

⑫

BREVET D'INVENTION

B1

⑤④ PROCÉDE DE PRODUCTION DE CHITINE PAR HYDROLYSE ENZYMATIQUE AVEC TRAITEMENT PRÉALABLE AVEC UN AGENT OXYDANT.

⑫② Date de dépôt : 31.12.14.

③③ Priorité :

⑥① Références à d'autres documents nationaux apparentés :

○ Demande(s) d'extension :

⑦① Demandeur(s) : YNSECT — FR.

④③ Date de mise à la disposition du public de la demande : 01.07.16 Bulletin 16/26.

④⑤ Date de la mise à disposition du public du brevet d'invention : 26.01.18 Bulletin 18/04.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de recherche :

Se reporter à la fin du présent fascicule

⑦② Inventeur(s) : BEREZINA Nathalie, HUBERT ANTOINE, BERRO FABRICE, LEVON JEAN-GABRIEL et LE ROUX KARINE.

⑦③ Titulaire(s) : YNSECT.

⑦④ Mandataire(s) : SANTARELLI.

FR 3 031 114 - B1



5 La présente invention concerne un procédé de préparation de chitine et/ou de chitosan à partir d'insectes. Plus particulièrement, l'invention concerne un procédé de préparation de chitine et/ou de chitosan par hydrolyse enzymatique de cuticules d'insectes.

10 Selon l'invention, par « chitine », on entend tout type de dérivé chitinique, c'est-à-dire de dérivé de polysaccharides comportant des unités N-acétyl-glucosamine et des unités D-glucosamines, en particulier les copolymères chitine-polypeptides (parfois désignés sous l'appellation « composite chitine-polypeptides »).

15 La chitine serait le deuxième polymère le plus synthétisé dans le monde vivant après la cellulose. En effet, la chitine est synthétisée par de nombreuses espèces du monde vivant: elle constitue en partie l'exosquelette des crustacés et des insectes et la paroi latérale qui entoure et protège les champignons. Plus particulièrement, chez les insectes, la chitine constitue ainsi 3 à 60% de leur exosquelette.

20 Par « chitosan », on entend selon la présente invention les produits de désacétylation de la chitine. La limite usuelle entre le chitosan et la chitine est déterminée par le degré d'acétylation : un composé ayant un degré d'acétylation inférieur à 50% est nommé chitosan, au-delà, un composé ayant un degré d'acétylation supérieur à 50% est nommé chitine.

25 Les applications de la chitine et/ou du chitosan sont nombreuses: cosmétique (composition cosmétique), médicale et pharmaceutique (composition pharmaceutique, traitement des brûlures, biomatériaux, pansements cornéens, fils chirurgicaux), diététique et alimentaire, technique (agent filtrant, texturant, flocculant ou adsorbant notamment pour la filtration et dépollution de l'eau), etc. En effet, la chitine et /ou le chitosan sont des matériaux biocompatibles, biodégradables et non toxiques.

30 L'extraction traditionnelle de la chitine s'effectue par voie chimique à partir de crustacés, de céphalopodes, mais aussi, de manière plus exceptionnelle, de champignons. Cette voie emploie de grandes quantités de réactifs (tel que l'acide chlorhydrique, l'hydroxyde de sodium et des agents de blanchiment) qui ont pour effet de dénaturer la structure de la chitine telle qu'elle existe à l'état naturel, par exemple telle que présente dans la carapace des crustacés. En outre, la plupart des réactifs
35 chimiques sont nocifs pour l'homme et l'environnement et génèrent d'importants

volumes d'effluents à traiter. Enfin, la chitine et/ou le chitosan issu(s) de crustacés peuvent générer des réactions allergiques chez les personnes sensibles.

Une autre voie d'extraction de la chitine est la voie enzymatique. Cette voie est considérée comme plus douce, permettant ainsi de mieux préserver la chitine et/ou le chitosan. Toutefois, la chitine obtenue par cette voie est d'une couleur brunâtre, nécessitant des étapes de purification afin d'obtenir une poudre valorisable, c'est-à-dire de couleur blanche. Les procédés existants comportent donc généralement une ou plusieurs étape(s) visant à débarrasser la chitine de ses impuretés, telle qu'une étape de déminéralisation à l'acide réalisée préalablement à l'hydrolyse enzymatique et/ou une étape de blanchiment de la chitine avec un agent oxydant, réalisée de manière subséquente à l'hydrolyse enzymatique. Ces deux étapes de purification de la chitine ont malheureusement pour effet d'altérer la structure chimique de la chitine.

Le travail des inventeurs a permis de mettre en évidence qu'il était possible d'obtenir une chitine à la fois plus pure et de structure plus proche de la structure originelle de la chitine en traitant les cuticules des insectes avec un oxydant avant d'effectuer l'hydrolyse enzymatique.

L'invention concerne donc un procédé de production de chitine et/ou de chitosan à partir de cuticules d'insectes, comportant les étapes suivantes :

- (i) le traitement des cuticules d'insectes avec un agent oxydant, puis,
- (ii) l'hydrolyse enzymatique des cuticules d'insectes par une enzyme protéolytique.

Par « insectes », on entend des insectes à n'importe quel stade de développement, tel qu'un stade adulte, larvaire ou un stade de nymphe. De préférence, les insectes mis en œuvre dans le procédé selon l'invention sont comestibles.

Plus particulièrement, les insectes peuvent être choisis parmi le groupe constitué par les coléoptères, les diptères, les lépidoptères, les orthoptères, les isoptères, les hyménoptères, les blattoptères, les hémyptères, les hétéroptères, les éphéméroptères et les mécoptères, de préférence, parmi les coléoptères, les diptères, les orthoptères et les lépidoptères.

Préférentiellement, les insectes sont choisis parmi le groupe constitué par *Tenebrio molitor*, *Hermetia illucens*, *Galleria mellonella*, *Alphitobius diaperinus*, *Zophobas morio*, *Blattella fusca*, *Musca domestica*, *Chrysomya megacephala*, *Locusta migratoria*, *Schistocerca gregaria*, *Acheta domestica* et *Samia ricini*, et plus préférentiellement encore, *T. molitor*.

Une ou plusieurs espèces d'insectes peuvent être utilisées dans le procédé

selon l'invention, de préférence une seule espèce d'insecte. Si plusieurs espèces sont utilisées, on choisira avantageusement deux espèces proches telles que par exemple, *Hermetia illucens* et *Musca domestica*.

Les insectes sont de préférence élevés et non prélevés dans la nature.

5 Par exemple, les insectes sont élevés dans une ferme d'insectes. L'élevage des insectes dans une ferme spécifique permet non seulement de contrôler et d'éliminer les risques associés aux maladies véhiculées par des insectes, mais également de limiter les risques associés à la toxicité des produits alimentaires dérivés des insectes due par exemple à la présence d'insecticides. En outre, l'élevage permet de

10 contrôler la qualité de l'approvisionnement en insectes et de limiter les coûts d'approvisionnement.

Par « traitement des cuticules d'insectes », on vise non seulement le traitement des cuticules une fois celles-ci séparées des insectes, mais également le traitement des cuticules, incluant tout ou partie des autres constituants de l'insecte, y compris

15 le traitement de l'insecte dans son intégralité. En effet, il est possible d'appliquer le procédé selon l'invention à l'insecte complet, tels que des insectes broyés, ou bien à seulement une partie des insectes comportant les cuticules, par exemple après extraction, tels que des insectes broyés puis pressés afin d'extraire un gâteau de presse riche en cuticules, ou tels que des exuvies/mues séparées naturellement,

20 et collectées par un procédé adéquat.

La cuticule est la couche externe (ou exosquelette) sécrétée par l'épiderme des insectes. Elle est en général formée de trois couches :

- l'épicuticule, qui est la couche la plus fine et la plus externe de la cuticule (inférieure à 4 μm) ; cette couche est imperméable à l'eau et comporte une

25 couche de cire imperméabilisante, ainsi que des protéines et de la chitine, en quantité moindre ;

- l'exocuticule, qui est la couche intermédiaire de la cuticule ; elle est composée essentiellement de protéines durcies, les tannées, qui sont responsables de la rigidité de la cuticule, de chitine et éventuellement de mélanine ; et

30 - l'endocuticule, qui est une couche fine, flexible, constituée d'un mélange de protéines et de chitine.

De préférence, dans le procédé selon l'invention, l'agent oxydant mis en œuvre lors du traitement des cuticules est choisi parmi le groupe constitué par le peroxyde d'hydrogène, le permanganate de potassium, l'ozone et l'hypochlorite de sodium,

35 plus préférentiellement encore, le peroxyde d'hydrogène.

Avantageusement, lorsque l'agent oxydant est le peroxyde d'hydrogène, la quantité introduite de cet agent pour le traitement des cuticules d'insectes est telle que la teneur en peroxyde d'hydrogène est comprise entre 1 et 33% en poids sur le poids total d'insectes, préférentiellement comprise entre 2 et 12% en poids sur le poids total d'insectes, préférentiellement de l'ordre de 6% en poids.

Dans la présente demande, les gammes de valeurs s'entendent bornes incluses. De même, lorsqu'« environ » ou « de l'ordre de » précède un nombre, cela équivaut à plus ou moins 10% de la valeur de ce nombre.

Préférentiellement, le traitement de cuticules d'insectes par l'agent oxydant s'effectue en présence d'eau, telle que de l'eau douce. Avantageusement, la quantité d'eau mise en œuvre lors du traitement des cuticules est déterminée de la façon suivante : le ratio du volume d'eau en mL sur le poids en g d'insecte est de préférence compris entre 0,3 et 10, plus préférentiellement entre 0,5 et 5, encore plus préférentiellement entre 0,7 et 3, encore plus préférentiellement de l'ordre de 1. On notera que ce ratio correspond également au ratio du poids d'eau sur le poids d'insecte, la masse volumique de l'eau étant de 1,0 g/mL dans les conditions normales de température et de pression.

Le traitement des cuticules d'insectes est suivi d'une hydrolyse enzymatique.

Selon l'invention, l'hydrolyse enzymatique est effectuée par au moins une enzyme protéolytique, de préférence une protéase. Dans la présente demande, les noms ou suffixes « peptidase » et « protéase » sont utilisés indifféremment pour désigner une enzyme lysant une liaison peptidique des protéines. Avantageusement, celle-ci est effectuée pendant une durée de 4 à 8h, préférentiellement, pendant 4 à 5h, à une température de 40 à 60°C, préférentiellement, 45 à 55°C et à un pH compris entre 6 et 8, préférentiellement entre 6,5 et 7,5.

L'hydrolyse enzymatique peut être réalisée avec une seule protéase ou alternativement avec un mélange d'enzymes contenant au moins une protéase, plus préférentiellement un mélange d'enzymes contenant plusieurs protéases, tel qu'un mélange contenant une endoprotéase et une exoprotéase, ou une protéase et une polysaccharase.

De préférence, la protéase est choisie parmi le groupe constitué par les aminopeptidases, les métallocarboxypeptidases, les endopeptidases sérine, les endopeptidases cystéine, les endopeptidases aspartiques, les métalloendopeptidases.

Avantageusement, les enzymes peuvent être choisies parmi les suivantes :

Enzyme(s)	Classe	Numéro EC	Fournisseur	Ville	Pays
Flavourzyme	Amino-peptidases	EC 3.4.11.1	Novozyme	Bagsvaerd	Danemark
Fungal protease 500		EC 3.4.11.1	Bio-Cat	Troy	Etats-Unis
Kojizyme		EC 3.4.11.1	Novozyme	Bagsvaerd	Danemark
Protex P	Endo-peptidases sérine	EC 3.4.21	Genencor International B.V.	Leiden	Pays-Bas
Chymotrypsine		EC 3.4.21.1	Novozyme	Bagsvaerd	Danemark
Protamex		EC 3.4.21	Novozyme	Bagsvaerd	Danemark
Elastase		EC 3.4.21.14	Novozyme	Bagsvaerd	Danemark
Trypsine		EC 3.4.21.36	Novozyme	Bagsvaerd	Danemark
Alcalase		EC 3.4.21.4	Novozyme	Bagsvaerd	Danemark
Papaine	Endo-peptidases cystéine	EC 3.4.22.2	Bio-Cat	Troy	Etats-Unis
Bromelaine (ananase)		EC 3.4.22.32	Bio-Cat	Troy	Etats-Unis
Prolyve NP	Endo-peptidases aspartique	EC 3.4.23	Lyven	Colombelles	France
Pepsine		EC 3.4.23.1	Sigma Aldrich	Saint-Quentin-Fallavier	France
Neutral protéase	Métallo-endo-peptidase	EC 3.4.24.28	Bio-Cat	Troy	Etats-Unis
Protex 50FP	Endo-peptidase	EC 3.4.21	Genencor International B.V.	Leiden	Pays-Bas
Pancrealyve	Exo & endo peptidase (cocktail protéases +	n.a.*	Lyven	Colombelles	France

Enzyme(s)	Classe	Numéro EC	Fournisseur	Ville	Pays
	amylases)				
Izyme BA	Protéase aspartique	EC 3.4.23	Novozyme	Bagsvaerd	Danemark
Sumizyme	Cocktail enzymatique	n.a.*	Takabio – Shin Nihon	Aichi	Japon

* n.a.: non applicable

L'enzyme ou le mélange d'enzymes est introduit(e) à une quantité allant de 0,2 à 10 % en poids de matière sèche estimé, préférentiellement de 0,4 à 8% en poids et plus préférentiellement de 0,5 à 2%. Par « poids de matière sèche estimé », on vise plus particulièrement le poids de matière sèche d'insectes ou de partie(s) d'insectes, tel qu'on peut l'estimer lors de l'entrée en étape d'hydrolyse enzymatique.

Avantageusement, l'étape d'hydrolyse enzymatique s'effectue en présence d'eau, telle que de l'eau douce. La quantité d'eau mise en œuvre lors de l'hydrolyse enzymatique est déterminée de la façon suivante : le ratio du volume d'eau en mL sur le poids en g d'insecte est de préférence compris entre 0,3 et 10, plus préférentiellement entre 0,5 et 5, encore plus préférentiellement entre 0,7 et 3, encore plus préférentiellement de l'ordre de 1.

Le procédé selon l'invention permet l'obtention d'une chitine ayant un degré de pureté compris entre 55 et 90%, préférentiellement compris entre 60 et 85%, plus préférentiellement de l'ordre de 80% (voir l'Exemple 2 et la Figure 2).

De plus, la taille de la chitine obtenue par le procédé selon l'invention, à savoir de l'ordre de 80000 g/mol dans l'Exemple 3 ci-après, est plus proche de celle qui existe à l'état naturel dans la cuticule d'insecte.

Avantageusement, le procédé selon l'invention comporte une étape d'abattage des insectes. Cette étape d'abattage est effectuée avant l'hydrolyse enzymatique. L'étape d'abattage peut s'effectuer par des méthodes classiques d'élevage d'animaux à sang froid et/ou de petite taille (crustacés, poissons, escargots, etc.), tels que le froid (congélation), le chaud (ébullition), la privation d'oxygène, etc. De préférence, l'abattage s'effectue par un ébullition. L'ébullition permet d'abattre les insectes tout en abaissant la charge microbienne (réduction du risque d'altération et sanitaire) et en inactivant les enzymes internes des insectes pouvant déclencher une autolyse, et ainsi un brunissement rapide de ceux-ci. De plus, l'ébullition est réalisé de manière à provoquer la mort le plus rapidement possible, dans le respect du bien-être

animal, et selon les préconisations scientifiques.

De préférence, l'étape d'ébouillantage est réalisée dans l'eau, telle que de l'eau douce, à une température de 95 à 105°C, préférentiellement de l'ordre de 100°C et pendant une durée de 2 à 20 min, préférentiellement, 5 à 15 min.

- 5 La quantité d'eau introduite à cette étape d'ébouillantage est déterminée de la façon suivante : le ratio du volume d'eau en mL sur le poids en g d'insecte est de préférence compris entre 0,3 et 10, plus préférentiellement entre 0,5 et 5, encore plus préférentiellement entre 0,7 et 3, encore plus préférentiellement de l'ordre de 1.

- De préférence, le traitement des cuticules d'insectes avec l'agent oxydant peut
10 être effectué concomitamment avec l'ébouillantage et/ou après l'étape d'ébouillantage, plus préférentiellement concomitamment avec l'ébouillantage.

Lorsque le traitement des cuticules d'insectes est effectué pendant l'ébouillantage, l'agent oxydant est ajouté à l'eau utilisée pour ébouillanter les insectes.

- Avantageusement, le procédé selon l'invention comporte également une étape
15 de broyage des insectes.

- De préférence, cette étape de broyage a lieu après l'étape d'ébouillantage. Cette étape de broyage a pour objectif de réduire les insectes en particules afin de faciliter l'accès des enzymes au substrat lors de l'hydrolyse enzymatique. Cette étape permet également, lorsqu'elle est suivie d'une étape de pressage, de faciliter
20 l'élimination du jus de presse et l'isolation de la matière solide.

Le broyage peut avantageusement être effectué avec un broyeur mixeur, tel qu'un broyeur mixeur à couteaux.

- De préférence, à l'issue du broyage, la taille des particules d'insectes est inférieure à 1 cm (plus grande taille de particule observable à l'aide d'un microscope),
25 de préférence inférieure à 0,5 cm, plus préférentiellement encore, une taille comprise entre 500 µm et 0,5 cm.

- Afin de faciliter le broyage, une quantité d'eau peut être ajoutée. Cette quantité d'eau est déterminée de la façon suivante : le ratio du volume d'eau en mL sur le poids en g d'insecte est de préférence compris entre 0,3 et 10, plus préférentiellement entre
30 0,5 et 5, encore plus préférentiellement entre 0,7 et 3, encore plus préférentiellement de l'ordre de 1.

- Optionnellement, le traitement des cuticules d'insectes avec l'agent oxydant peut être effectué concomitamment avec le broyage. Dans ce cas, l'agent oxydant est ajouté à l'eau utilisée pour le broyage. Alternativement, le traitement des cuticules peut
35 être effectué pendant l'ébouillantage, le broyage et/ou lors d'une étape spécifique de

traitement des cuticules d'insectes.

Le procédé selon l'invention peut en outre comporter, de préférence avant l'hydrolyse enzymatique, une étape de pressage. Bien que cette étape de pressage puisse être effectuée avant l'étape de broyage, celle-ci est avantageusement effectuée
5 juste après l'étape de broyage. Cette étape de pressage a pour objectif d'éliminer un jus de presse riche en matière grasse et d'enrichir le gâteau de presse en substrat pour l'hydrolyse.

Avantageusement, l'hydrolyse enzymatique peut être suivie d'une étape d'inactivation thermique visant à inactiver l'enzyme ou le mélange d'enzymes mis en
10 œuvre lors de l'hydrolyse enzymatique.

A l'issue d'un procédé selon l'invention, la chitine peut être récupérée par pressage ou centrifugation du milieu de réaction de l'hydrolyse enzymatique. A ce stade, un co-produit d'intérêt de la chitine est également récupéré, à savoir un hydrolysats.

15 Par « hydrolysats », on désigne un produit qui comporte des protéines, des protéines hydrolysées, des peptides, des acides aminés et/ou d'autres composés dérivés d'une protéine, susceptibles d'être obtenus par hydrolyse enzymatique de protéines.

L'invention concerne également un hydrolysats susceptible d'être obtenu comme
20 co-produit de l'hydrolyse enzymatique par l'un quelconque des procédés selon l'invention.

Cet hydrolysats peut avantageusement être complété avec des additifs pour équilibrer son profil nutritionnel afin d'être adapté à différents types d'animaux.

L'hydrolysats peut être concentré puis séché pour obtenir un hydrolysats séché.
25 Alternativement, l'hydrolysats peut être sous forme liquide. Ces hydrolysats peuvent être utilisés comme un aliment ou un ingrédient alimentaire en particulier pour des animaux, ou, alternativement, ils peuvent être traités, par exemple, pour isoler des acides aminés.

Un mode de réalisation préférentiel d'un procédé selon l'invention est plus
30 détaillé ci-après.

En particulier, ce mode de réalisation préférentiel décrit diverses étapes avantageuses pour un procédé selon l'invention, telles que des étapes de purification douce de la chitine : un second pressage, des lavages, filtration et séchage éventuels.

Enfin, la chitine étant généralement commercialisée sous forme de poudre,
35 un second broyage peut également être réalisé. Celui-ci peut également être effectué

afin de favoriser la réaction de désacétylation, qui permet de préparer du chitosan à partir de chitine. Les conditions de la réaction de désacétylation sont plus amplement décrites à l'étape 10 du mode de réalisation préférentiel détaillé ci-après.

5 Un procédé particulièrement avantageux de production de chitine à partir de cuticules d'insectes, comporte les étapes suivantes :

- a) l'abattage des insectes,
- b) le broyage des insectes, le broyage étant éventuellement précédé ou suivi d'une étape de pressage,
- c) l'hydrolyse enzymatique des cuticules d'insectes par une enzyme
10 protéolytique,
- d) la récupération de la chitine,

les cuticules d'insectes étant traitées avec un agent oxydant, avant l'étape c).

15 Les modes de réalisation préférés des diverses étapes a) à d), ainsi que du traitement avec l'agent oxydant, sont tels qu'indiqués ci-avant ou dans l'étape correspondante dans le mode de réalisation préférentiel ci-après.

L'invention concerne également une chitine susceptible d'être obtenue par un procédé selon l'invention. Cette chitine possède une structure proche de la chitine telle que présente à l'état naturel dans la cuticule de l'insecte.

20 Un procédé particulièrement avantageux de production de chitosan à partir de cuticules d'insectes, comportant les étapes suivantes :

- a) l'abattage des insectes,
- b) le broyage des insectes, le broyage étant éventuellement précédé ou suivi d'une étape de pressage,
- c) l'hydrolyse enzymatique des cuticules d'insectes par une enzyme
25 protéolytique,
- d) la récupération de la chitine,
- e) la désacétylation de la chitine récupérée,
- f) la récupération du chitosan,

les cuticules d'insectes étant traitées avec un agent oxydant, avant l'étape c).

30 Les modes de réalisation préférés des diverses étapes a) à f), ainsi que du traitement avec l'agent oxydant, sont tels qu'indiqués ci-avant ou dans l'étape correspondante dans le mode de réalisation préférentiel ci-après.

L'invention concerne enfin un chitosan susceptible d'être obtenu par un procédé selon l'invention.

35 La chitine et/ou le chitosan susceptible(s) d'être obtenu(s) par un procédé selon

l'invention peu(ven)t avantageusement être utilisé(s) dans diverses applications :

- dans des compositions cosmétiques, pharmaceutiques, nutraceutiques ou diététiques,
- comme biomatériaux pour traiter des brûlures en tant que seconde peau, pour réaliser des pansements cornéens ou des fils chirurgicaux,
- comme agent filtrant, texturant, floculant et/ou adsorbant notamment pour la filtration et dépollution de l'eau.

Selon un mode de réalisation préférentiel de l'invention, le procédé comporte les étapes suivantes, décrites schématiquement en Figure 1. On notera que certaines étapes sont indiquées comme facultatives dans ce mode de réalisation préférentiel.

• **Etape 1 : ébouillantage des insectes**

Cette étape 1 d'ébouillantage permet d'abattre les insectes tout en abaissant la charge microbienne (réduction du risque d'altération et sanitaire) et en inactivant les enzymes internes des insectes pouvant déclencher une autolyse, et ainsi un brunissement rapide de ceux-ci. Les insectes, de préférence des larves, sont ainsi ébouillantés à l'eau pendant 2 à 20 min, préférentiellement, 5 à 15 min. De préférence, l'eau est à température comprise entre 95 à 105°C, préférentiellement 100°C.

La quantité d'eau introduite à cette étape 1 d'ébouillantage est déterminée de la façon suivante : le ratio du volume d'eau en mL sur le poids en g d'insecte est de préférence compris entre 0,3 et 10, plus préférentiellement entre 0,5 et 5, encore plus préférentiellement entre 0,7 et 3, encore plus préférentiellement de l'ordre de 1.

Lors de cette étape, il est également possible de traiter les cuticules d'insectes en utilisant une eau d'ébouillantage comportant l'agent oxydant selon les modalités indiquées dans l'étape intermédiaire ci-après.

• **Etape intermédiaire (facultative) : traitement des cuticules par l'agent oxydant**

Il est possible d'introduire dans le procédé une étape spécifique de traitement des cuticules par l'agent oxydant. Avantageusement, cette étape intermédiaire de traitement des cuticules s'effectue entre l'étape 1 d'ébouillantage et l'étape 2 de broyage.

Cette étape intermédiaire s'effectue de préférence avec un agent oxydant choisi parmi le groupe constitué par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le permanganate de potassium ($KMnO_4$), l'ozone (O_3) et l'hypochlorite de sodium ($NaClO$), plus préférentiellement, le peroxyde d'hydrogène.

Selon un premier mode de réalisation, à l'issue de l'étape 1 d'ébouillantage, on

introduit directement dans la cuve d'ébouillantage l'agent oxydant, après éventuel refroidissement de l'eau d'ébouillantage à une température de l'ordre de 40 à 60°C, préférentiellement de l'ordre de 50°C.

Le peroxyde d'hydrogène tel que commercialisé est usuellement sous la forme d'une solution aqueuse, par exemple une solution à 30% en poids sur le poids total d'eau.

La quantité introduite de peroxyde d'hydrogène pour le traitement est telle que la teneur en peroxyde d'hydrogène est comprise entre 1 à 33% en poids sur le poids total d'insectes, préférentiellement, 2 à 12% en poids sur le poids total d'insectes, préférentiellement de l'ordre de 6% en poids.

Selon un second mode de réalisation, les insectes sont retirés de la cuve d'ébouillantage, tamisés et réintroduits dans une cuve.

Le peroxyde d'hydrogène est alors introduit dans la cuve sous la forme d'une solution aqueuse diluée, la teneur en peroxyde d'hydrogène étant alors comprise entre 1 et 33% en poids sur le poids d'eau, préférentiellement, 2 à 12% en poids sur le poids d'eau, préférentiellement de l'ordre de 6% en poids.

- **Etape 2 : broyage**

Les insectes sont retirés de la cuve d'ébouillantage ou de traitement, ils sont ensuite tamisés, et placés dans un broyeur, tel qu'un broyeur mixeur à couteaux, permettant de réduire les insectes en particules.

Afin de faciliter le broyage, une quantité d'eau peut être ajoutée. Cette quantité d'eau est similaire à celle introduite lors de l'étape 1 d'ébouillantage : le ratio du volume d'eau en mL sur le poids en g d'insecte est de préférence compris entre 0,3 et 10, plus préférentiellement entre 0,5 et 5, encore plus préférentiellement entre 0,7 et 3, encore plus préférentiellement de l'ordre de 1. Il est également possible de garder l'eau d'ébouillantage et/ou l'eau de l'étape intermédiaire pour effectuer cette étape. Cette eau est susceptible de contenir l'oxydant. Dans ce cas, le traitement des cuticules peut avoir lieu durant l'étape 1 d'ébouillantage et l'étape 2 de broyage ou pendant l'étape intermédiaire de traitement des cuticules et pendant l'étape de broyage.

De préférence, à l'issue du broyage, la taille des particules d'insectes est inférieure à 1 cm (plus grande taille de particule observable à l'aide d'un microscope), de préférence inférieure à 0,5 cm. Il n'est pas nécessaire de réduire excessivement la taille des particules, par exemple à une taille inférieure à 250 µm.

Cette étape 2 de broyage favorise l'accès des enzymes à leur substrat.

Lors de cette étape, il est possible d'introduire dans le broyeur l'agent oxydant

afin de traiter les cuticules selon les modalités indiquées dans l'étape intermédiaire ci-avant.

Lorsque le traitement des cuticules n'est pas effectué de manière concomitante avec le broyage, il est possible d'ajouter lors de cette étape, des additifs antioxydants
5 communément employés pour la conservation et la stabilité du produit.

- **Etape 3 (facultative) : pressage**

La pâte humide issue de l'étape 2 de broyage est ensuite placée dans une presse selon un mode opératoire qui permet de presser et séparer un jus comportant à la fois une fraction huileuse et une fraction protéique.

10 Si la pâte humide issue de l'étape 2 de broyage a été obtenue avec une eau comportant l'oxydant, il peut être avantageux d'éliminer au moins une partie de cet oxydant avant l'étape 3 de pressage.

Cette étape 3 de pressage peut éventuellement être réalisée avant l'étape 2 de broyage à partir des insectes ébouillantés.

15 Cette étape 3 de pressage permet donc l'obtention d'un jus de presse et d'un gâteau de presse.

- **Etape 4 : hydrolyse enzymatique**

La pâte humide issue de l'étape 2 de broyage ou le gâteau de presse issu de l'étape 3 de pressage est placé dans une cuve d'hydrolyse avec de l'eau.

20 Optionnellement, et comme cela sera décrit ci-après, la fraction protéique issue de l'étape 12 de séparation, peut être réintroduite dans cette étape 4 d'hydrolyse enzymatique, en la mélangeant au gâteau de presse.

De manière optionnelle et dans le cas où l'eau de l'ébouillantage ne contient pas d'oxydant, l'eau de l'ébouillantage peut être récupérée et réintroduite lors de
25 l'étape d'hydrolyse. En effet, cette eau contient des fractions d'insectes solubilisées de par l'action de cet ébouillantage et l'utilisation de celle-ci lors de l'hydrolyse permet de réduire les pertes. Optionnellement, cette eau issue de l'ébouillantage peut être dégraissée, certaines cires pouvant s'être dissoutes dans l'eau.

La quantité d'eau introduite à cette étape 4 d'hydrolyse enzymatique est
30 similaire à celle introduite lors de l'étape 1 d'ébouillantage : le ratio du volume d'eau en mL sur le poids en g d'insecte est de préférence compris entre 0,3 et 10, plus préférentiellement entre 0,5 et 5, encore plus préférentiellement entre 0,7 et 3, encore plus préférentiellement de l'ordre de 1.

L'hydrolyse enzymatique est réalisée avec une protéase, telle qu'une protéase
35 commerciale pendant 4 à 8h, plus particulièrement pendant 4 à 5h, à un pH de 6 à 8,

plus particulièrement de 6,5 à 7,5, à une température de 40 à 60°C, plus particulièrement de 45 à 55°C.

La quantité d'enzymes introduite lors de l'étape d'hydrolyse est inférieure à 10 % en poids sur le poids total de matière sèche estimée entrant en hydrolyse, 5
préférentiellement inférieure à 6%, plus préférentiellement de l'ordre de 2 %.

L'hydrolyse protéolytique engendre la production d'une phase soluble contenant les peptides, glucosamines et oligochitines et d'un résidu solide formé de chitine, principalement de copolymère chitine-polypeptides.

- **Etape 5 : inactivation thermique**

10 Afin de stopper l'activité des enzymes de la réaction et de stabiliser la phase soluble de l'hydrolyse, on réalise une inactivation thermique en chauffant ce jus entre 80 et 105° pendant 10 à 25 min, préférentiellement, 15 à 20 minutes. Selon un mode opératoire, cette étape 5 d'inactivation thermique est réalisée selon les techniques habituelles de stérilisation de l'industrie agroalimentaire. Selon un autre mode 15
opératoire, l'inactivation enzymatique est réalisée par chauffage sous rayonnement IR ou UV, ou micro-ondes.

- **Etape 6 : pressage**

Le résidu solide, majoritairement composé de chitine, est récupéré puis pressé par un presseur afin d'essorer au maximum ce résidu pour réinjecter dans la phase 20
soluble ce pressât. Le résidu pressé ainsi formé est composé essentiellement de chitine, principalement sous la forme de copolymère chitine-polypeptides.

- **Etapes (facultatives) 7 et 8 : lavage et séchage**

Le résidu solide est ensuite lavé, filtré, à nouveau lavé puis séché par les technologies classiques connues par l'homme de métier.

25 Avantageusement, le système de séchage est étudié pour protéger la structure du copolymère de chitine-polypeptides : l'hydrométrie, la ventilation et la composition de l'air sont contrôlés. Avantageusement, le séchage peut s'effectuer dans une étuve ventilée à une température de 60 à 80°C, préférentiellement de l'ordre de 70°C.

Optionnellement, ces étapes peuvent comporter une étape de délipidation 30
terminale : le résidu solide est traité avec du HCl afin d'enlever les derniers résidus lipidiques, notamment les cires cuticulaires.

Les étapes 9 à 11 qui suivent, visent à transformer la chitine en chitosan et ne sont donc mises en œuvre que lorsque le produit souhaité est le chitosan.

- **Etape 9 (facultative) : broyage**

35 Le résidu solide séché, comportant majoritairement de la chitine, est ensuite

broyé, par exemple dans un broyeur à couteaux.

- La production de chitosan à partir de chitine, par la réaction de désacétylation, dépend en grande partie de la taille des particules de chitine. Ainsi un broyage très fin du résidu solide séché avant désacétylation permet d'augmenter significativement les rendements et la vitesse de la réaction de désacétylation, comme cela est illustré dans le Tableau 1 ci-après :

	Broyage 30 s	Broyage 45 s	Broyage 60 s	Broyage 120 s
50% des particules	< 174 μm	< 117 μm	< 95 μm	< 67 μm
90% des particules	< 310 μm	< 244 μm	< 157 μm	< 159 μm
DA*	99%	90%	85%	80%

Tableau 1 : Efficacité de la désacétylation selon le broyage préalable de la chitine

*Mesure du Degré d'Acétylation DA

- Les conditions de la désacétylation effectuée dans l'essai rapporté dans le Tableau 1 sont les suivantes : 4h de réaction, 100°C, NaOH en solution aqueuse à 30% en volume, dans un ratio chitine estimée : solution de NaOH égal à 1:20.

Par conséquent, le résidu solide est préférentiellement broyé à une taille de particules inférieure à 200 μm , plus préférentiellement, inférieure à 160 μm .

15 • **Etape 10 : désacétylation**

- Le résidu solide, éventuellement broyé à l'étape 9, est ensuite placé dans un réacteur où est ajoutée une solution de soude concentrée pendant 4 à 24h, et préférentiellement 6 à 18h. L'hydroxyde de sodium en solution aqueuse à une teneur allant de 30% à 40% est ajouté selon un ratio poids en g de chitine broyée / volume en mL d'hydroxyde de sodium en solution aqueuse compris entre 1:50 à 1:10, de préférence de l'ordre de 1:20. La cuve est ensuite chauffée, la température de désacétylation se situant entre 80 et 150°C, de préférence entre 90 et 120°C et plus préférentiellement à 100°C.

On obtient ainsi du chitosan en poudre.

- Le chitosan peut ensuite subir toute opération connue de l'homme du métier permettant de le fonctionnaliser, notamment par l'ajout de radicaux (carboxylation, hydroxylation...).

• **Etape 11 (facultative) : séchage**

La poudre de chitosan est ensuite séchée entre 30 et 80°C, de préférence entre

50 et 70°C et de préférence à environ 60°C, afin d'obtenir une poudre ayant une teneur en matière sèche supérieure à 85%, plus particulièrement supérieure à 90%.

Les étapes qui suivent visent à récupérer une fraction huileuse et une fraction protéique à partir du jus obtenu à l'étape 3 (facultative) de pressage et ne sont donc mises en œuvre que lorsque l'étape 3 de pressage a été mise en œuvre et qu'une telle récupération est souhaitée.

- **Etape 12 : séparation**

Le jus de presse subit une ou plusieurs étapes de séparation, afin de séparer la fraction huileuse (huiles des insectes) de la fraction protéique (protéines de l'hémolymph des insectes). Ces étapes peuvent être réalisées par toute technologie de séparation des huiles bien connue de l'homme du métier, telle que la centrifugation, la décantation, la séparation par osmose inverse, l'ultrafiltration, le CO₂ supercritique, etc. ou une combinaison de plusieurs de ces technologies.

La séparation de la fraction huileuse peut être complexe, étant donné la présence d'huiles de compositions très différentes chez les insectes, les acides gras pouvant présenter de courtes chaînes (C2-C5) ainsi que de très longues chaînes (par exemple, pour les cires : > C25). La montée en température au-dessus du point de fusion de ces huiles (environ 38°C) lors de la centrifugation permet de solubiliser cette crème et de faciliter la séparation de la fraction huileuse du reste du jus. Le centrifugat passe ensuite en décantation selon un mode opératoire (type décanteur ou tricanteur), afin de séparer au mieux les huiles et les protéines.

Ces étapes permettent ainsi l'obtention d'une fraction huileuse.

La fraction protéique, une fois séparée de la fraction huileuse, peut être mélangée au gâteau de presse issu de l'étape 3 de pressage juste avant l'étape 4 d'hydrolyse. En effet, souvent plus de 20% des protéines sont perdues dans le jus lors de l'étape 3 de pressage, d'où l'intérêt de récupérer cette fraction et de la soumettre à l'étape d'hydrolyse.

- **Etape 13 (facultative) : concentration**

Selon un mode opératoire, la concentration est réalisée par évaporation sous vide de la partie aqueuse. Le concentrât présente un extrait sec supérieur à 10%, de préférence supérieur à 20%. Cette opération facilite le séchage, et des additifs communément employés pour la conservation et la stabilité du produit peuvent être ajoutés à cette étape.

- **Etape 14 (facultative) : séchage**

Le concentrât est enfin séché par des technologies connues de l'homme du

métier, telles que par exemple, par pulvérisation / atomisation (« spray-drying »), qui permet d'obtenir un extrait, c'est-à-dire une poudre sèche de concentrât riche en peptides et glucosamines, les glucosamines étant en particulier issues de l'hydrolyse partielle de la chitine par H_2O_2 (essentiellement).

5 D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans les exemples qui suivent, donnés à titre illustratif, avec référence aux figures, qui représentent respectivement :

- La Figure 1 est un schéma d'un mode de réalisation préférentiel d'un procédé selon l'invention,
- 10 - La Figure 2 est un diagramme comparant le degré de pureté pour la chitine obtenue par un procédé enzymatique avec et sans le peroxyde d'hydrogène,
- La Figure 3 est un diagramme illustrant l'influence du procédé d'extraction (enzymatique ou chimique) et du traitement avec un agent oxydant sur la chitine obtenue.

15

Exemple 1 : Exemple de procédé de traitement selon l'invention

15 g de larves de *T. molitor* sont introduits dans un bécher, placés dans un bain-marie à 100 °C et contenant 30 mL d'une solution de peroxyde d'hydrogène à 6% préalablement portée à ébullition. Après 5 minutes, le bécher est retiré du bain-marie,
20 les larves sont essorées, puis broyées avec un volume d'eau de 15 mL. Le liquide ainsi obtenu est transféré dans un Erlen Meyer de 250 mL contenant 50 mL d'une solution de protéase (Prollyve) à 1%, l'ensemble est placé pendant 4 heures à 45 °C sous agitation magnétique (pH approximativement à 6,5). L'Erlen Meyer est ensuite placé pendant 15 minutes dans un bain-marie à 90 °C afin de désactiver les enzymes,
25 la solution est ensuite filtrée à 0,45-0,5 µm à chaud. La chitine ainsi obtenue est séchée pendant 24 heures à 70 °C. On obtient ainsi $0,6 \pm 0,05$ g de chitine.

Exemple 2 : Influence de la présence du traitement avec l'oxydant dans le procédé selon l'invention

30 25 g de larves de *T. molitor* sont introduits dans un bécher, placé dans un bain-marie à 100 °C et contenant 50 mL d'eau préalablement portée à ébullition. Après 5 minutes, le bécher est retiré du bain-marie, les larves sont essorées, puis broyées avec un volume d'eau de 25 mL. Dans le cas de la réaction avec le peroxyde d'hydrogène, le liquide ainsi obtenu est placé pendant 1 heure en présence d'une

solution de peroxyde d'hydrogène, puis transféré dans un Erlen Meyer de 250 mL contenant une solution de protéase (Sumizyme LP) à 4%, sinon, il est transféré directement dans l'Erlen Meyer contenant la solution de protéase. L'ensemble est placé pendant 4 heures à 45 °C sous agitation magnétique (pH approximativement à 6,5). L'Erlen Meyer est ensuite placé pendant 15 minutes dans un bain-marie à 90 °C afin de désactiver les enzymes, la solution est ensuite filtrée à 0,45-0,5 µm à chaud. La chitine ainsi obtenue est séchée pendant 24 heures à 70 °C.

Le résidu sec ainsi obtenu après utilisation du peroxyde d'hydrogène est de $6,3 \pm 0,7$ % par rapport à la matière sèche initiale, alors que le résidu sec résultant d'un procédé sans le peroxyde d'hydrogène est de $9,75 \pm 0,9$ % par rapport à la matière sèche initiale.

Le degré de pureté de la chitine est déterminé en comparaison de la masse en résidu sec obtenue par rapport à celle résultant d'une extraction chimique, 5 % de la matière sèche initiale. Il s'établit ainsi à $79,9 \pm 9$ % pour le produit obtenu après traitement avec le peroxyde et à $51,5 \pm 4,9$ % en l'absence de peroxyde (voir Figure 2).

Exemple 3 : Influence de la séquence des différentes étapes dans le procédé selon l'invention

Obtention de chitine par voie enzymatique (sans ajout d'oxydant)

50 g de larves de *T. molitor* sont introduits dans un bécher, placé dans un bain-marie à 100 °C et contenant 50 mL d'eau préalablement portée à ébullition. Après 5 minutes, le bécher est retiré du bain-marie, les larves sont essorées, puis broyées avec un volume d'eau de 100 mL. Le liquide ainsi obtenu est transféré dans un Erlen Meyer de 500 mL contenant 150 mL d'une solution de protéase (Prolyve) à 1%, l'ensemble est placé pendant 4 heures à 45 °C sous agitation magnétique (pH approximativement à 6,5). L'Erlen Meyer est ensuite placé pendant 15 minutes dans un bain-marie à 90 °C afin de désactiver les enzymes, la solution est ensuite filtrée à 0,45-0,5 µm à chaud. La chitine ainsi obtenue est séchée pendant 24 heures à 70 °C. On obtient ainsi $1,656 \pm 0,021$ g de chitine par ce procédé.

Obtention de chitine par voie enzymatique avec ajout de H₂O₂ pendant l'ébouillantage

50 g de larves de *T. molitor* sont introduits dans un bécher, placé dans un bain-marie à 100 °C et contenant 50 mL d'une solution de H₂O₂ à 6% dans l'eau, préalablement portée à ébullition. Après 5 minutes, le bécher est retiré du bain-marie, les larves sont essorées, puis mixées avec un volume d'eau de 100 mL. Le liquide

ainsi obtenu est transféré dans un Erlen Meyer de 500 mL contenant 150 mL d'une solution de protéase (Prolyve) à 1%, l'ensemble est placé pendant 4 heures à 45 °C sous agitation magnétique. L'Erlen Meyer est ensuite placé pendant 15 minutes dans un bain-marie à 90 °C afin de désactiver les enzymes, la solution est ensuite filtrée à 0,45-0,5 µm à chaud. La chitine ainsi obtenue est séchée pendant 24 heures à 70 °C. On obtient ainsi $1,98 \pm 0,22$ g de chitine par ce procédé.

Obtention de chitine par voie enzymatique avec ajout de H₂O₂ après hydrolyse

50 g de larves de *T. molitor* sont introduits dans un bécher, placé dans un bain-marie à 100 °C et contenant 50 mL d'eau préalablement portée à ébullition. Après 5 minutes, le bécher est retiré du bain-marie, les larves sont essorées, puis broyées avec un volume d'eau de 100 mL. Le liquide ainsi obtenu est transféré dans un Erlen Meyer de 500 mL contenant 150 mL d'une solution de protéase (Prolyve) à 1%, l'ensemble est placé pendant 4 heures à 45 °C sous agitation magnétique (pH approximativement à 6,5). L'Erlen Meyer est ensuite placé pendant 15 minutes dans un bain-marie à 90 °C afin de désactiver les enzymes, la solution est ensuite filtrée à 0,45-0,5 µm à chaud. Le résidu est alors placé pendant 1 heure à 65 °C dans une solution de H₂O₂ à 6%. La chitine ainsi obtenue est filtrée (0,45-0,5 µm), puis séchée pendant 24 heures à 70 °C. On obtient ainsi $1,304 \pm 0,091$ g de chitine par ce procédé.

Obtention de chitine par voie chimique

50 g de larves de *T. molitor* sont introduits dans un bécher, placé dans un bain-marie à 100 °C et contenant 50 mL d'eau préalablement portée à ébullition. Après 5 minutes, le bécher est retiré du bain-marie, les larves sont essorées, puis broyées avec un volume d'eau de 60 mL. Le liquide ainsi obtenu est transféré avec 50 mL d'eau dans un flacon de 1 L. On y ajoute 500 mL de HCl 1M et on place l'ensemble sous agitation pendant 1 heure à 90 °C. Le milieu réactionnel est ensuite filtré et lavé avec de l'eau jusqu'à obtention de résidu clair. Ce résidu est ensuite transféré dans un flacon de 1 L auquel on ajoute 500 mL de NaOH 1M et on maintient le tout sous agitation à 90 °C pendant 24 heures. Le milieu réactionnel est alors filtré et lavé jusqu'à l'obtention d'un filtrat clair, le résidu est finalement séché 24 heures à 70 °C. On obtient ainsi $0,944 \pm 0,005$ g de chitine par ce procédé.

Détermination (par viscosimétrie) de la masse moléculaire de la chitine obtenue

Un flacon contenant 1 g de chitine et 10 mL de NaOH 1M est placé pendant

4 heures à 90 °C. Le mélange est ensuite filtré (0,45-0,5 µm) et le résidu ainsi lavé est placé 24 heures à 70 °C.

La préparation du solvant : 5 g de LiCl sont placés dans 100 mL de N,N-diméthylacétamide, sous agitation et pendant 4-5 heures (jusqu'à complète dissolution).

La solution-mère est obtenue en dissolvant 0,2 mg de chitine dans 1 mL de solvant. A partir de cette solution-mère, des solutions-filles, avec des concentrations de 0,1 mg/mL, 0,08 mg/mL et 0,04 mg/mL, sont préparées. La viscosité de ces différentes solutions est ensuite mesurée en triplicata avec un viscosimètre de type Ostwald et la masse moléculaire est calculée suivant la formule :

$$[\eta] = KM_w^\alpha \quad (1)$$

avec

$[\eta]$: viscosimétrie intrinsèque en cm³/g,

M_w : masse molaire de la chitine en g/mol (ou Da), et

les coefficients de Mark-Houwink $\alpha = 0,71$ et $K = 0,000893$,

la viscosité intrinsèque étant obtenue selon :

$$[\eta] = \eta_r / C \quad (2)$$

avec

η_r : viscosité réduite (sans unités),

C : concentration en mg/mL,

la viscosité réduite étant obtenue selon :

$$\eta_r = t/t_0 \quad (3)$$

avec

t : le temps de chute mesuré pour la solution en s,

t₀ : le temps de chute mesuré pour le solvant en s.

Il peut être observé sur la Figure 3 que la taille de la molécule de la chitine obtenue est fonction de la méthode d'extraction utilisée. Ainsi, la méthode chimique endommage l'intégrité de la molécule (M_w obtenue est inférieure à 70000 g/mol), mais le traitement le plus drastique est celui qui consiste à blanchir la chitine par le peroxyde d'hydrogène après hydrolyse, même enzymatique (M_w inférieure à 9000 g/mol).

Le procédé selon l'invention (hydrolyse enzymatique avec l'ajout du peroxyde d'hydrogène pendant ou juste après l'ébullition, c'est-à-dire en début du procédé), certes, diminue la taille de la molécule par rapport à celle que l'on peut trouver initialement dans l'insecte (M_w de la chitine par hydrolyse enzymatique simple est de 130000 g/mol), mais dans une bien moindre mesure (M_w de près de 80000 g/mol)

et le résultat obtenu est supérieur à celui lié à l'extraction chimique traditionnelle.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de production de chitine et/ou de chitosan à partir de cuticules d'insectes, comportant les étapes suivantes :
 - (i) le traitement des cuticules d'insectes avec un agent oxydant, puis,
 - 5 (ii) l'hydrolyse enzymatique des cuticules d'insectes par une enzyme protéolytique.
2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel l'enzyme protéolytique est une protéase.
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, dans lequel l'agent oxydant est choisi
 10 parmi le groupe constitué par le peroxyde d'hydrogène, le permanganate de potassium, l'ozone et l'hypochlorite de sodium.
4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, comportant une étape d'abattage des insectes.
5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, comportant une
 15 étape de broyage des insectes.
6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans lequel l'agent oxydant est le peroxyde d'hydrogène.
7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans lequel le ou les insecte(s) est/sont choisi(s) parmi le groupe constitué par les coléoptères, les
 20 lépidoptères, les orthoptères et les diptères.
8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 7, dans lequel la protéase est choisie parmi le groupe constitué par les aminopeptidases, les métallocarboxypeptidases, les endopeptidases sérine, les endopeptidases cystéine, les endopeptidases aspartiques, les métalloendopeptidases.
9. Procédé de production de chitine à partir d'insectes, comportant les étapes
 25 suivantes :
 - a) l'abattage des insectes,
 - b) le broyage des insectes, le broyage étant éventuellement précédé ou suivi d'une étape de pressage,
 - 30 c) l'hydrolyse enzymatique des cuticules d'insectes par une enzyme protéolytique,
 - d) la récupération de la chitine,
 - les cuticules d'insectes étant traitées avec un agent oxydant, avant l'étape c).
10. Chitine susceptible d'être obtenue par un procédé selon l'une quelconque des
 35 revendications 1 à 9.

11. Procédé de production de chitosan à partir d'insectes, comportant les étapes suivantes :

- a) l'abattage des insectes,
 - b) le broyage des insectes, le broyage étant éventuellement précédé ou suivi d'une étape de pressage,
 - c) l'hydrolyse enzymatique des cuticules d'insectes par une enzyme protéolytique,
 - d) la récupération de la chitine,
 - e) la désacétylation de la chitine récupérée,
 - f) la récupération du chitosan,
- les cuticules d'insectes étant traitées avec un agent oxydant, avant l'étape c).

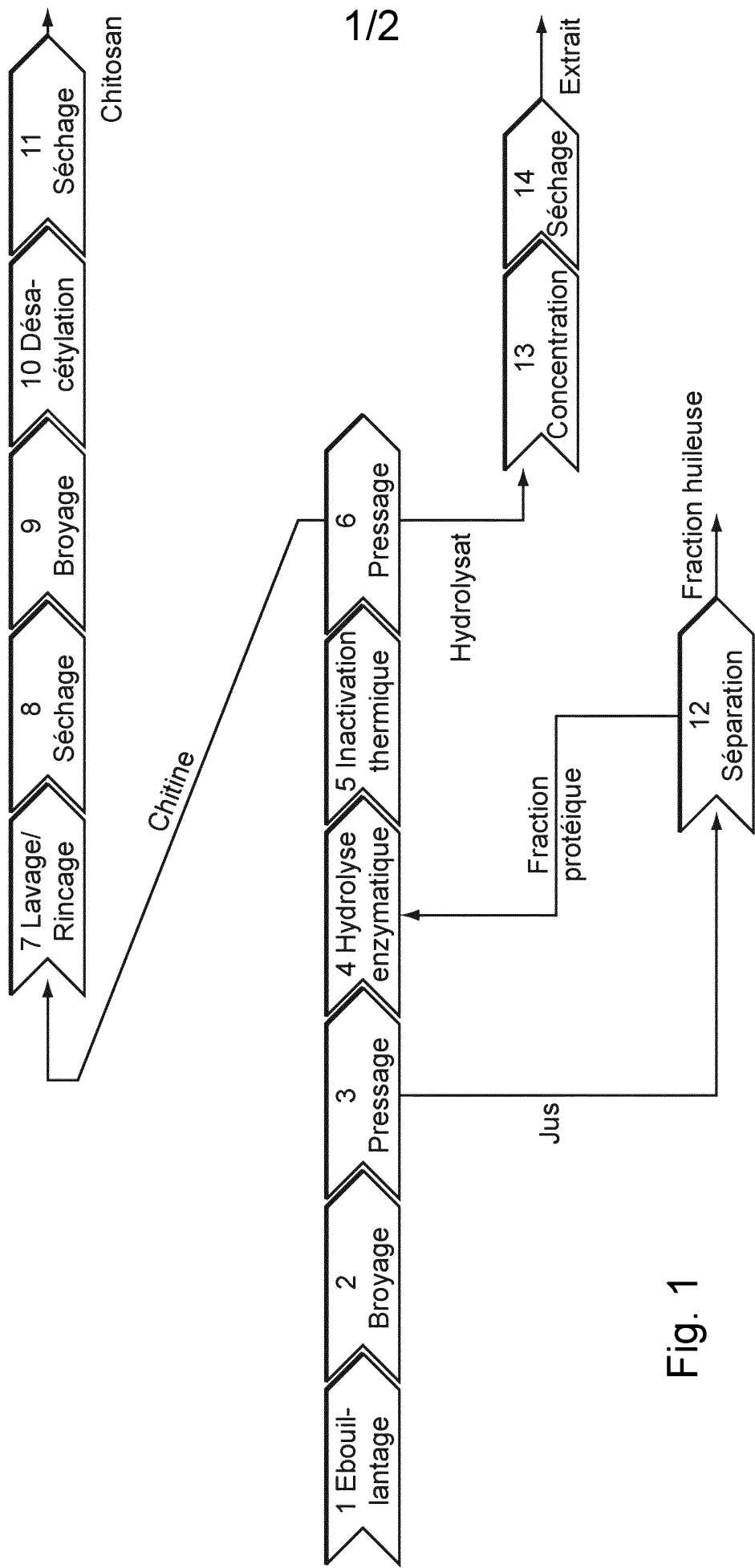


Fig. 1

2/2

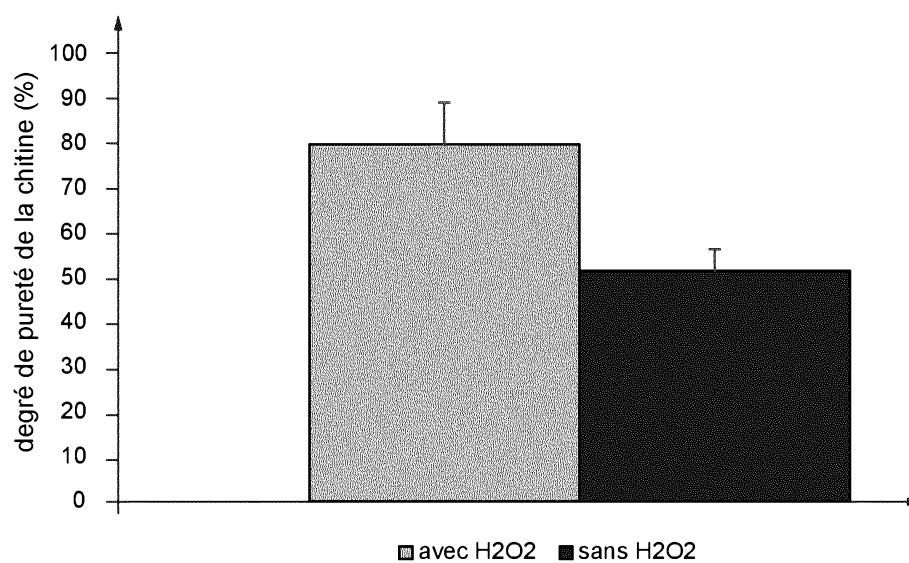


Fig. 2

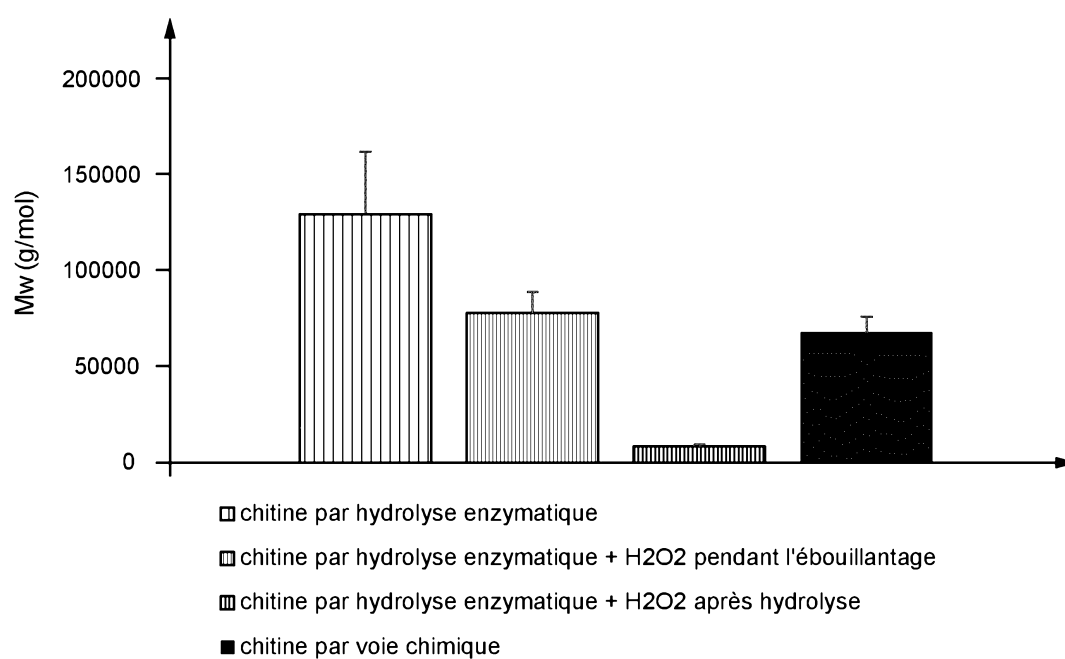


Fig. 3

RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-17 et R.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveau) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ÉTABLISSEMENT DU PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

- ☒ Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.
- ☒ Le demandeur a maintenu les revendications.
- ☐ Le demandeur a modifié les revendications.
- ☐ Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.
- ☐ Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.
- ☐ Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITÉS DANS LE PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

- ☒ Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.
- ☒ Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.
- ☐ Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.
- ☐ Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION

WO 2012/168618 A1 (IFREMER [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; UNIV NANTES [FR]; LE ROUX K)
13 décembre 2012 (2012-12-13)

S. V. NEMTSEV ET AL: "Isolation of Chitin and Chitosan from Honeybees", APPLIED BIOCHEMISTRY AND MICROBIOLOGY, vol. 40, no. 1, 1 janvier 2004 (2004-01-01), pages 39-43, XP055221293, US ISSN: 0003-6838, DOI: 10.1023/B:ABIM.0000010349.62620.49

CN 102 898 544 A (NANJING DADI REFRIGERATION FOOD CO LTD)
30 janvier 2013 (2013-01-30)

2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL

LAILA MANNI ET AL: "An Oxidant- and Solvent-Stable Protease Produced by Bacillus cereus SV1: Application in the Deproteinization of Shrimp Wastes and as a Laundry Detergent Additive", APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 160, no. 8, 1 avril 2010 (2010-04-01), pages 2308-2321, XP055221571, United States
ISSN: 0273-2289, DOI: 10.1007/s12010-009-8703-z

MARÍA CECILIA GORTARI ET AL: "Biotechnological processes for chitin recovery out of crustacean waste: A mini-review", EJB ELECTRONIC JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 16, no. 3, 15 mai 2013 (2013-05-15), pages 1-18, XP055221276, CL
ISSN: 0717-3458, DOI: 10.2225/vol16-issue3-fulltext-10

Nitar Nwe ET AL: "Chitin and Chitosan from Terrestrial Organisms" In: "Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives: Biological Activities and Applications", 1 octobre 2010 (2010-10-01), CRC Press, XP055221223,
ISBN: 978-1-4398-1603-5 pages 3-10,

Wolfram M Brück ET AL: "Chitin and Chitosan from Marine Organisms" In: "Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives: Biological Activities and Applications", 1 octobre 2010 (2010-10-01), CRC Press, XP055221232,
ISBN: 978-1-4398-1603-5 pages 11-23,

Gyung-Hyun Jo ET AL: "Enzymatic Production of Chitin from Crustacean Shell Waste" In: "Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives: Biological Activities and Applications", 1 octobre 2010 (2010-10-01), CRC Press, XP055221243,
ISBN: 978-1-4398-1603-5 pages 37-45,

N° d'enregistrement national : 1463511

N° de publication : 3031114

**3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND
DE LA VALIDITE DES PRIORITES**

NEANT