un sécheur pneumatique (de type « flash dryer ») .

20

Composition du mycélium

Le mycélium d'*Aspergillus niger* est conforme aux spécifications du Tableau 1.

25

Tableau 1

Analyse	Spécification
Eau (%)	≤10%
Cendres (% masse humide)	≤2%
Protéines (%masse humide)	≤10%
Lipides (%masse humide)	≤1%

Le type de mycélium d'*A. niger* peut avoir une influence sur la pureté du chitosane. L'exemple présenté ci-dessous montre la différence de rendement et de pureté entre deux mycélium, l'un non lavé après récolte de l'acide citrique (de couleur noire), l'autre pressé/lavé après récolte de l'acide citrique (de couleur beige).

30

Tableau 2

	Mycélium non lavé	Mycélium pressé/lavé
Rendement de la réaction (%m/m mycélium sec)	4.4%	9.6%
Composition et caractéristiques du chitosane		
Cendres (%m/m humide humide)	2.8%	0.5%
Protéines (%m/m chitosane humide)	NE	0.3%
Glucan (%m/m)	5.4%	13.7%
Degré d'acétylation (mol%)	21.7%	24.0%
Viscosité apparente en solution à 1% (v/m) (mPa.s)	3.7	5.4
Turbidité d'une solution à 1% (v/m) (NTU)	491NTU	27NTU
Coloration d'une solution à 1% (v/m)	Brun clair	Beige clair

5 En comparant les chitosanes, on remarque que l'on obtient un rendement plus élevé au départ du mycélium pressé/lavé. Au niveau de la pureté, la coloration du chitosane obtenu à partir du mycélium non lavé est également plus foncée. La turbidité d'une solution de chitosane à 1% (v/m) dans l'acide acétique 1% est aussi plus élevée que celle d'une solution de chitosane obtenu à partir du mycélium pressé/lavé. La teneur

10 en glucan lorsque l'on utilise le mycélium pressé/lavé peut être diminuée en dessous de 10% en masse par rapport à la masse totale de chitosane.

Exemple 2 : Co-préparation industrielle de chitosane et de glucans

Des premiers tests ont été réalisés au laboratoire.

Les conditions de la réaction de déacétylation de la chitine contenue dans le mycélium suivantes ont été testées :

5

Tableau 3

Référence	A	B	C
Température	110 °C	110 °C	110 °C
Ajout d'une solution de NaOH de concentration 50%	30 ml	37.5 ml	30ml
Durée de la réaction	3hr	3hr	7hr
Masse de mycélium	30g sec	30g sec	30g sec

Selon ces conditions, on peut obtenir les caractéristiques du chitosane et du glucan suivantes :

Tableau 4

Référence	A	B	C
Masse de chitosane récupérée (g)	2.35g sec	1.95g sec	3g sec
Rendement (%)	7.8%	6.5%	10.0%
Glucan (% m/m)	17.7%	26.3%	12.0%
Degré d'acétylation (mol%)	32.7%	38.9%	/
Viscosité apparente (mPa.s)	4.7	4.35	/
Rendement en glucan	ND	ND	6.54g

On remarque que les conditions de déacétylation ont un impact sur les rendements en chitosane et en glucan.

Les résultats montrent qu'il est préférable de réaliser des conditions de réaction de déacétylation plus poussées en termes de température et de durée pour augmenter le rendement en chitosane.

Les conditions qui donnent les meilleurs rendements en chitosane sont dès lors appliquée à l'échelle industrielle dans les exemples qui suivent sont : 6 heures de déacétylation, suivi d'une montée en température jusqu'à 110°C qui dure 2 heures, suivi d'un maintien de cette température pendant 6 heures, suivi d'un transfert du mélange réactionnel pendant 1 heure.

La pureté du chitosane obtenu est en adéquation avec applications visées. De plus, ces conditions permettent de préserver une grande partie du glucan insoluble et donc de pouvoir les récupérer.

Pour un procédé industriel on peut utiliser un mélangeur conique (de type « Conical Mixer ») qui est par exemple pour l'invention un réacteur conique de 4 m³ équipé d'une double enveloppe permettant de chauffer le milieu réactionnel jusqu'à 120°C. L'agitation du mélange est assurée par une vis sans fin montée sur un bras orbital qui parcourt la périphérie du réacteur à raison d'environ 2 tours/min.

Séparation glucan/chitosane Équipement industriel

Une fois la déacétylation effectuée il est procédé à des lavages à l'eau afin d'éliminer la soude. Après ces étapes de lavages, la suspension est mise à pH 4 par ajout d'acide acétique concentré. Le chitosane est soluble et le glucan est insoluble.

Pour séparer les deux fractions, il a été testé différents équipements industriels. De préférence on utilise une centrifugeuse à buse, et en particulier une centrifugeuse à assiettes de type séparateur à buses vortex haute performance (« BTUX »). L'homme du métier optimise les réglages de cet équipement pour séparer le plus efficacement le chitosane du glucan, notamment en tenant compte du rendement en chitosane et en glucan, et de leurs puretés respectives..

Les réglages de la centrifugeuse à buse « BTUX » sont réalisés afin de concentrer suffisamment le glucan pour qu'une partie minimale de chitosane se retrouve dans la fraction insoluble comprenant le glucan (Tableau 5).

Tableau 5

Vitesse de la pompe d'alimentation « BTUX » en % par rapport à vitesse maximale qui est de 12m ³ /h	15%	20%	25%	30%
Fraction insoluble dans le filtrat après centrifugation (%v/v)	0.5%	15%	25%	30%
Teneur en fraction soluble dans la fraction insoluble après centrifugation (%v/v)	25%	<5%	<5%	<5%

La mesure des proportions se fait après centrifugation par détermination des volumes dans un tube à essai.

5 Le pourcentage d'insolubles dans les filtrats correspond à la quantité de glucans qu'il reste encore dans la solution de chitosane.

Dans cet exemple, le meilleur réglage de la « BTUX » est celui où la pompe fonctionne à une vitesse de 20% de la vitesse maximale, comme indiqué par la concentration de glucan élevée (<95%) qui révèle une perte limitée en chitosane. La dernière fraction de glucan présent dans la solution de chitosane (15%) est séparée par passage dans un équipement de type « Sédicanteur ». La vitesse de la pompe est réglée en fonction de la quantité d'insoluble présente dans la fraction soluble (chitosane) et de la concentration de fraction insoluble (glucan). Il est visé une proportion d'insoluble dans les filtrats comprise entre 8 et 12%. Ce réglage permet d'avoir une faible teneur en fraction soluble dans la fraction insoluble faible (<5%).

15 Pour un procédé industriel, on peut également utiliser une centrifugeuse à buses. La centrifugeuse à buses est un équipement de séparation solide/liquide. La suspension solide/liquide est séparée grâce à la rotation à haute vitesse (HFA 8000 rpm / BTUX 7000 rpm) d'un bol qui permet de séparer les particules solides fines de la phase liquide et de les concentrer via des buses. Cette séparation à haute vitesse est accentuée grâce à une surface de filtration élevée (assiettes).

Afin d'augmenter le rendement en glucan, on fait ensuite passer la fraction soluble contenant le chitosane et le glucan éventuellement résiduel dans un décanteur à séparation par force centrifuge élevée, comme un appareillage du type « Sédicanteur ».

25 Le Sédicanteur/décanteur est un équipement de séparation solide/liquide. La suspension solide/liquide est séparée grâce à la rotation à haute vitesse (Sédicanteur 4800 rpm / Décanteur 3500 rpm) d'un bol qui permet de séparer les particules solides fines de la phase liquide et de les évacuer à l'aide d'une vis sans fin placée à l'intérieur de ce bol.

23

Les réglages sont donc effectués afin d'optimiser la récupération du glucan sans affecter significativement la fraction soluble comprenant le chitosane d'un point de vue de la pureté et du rendement.

5 **Exemple 3 : Récupération du glucan**

Objectif : Les conditions de ce traitement permettent de pouvoir récupérer la totalité des glucans en sortie de la « BTUX » et du « Sédicanteur ». Une productivité élevée avec une pureté acceptable (teneur en glucan >60%) sont visées.

10

Le choix du mode de précipitation a un impact très important sur la productivité de la ligne de production et sur la pureté du glucan. En effet, une précipitation à l'hydroxyde de sodium uniquement ne permet pas une séparation aisée dans le filtre-presse.

15

Pour favoriser la séparation, la précipitation l'aide de lait de chaux a été testé. Ce type d'additif permet d'obtenir des floccs (par floculation). Ce type de texture du précipité permet une séparation plus facile dans un équipement industriel et une diminution avantageuse du temps de séparation.

20

De préférence, il est utilisé le mélange hydroxyde de sodium/chaux pour réaliser la floculation du glucan à un pH d'environ 10.

25

La proportion entre soude et chaux du mélange récupéré a été est variée à l'échelle laboratoire, afin de vérifier comment limiter l'apport en calcium dans glucan final (Tableau 6).

30

35

Tableau 6

Type additif	NaOH	CaO	Mélange NaOH/CaO		
			N°1	N°2	N°3
Volume additif ajouté par kg de glucans sortie BTUX	11ml/kg	28mL/kg	4ml soude 30% 14ml lait de chaux 30%	7mL soude 30% 18ml lait de chaux 30%	11mL soude 30% 36ml lait de chaux
Siccité (%)	13	20	22	16.4	14.6
pH final de la fraction glucan après précipitation	>10	>10	>10	>10	>10
Cendres (%m/m humide)	>15%	>15%	<10%	>10%	>10%

La siccité correspond au pourcentage en masse de matière sèche par rapport à la masse totale du gâteau récupéré après concentration, typiquement avec un filtre presse.

5 A l'échelle laboratoire, les conditions de l'essai N°1 sont les meilleures : 1.6g de NaOH et 4.2g de CaO (rapport massique de 1 / 2,5 environ).

Le produit résultant présente une teneur inférieure à 10% de cendres, ce qui est adapté à la nutrition animale.

10 Il est important d'éliminer la phase aqueuse de manière suffisante avant passage dans le sécheur pneumatique (« flash dryer ») pour obtenir une pureté en glucan importante. .

Les glucans sont ensuite concentrés dans un filtre-presse, ou décanteur, ou filtre à bande, ou centrifugeuse à panier afin de pouvoir procéder à leur séchage.

15 Industriellement, on préfère réaliser la concentration en utilisant un filtre-presse :

20 Le filtre-presse est un équipement de séparation solide/liquide. Il permet de séparer, sous pression, une suspension par filtration frontale des particules solides au travers d'un média filtrant (toiles synthétiques) maintenu entre 2 plateaux rigides. L'espace 2 plateaux rigides permet de récolter la partie solide déshydratée grâce à la pression interne du filtre. La partie clarifiée liquide est récupérée via un tube transversal récoltant le filtrat de chaque média filtrant.

25

Le séchage de la solution concentrée est réalisé par un sécheur pneumatique (« flash dryer »).

Le « flash dryer » est un équipement de séchage qui permet de récupérer une poudre fine au départ d'un produit humide et compact. Le produit humide est alimenté via une vis sans fin dans la chambre de séchage. Dans cette chambre de séchage, un flux d'air chaud entraîne et sèche les particules solides et les emporte au travers d'un classificateur. La vitesse de rotation du classificateur permet de contrôler la taille des particules sèches, si elles sont trop grandes, elles retombent dans la chambre de séchage équipée d'un broyeur, se font broyées et remportées par le flux d'air. Une fois le classificateur passé, le flux d'air et les particules sont séparées dans un cyclone. La poudre fine est récupérée sous le cyclone et l'air est filtré au travers d'un filtre à manches pour être rejeté à l'extérieur.

Exemple 4 : Production industrielle de beta-glucan adapté à l'alimentation animale

Dans cet exemple, 2.77m³ de glucan ont été traités après séparation dans la centrifugeuse à buse (type BTUX). Cette solution de glucan avec un pH compris entre 3.5 et 4.8 (acide acétique) est traitée par ajout de soude et de chaux de façon à atteindre un pH supérieur à 10 (rapport massique soude/chaux de 1/5,6 (12l de soude à 30% et 90l de chaux à 30%, soit 4,8 et 27kg respectivement). La soude est ajoutée pour permettre l'obtention d'un pH supérieur à 4.8, puis la chaux est ajoutée afin d'obtenir un précipité sous forme de floccs (pH 10).

Le glucan ainsi précipité a été concentré par un filtre presse afin d'éliminer l'eau et d'obtenir le glucan sous forme solide à environ 20% de matière sèche. Après cette étape de concentration, on alimente le sécheur (« flash dryer »), afin de récupérer 155kg d'une poudre de glucan de référence L15.

Les caractéristiques du glucan ainsi produit sont décrites au Tableau 7.

Tableau 7

	L11
Glucan (% m/m humide)	60
Eau (% m/m humide)	5
Cendres (% m/m humide)	9
Protéines (% m/m humide)	0,15
Lipides (% m/m humide)	3,8

Exemple 5 : Purification supplémentaire du glucan à l'échelle industrielle

Le glucan est remis en suspension dans l'eau après avoir été précipité et concentré. Le pH est ajusté entre 6 et 7 par ajout d'acide acétique afin de solubiliser le chitosane encore présent. La suspension est envoyée pour séparation, par exemple dans un filtre-presse.

Dans cet exemple, 4m³ de glucans ont été traités après séparation dans la centrifugeuse à buse (type BTUX). Cette solution de glucans avec un pH compris entre 3,5 et 4,8 (acide acétique) a été traitée par ajout de soude et de chaux de façon à atteindre un pH supérieur à 10 (15l de NaOH 30% et 70l de lait de chaux). Le glucan ainsi précipité a été injecté dans un filtre-presse afin d'être concentré. Le glucan a été remis en suspension dans une cuve avec 10m³ d'eau osmosée. Le pH de la suspension a été ajusté à 6,4 avec un volume de 17l d'acide acétique 80%.

La suspension a été réinjectée dans un filtre-presse afin d'être concentrée. Le glucan concentré a été séché au « flash dryer ». Il a été récupéré 150kg de glucan de référence L37.

Les caractéristiques du glucan ainsi produit sont décrites au Tableau 8.

Tableau 8

	L37
Glucan (% m/m humide)	90
Eau (% m/m humide)	3.12
Cendres (% m/m humide)	1.5
Proteines (% m/m humide)	0.21
Lipides (% m/m humide)	4.1

Exemple 6 : Préparation et caractéristiques des lots de glucan utilisés pour l'étude *in vivo* des propriétés immunomodulantes

Les glucans utilisés pour les études sont décrits au Tableau 9. Le glucan d'origine *A. niger* de référence L11 est celui de l'exemple 4. Le glucan issu de levure de référence « glucan » est un produit commercial destiné à l'alimentation animale.

Le glucan d'origine *A. niger* de référence L15 est préparé de la manière suivante, à l'échelle industrielle :

3m³ de fraction insoluble à la sortie de la BTUX (étape iii) sont récoltés. La solution de glucan a été traitée par ajout de 50l d'hydroxyde de sodium 30% de façon à atteindre un pH supérieur à 11. Les glucans traités ont été injectés dans le filtre presse afin d'être concentrés (élimination de l'eau).

Afin d'abaisser la teneur en cendres (hydroxyde de sodium), 3m³ d'eau osmosée ont été injectée dans le filtre presse. Les glucans sous forme solides ont ensuite été séchés au flash dryer, et 70kg de poudre de glucan de référence L15 sont récoltés.

Tableau 9

	A.niger beta-glucan L11	A.niger beta-glucan L15	Yeast beta-glucan « glucan »
Glucan (% m/m humide)	64.7	70	61
Cendres (%m/m humide)	9.2	6.4	3.2
Lipides (%m/m humide)	3.8	ND	ND
Protéines (%m/m humide)	0.15	0.2	ND

Exemple 7 - Etude *in vivo* de l'effet du beta-glucan issu d'*A.niger* sur les fonctions du système immunitaire inné de poissons adultes *Pimephales promelas* en l'absence de stress et placés sous stress.

Le poisson *Pimephales promelas* est couramment utilisé comme modèle pour des études toxicologiques et immunologiques (Russom et al. In : *Environmental Toxicol Chem* 16 :948 (1997). Son système immunitaire cellulaire inné est représentatif du système immunitaire inné de nombreuses espèces animales et de l'homme.

Deux beta-glucans issus d'*A.niger* et produits comme décrit aux exemples 4 et 6 (références L11 et L15) sont incorporés dans une nourriture pour poisson en poudre, comme décrit par Palic et al in : *Developmental Comparative Immunol 30:817 (2006)*, aux doses de 5g/kg et 4g/kg respectivement. Le beta-glucan issu de levure (« glucan ») est incorporé à la nourriture pour poissons à la dose de 5g/kg.

Des poissons adultes *Pimephales promelas* sont divisés en plusieurs cuves selon la nourriture qu'ils reçoivent : contrôle (nourriture seule) ou nourriture supplémentée avec un des deux beta-glucans, issus de *A.niger* (références L11 et L15) et un beta-glucan issu de levure (référence « glucan »), ou avec le myristate acetate phorbol (PMA, contrôle positif).

Les poissons sont nourris tous les jours. Pour la moitié des poissons de chaque cuve, un stress est ensuite appliqué 7 jours après le début de l'étude, selon une méthode qui mime une manipulation des poissons et leur surnombre, telle que décrite par Palic et al. in : *Aquaculture 254:675 (2006)*. En effet, le stress provoque une perte d'efficacité des défenses immunitaires innées, en particulier des fonctions des neutrophiles comme par exemple le « burst oxydatif » (émission massive de forme active de l'oxygène) après stimulation par le PMA et la dégranulation des granules primaires. Le test a pour objectif de vérifier que la supplémentation des poissons avec les beta-glucans issus d'*A.niger* permet de stimuler l'activité des neutrophiles d'une part, et que la pré-supplémentation avec les beta-glucans issus d'*A.niger* permet d'éviter la diminution des défenses immunitaires liée à un stress d'autre part.

Le marqueur de l'activité des neutrophiles est l'effet sur la dégranulation des granules primaires des neutrophiles, qui est déterminé par la libération de la myeloperoxydase (MPO) par les granules primaires des neutrophiles qui ont été isolés au départ des reins des poissons et stimulé par le calcium ionophore, selon la méthode décrite par Palic et al. in : *Developmental Comparative Immunol 30:817 (2006)*. La supplémentation des poissons avec les 3 types de beta-glucan (L11 à 5%, L15 à 4% et L4 à 5%) est d'abord étudiée pendant une durée de 21 jours en conditions normales, sans stress : elle entraîne une augmentation de la dégranulation par rapport au contrôle (Figure 3). Les effets des 2 glucans issus d'*A.niger* (L11 et L15) sont comparables à ceux du glucan issu de levure (« glucan »).

Ensuite, l'effet de la supplémentation des poissons par les 3 types de beta-glucan sur la réaction au stress appliqué au septième jour est étudiée : elle entraîne une augmentation de la dégranulation des neutrophiles par rapport au groupe contrôle « stressé » après l'application du stress (Figure 4). Ce résultat confirme que les beta(1,3) glucans issus d'*A.niger* sont bioactifs et immunostimulants aux doses administrées aux poissons, à un niveau comparable à celui d'un beta-glucan issu de levure.

Exemple 8 - Etude *ex-vivo* sur cellules de sang humaines

8.1.- Beta-glucan utilisé pour cette étude

Le composé Beta-glucan issu d'*A.niger* utilisé pour cette étude est un grade pour usage en nutrition humaine.

Ce grade peut être caractérisé comme suit (tableau 10) :

Tableau 10

Produit	Cendres (%masse/ masse humide)	Proteins (%masse/masse humide)	Beta-glucans (%masse/masse humide)
Beta-glucan	1,4%	0,3%	80%

L'échantillon a été traité avant de réaliser l'étude, en particulier pour éliminer les endotoxines bactériennes potentiellement présentes : L'échantillon est broyé pour obtenir une granulométrie d'environ 70µm ($d(0.9) < 70\mu\text{m}$). Il a ensuite été stérilisé par l'oxyde d'éthylène puis traité par NaOH afin d'éliminer les endotoxines bactériennes, les endotoxines étant connues pour stimuler le système immunitaire.

8.2.- Activation de cellules immunitaires

Du sang prélevé sur des volontaires sains a été exposé pendant 24h à des quantités croissantes de glucan (grade selon l'exemple 8.1) allant de 0,1 mg/mL à 1000 mg/mL. L'activation de cellules immunitaires a ensuite été mesurée grâce à des marqueurs de membrane cellulaire, notamment CD54, par cryométrie de flux.

Une activation claire des monocytes (Figure 5) et des cellules dendritiques plasmacytoïdes (Figure 6) a été observée par le beta-glucan selon la présente invention, et ce d'autant plus lorsque le beta-glucan est utilisé à 100µg/mL.

5

8.3.– Induction de cytokines

Du sang prélevé sur des volontaires sains a été exposé pendant 24h à des quantités croissantes de glucan allant de 0,1 mg/mL à 1000 mg/mL.

10

La production de cytokines dans le milieu a ensuite été mesurée par multiplex. Le glucan selon la présente invention est capable d'induire la production d'Interleukin 6 (IL-6) (Figure 7) et de Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α) (Figure 8), en particulier à partir de 100µg/mL, ainsi que de la Macrophage Inflammatory protein 1 alpha (MIP-1 α) dès 1µg/mL (Figure 9). La production d'autres cytokines, telles que le Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF), Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) et Interleukin 1 beta (IL-1 β), est aussi augmentée en présence de beta-glucan selon la présente invention, et cela en suivant un effet dose-réponse.

15

20

Le glucan selon la présente invention permet l'activation des cellules immunitaires d'un être humain et d'induire la production de cytokines, montrant ainsi son bénéfice pour son utilisation comme agent actif dans une composition pharmaceutique immunostimulante d'un être humain.

Exemple 9 – Formulations cosmétique

25

Le glucan utilisé dans les exemples suivants présente une composition selon l'exemple 8, sans traitement ultérieur d'élimination des endotoxines bactériennes potentiellement présentes.

30

Afin de préparer des formulations acceptables en cosmétique, c'est à dire pour une application topique, la distribution des tailles de particules de beta-glucan est de préférence celle suivante :

35

Le diamètre de 90% (d(0.9)) des particules est inférieur à 350 microns, de préférence inférieur à 100 microns pour des émulsions huile-dans-eau et eau-dans- huile, et de préférence inférieure à 50 microns pour des rouges à lèvres et des baumes à lèvres (mesuré par diffractométrie au laser).

EXAMPLE 9.1- Composition hydratante anti-âge contenant du beta-glucan issu d'*A. niger*.

Cette formulation présente la composition suivante :

5 **Tableau 11**

Phase	Ingredient (INCI)	%
A	Dicaprylyl Ether	5
	Caprylic/Capric triglyceride	5
	Cetearyl alcohol	2
B	Aqua	Ad 100%
	Glycerin	8
	Xanthan gum	0.30
C	Beta-glucan	1.5%
	Ammonium acryloyldimethyltaurate/VP copolymer	1.10
D	Phenoxyethanol, methylparaben and piroctone olamine	1*
	Tocopheryl acetate	0.30
E	Citric acid 10%	q.s.

q.s. quantité suffisante pour atteindre 100%

Procédure

- 10
1. Mélanger les composants de la phase A, et faire fondre approximativement à 80 °C
 2. Dissoudre les ingrédients de la phase B ensemble
 3. Ajouter des composants de la phase C au mélange 1 tout en agitant
 4. Ajoutez les mélanges 2 et 3 tout en agitant à 250 tr/min, laissez refroidir
 5. Ajoutez la phase D au mélange 4 à 35° C
 6. Ajuster le pH du mélange 5 avec la phase E à une valeur comprise entre 6.0 et 6.5
 7. Finir par homogénéiser.
- 15

EXAMPLE 9.2- Lotion pour bébé contenant du beta-glucan issu d'*A. niger*.

Cette formulation présente la composition suivante :

Tableau 12

Phase	INCI	%
A	Sunflower seed oil sorbitol esters	2.00
	Caprylic/capric triglyceride	2.00
	Dicaprylyl ether	2.00
	Prunus amygdalus dulcis (sweet almond) oil	3.00
	Helianthus Annuus (sunflower) seed oil	2.00
	Behenyl alcohol	2.00
	Stearyl alcohol	2.00
	Sorbitan caprylate	1.50
B	Aqua	Ad 100%
	Glycerin	5.00
C	Xanthan gum	0.030
D	Potassium cetyl phosphate	0.60
E	p-anisic acid	0.30
F	Beta-glucan	1.00
G	Sodium hydroxide 10%	q.s.

Procédure

- 5
1. Mélanger les composants de la phase A, et faire fondre approximativement à 80° C
 2. Mélanger les ingrédients de la phase B
 3. Ajouter la phase C au mélange 2 et mélanger avec une forte agitation jusqu'à obtenir une solution claire et homogène

33

4. Ajoutez la phase D au mélange 3 tout en mélangeant bien et en chauffant à 80°C
5. Ajoutez la phase E au mélange 4 et mélanger jusqu'à obtenir une solution homogène
6. Ajoutez la phase F au mélange 1 et mélanger
7. Ajoutez le mélange 5 au mélange 6 et mélanger à 300 tr/min jusqu'à ce que la température diminue
8. Ajuster le pH avec la phase G à 5.5
9. Finir par homogénéiser.

5

10

Résultats

pH: 5.45

Viscosité (Brookfield, 20 °C à 20 rpm): 4000 mPa.s

Stabilité: satisfaisante après 12 semaines à température ambiante (20 °C), 40 °C et

15

45°C

EXAMPLE 9.3- Crème hydratante contenant du beta-glucan issu d'*A. niger*.

Cette formulation présente la composition suivante :

20

25

30

35

Tableau 13

Phase	INCI	%
A	Dicaprylyl ether	5.00
	Caprylic/ capric triglyceride	5.00
	Cetearyl alcohol	2.00
B	Aqua	Ad 100%
	Glycerin	8.00
	Xanthan gum	0.30
C	Beta-glucan	1.00
	Ammonium acryloyldimethyltaurate/VP copolymer	1.10
D	Phenoxyethanol, methylparaben and piroctone olamine	1.00*
	Tocopheryl acetate	0.30
E	Citric acid 10%	q.s.

Procédure

- 5 1. Mélanger les composants de la phase A, et faire fondre approximativement à 80 °C
2. Dissoudre les ingrédients de la phase B
3. Ajouter des composants de la phase C au mélange 1 tout en agitant
4. Ajoutez les mélanges 2 et 3 tout en agitant à 250 tr/min, laissez refroidir
5. Ajoutez la phase D au mélange 4 à 35° C
- 10 6. Ajuster le pH du mélange 5 avec la phase E à une valeur comprise entre 6.0 et 6.5
7. Finir par homogénéiser.

Résultats

pH: 6.30

15 Apparence: crème blanche onctueuse

Viscosité (Brookfield, 20 °C, 20 rpm): 40300 mPa.s

Stabilité: satisfaisante après 12 semaines à température ambiante (20 °C), 40 °C et 45 °C

35
REVENDICATIONS

1.- Méthode de préparation de glucan issu d'*Aspergillus niger* caractérisée en ce qu'elle comprend (i) la déacétylation au moins partielle de mycélium d'*Aspergillus niger* ;
5 (ii) un traitement acide du mycélium déacétylé ou partiellement déacétylé, de préférence après purification et/ou lavage, pour obtenir du glucan insoluble et du chitosane soluble, ledit traitement acide comprenant la mise en contact du mycélium déacétylé avec une solution acide ; (iii) la séparation du chitosane soluble d'une part, et d'autre part du glucan insolubles ; (iv) un traitement alcalin du glucan comprenant la mise en contact du glucan
10 avec une solution alcaline pour faire flocculer le glucan ; et (v) le séchage du glucan flocculés pour obtenir une poudre de glucan.

2.- Méthode, selon la revendication 1, caractérisée en ce que la solution alcaline de l'étape (iv) comprend ou est constituée d'un mélange d'hydroxyde de sodium (NaOH)
15 et d'hydroxyde de calcium (Ca(OH)₂).

3.- Méthode, selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'étape (iv) comprend un rapport massique hydroxyde de sodium/ hydroxyde de calcium de 1/2 à 1/10, entre l'hydroxyde de sodium et l'hydroxyde de calcium.
20

4.- Méthode, selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la séparation est effectuée par une séparation centrifuge continue à buse.

5.- Méthode, selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle comprend une étape supplémentaire (iiia) de traitement du chitosane soluble
25 obtenu à l'étape (iii) pour en séparer le glucan insoluble, qui est ajouté au glucan insoluble récupéré à l'étape (iii).

6.- Méthode, selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la déacétylation est effectuée par mise en contact du mycélium avec une
30 matière alcaline, et de préférence l'hydroxyde de sodium (NaOH), à une concentration, à une température, et pendant une durée suffisantes pour déacétyler la chitine en chitosane avec un rendement minimum de 4% en chitosane et un degré de déacétylation de 0 à 50%, et de préférence de 10 à 25%.

7.- Méthode, selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que préalablement à l'étape (ii) le pH est diminué par un ou plusieurs lavages à l'eau.

5 8.- Méthode, selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que le traitement acide de l'étape (ii) comprend l'ajout d'un acide organique jusqu'à l'obtention d'un pH compris entre 3 et 5,5, et de préférence entre 3,5 et 4,5.

10 9.- Méthode, selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que le traitement acide de l'étape (ii) comprend ou consiste en l'ajout d'acide acétique au mycélium déacétylé obtenu à l'étape (i).

15 10.- Méthode de co-préparation de chitosane et de glucan à partir d'*Aspergillus niger*, caractérisée en ce qu'elle comprend la préparation de glucan selon l'une quelconque des revendications précédentes, et la préparation de chitosane.

11.- Beta-glucan issu d'*Aspergillus niger* susceptible d'être obtenu par une méthode telle que définie à l'une quelconque des revendications précédentes.

20 12.- Beta-glucan issu d'*Aspergillus niger*, selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il est adapté à l'alimentation animale.

25 13.- Beta-glucan issu d'*Aspergillus niger*, selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il est adapté à une application chez l'être humain.

14.- Beta-glucan issu d'*Aspergillus niger* pour la modulation du système immunitaire d'un être humain ou d'un animal.

30 15.- Beta-glucan issu d'*Aspergillus niger* selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il est destiné à l'amélioration des fonctions du système immunitaire inné, en particulier les fonctions des neutrophiles.

35 16.- Composition de complément alimentaire pour l'être humain ou l'animal, caractérisée en ce qu'elle comprend du beta-glucan issu d'*Aspergillus niger* tel que défini à l'une quelconque des revendications 11 à 15.

37

17.- Nourriture solide pour poissons, caractérisée en ce qu'elle comprend du beta-glucan issu d'*Aspergillus niger* tel que défini à l'une quelconque des revendications 11 à 15.

5

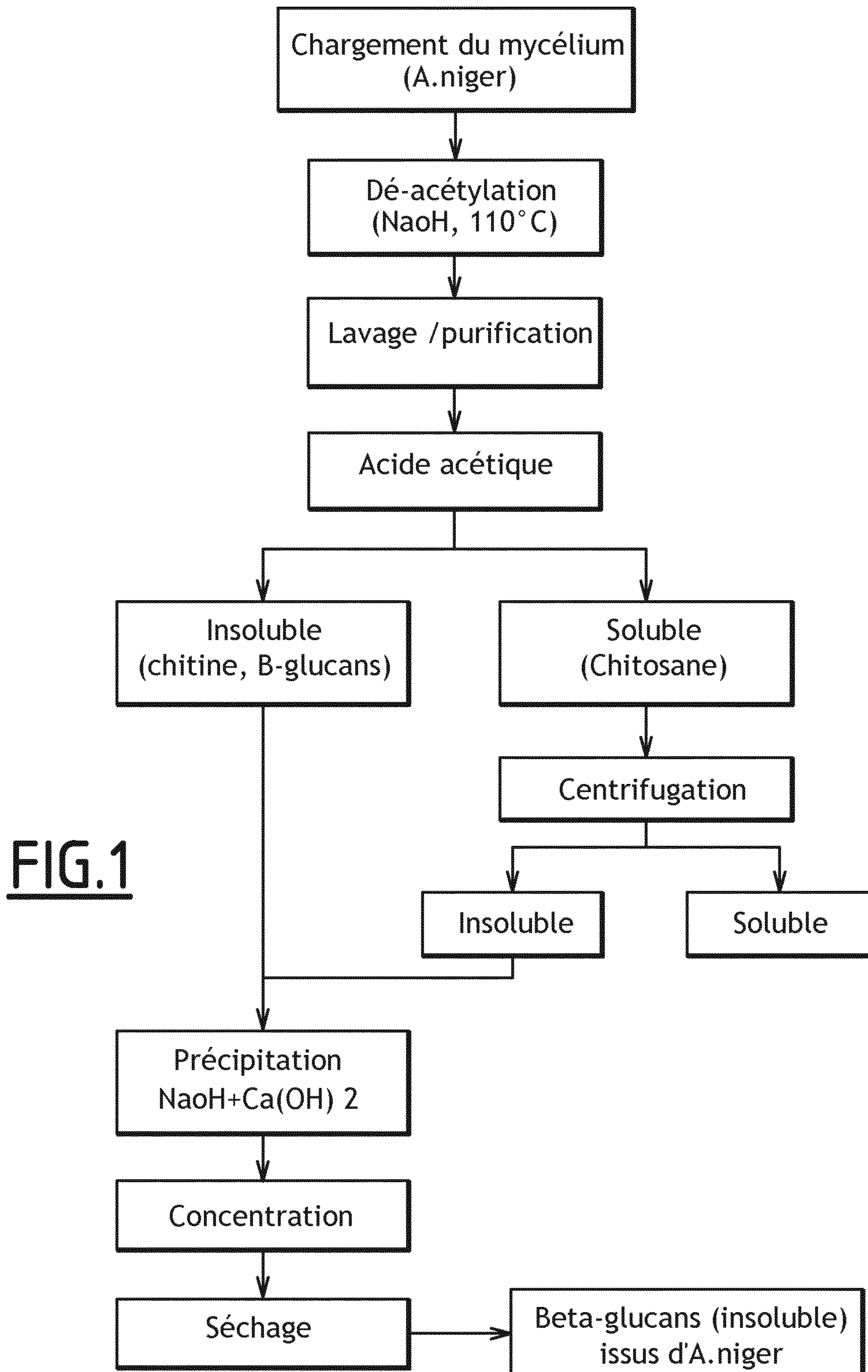
18.- Composition pharmaceutique comprenant du beta-glucan issu d'*Aspergillus niger* tel que défini à l'une quelconque des revendications 11 à 15.

19.- Composition pharmaceutique immunostimulante comprenant du beta-glucan issu d'*Aspergillus niger* tel que défini à l'une quelconque des revendications 11 à 15.

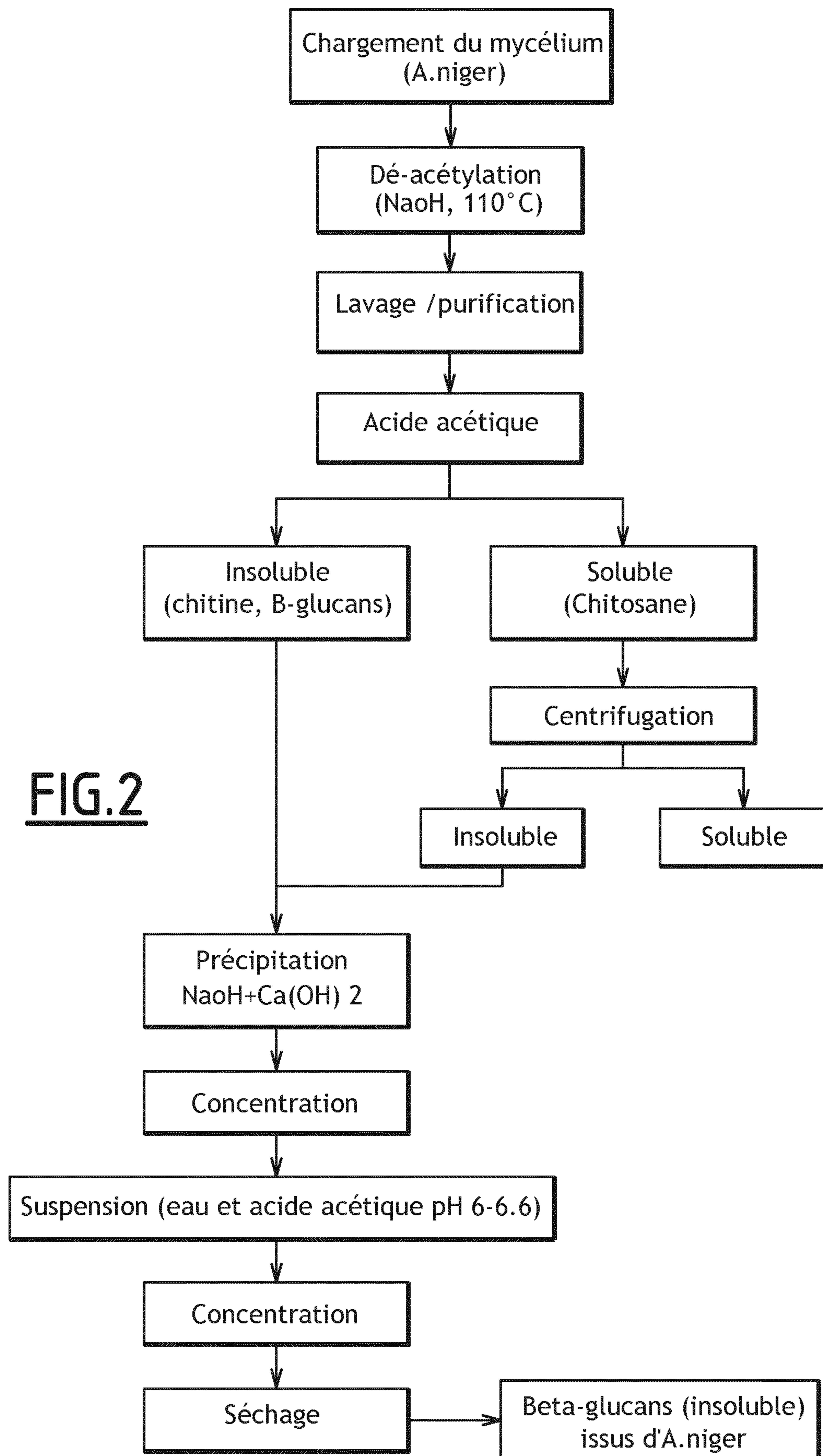
10

20.- Composition cosmétique comprenant du beta-glucan issu d'*Aspergillus niger* tel que défini à l'une quelconque des revendications 11 ou 13.

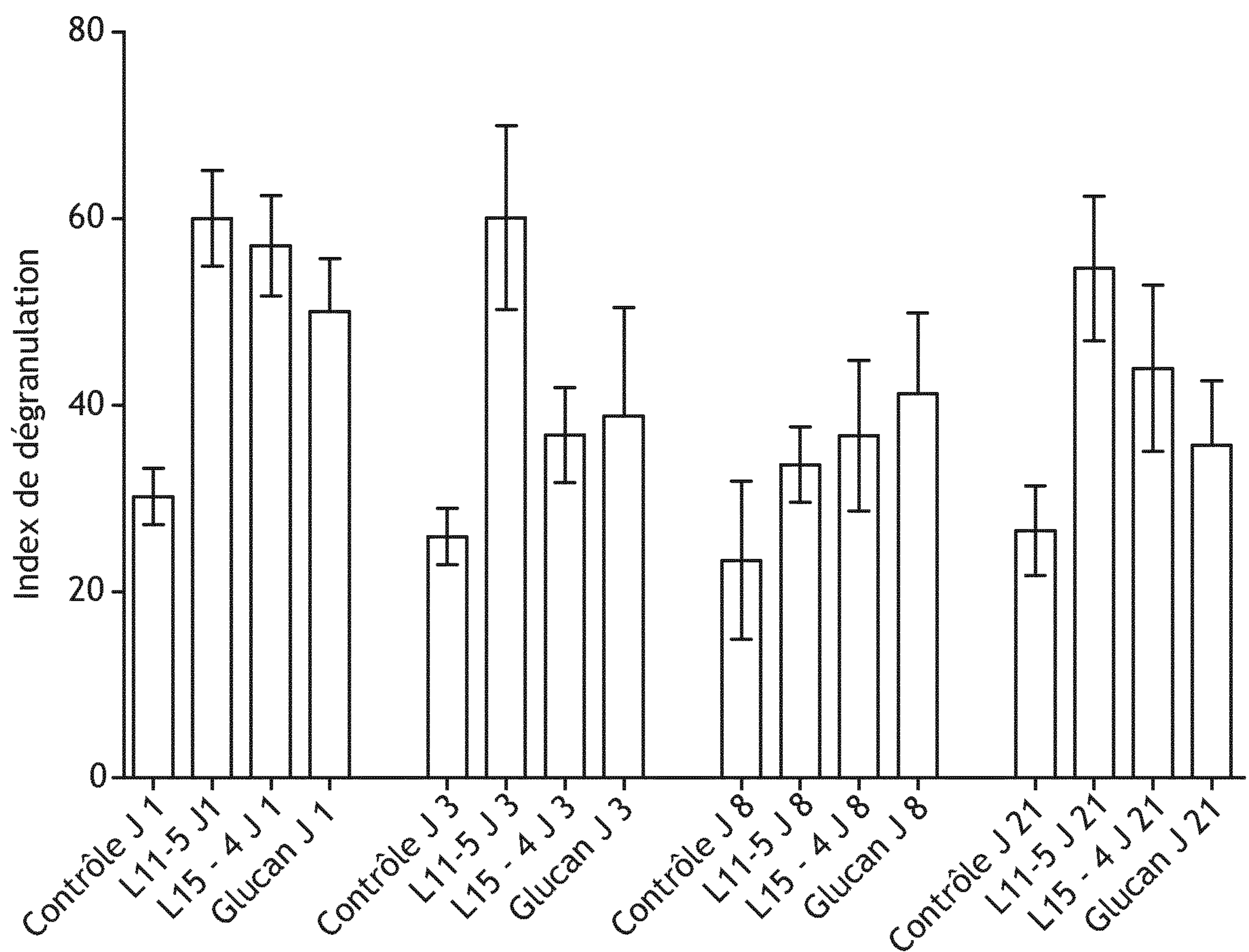
1/7



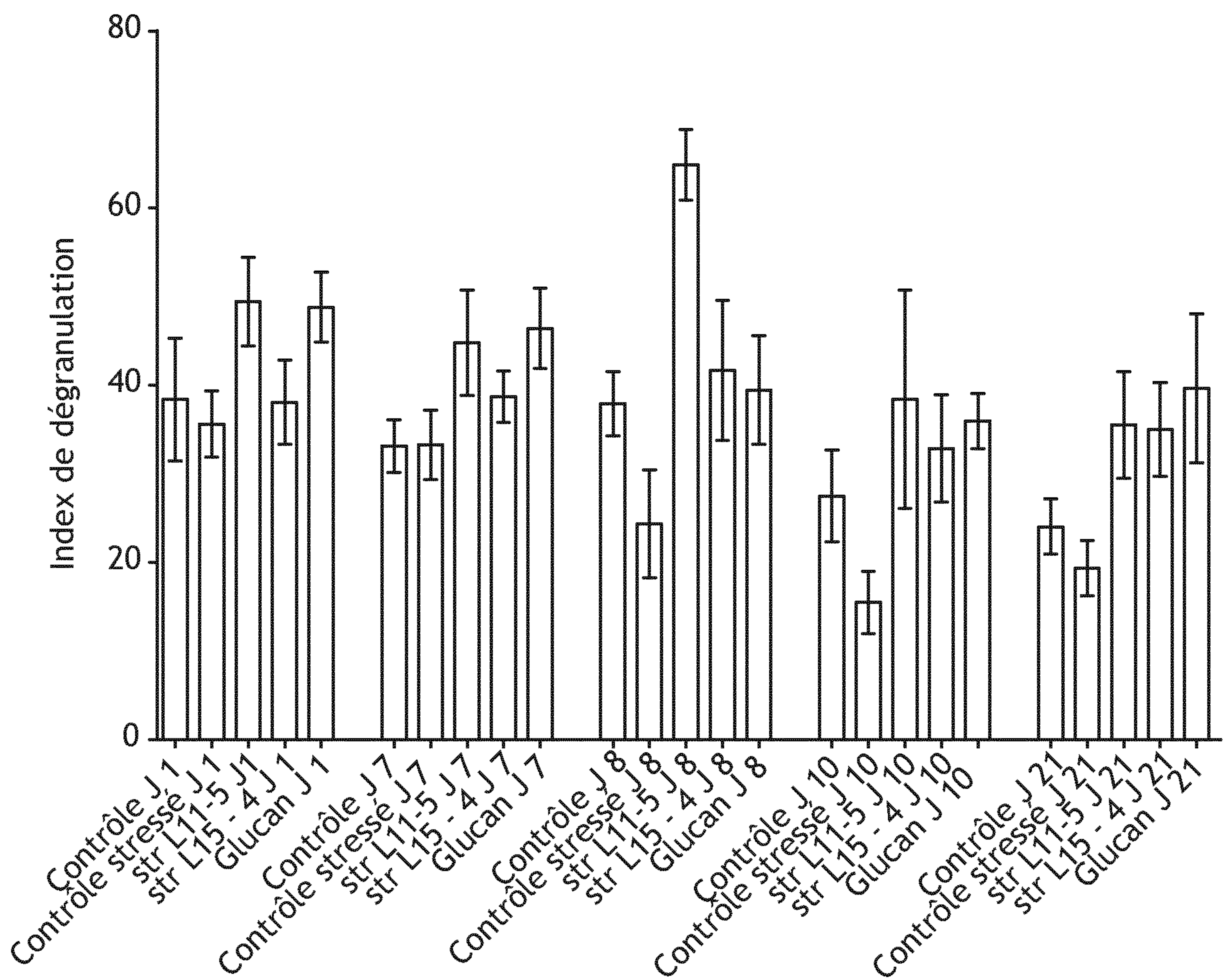
2/7



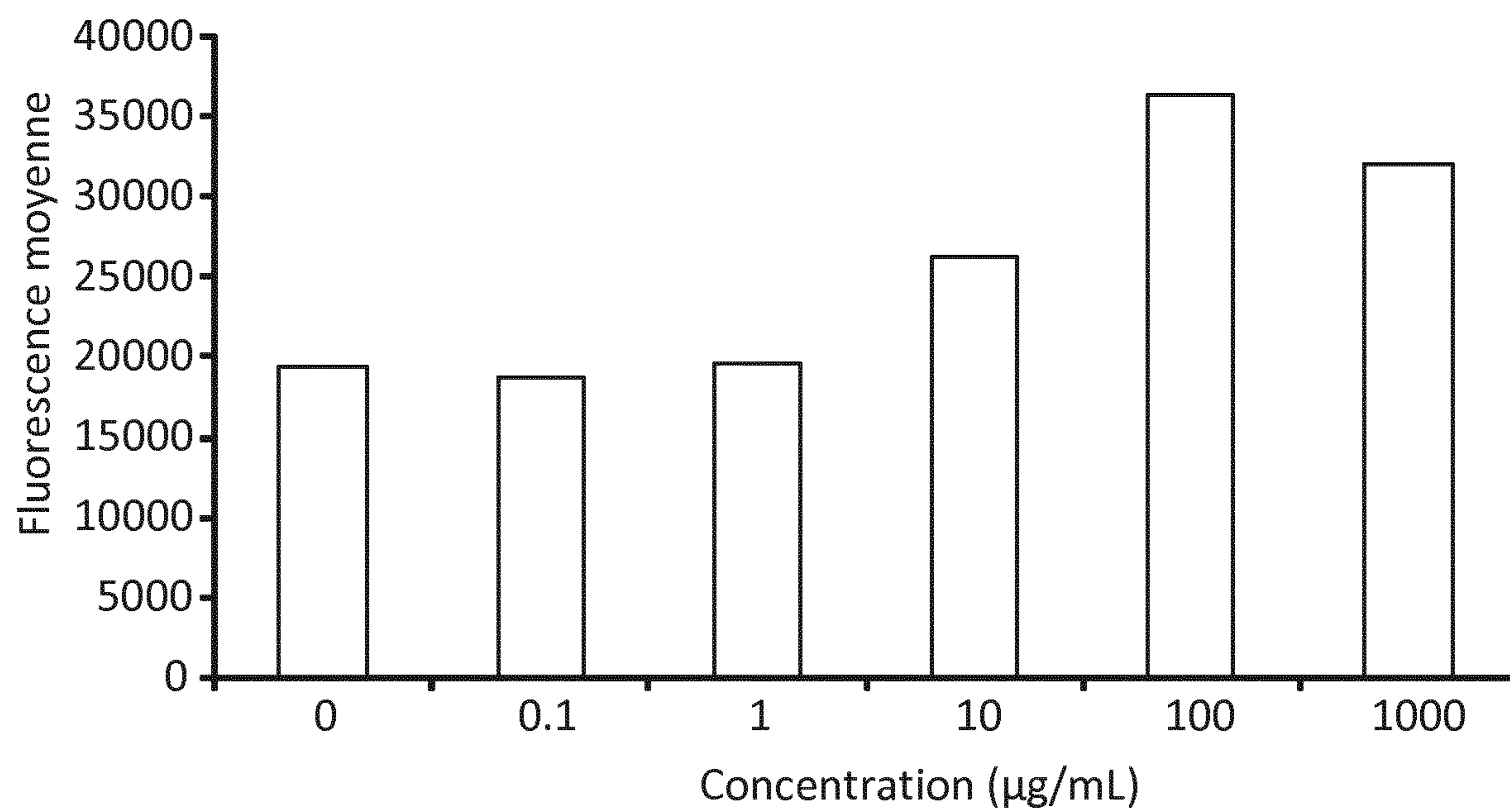
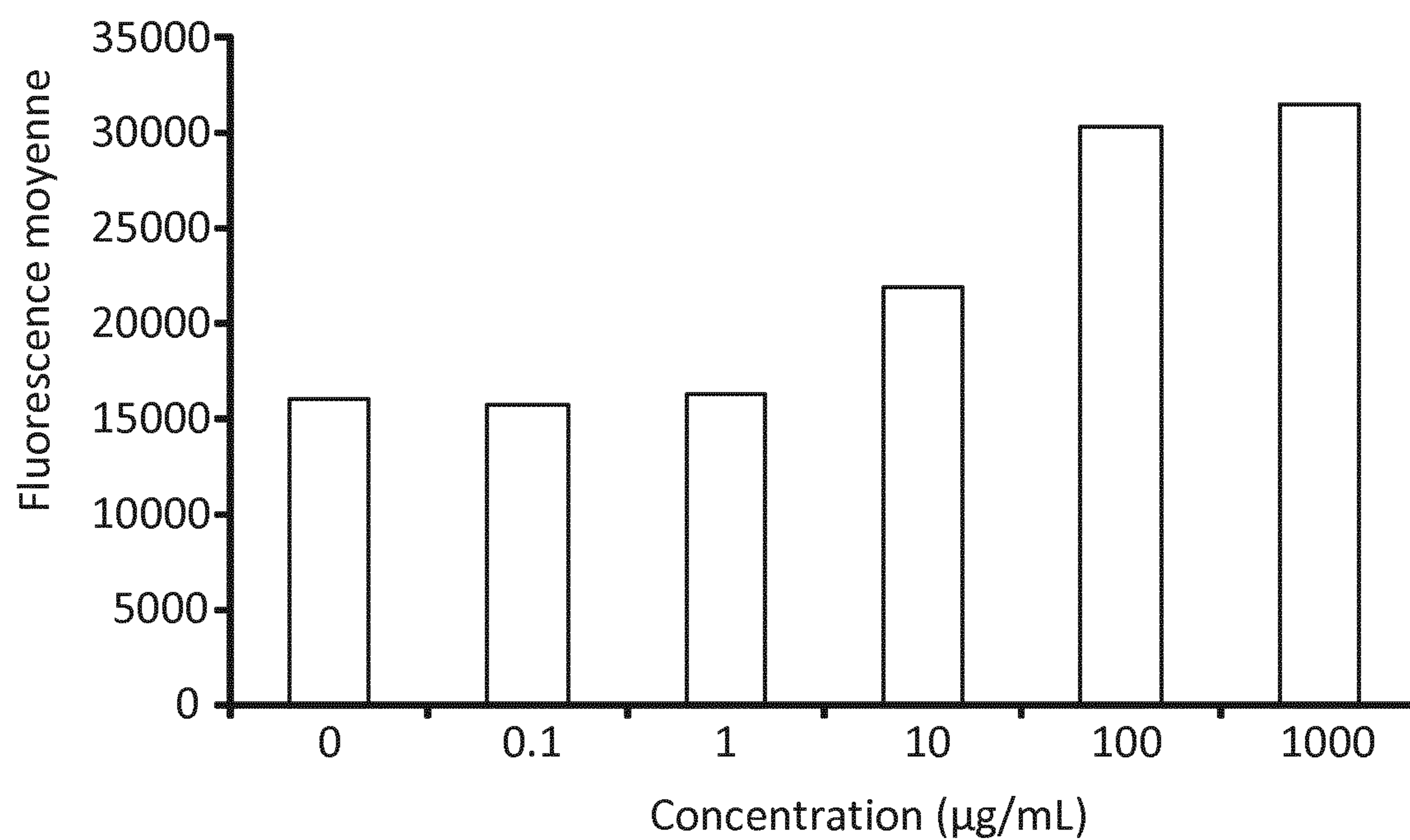
3/7

FIG.3

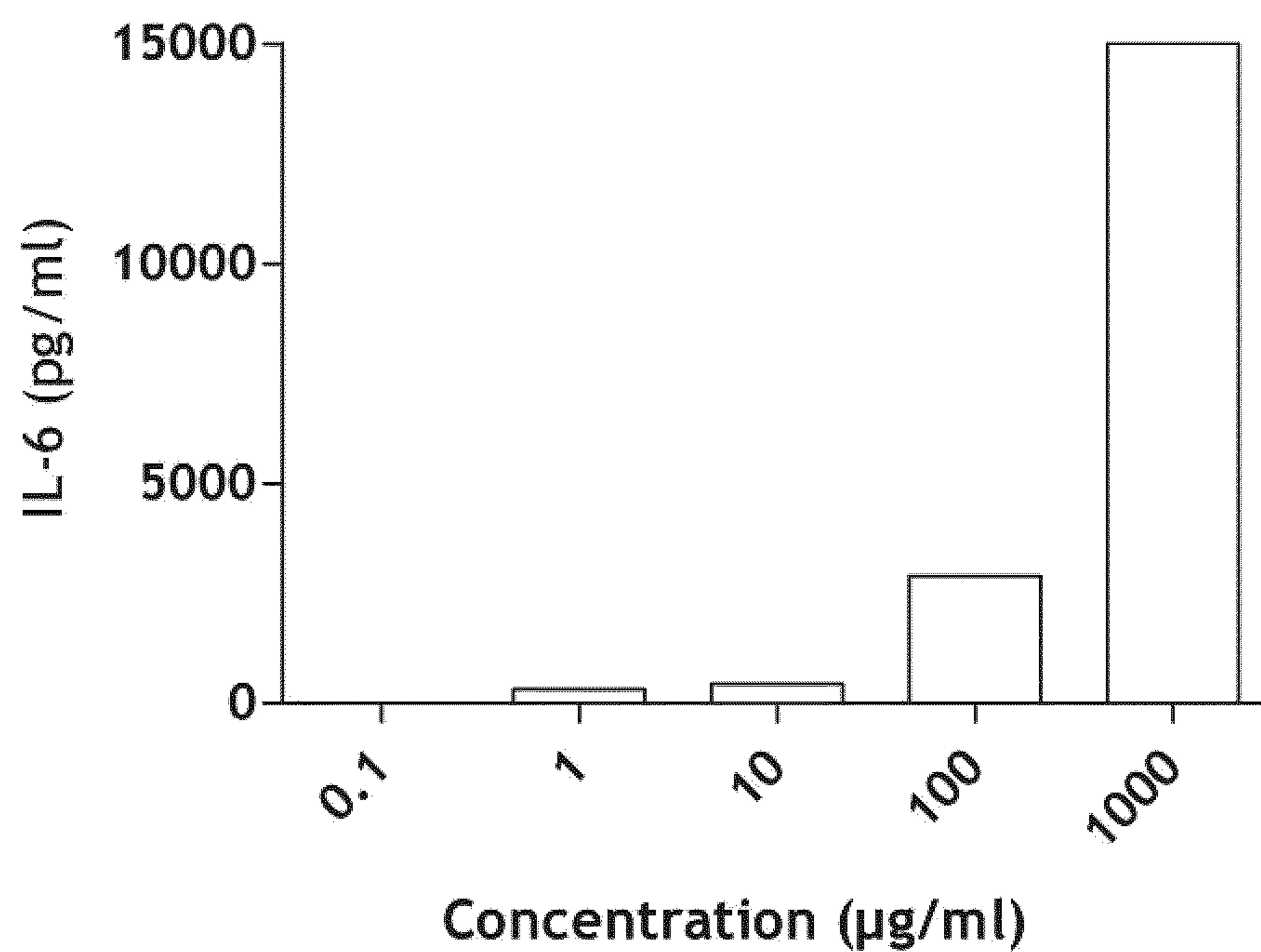
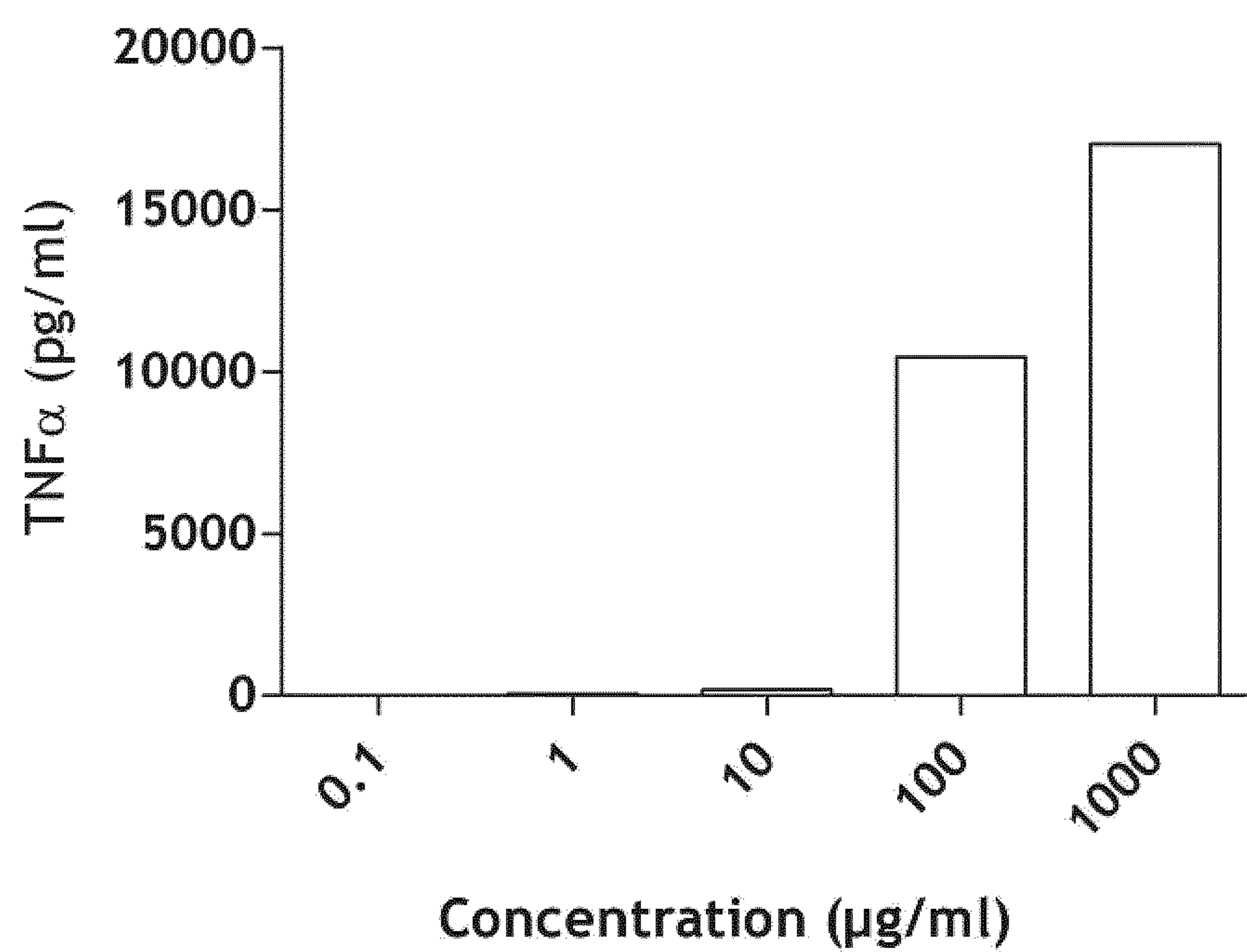
4/7

FIG.4

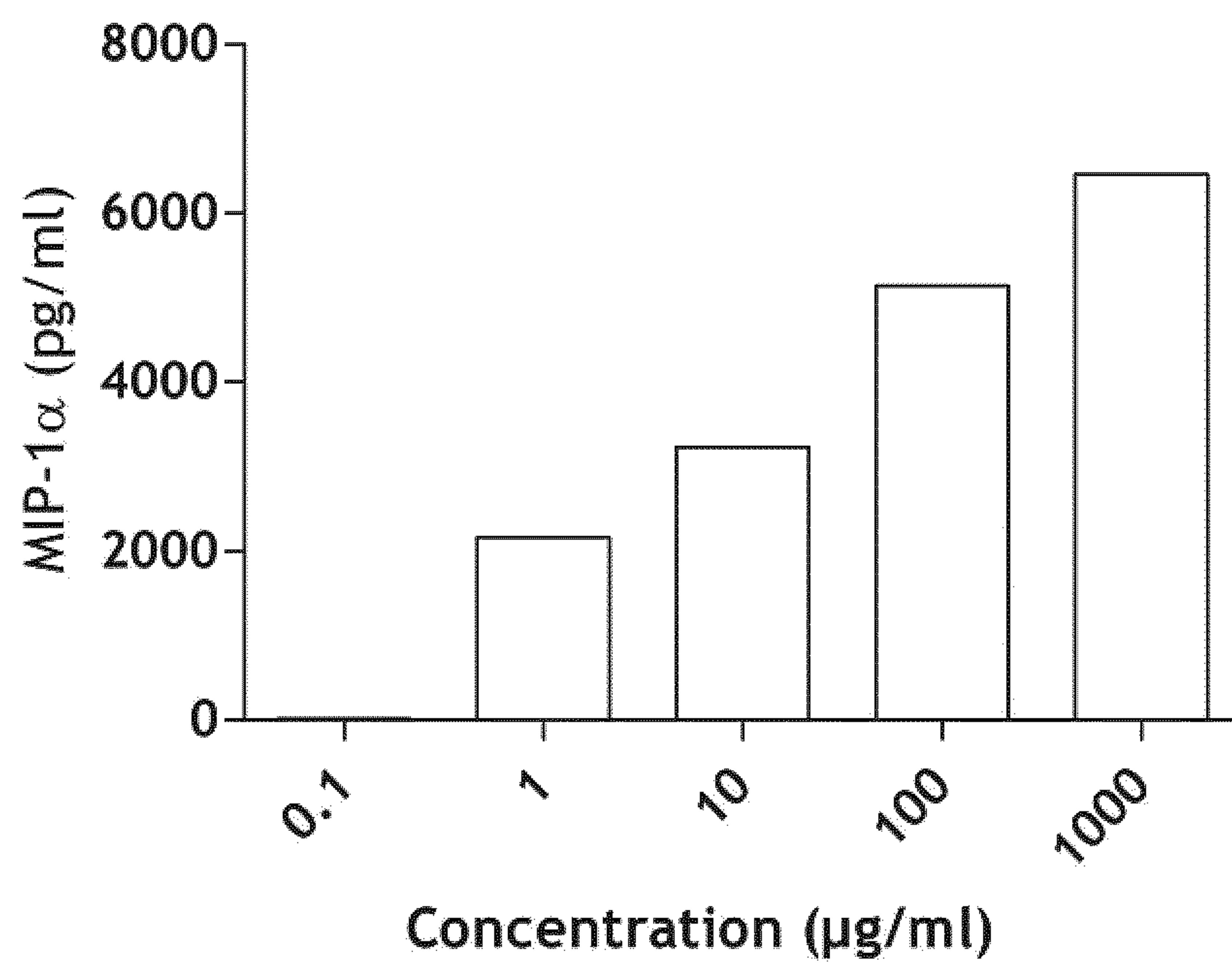
5/7

FIG.5FIG.6

6/7

FIG.7FIG.8

7/7

FIG.9