

(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
7 juillet 2016 (07.07.2016)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2016/108033 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C12P 19/26 (2006.01) C12P 21/06 (2006.01)
C08B 37/08 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2015/053781

(22) Date de dépôt international :
30 décembre 2015 (30.12.2015)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1463512 31 décembre 2014 (31.12.2014) FR

(71) Déposant : YNSECT [FR/FR]; 1 Rue Pierre Fontaine,
91058 Evry Cedex (FR).

(72) Inventeurs : **BEREZINA, Nathalie**; 5 rue Basse des
Carnes, 75005 Paris (FR). **HUBERT, Antoine**; 13 chemin
Latéral, 94140 Alfortville (FR). **BERRO, Fabrice**; 15 rue
Jean-Jacques Rousseau, 75001 Paris (FR). **LEVON, Jean-
Gabriel**; 102 boulevard Richard Lenoir, 75011 Paris (FR).
LE ROUX, Karine; 1 chemin de Chambergeot, 91490
Milly La Foret (FR). **SOCOLSKY, Cecilia**; 88 boulevard
de l'Hôpital, 75013 Paris (FR). **SANCHEZ, Lorena**; 14
Avenue de la Terrasse Batiment A, 91260 Juvisy (FR).
LAURENT, Sophie; 12 rue Domrémy, 75013 Paris (FR).

(74) Mandataire : **SANTARELLI**; 49 avenue des Champs-E-
lysées, 75008 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR,
KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, SA, 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, ST, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))

Publiée :

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

(54) Title : CHITIN, HYDROLYSATE AND METHOD FOR THE PRODUCTION OF ONE OR MORE DESIRED PRODUCTS FROM INSECTS BY MEANS OF ENZYMATIC HYDROLYSIS

(54) Titre : CHITINE, HYDROLYSAT ET PROCÉDÉ DE PRODUCTION DE PRODUIT(S) D'INTÉRÊT À PARTIR D'INSECTES PAR HYDROLYSE ENZYMATIQUE

(57) Abstract : The invention relates to chitin, a hydrolysate and a method for the production of at least one desired product from insects. More specifically, the invention relates to a method for the production of at least one desired product from insects, comprising an insect cuticle pressing step, followed by the enzymatic hydrolysis of the insect cuticles using a proteolytic enzyme.

(57) Abrégé : La présente invention concerne de la chitine, un hydrolysate et un procédé de production d'au moins un produit d'intérêt à partir d'insectes. Plus particulièrement, la présente invention concerne un procédé de production d'au moins un produit d'intérêt à partir d'insectes, comportant une étape de pressage des cuticules d'insectes, puis l'hydrolyse enzymatique des cuticules d'insectes par une enzyme protéolytique.



WO 2016/108033 A1

**CHITINE, HYDROLYSAT ET PROCEDE DE PRODUCTION DE PRODUIT(S)
D'INTERET A PARTIR D'INSECTES PAR HYDROLYSE ENZYMATIQUE**

5 La présente invention concerne un procédé de production d'au moins un produit d'intérêt à partir d'insectes. Plus particulièrement, l'invention concerne un procédé de production de chitine et/ou de chitosan par hydrolyse enzymatique de cuticules d'insectes. Elle vise également une chitine spécifique et un hydrolysate.

 Selon l'invention, par « chitine », on entend tout type de dérivé chitinique, c'est-
10 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 »).

 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
15 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.

 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
20 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.

 Les applications de la chitine et/ou du chitosan sont nombreuses: cosmétique (composition cosmétique), médicale et pharmaceutique (composition pharmaceutique,
25 traitement des brûlures, biomatériaux, pansements cornéens, fils chirurgicaux), diététique et alimentaire, technique (agent filtrant, texturant, floculant 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.

 L'extraction traditionnelle de la chitine s'effectue par voie chimique à partir de
30 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 effectuant une étape de traitement mécanique préalable à l'hydrolyse, à savoir une étape de pressage des cuticules d'insectes.

L'invention concerne donc un procédé de production d'au moins un produit d'intérêt à partir d'insectes, comportant les étapes suivantes :

- (i) le pressage des cuticules d'insectes, puis,
- (ii) l'hydrolyse enzymatique des cuticules d'insectes par une enzyme protéolytique.

Par « produit d'intérêt », on entend plus particulièrement la chitine et/ou le chitosan et/ou un hydrolysate.

Par « hydrolysate », 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.

Le ou les produit(s) d'intérêt sont obtenus à partir d'insectes. 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 isoptères, les orthoptères, 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*, *Tribolium castaneum*, *Rhynchophorus ferrugineus*, *Musca domestica*, *Chrysomya megacephala*, *Locusta migratoria*, *Schistocerca gregaria*, *Acheta domesticus* et *Samia ricini*.

Plus 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 domesticus* 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. 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 contrôler la qualité de l'approvisionnement en insectes et de limiter les coûts d'approvisionnement.

Par « cuticules d'insectes », on vise non seulement les cuticules une fois celles-ci séparées des insectes, mais également les cuticules incluant tout ou partie des autres constituants de l'insecte, y compris 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 les exuvies et/ou les mues d'insectes, séparées naturellement 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 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
- l'endocuticule, qui est une couche fine, flexible, constituée d'un mélange de protéines et de chitine.

Le pressage des cuticules d'insectes a pour objectif principal d'éliminer un jus de presse riche en matière grasse et/ou d'enrichir le gâteau de presse en substrat pour l'hydrolyse.

Dans le procédé selon l'invention, le pressage des cuticules d'insectes permet d'obtenir un gâteau de presse comportant une teneur en huile (ou lipides) inférieure ou égale à 20%, préférentiellement, inférieure ou égale à 15%, plus préférentiellement, inférieure ou égale à 12%, encore plus préférentiellement, inférieure ou égale à 10%.

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.

Par ailleurs, afin d'enrichir le gâteau de presse en substrat pour l'hydrolyse, le pressage des cuticules d'insectes permet d'obtenir un gâteau de presse présentant une teneur en matière sèche comprise entre 30% et 60%, préférentiellement, comprise entre 40% et 55%, et plus préférentiellement comprise entre 45% et 50%.

Tout système de presse peut être utilisé pour réaliser le pressage des cuticules d'insectes, tel que par exemple, une presse mono-vis ou bi-vis (presse bi-vis de type Angel), un filtre-pressé (filtre-pressé de type Choquet), une presse à plateaux, etc. Ces systèmes sont bien connus de l'homme du métier qui est à même de déterminer les conditions de pressage afin d'obtenir les teneurs en huile et/ou en eau mentionnées ci-avant.

Dans le procédé selon l'invention, le pressage des cuticules d'insectes est suivi d'une hydrolyse enzymatique.

De préférence, 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.

- 5 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
Papaïne	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	Métallo-endo-	EC	Bio-Cat	Troy	Etats-Unis

Enzyme(s)	Classe	Numéro EC	Fournisseur	Ville	Pays
protéase	peptidase	3.4.24.28			
Protex 50FP	Endo-peptidase	EC 3.4.21	Genencor International B.V.	Leiden	Pays-Bas
Pancrealyve	Exo & endo peptidase (cocktail protéases + amylases)	n.a.*	Lyven	Colombelles	France
Izyme BA	Protéase aspartique	EC 3.4.23	Novozyme	Bagsvaerd	Danemark
Sumizyme	Cocktail enzymatique	n.a.*	Takabio – Shin Nihon	Aichi	Japon
Neutrase	Endoprotéase base de Zn de β amyloliquefaciens	EC 3.4.24	Novozyme	Bagsvaerd	Danemark
Novozyme 37071	Protéase	n.a.*	Novozyme	Bagsvaerd	Danemark

*n.a. : non applicable

Avantageusement, l'enzyme mise en œuvre lors de l'hydrolyse est une endo-peptidases aspartique, telle que la Prolyve NP. Ce type d'enzyme permet d'obtenir de très bons résultats en terme de pureté de la chitine obtenue, en particulier lorsque ce type d'enzyme est appliqué à l'hydrolyse d'un gâteau de presse obtenu à partir de coléoptères et plus particulièrement de *T. molitor*.

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.

En termes d'activité enzymatique, la quantité d'enzyme ou de mélange d'enzymes introduite est équivalente à une activité comprise entre 2000 et 5000 SAPU (« *Spectrophotometric Acid Protease Unit* », décrit dans l'Exemple 5 ci-après), de préférence comprise entre 3000 et 4000 SAPU, pour 100 g en poids humide, avec une humidité de 30 à 70%, de substrat à transformer, c'est-à-dire de matière d'insectes ou

de partie(s) d'insectes hydratée.

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. 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 procédé selon l'invention permet l'obtention d'une chitine ayant un degré de pureté (ou pureté gravimétrique) compris entre 40 et 90%, préférentiellement entre 50 et 90%, plus préférentiellement compris entre 60 et 85%, et encore plus préférentiellement de l'ordre de 80% (voir l'Exemple 2 et la Figure 2).

De plus, le procédé selon l'invention permet l'obtention d'un hydrolysât présentant un certain nombre de propriétés avantageuses, en particulier en terme de digestibilité, de teneur en lipides et/ou protéines, de taille de protéine ou de composition en acides aminés.

De préférence, le procédé selon l'invention comporte une étape de broyage préalable à l'étape de pressage.

Un mode particulièrement préféré de l'invention concerne donc un procédé de production d'au moins un produit d'intérêt à partir d'insectes, comportant les étapes suivantes :

- (i) le broyage des cuticules d'insectes,
- (ii) le pressage des cuticules d'insectes, puis
- (iii) l'hydrolyse enzymatique des cuticules d'insectes par une enzyme protéolytique.

Cette étape de broyage a pour objectif de réduire les cuticules et/ou 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 l'élimination du jus de presse et l'isolation de la matière solide.

Cette étape de broyage permet également d'améliorer la répartition des lipides issus de l'insecte entre le gâteau de presse et le jus de presse issus du pressage. En effet, comme cela est illustré en Figure 4, le gâteau de presse issu d'un procédé comportant à la fois broyage et pressage présente une teneur en lipides réduite en

comparaison avec un gâteau de presse d'un procédé comportant uniquement un pressage.

Plus particulièrement, dans le procédé selon l'invention, le broyage et le pressage des cuticules d'insectes permet d'obtenir un gâteau de presse comportant
5 une teneur en lipides (ou huile) inférieure ou égale à 15%, préférentiellement, inférieure ou égale à 12%, encore plus préférentiellement, inférieure ou égale à 10%.

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
10 inférieure à 1 cm (plus grande taille de particule observable à l'aide d'un microscope), de préférence inférieure à 0,5 cm, plus préférentiellement encore, une taille comprise entre 300 μm et 0,5 cm, préférentiellement 500 μm et 0,5 cm et encore plus préférentiellement entre 500 μm et 1 mm.

Afin de faciliter le broyage, une quantité d'eau peut être ajoutée. Cette quantité
15 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 0,5 et 5, encore plus préférentiellement entre 0,7 et 3, encore plus préférentiellement de l'ordre de 1.

Avantageusement, le procédé selon l'invention comporte également une étape
20 d'abattage des insectes préalable à l'étape de pressage et/ou de broyage.

Cette 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. Avantageusement, l'étape d'abattage des insectes est effectuée par ébullition.
25 L'ébullition permet non seulement d'abattre les insectes, mais également d'abaisser la charge microbienne (réduction du risque d'altération et sanitaire) et d'inactiver les enzymes internes des insectes pouvant déclencher une autolyse, et ainsi un brunissement rapide de ceux-ci. Cet ébullition est réalisé de manière à provoquer la mort le plus rapidement possible, dans le respect du bien-être animal, et
30 selon les préconisations scientifiques.

Alternativement, l'abattage peut être effectué par blanchiment. Le blanchiment présente les mêmes avantages cités ci-avant que l'ébullition.

Avantageusement, les insectes sont abattus, par exemple par ébullition ou blanchiment, puis broyés avant d'être pressés.

35 De préférence, l'étape d'ébullition 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.

La quantité d'eau introduite à cette étape d'ébullition 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.

Alternativement, l'étape de blanchiment est réalisée à la vapeur d'eau et/ou à l'eau à une température comprise entre 80°C et 130°C, de préférence entre 90°C et 120°C.

Le procédé selon l'invention peut comporter, en outre, une étape de traitement des cuticules des insectes par un agent oxydant préalablement à l'hydrolyse enzymatique.

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, 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, entre 2 et 12% en poids sur le poids total d'insectes, préférentiellement de l'ordre de 6% en poids.

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.

Le traitement des cuticules d'insectes avec l'agent oxydant peut être effectué pendant l'une ou plusieurs des étapes ci-après :

- concomitamment avec l'ébullition et/ou après l'étape d'ébullition, plus préférentiellement concomitamment avec l'ébullition. Alternativement, concomitamment avec le blanchiment et/ou après l'étape de blanchiment, plus préférentiellement concomitamment avec le blanchiment. Plus particulièrement, lorsque le traitement des cuticules d'insectes est effectué pendant l'ébullition ou le blanchiment, l'agent oxydant peut être avantageusement ajouté à l'eau utilisée pour

ébouillanter les insectes.

- avant, concomitamment et/ou après le broyage. Plus particulièrement, lorsque le traitement des cuticules d'insectes est effectué pendant le broyage, l'agent oxydant peut être avantageusement ajouté à l'eau utilisée pour le broyage.

- 5 - avant et/ou concomitamment avec le pressage.
 - lors d'une étape spécifique de traitement des cuticules d'insectes.

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 œuvre lors de l'hydrolyse enzymatique.

- 10 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 de la chitine est également récupéré, à savoir un hydrolysate.

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

- 15 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, un second broyage peut également être réalisé. Celui-ci peut également être effectué
20 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.

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

- 25 a) l'abattage des insectes,
 b) le broyage des insectes,
 c) le pressage des insectes,
 d) l'hydrolyse enzymatique des cuticules d'insectes par une enzyme protéolytique,
30 e) la récupération de la chitine,
 les cuticules d'insectes pouvant optionnellement être traitées avec un agent oxydant avant l'étape d).

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

L'invention concerne également une chitine, telle qu'une chitine susceptible d'être obtenue par un procédé selon l'invention. Grâce aux conditions douces employées dans le 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 tout
5 en ayant un haut degré de pureté, tel qu'un degré de pureté compris entre 40 et 90%, préférentiellement entre 50 et 90%, plus préférentiellement compris entre 60 et 85%, et encore plus préférentiellement de l'ordre de 80%.

La chitine selon l'invention présente au moins l'une quelconque des propriétés avantageuses suivantes :

- 10 - un taux de cendre inférieur à 4%, préférentiellement inférieur à 3,5%, plus préférentiellement inférieur ou égal à 2,5% (en particulier lorsque la chitine est préparée à partir d'insectes végétariens), plus préférentiellement inférieur à 2%, et encore plus préférentiellement inférieur ou égal à 1,5% (en particulier lorsque la chitine est préparée à partir de *T. molitor*), et encore plus préférentiellement
15 inférieur à 1% en poids sur le poids total de matière sèche,
- degré de pureté (ou pureté gravimétrique) compris entre 40 et 90%, préférentiellement entre 50 et 90%, plus préférentiellement compris entre 60 et 85%, et encore plus préférentiellement de l'ordre de 80%,
- une abondance fonctionnelle en surface présentant un ratio (C-O)/(C-H)
20 compris entre 0,30 et 0,56, préférentiellement, entre 0,31 et 0,53,
- Taux de lipides $\leq 14\%$ en poids total sur le poids total de matière sèche,
- Taux de lipides $\leq 5\%$ lorsque la chitine est préparée à partir d'insectes non volants,
- Total des acides aminés $\leq 45\%$,
- 25 - Total des acides aminés $\leq 16\%$ lorsque la chitine est préparée à partir d'insectes volants,
- Taux d'abondance relative de au moins 3 quelconque acides aminés parmi ALA, GLY, LEU, PRO, SER, TYR, VAL $\leq 10\%$,
- Taux d'abondance relative de LEU, PRO, VAL $\leq 10\%$ lorsque la chitine est
30 préparée à partir de *T. molitor*,
- Taux d'abondance relative de ALA $\leq 12\%$ lorsque la chitine est préparée à partir de *T. molitor*,
- Pureté colorimétrique $\geq 40\%$,
- Pureté colorimétrique $\geq 50\%$ lorsque la chitine est préparée avec l'enzyme
35 prolyse NP lors de l'hydrolyse enzymatique,

- Pureté par différence $\geq 45\%$, préférentiellement $\geq 49\%$,
 - Pureté par différence $\geq 52\%$ lorsque la chitine est préparée à partir de *T. molitor*,
 - Pureté par différence $\geq 70\%$ lorsque la chitine est préparée à partir d'insectes volants,
- 5 - Degré d'acétylation $\geq 70\%$ et degré de cristallinité $\leq 0,61$,
- Degré d'acétylation $\geq 70\%$ et degré de cristallinité $\geq 0,42$.

La chitine comporte un taux d'acides aminés inférieur ou égal à 45%, un taux de cendres inférieur ou égal à 3,5%, préférentiellement inférieur ou égal à 2,5%, et une pureté par différence supérieure ou égale à 45%, préférentiellement supérieure ou

10 égale à 49%.

De préférence, la chitine présente toutes les propriétés ci-avant.

Toutes les unités et méthodes de mesure des caractéristiques indiquées ci-avant sont décrites dans les Exemples et, plus particulièrement, dans l'Exemple 5.

Un procédé particulièrement avantageux de production d'un hydrolysate à partir

15 d'insectes, comportant les étapes suivantes :

- a) l'abattage des insectes,
 - b) le broyage des insectes,
 - c) le pressage des insectes,
 - d) l'hydrolyse enzymatique des cuticules d'insectes par une enzyme
- 20 protéolytique,
- e) la récupération de l'hydrolysate,
- les cuticules d'insectes pouvant optionnellement être traitées avec un agent oxydant avant l'étape d).

Les modes de réalisation préférés des diverses étapes a) à e) ainsi que le

25 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 un hydrolysate, tel qu'un hydrolysate susceptible d'être obtenu par un procédé selon l'invention.

L'hydrolysate selon l'invention présente au moins l'une quelconque des

30 propriétés avantageuses suivantes :

- un taux de cendre inférieur à 4%, préférentiellement inférieur à 3% en poids (en particulier lorsque l'hydrolysate est préparé à partir d'insectes végétariens) sur le poids total de matière sèche,
 - une excellente digestibilité, en particulier une digestibilité pepsique, supérieure
- 35 à 95%, préférentiellement supérieure ou égale à 96% et plus préférentiellement

supérieure ou égale à 98%, et plus particulièrement supérieure ou égale à 99%, la digestibilité pepsique ayant été mesurée selon une méthode conforme à la directive 72/188/EEC ;

- 5 - une teneur en protéines/peptides supérieure ou égale à 70%,
préférentiellement supérieure ou égale à 71%, et plus préférentiellement
supérieure ou égale à 75%, et plus préférentiellement supérieure ou égale à
80% (en particulier, lorsque l'hydrolysate est préparé à partir d'insectes non
volant) ;
- 10 - une teneur en protéines hydrosolubles présentant une taille supérieure à
12400 g/mol, inférieure à 20%, de préférence, inférieure à 18% en poids sur le
poids total de protéines hydrosolubles ;
- une teneur en lipides inférieure à 14%, préférentiellement inférieure à 10%, plus
préférentiellement inférieure ou égale à 5% (en particulier lorsque l'hydrolysate
est préparé à partir d'insectes non volants), plus préférentiellement inférieure
15 ou égale à 2%, et encore plus préférentiellement inférieure ou égale à 1% ;
- une composition dans laquelle les acides aminés les plus abondants sont la
proline, l'alanine, la leucine, l'acide aspartique, la glutamine et/ou la valine. Par
« plus abondant », on entend une quantité relative de l'acide aminé dans la
composition supérieure à 5%, préférentiellement supérieure à 7% en poids sur
20 le poids total d'acides aminés. La forte teneur en proline s'avère
particulièrement intéressante ;
- Taux d'abondance relative de au moins 5 quelconques acides aminés choisis
parmi ASP, GLU, ALA, GLY, LEU, PRO, TYR, VAL, LYS $\geq 6\%$;
- Taux d'abondance relative de au moins 3 quelconques acides aminés choisis
25 parmi ASP, GLU, ALA, LEU, PRO, TYR, VAL $\geq 8\%$.

Plus particulièrement, par « protéines hydrosolubles », on entend, parmi les protéines (ou protéines brutes), celles qui sont solubles dans une solution aqueuse dont le pH est compris entre 6 et 8, avantageusement entre 7,2 et 7,6.

De préférence, la solution aqueuse est une solution tampon dont le pH est
30 compris entre 6 et 8, avantageusement entre 7,2 et 7,6.

Préférentiellement, la solution tampon est une solution phosphate NaCl, dont le pH est égale à $7,4 \pm 0,2$.

L'hydrolysate comporte au moins 40% de protéines, au maximum 10%
préférentiellement au maximum 8% de cendres, et un taux de protéines hydrosolubles
35 ayant une taille supérieure à 12400 g/mol inférieure à 50%, préférentiellement inférieure

à 43%.

Par « insecte végétarien », on vise un insecte qui n'a pas de protéines animales dans son régime alimentaire habituel. A titre d'exemple d'insecte végétarien, on peut citer les coléoptères, les lépidoptères ou les orthoptères.

5 Par « insecte volant », on vise un insecte qui est capable de voler à l'âge adulte, contrairement à un insecte dit « non volant ». A titre d'exemple d'insecte volant, on peut citer les lépidoptères ou les diptères. A titre d'exemple d'insecte non volant, on peut citer les coléoptères ou les orthoptères.

10 Toutes les unités et méthodes de mesure des caractéristiques indiquées ci-avant sont décrites dans les Exemples et, plus particulièrement, dans l'Exemple 5.

De préférence, l'hydrolysate présente toutes les propriétés ci-avant.

On notera en particulier que l'hydrolysate selon l'invention peut être distingué de tout autre type d'hydrolysate par sa teneur en glucosamine, et/ou l'un de ses dérivés (préférentiellement N-acétyl-glucosamine), plus particulièrement une teneur supérieure
15 ou également à 0,01%, préférentiellement supérieure ou égale à 0,08% en poids sur le poids total de matière sèche de l'hydrolysate.

Dans la présente demande, toute référence à un règlement ou à une directive concerne ledit règlement ou ladite directive telle qu'en vigueur à la date de dépôt de la présente demande.

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

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

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

- a) l'abattage des insectes,
- 30 b) le broyage des insectes,
- c) le pressage des insectes,
- d) l'hydrolyse enzymatique des cuticules d'insectes par une protéase,
- e) la récupération de la chitine,
- f) la désacétylation de la chitine récupérée,
- 35 g) la récupération du chitosan,

les cuticules d'insectes pouvant optionnellement être traitées avec un agent oxydant avant l'étape d).

Les modes de réalisation préférés des diverses étapes a) à g) ainsi que le 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 un chitosan susceptible d'être obtenu par un procédé selon l'invention.

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 : abattage des insectes**

Cette étape 1 d'abattage 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.

L'abattage peut s'effectuer par ébouillantage.

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.

Alternativement, l'abattage peut s'effectuer par blanchiment. De préférence, les insectes sont blanchis à la vapeur (buses ou lit de vapeur) à une température comprise entre 80 et 130 °C, de préférence entre 90 et 120 °C, plus préférentiellement entre 95 et 105 °C, encore plus préférentiellement 98 °C ou bien à l'eau à une température

comprise entre 95 et 105 °C, préférentiellement 100 °C (par buses d'aspersion) ou en mode mixte (eau + vapeur) à une température comprise entre 80 et 130 °C, de préférence entre 90 et 120 °C, plus préférentiellement entre 95 et 105 °C. Le temps de séjour dans la chambre de blanchiment est compris entre 1 et 15 minutes, 5 préférentiellement entre 3 et 7 min.

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

10 • **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'abattage et l'étape 2 de broyage.

15 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.

20 Selon un premier mode de réalisation, à l'issue de l'étape 1, lorsque celle-ci est faite par 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.

25 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.

30 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.

35 • **Etape 2 : broyage**

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

5 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
10 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),
15 de préférence inférieure à 0,5 cm. Préférentiellement, la taille des particules est comprise entre 500 μm et 0,5 cm et encore plus préférentiellement entre 500 μm et 1 mm.

Il n'est pas nécessaire de réduire excessivement la taille des particules, par exemple à une taille inférieure à 250 μm .

20 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
25 avec le broyage, il est possible d'ajouter lors de cette étape, des additifs antioxydants communément employés pour la conservation et la stabilité du produit.

- **Etape 3 : pressage des cuticules d'insectes**

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
30 à la fois une fraction huileuse et une fraction protéique.

De préférence, l'étape de pressage permet d'obtenir un gâteau de presse comportant une teneur en huile inférieure ou égale à 20%, préférentiellement, inférieure ou égale à 15%, plus préférentiellement, inférieure ou égale à 12%, encore plus préférentiellement, inférieure ou égale à 10%.

35 De même, l'étape de pressage permet d'obtenir un gâteau de presse

présentant une teneur en matière sèche comprise entre 30% et 60%, préférentiellement, comprise entre 40% et 55%, et plus préférentiellement comprise entre 45% et 50%.

5 Tout système de presse peut être utilisé pour réaliser l'étape de pressage, tel que par exemple, une presse mono-vis ou bi-vis (presse bi-vis de type Angel), un filtre-presse (filtre-presse de type Choquet), une presse à plateaux, etc. Ces systèmes sont bien connus de l'homme du métier qui est à même de déterminer les conditions de pressage afin d'obtenir les teneurs en huile et/ou en eau mentionnées ci-avant.

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. Toutefois, il est avantageux d'effectuer
15 l'étape 3 de pressage après l'étape 2 de broyage.

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
20 l'étape 3 de pressage est placé dans une cuve d'hydrolyse avec de l'eau.

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
25 pas d'oxydant, l'eau de l'ébouillantage peut être récupérée et réintroduite lors de 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.

30 La quantité d'eau introduite à cette étape 4 d'hydrolyse enzymatique 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.

35 L'hydrolyse enzymatique est réalisée avec une protéase, telle qu'une protéase

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 5 10 % en poids sur le poids total de matière sèche estimé entrant en hydrolyse, 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.

10 • **Etape 5 : inactivation thermique**

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 15 habituelles de stérilisation de l'industrie agroalimentaire. Selon un autre mode 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 20 par un presseur afin d'essorer au maximum ce résidu pour réinjecter dans la phase 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 25 technologies classiques connues par l'homme de métier.

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.

30 Optionnellement, ces étapes peuvent comporter une étape de délipidation 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.

35 • **Etape 9 (facultative) : broyage**

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
 5 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

10 *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.

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

• **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
 20 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
 25 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
5 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 de pressage et ne sont donc mises en œuvre que lorsque qu'une telle récupération est souhaitée.

- **Etape 12 : séparation**

10 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,
15 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
20 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.

25 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**

30 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
35 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).

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 :

- 10 - La Figure 1 est un schéma d'un mode de réalisation préférentiel du procédé selon l'invention,
- La Figure 2 un diagramme comparant le degré de pureté de la chitine obtenue par un procédé enzymatique comportant une ou plusieurs étapes préalables de broyage(s) et pressage,
- 15 - La Figure 3 est un diagramme comparant le taux de lipides mesuré dans différentes fractions du produit intermédiaire dont la chitine a été extraite,
- La Figure 4 illustre la répartition des lipides dans le jus et le gâteau de presse obtenus par un procédé enzymatique comportant des étapes préalables de broyage et de pressage ou une étape préalable de pressage,
- 20 - La Figure 5 est un diagramme illustrant la répartition des protéines/peptides selon leurs masses molaires (en %) dans un hydrolysât selon l'invention et dans le jus de presse,
- La Figure 6 est un diagramme illustrant la répartition relative des acides aminés constitutifs d'un l'hydrolysât selon l'invention,
- 25 - La Figure 7 est un diagramme illustrant l'abondance relative des acides aminés dans la chitine ;
- La Figure 8 : Effet du pressage sur le taux de cendres dans l'hydrolysât – différents insectes,
- La Figure 9 : Effet du pressage sur le taux de cendres dans l'hydrolysât – différentes enzymes,
- 30 - La Figure 10 : Taux de cendres dans l'hydrolysât avec le procédé broyage + pressage – différents insectes,
- La Figure 11 : Abondance relative de protéines de grande taille en fonction de différents procédés et différents insectes pour une hydrolyse effectués avec la
- 35 Prollyve,

- La Figure 12 : Abondance relative de protéines de grande taille en fonction de différents procédés et différentes enzymes appliquées à *T. molitor*,
- La Figure 13 : Effet du pressage sur la teneur en protéines de l'hydrolysats – différentes enzymes,
- 5 - La Figure 14 : Effet du pressage sur la teneur en protéines de l'hydrolysats – différents insectes,
- La Figure 15 : Effet du pressage sur la teneur en lipides de l'hydrolysats – différentes enzymes,
- La Figure 16 : Effet du pressage sur la teneur en lipides de l'hydrolysats – différents insectes,
- 10 - La Figure 17 : Digestibilité pepsique des hydrolysats obtenus – provisoire,
- La Figure 18 : TM + prolyve : abondance relative des acides aminés de l'hydrolysats,
- La Figure 19 : TM + sumizyme : abondance relative des acides aminés de l'hydrolysats,
- 15 - La Figure 20 : TM + novozyne : abondance relative des acides aminés de l'hydrolysats,
- La Figure 21 : TM + neutrase : abondance relative des acides aminés de l'hydrolysats,
- 20 - La Figure 22 : HI + prolyve : abondance relative des acides aminés de l'hydrolysats,
- La Figure 23 : GM + prolyve : abondance relative des acides aminés de l'hydrolysats,
- La Figure 24 : AD + prolyve : abondance relative des acides aminés de l'hydrolysats,
- 25 - La Figure 25 : Effet du pressage sur le taux de cendres dans la chitine – différentes enzymes,
- La Figure 26 : Taux de cendres dans la chitine de différents insectes,
- La Figure 27 : Teneur en lipides dans la chitine,
- 30 - La Figure 28 : Taux d'acides aminés dans la chitine,
- La Figure 29 : TM + prolyve : abondance relative des acides aminés de la chitine,
- La Figure 30 : TM + sumizyme : abondance relative des acides aminés de la chitine,
- 35 - La Figure 31 : TM + novozyne : abondance relative des acides aminés de la

- chitine,
- La Figure 32 : TM + neutrase : abondance relative des acides aminés de la chitine,
 - La Figure 33 : HI + prolyve : abondance relative des acides aminés de l'hydrolysat,
 - La Figure 34 : GM + prolyve : abondance relative des acides aminés de l'hydrolysat,
 - La Figure 35 : AD + prolyve : abondance relative des acides aminés de l'hydrolysat,
 - La Figure 36 : Pureté gravimétrique de la chitine en fonction de différents procédés et différentes enzymes appliquées à *T. molitor*,
 - La figure 37 : Pureté gravimétrique de la chitine en fonction de différents procédés et différents insectes avec la Prolyve,
 - La Figure 38 : Pureté colorimétrique de la chitine en fonction de différents procédés et différentes enzymes avec *T. molitor*,
 - La Figure 39 : Pureté colorimétrique de la chitine en fonction de différents procédés et différents insectes avec la Prolyve,
 - La Figure 40 : Pureté par différence de la chitine,
 - La Figure 41 : Degré d'acétylation de la chitine obtenue par le procédé pour *T. molitor*,
 - La Figure 42 : Degré d'acétylation de la chitine obtenue par le procédé avec la Prolyve,
 - La Figure 43 : Représentation de la cuticule par microscopie par fluorescence bi-photon,
 - La Figure 44 : Degré de cristallinité des chitines obtenues, et
 - La Figure 45 : Taille des protéines dans l'hydrolysat.

Exemple 1 : Exemple de procédé selon l'invention

600 g de larves de *T. molitor* sont introduits dans un bécher, placé dans un bain-marie à 100 °C et contenant 600 mL d'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 600 mL. Le liquide ainsi obtenu est pressé avec une presse bi-vis de type Angel dans les conditions suivantes :

- Vitesse = 82 tr/min;

- W (énergie) = 3 HP (chevaux vapeur) soit $2,68 \times 10^6$ J;
- Porosité (approximative) = 0,5 mm dans la première partie et 0,2 mm dans la dernière partie.

On obtient ainsi un jus de presse et un gâteau de presse de $136,49 \pm 4,48$ g en poids humide, dont $100,22 \pm 0,22$ g sont utilisés dans les étapes suivantes. Tout autre type de presse aurait toutefois pu être utilisé, dans la mesure où celle-ci permet l'extraction l'obtention d'un gâteau de presse sensiblement similaire en termes de teneur en eau et/ou de teneur en lipides. A titre d'exemple, d'autres essais ont été réalisés avec le filtre presse de type Choquet présentant les caractéristiques

10 suivantes :

- Surface de filtration de la cellule = 50 cm^2 ;
- Pression = 2 à 8 bars ;
- Température = 20 à 80 °C,
- Porosité = 25 à 80 μm ;
- 15 - Débit en fin de filtration = 100 à 250 mL/h.

Le gâteau de presse est transféré dans un Erlen Meyer contenant 600 mL d'une solution de protéase (Prolyve NP conc) à 1% (par rapport au poids humide du gâteau de presse), l'ensemble est placé pendant 4 heures à 45 °C sous agitation magnétique (à un pH d'environ 6,5). L'Erlen Meyer est ensuite placé pendant

20 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 $16,99 \pm 1,77$ g de chitine par ce procédé. L'hydrolysate (filtrat obtenu après hydrolyse) représente dans ces conditions $609,98 \pm 10,9$ g avec une teneur en matière sèche de 5,05%, ce qui, après lyophilisation, donne

25 $30,8 \pm 0,55$ g de l'hydrolysate sec.

Exemple 2 : Influence des étapes mécaniques préalables à l'hydrolyse enzymatique sur le degré de pureté de la chitine obtenue

Différents types de prétraitement mécanique ont été testés, le broyage

30 (« broyage 1 ») seul, le broyage suivi du pressage, le broyage suivi du pressage et d'un second broyage (« broyage 2 »), ainsi que le pressage seul.

Pour le pressage, la presse de type Angel décrite à l'exemple 1 a été utilisée.

1. Matériel et méthodes

35 Production de chitine avec un broyage

200 g de larves de *T. molitor* sont introduits dans un bécher, placé dans un bain-marie à 100 °C et contenant 200 mL d'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 200 mL. Le liquide ainsi obtenu est transféré dans un Erlen Meyer contenant 2 g de protéase (Prolyve), l'ensemble est placé pendant 4 heures à 45 °C sous agitation magnétique (à un pH d'environ 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 8,13 ± 0,27 g de chitine par ce procédé.

Production de chitine avec un broyage suivi d'un pressage

200 g de larves de *T. molitor* sont introduits dans un bécher, placé dans un bain-marie à 100 °C et contenant 200 mL d'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 200 mL. Le liquide ainsi obtenu est passé dans une presse de type bi-vis. 30 g du gâteau de presse ainsi obtenu sont transférés dans un Erlen Meyer contenant 150 mL d'eau et 0,3 g de protéase (Prolyve), l'ensemble est placé pendant 4 heures à 45 °C sous agitation magnétique (à un pH d'environ 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 4,71 ± 0,11 g de chitine par ce procédé.

Production de chitine avec un premier broyage (« broyage 1 ») suivi d'un pressage et d'un second broyage (« broyage 2 »)

200 g de larves de *T. molitor* sont introduits dans un bécher, placé dans un bain-marie à 100 °C et contenant 200 mL d'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 200 mL. Le liquide ainsi obtenu est passé dans une presse de type bi-vis. Le gâteau de presse ainsi obtenu est séché 24 heures dans une étuve à 70 °C, puis broyé à 250 µm. 10 g de la poudre ainsi obtenue sont transférés dans un Erlen Meyer contenant 50 mL d'eau et 0,1 g de protéase (Prolyve), l'ensemble est placé pendant 4 heures à 45 °C sous agitation magnétique (à un pH d'environ 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 4,93 ±

0,12 g de chitine par ce procédé.

Production de chitine avec pressage uniquement

200 g de larves de *T. molitor* sont introduits dans un bécher, placé dans un bain-marie à 100 °C et contenant 200 mL d'eau préalablement portée à ébullition.

5 Après 5 minutes, le bécher est retiré du bain-marie, les larves sont essorées, puis passées dans une presse de type bi-vis. 90 g de gâteau de presse ainsi obtenu sont transférés dans un Erlen Meyer contenant 450 mL d'eau et 0,9 g de protéase (Prolyve), l'ensemble est placé pendant 4 heures à 45 °C sous agitation magnétique (à un pH d'environ 6,5). L'Erlen Meyer est ensuite placé pendant 15 minutes dans un

10 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 $6,48 \pm 0,28$ g de chitine par ce procédé.

Production de chitine par voie chimique

50 g de larves de *T. molitor* sont introduits dans un bécher, placé dans un bain-

15 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 mixées avec un volume d'eau de 60 mL. Le liquide ainsi obtenu est transféré dans un récipient de 1 L et 500 mL d'une solution d'HCl 1M sont ajoutés. L'ensemble est placé à 90 °C sous agitation pendant 1 heure. Le contenu est ensuite filtré et le résidu solide est

20 transféré dans un flacon de 1 L contenant 500 mL d'une solution de NaOH 1M, l'ensemble est placé à 90 °C sous agitation pendant 24 heures. Le résidu est ensuite filtré et placé en étuve ventilée à 70 °C pendant 24 heures. On obtient ainsi $0,944 \pm 0,005$ g de chitine purifiée par voie chimique.

Calcul du degré de pureté

25 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 % environ de la matière sèche initiale.

Mesure du taux de lipides

On place 2 g d'échantillon dans un bécher, on y ajoute 0,2 g de Na₂SO₄ et

30 15 mL de CHCl₃/MeOH (2/1 v/v). L'ensemble est placé sous agitation magnétique pendant 20 minutes, ensuite la solution est filtrée, le résidu est placé de nouveau dans le bécher avec 10 mL de CHCl₃/MeOH (2/1 v/v). L'ensemble est placé sous agitation magnétique pendant 15 minutes, ensuite la solution est filtrée, les phases solvants sont réunies et évaporées à poids constant. La teneur en lipides est déterminée comme

35 pourcentage de masse après extraction-évaporation par rapport à la masse initiale de

l'échantillon (2 g).

2. Résultats

Comme cela peut être constaté sur la Figure 2, le procédé a une influence sur la pureté de la chitine obtenue, les meilleurs résultats étant obtenus avec un pressage
5 la pureté de la chitine obtenue, les meilleurs résultats étant obtenus avec un pressage a minima. Le meilleur résultat est obtenu avec le broyage suivi du pressage, à savoir une chitine présentant un degré de pureté de 78% et le moins bon avec le broyage seul, à savoir une chitine présentant un degré de pureté de 48%.

Une analyse plus fine du produit intermédiaire dont la chitine a été extraite,
10 permet de constater qu'un bas taux de lipides est favorable à une plus grande pureté de la chitine obtenue (Figure 3). Par « produit intermédiaire », on vise le produit entrant en hydrolyse enzymatique, c'est-à-dire issu de la dernière étape avant hydrolyse, à savoir, selon les procédés de production ci-avant, l'étape de broyage 1 ou 2 ou l'étape de pressage.

15 L'analyse du taux des lipides dans la chitine et le jus d'hydrolyse permet en effet de relever qu'en fonction du taux de lipides initiaux présents dans le produit intermédiaire, le taux des lipides dans la chitine est relativement stable, de 7 à 15%, tandis que le taux des lipides dans l'hydrolysate varie, quant à lui, de 11 à 47% (Figure 3).

20 Plus particulièrement, si le produit intermédiaire a une teneur en lipides de 35%, alors :

- la chitine qui résultera de l'hydrolyse ne sera pure qu'à 50% et comportera 10% lipides, et
- la teneur en lipides de l'hydrolysate avoisinera quant à elle les 40%.

25 En revanche, si la teneur en lipides du produit intermédiaire est de 7%, alors :

- la chitine obtenue après hydrolyse aura une pureté de 80% et aura une teneur en lipides de 8% et l'hydrolysate présentera également une faible teneur en lipides, de l'ordre de 10%.

Cela indique que lorsque le taux des lipides initiaux est élevé, supérieur à 12%,
30 l'enzyme responsable d'hydrolyse est amenée à hydrolyser non seulement les protéines, mais également les lipides par promiscuité catalytique. C'est ainsi qu'un taux de lipides dans la chitine similaire est obtenu, à savoir 8,6 et 7,9% dans les cas où les lipides initiaux étaient de 35 et 7% respectivement. En revanche, la pureté de la chitine passe dans ce cas de 48 à 84% respectivement. Ainsi, sur les 52% d'impuretés d'une
35 part et 16% de l'autre, 8% en moyenne sont dus aux lipides, la quantité de protéines

restées accrochées à la chitine est donc de 38 points supérieure dans le cas où davantage de lipides étaient présents dans le produit intermédiaire soumis à l'hydrolyse.

5 Finalement, l'importance du broyage en amont du pressage peut également être étudiée (Figure 4). Il apparaît ainsi clairement que la répartition des lipides entre le gâteau et le jus de presse est bien plus efficace, 12,9 *versus* 87,1 contre 42,7 *versus* 57,3, lorsqu'un broyage préalable a été réalisé.

Exemple 3 : Analyse de l'hydrolysate

10 Une analyse détaillée de l'hydrolysate obtenu à l'exemple 1 a été effectuée.

1. Teneur en glucosamines

La teneur de l'hydrolysate en glucosamines et certains autres sucres a été analysée par chromatographie gazeuse après méthanolyse et silylation.

Mode opératoire :

15 10 mg de l'échantillon et 50 µg d'étalon interne sont placés dans 500 µL d'un mélange méthanol/acide chlorhydrique 3 N pendant 4 heures à 110 °C (ou 24 heures à 130 °C). Le mélange est ensuite neutralisé avec le Ag₂CO₃. 50 µL d'anhydride acétique sont ajoutés afin de ré-acétyler les osamines éventuellement présentes. Après une nuit à l'obscurité et à température ambiante, les échantillons sont
20 centrifugés (15 min, 3000 rpm) et le surnageant est évaporé. Les composés sont ensuite dissous dans 100 µL de pyridine et incubés une nuit à température ambiante avec 100 µL de BSTFA (Supelco). Les réactifs sont ensuite évaporés et le résidu repris dans 700 µL de CH₂Cl₂ et injecté en CPG.

Programme de température : 1 minute à 120 °C, rampe de 1.5 °C/minute
25 jusqu'à 180 °C, puis 2 °C/minute jusqu'à 200 °C.

Détection : FID

Colonne : HP-5MS (30 m, 0.25 mm diamètre interne)

Etalon interne : myo-inositol

Les différentes teneurs ont été mesurées et calculées de deux façons
30 différentes (Tableau 2). Il en ressort que le glucosamine est contenu dans l'hydrolysate à hauteur de 0,1-0,15 % en masse et avec un ratio de 0,04-0,05 par rapport au glucose.

	Méthanolyse à 110 °C		Méthanolyse à 130 °C	
	% massique	Ratio molaire	% massique	Ratio molaire
Glucose	1,6 ± 0,3	1	2 ± 0,4	1

Mannose	$0,3 \pm 0,05$	$0,15 \pm 0,005$	$0,4 \pm 0,08$	$0,15 \pm 0,007$
Glucosamine	$0,1 \pm 0,02$	$0,04 \pm 0,007$	$0,15 \pm 0,04$	$0,05 \pm 0,003$

Tableau 2 : Répartition du glucosamine, mannose et glucose dans l'hydrolysate

2. Taille des protéines

5 La taille des protéines/peptides de l'hydrolysate a été évaluée par HPLC, appareil Shimadzu 20A, à température ambiante, sur colonne Superdex Peptide 10/300 GL, dans le tampon acétonitrile (ACN) 30%, acide trifluoroacétique (TFA) 0,1%, avec un débit de 0,4 mL/min. La détection a été réalisée à 205 nm et le volume d'échantillon injecté était de 20 µL.

10 De même, la taille des protéines/ peptides du jus de presse préparé à l'Exemple 1, a également été évaluée dans des conditions identiques à des fins de comparaison.

La comparaison de la taille des protéines entre le jus de presse et l'hydrolysate (Figure 5) montre clairement que l'essentiel, 76%, des peptides présents dans l'hydrolysate ont une masse molaire comprise entre 130 et 900 Da. En revanche, la 15 partie des protéines peu digestes (de masse molaire supérieure à 1300 Da) est réduite de 31% à 2%. De même, la proportion de peptides présentant un caractère d'amertume (de masse molaire inférieure à 130 Da) passe de 38% à 15%. Les critères de digestibilité et palatabilité se trouvent donc ainsi améliorés par le traitement 20 enzymatique proposé.

3. Digestibilité

Le taux de digestibilité pepsique de l'hydrolysate est estimé à 99,6 % des protéines totales. Il a été mesuré par un laboratoire externe, la méthode utilisée est 25 conforme à la directive 72/199/EEC et a été pratiquée sans dégraissage.

4. Teneur en protéines

Le taux de protéines de l'hydrolysate est estimé à 84,8 %. Il a été mesuré par un 30 laboratoire externe, selon la méthode Kjeldahl avec le coefficient de correction de 6,25. La méthode utilisée est conforme au règlement CE 152/2009.

5. Teneur en lipides

Le taux de lipides de l'hydrolysate est estimé à $0,7 \pm 0,5$ %. Il a été mesuré par un laboratoire externe selon la méthode dite de « l'hydrolyse » adaptée du règlement CE 152/2009 (procédé B).

5 6. Composition en acides aminés

L'hydrolysate obtenu après traitement par les différentes enzymes a été analysé quant à sa composition en acides aminés (Figure 6). On y observe la prépondérance de la proline, conjointement avec la présence de l'hydroxy proline (HYP) – métabolite de la proline et acide aminé absent chez certains organismes, par exemple les
10 crustacés. Or, la proline et son métabolite, l'hydroxy proline, jouent un rôle essentiel dans le métabolisme, notamment en permettant la synthèse d'autres acides aminés tels que l'arginine et le glutamate. Si la plupart des mammifères sont capables de synthétiser la proline, la production de cet acide aminé par les nouveau-nés, les oiseaux et les poissons est insuffisante, c'est pourquoi une supplémentation en proline
15 et hydroxy proline est parfois mise en place afin d'accroître la croissance de certains animaux. Par ailleurs, la proline est le premier acide aminé contenu dans le lait des mammifères, elle y est présente à hauteur de 12%, en revanche son contenu dans les protéines des plantes est bien moindre, seulement 2,9% dans le soja et 0,8% dans le maïs. On retrouve donc dans cet hydrolysate une teneur en proline aussi élevée que
20 dans le lait et bien supérieure à celle trouvée dans les protéines végétales.

Les autres acides aminés présents en quantité importante sont l'alanine, la leucine et le glutamate (avec la glutamine). Leurs quantités relatives sont supérieures à 9%. En revanche, les acides aminés soufrés tels que la cystéine et la méthionine sont en faible quantité, de l'ordre de 0,5%.

25 La méthode utilisée pour la détermination de ces résultats (hydrolyse acide) n'a pas permis la mise en évidence des acides aminés tels que le tryptophane et l'arginine. Par ailleurs, l'asparagine a été entièrement transformée en acide aspartique et la glutamine en acide glutamique et ce qui est observé sous les pics ASP et GLU est en fait respectivement la somme de l'acide aspartique et de l'asparagine d'une part et de
30 l'acide glutamique et de la glutamine d'autre part, initialement présents dans l'hydrolysate.

Exemple 4 : Analyse de la chitine

Une analyse détaillée en acides aminés de la chitine obtenue à l'exemple 1
35 a été effectuée.

La teneur totale en acides aminés est de 32,3 g pour 100 g de copolymère (déterminée comme somme des acides aminés). Les acides aminés majoritairement présents sont la valine, la glycine, l'alanine et la tyrosine (Figure 7).

Les analyses ont été sous-traitées et les résultats obtenus selon la méthode NF
5 EN ISO 13904 pour le tryptophane et NF EN ISO 13903 pour les autres acides aminés.

Exemple 5 : Caractérisation de l'hydrolysats et de la chitine selon le procédé de production mis en œuvre

I. Matériel et méthodes

10 a) Matériel

Insectes

Différents insectes ont été étudiés :

- un coléoptère : *Tenebrio molitor* (*T. molitor* ou TM),
- un lépidoptère : *Galleria mellonella* (*G. mellonella* ou GM),
- 15 - un diptère : *Hermetia illucens* (*H. illucens* ou HI), et
- un orthoptère : *Acheta domesticus* (*A. domesticus* ou AD).

Enzymes

Différentes enzymes ont été mises en œuvre lors de l'étape d'hydrolyse.

Cette mesure de l'activité enzymatique est basée sur le principe de la mesure
20 de libération de la tyrosine à 275 nm lors de l'hydrolyse de la caséine par une enzyme protéolytique (Valley research SAPU Assay method, par Karen PRATT).

$$\frac{SAPU}{g} = \frac{(\Delta A - i) \times 11}{m \times 30 \times C \times 1}$$

SAPU/g = une unité spectrophotométrique de protéase

ΔA = absorbance corrélée

i = ordonnée à l'origine

25 11 = volume final de réaction

M = coefficient directeur de la courbe de calibration

30 = temps de réaction (en minutes)

C = concentration de l'enzyme (g/mL) dans la solution enzymatique ajoutée

1 = 1 mL volume de la solution d'enzyme ajoutée

30 La courbe de calibration est obtenue par mesure de l'absorbance des solutions de tyrosine de différentes concentrations dans un tampon phosphate (0,2 M, pH 7).

5 mL d'une solution de caséine (0,7% m/v, tampon phosphate 0,2 M, pH 7, chauffée pendant 30 minutes à 90 °C et additionnée de 3,75 g/L_{solution}) sont incubés

avec 1 mL de la solution enzymatique (0,15 g dans 100 mL du tampon glycine, 0,05M) à tester à 37 °C pendant 30 minutes. On y ajoute ensuite 5 mL d'une solution de TCA (18 g TCA, 11,35 g d'acétate de sodium anhydre, 21 mL d'acide acétique glacial, complétée avec l'eau déminéralisée à 1 litre de solution), mélange sur un vortex, filtre
5 et mesure l'absorbance à 275 nm.

Le blanc est préparé de façon identique mais sans ajout d'enzyme, 1 mL d'eau déminéralisée est ajouté à la place afin de retrouver le même volume réactionnel.

Les activités ainsi mesurées pour les différentes enzymes utilisées (Prolyve NP, Novozyme 37071, Neutrase et Sumizyme) sont répertoriées dans le Tableau 3.

enzyme	Prolyve	Novozyme	Neutrase	Sumizyme
Activité enzymatique voulue	3789,52	3789,52	3789,52	3789,52
Activité enzymatique / g	3789,52	1662,35	2213,24	3237,19
m (g)	1,00	2,28	1,71	1,17

10 **Tableau 3.** Correspondance des activités et masses enzymatiques des enzymes utilisées

b) Procédés de production

15 Procédé de production avec broyage seul (désigné « broyage » dans les figures)

600 g d'insectes (qu'il s'agisse de larves dans le cas de *T. molitor*, *G. melonella* ou *H. illucens*, ou de criquets dans le cas de *A. domesticus*) frais sont introduite dans une enceinte où ils sont abattus à la vapeur d'eau (115 °C, 5 minutes). Les insectes sont ensuite introduits dans un appareil de mixage et 75 mL d'eau pour 100 g d'insectes sont ajoutés, l'ensemble est ensuite mixé. 100 g (poids humide) de produit ainsi obtenu sont ensuite introduits dans un ballon tricol muni d'un réfrigérant et d'un agitateur mécanique, une enzyme protéolytique d'une activité équivalente à 3789 SAPU est alors ajouté. La réaction est ensuite portée à 45 °C pendant 4 heures. La température est ensuite portée à 90 °C pendant 15 minutes, le mélange réactionnel est
20 enfin filtré (0,40 – 0,45 µm). Le résidu est séché pendant 24 heures à 70 °C : il s'agit
25

donc de la chitine obtenue par voie enzymatique de purification ; le filtrat est congelé et est lyophilisé : il s'agit donc de l'hydrolysate.

Le procédé est identique quel que soit l'insecte ou l'enzyme étudié.

5 Procédé de production avec broyage suivi d'un pressage (désigné « broyage +pressage » dans les figures)

600 g d'insectes (qu'il s'agisse de larves dans le cas de *T. molitor*, *G. melonella* ou *H. illucens*, ou de criquets dans le cas de *A. domesticus*) frais sont introduite dans une enceinte où ils sont abattus à la vapeur d'eau (115 °C, 5 minutes). Les insectes sont ensuite introduits dans un appareil de mixage et 75 mL d'eau pour 100 g
10 d'insectes sont ajoutés, l'ensemble est ensuite mixé et pressé (presse bi-vis, ou filtre presse, ou autre système de pressage). 100 g (poids humide) de produit ainsi obtenu sont ensuite introduits dans un ballon tricol muni d'un réfrigérant et d'un agitateur magnétique, 500 mL d'eau sont ajoutés ainsi qu'une enzyme protéolytique d'une activité équivalente à 3789 SAPU. La réaction est ensuite portée à 45 °C pendant 4
15 heures. La température est ensuite portée à 90 °C pendant 15 minutes, le mélange réactionnel est enfin filtré (0,40 – 0,45 µm). Le résidu est séché pendant 24 heures à 70 °C : il s'agit donc de la chitine obtenue par voie enzymatique de purification ; le filtrat est congelé et est lyophilisé : il s'agit donc de l'hydrolysate.

Le procédé est identique quel que soit l'insecte ou l'enzyme étudiés.

20

c) Analyses

Mesure du taux de cendres

Le taux de cendres a été déterminé selon la méthode relevant du règlement CE 152/2009 du 27-01-2009.

25 Mesure de la taille des protéines

100 mg d'échantillon sont placés dans 10 mL de tampon phosphate /NaCl (pH 7,4, 0,137 mM). L'échantillon a été agité durant une minute (vortex), centrifugé à 900 g durant 1 min et filtré ensuite sur une membrane de 0,45 µm. L'analyse a été réalisée sur un système de chromatographie par exclusion stérique, avec la colonne Nucleogel
30 GFC-300, l'éluant utilisé est le tampon phosphate /NaCl (pH 7,4, 0,137 mM), le débit est de 1,0 mL/min, la détection est réalisée par un détecteur UV à 280 nm.

Mesure de la teneur en protéines

Le taux de protéines est obtenu par la méthode Dumas, avec le coefficient de conversion de 6,25, adaptée de la norme NF EN ISO 16634-1

35 Mesure de la teneur en lipides

Le taux de lipides est obtenu par une méthode adaptée du règlement CE 152/2009 – procédé B – SN.

Digestibilité pepsique

La digestibilité pepsique est mesurée par la méthode décrite dans la
5 directive 72/199/CE.

Abondance relative en acides aminés

L'abondance des acides aminés a été déterminée par une méthode issue du règlement CE 152/2009 du 27-01-2009 – SN. La teneur en tryptophane a été déterminée séparément par une méthode adaptée du règlement CE 152/2009 du 27-
10 01-2009 – SN. L'abondance relative a été calculée en rapportant la teneur de chaque acide aminé au taux des acides aminés.

Taux d'acides aminés

Le taux des acides aminés a été déterminé en additionnant les valeurs individuelles obtenues pour chaque acide aminé, y compris le tryptophane.

15 Pureté gravimétrique

La pureté gravimétrique est déterminée en comparaison de la masse en résidu sec obtenue par rapport à celle résultant d'une extraction chimique, cette dernière étant évaluée à 5% environ de la matière sèche initiale.

Pureté colorimétrique

20 La couleur de l'échantillon a été estimée grâce à l'analyse de photographies d'échantillons à l'aide du logiciel ImageJ selon les trois couleurs rouge, verte et bleue (RVB ou RGB en anglais), leur moyenne représentant une cotation de la couleur réelle. Un échantillon de chitine de crevettes commercialisé par Chitine France a été pris comme standard (100% de pureté) et la pureté colorimétrique des échantillons produits
25 a été calculée en tant que pourcentage de cette couleur (ratio couleur de l'échantillon/couleur du standard).

Pureté par différence

Dans le cas de cette mesure, les quantités d'impuretés connues (acides aminés, lipides et cendres) ont été soustraites à la valeur de pureté absolue (100%)
30 pour obtenir la valeur de la pureté estimée par différence ; *i.e.* un échantillon qui contient 30% protéines, 10% de lipides et 1% de cendres, se voit dès lors attribuer une pureté de $100-30-10-1=59\%$

Degré de cristallinité

Les mesures ont été effectuées selon la technique WAXS (wide angle X-ray
35 scattering) sur l'appareil Bruker D8 Advance (A25 DaVinci design) équipé d'un

détecteur Lynxeye XE. Les résultats ont été interprétés suivant le procédé décrit dans Loelovich, M. Res. Rev.: J. Chem. 2014, 3, 7-14.

Degré d'acétylation

Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un appareil RMN ^{13}C CP/MAS, de
5 marque Bruker et équipé d'un aimant de 800 MHz.

L'analyse des résultats a été effectuée conformément à celle décrite dans Simionatto Guinesi, L.; Gomes Cavalheiro, E. T. *Thermochimica Acta* **2006**, 444, 128-133 et Heux, L.; Brugnerotto, J.; Desbrières, J.; Versali, M.-F.; Rinaudo, M. *Biomacromolecules* **2000**, 1, 746-751.

10 Mesure de l'abondance atomique et fonctionnelle à la surface

Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un appareil XPS Escalab 250, de marque VG Scientific et équipé d'une source RX Ka A1 (1486,6 eV), d'un monochromateur et d'une lentille magnétique.

Les échantillons, préalablement réduits en poudre, ont été placés sous vide
15 pendant 48 à 72 heures et analysés ensuite.

Représentation de la cuticule par microscopie par fluorescence bi-photon

Microscopie multiphotonique sur les appareils DISCO (Synchrotron Soleil).

Lambda exc=810nm, power 18%, filtre bleu turquoise et ocre 406/15 (SHG),
filtre bleu 460/60, filtre vert 550/88.

20

II. Hydrolysats

a) Cendres

L'effet du pressage est très significatif sur le taux de cendres dans l'hydrolysats obtenu, et ce quel que soit l'insecte étudié (Figure 8). En effet, la diminution du taux de
25 cendres peut atteindre 52%, la proportion à la baisse est relativement similaire lorsqu'il s'agit d'insectes naturellement riches ou pas en minéraux. Ainsi, dans le cas de *H. illucens* – le taux de cendres passe de 7,5 g/100 g de matière sèche lorsque le procédé avec broyage est utilisé à 3,8 g/100 g de matière sèche, lorsque l'on adjoint une étape de pressage, i.e. 49% de diminution ; dans le cas de *T. molitor*, on passe
30 ainsi de 5 g/100 g à 2.4 g/100 g, i.e. 52% de diminution.

L'effet du pressage est également significatif sur le taux de cendres dans l'hydrolysats obtenu, et ce quel que soit l'enzyme mise en œuvre (Figure 9). En particulier, on note que *T. molitor*, quel que soit l'enzyme, le taux de cendres dans l'hydrolysats est inférieur à 3% lorsque l'on utilise le procédé avec pressage.

35 Le taux de cendres dans l'hydrolysats (obtenu par le procédé broyage +

pressage) est inférieur à 4 g/100 g de matière sèche, et ce quel que soit l'insecte étudié (Figure 10).

b) Taille des protéines dans l'hydrolysate

5 L'utilisation de l'étape de pressage permet clairement d'améliorer la performance des enzymes protéolytiques, et ceux quel que soit l'insecte (Figure 11) ou l'enzyme utilisés (Figure 12). L'abondance relative des protéines de grande taille chute ainsi significativement par rapport au procédé ne comportant que l'étape de broyage, l'hydrolysate final n'en comportant plus que 10,3% maximum dans le cas de l'hydrolyse
10 effectuée avec la prolyve, et ce quel que soit l'insecte ; et pas plus que 17,5% dans le cas de l'hydrolyse de *T. molitor*, et ce quel que soit l'enzyme utilisée.

c) Teneur en protéines

La teneur en protéines de l'hydrolysate dépend très fortement du procédé utilisé.
15 Ainsi lorsque le broyage est appliqué seul, les protéines ne représentent que $53,59 \pm 1,5\%$ de la matière sèche de l'hydrolysate de *T. molitor* ainsi obtenu, et ce quel que soit l'enzyme utilisée (Figure 13). En revanche, lorsque le broyage est suivi du pressage, le taux de protéines dans l'hydrolysate passe à $84,58 \pm 1,4\%$, il subit ainsi une augmentation de 53 – 62%, suivant l'enzyme utilisée.

20 Cette augmentation est d'autant plus forte que l'insecte initialement était pauvre en protéines, ainsi dans le cas de *G. melonella*, le taux de protéines passe de 41,25% à 71%, subissant une augmentation de près de 86% et dans le cas de *H. illucens*, l'augmentation est même de 118%, puisque l'on passe de 34,2% à 74,5% (Figure 14).

25 d) Teneur en lipides

Le pressage a une influence majeure sur la teneur de l'hydrolysate en lipides et ce quel que soit l'enzyme (Figure 15) ou l'insecte étudié (Figure 16). En effet, la teneur en lipides diminue drastiquement de 51,4-97,7% passant ainsi de 28,6 à 13,9% dans le cas de *H. illucens* (51,4% de diminution) et de 33,85 à 0,9% dans le cas de *T. molitor*
30 avec novozyme (97,3% de diminution).

e) Digestibilité pepsique

La digestibilité pepsique des hydrolysats ainsi obtenus est très élevée, supérieure à 96% quel que soit l'enzyme ou l'insecte étudié (Figure 17).

f) Abondance en acides aminés

L'utilisation de l'étape de pressage permet une meilleure extraction des acides aminés davantage présents au niveau de la cuticule, tels que l'alanine et la tyrosine et, dans une moindre mesure, la valine, la sérine et la glycine, et ce quel que soit l'enzyme ou l'insecte étudiés (Figures 18 - 24). Ces résultats sont également à mettre en rapport avec ceux concernant les acides aminés présents au niveau de la chitine purifiée enzymatiquement (Figure 29-35).

Remarque : si l'abondance relative de certains acides aminés, dont l'acide aspartique et le glutamate, notamment, diminue, leurs quantités restent identiques, voire, augmentent légèrement dans certains cas, puisque la quantité totale des acides aminés extraits par le procédé avec une étape de pressage augmente (cf. taux de protéines dans l'hydrolysat)

III. Chitine

a) Cendres

Le taux de cendres dans la chitine est également affecté par l'étape de pressage, bien que dans une moindre mesure que pour l'hydrolysat. On observe ainsi une diminution allant de 25% à 28,6% en fonction de l'enzyme utilisée (Figure 25).

Le taux de cendres dans la chitine (obtenue par le procédé broyage + pressage) est extrêmement bas, et ce quel que soit l'insecte (Figure 26) étudié. Ainsi, dans le cas de *T. molitor*, le taux maximum de cendres est de 1,05 g/100 g de matière sèche, et même pour les insectes naturellement riches en minéraux il reste inférieur à 3,5 g/100 g de matière sèche.

b) Teneur en lipides dans la chitine

Bien que dans une mesure légèrement moindre que pour l'hydrolysat, la teneur en lipides dans la chitine diminue également lorsque l'étape de pressage est ajoutée au procédé (Figure 27). L'efficacité dépend essentiellement de l'enzyme, de 15% pour la sumizyme et jusqu'à 60% pour la novozyme. Quel que soit l'insecte, cette diminution se situe entre 50% dans le cas de *H. illucens* et 58% dans le cas de *T. molitor*, lorsque la réaction est réalisée avec la prolyve.

Pour l'ensemble des insectes, le taux de lipides est inférieur à 12%, et pour les insectes non volants il est même $\leq 6\%$.

c) Taux et abondance relative d'acides aminés dans la chitine

L'étape de pressage permet l'élimination d'une plus grande partie des protéines accrochées à la chitine. La mesure directe du taux de protéines étant rendue difficile étant donné la fonction amide présentes au niveau de la structure même de la chitine, nous avons approché ce taux de protéines par la somme des acides aminés (Figure 28). Ainsi, on peut constater que la somme des acides aminés diminue, de 5 à 54%, lorsque l'étape de pressage est ajoutée au procédé et ce quel que soit l'enzyme ou l'insecte étudié.

L'abondance relative des acides aminés est faiblement affectée par l'étape de pressage, quelques acides aminés néanmoins, dont l'alanine, semblent mieux extraits lorsque l'étape de pressage est réalisée (Figures 29 à 35). Néanmoins nous pouvons constater que pour l'ensemble des insectes, l'alanine, la tyrosine et la proline, ainsi que, dans une moindre mesure, la valine, la glycine, la leucine et la sérine sont des acides aminés principalement attachés à la chitine, leur taux est compris en moyenne entre 23 – 40% de l'ensemble des acides aminés, et c'est également parmi ces acides aminés que l'on note les diminutions les plus importantes au niveau de la chitine et les augmentations les plus importantes (on arrive à 7-30% maximum) au niveau de l'hydrolysate (Figures 18-24) lorsque l'on rajoute une étape de presse dans le procédé.

d) Pureté gravimétrique

Quel que soit l'enzyme (Figure 36) ou l'insecte (Figure 37) étudiés, la pureté gravimétrique est améliorée par l'utilisation de l'étape de pressage. Elle passe ainsi de 48,7% à 77,1% dans le cas de *T. molitor* avec la polyve et de 33,7% à 87,9% dans le cas de *H. illucens* avec polyve.

e) Pureté colorimétrique

Une amélioration, certes, moins nette par rapport à la pureté gravimétrique, de la pureté colorimétrique est également observée lorsque l'étape de pressage fait partie du procédé, et ce quel que soit l'enzyme ou l'insecte étudié (Figures 38 et 39).

f) Pureté par différence

Du fait de la diminution du taux de lipides, de cendres et d'acides aminés dans la chitine obtenue après le procédé avec pressage, la pureté par différence de cette chitine, augmente de manière significative, de 13% dans le cas de *H. illucens* et jusqu'à 74% dans celui de *T. molitor* avec polyve, et ce quel que soit l'insecte ou l'enzyme étudiés (Figure 40).

g) Degré d'acétylation de la chitine

Le degré d'acétylation est significativement affecté par l'ajout de l'étape de pressage dans le procédé (Figures 41 et 42). En effet, l'élimination des lipides et acides aminés de l'hémolymphe permet une plus grande accessibilité des enzymes à la surface de la cuticule, ce qui contribue à l'amélioration du clivage des liaisons peptidiques des protéines liées à la chitine, mais également, par promiscuité catalytique, clivage des liaisons amides de la chitine. Ainsi le degré d'acétylation de la chitine de *T. molitor* issue du procédé est compris entre 76 et 79%, alors qu'en l'absence de l'étape de pressage, il est à 91% et même l'hydrolyse chimique, réalisée dans des conditions drastiques de température et réactifs conduit à un degré d'acétylation de 85%.

Pour les autres insectes considérés, notamment *G. mellonella* et *A. domesticus*, le degré d'acétylation est également affecté par le procédé, ainsi il passe de 83 à 74% dans un cas et de 100 à 95% dans l'autre, respectivement.

La solubilité et la processabilité de la chitine étant tout particulièrement liées à son degré d'acétylation, cette hydrolyse concomitante de la liaison amide des unités *N*-acétyl-glucosamine de la chitine, est un effet positif inattendu de l'hydrolyse enzymatique réalisée dans ces conditions.

20

h) Abondances atomique et fonctionnelle à la surface

La répartition des atomes à la surface de la chitine au fur et à mesure de la purification montre une progression du taux relatif d'oxygène et une diminution du taux relatif de carbone (Tableau 4).

De même, les liaisons des atomes de carbone à la surface tendent à passer de liaisons majoritairement de type hydrocarbure (C-H, C-C), vers des liaisons de type alcool (C-O) ou carbonyle (C=O). Les liaisons de type amide (N-C=O) diminuent également.

Ce qui, néanmoins, semble le plus représentatif, c'est le ratio liaison alcool/liaison hydrocarbure (C-O/C-H), dans le cadre de la chitine purifiée enzymatiquement ce ratio est compris entre 0,31 et 0,56, mais plus spécifiquement entre 0,39 et 0,41.

Dans ce Tableau 4, par :

- « cuticule brute », on vise la chitine de la cuticule à l'état natif, analysée directement après arrachage à l'insecte par dissection ;

35

- « chitine purifiée enzymatiquement (novozyme) », on vise une chitine issue d'un procédé comportant un broyage + pressage et une hydrolyse enzymatique en présence de l'enzyme Novozyme 37071 ;
 - « chitine purifiée enzymatiquement (prolyve) », on vise une chitine issue d'un
- 5 procédé comportant un broyage + pressage et une hydrolyse enzymatique en présence de l'enzyme Prolyve NP ;
- « chitine purifiée enzymatiquement », on vise une chitine issue d'un procédé comportant un broyage + pressage et une hydrolyse enzymatique en présence de l'enzyme prolyve ;
- 10 - « chitine pure », on vise une chitine obtenue par purification chimique, identique à celle utilisée pour la détermination de la quantité de la chitine dans l'insecte

		atomes		types de liaisons				ratio
		C	O	C-H	C-O	C=O	N-C=O	(C-O)/ (C-H)
TM	cuticule brute	78,85	16,23	68,88	20,16	6,87	3,53	0,29
	chitine purifiée enzymatiquement (novozyme)	75,71	18,50	62,88	24,21	9,93	2,98	0,39
	chitine purifiée enzymatiquement (prolyve)	75,64	19,40	57,54	29,57	10,67	2,22	0,51
	chitine pure	64,24	30,31	39,5	42,36	16,21	1,92	1,07
AD	chitine purifiée enzymatiquement	78,49	16,37	68,16	20,84	8,48	2,32	0,31
	chitine pure	67,27	27,30	42,32	40,46	13,59	3,63	0,96
GM	chitine purifiée enzymatiquement	76,24	19,29	63,15	25,15	8,9	2,81	0,40
	chitine pure	64,93	28,87	34,1	45,39	18,07	2,44	1,33
HI	cuticule brute	86,09	12,69	83,35	8,41	2,55	5,68	0,10
	chitine purifiée enzymatiquement	74,46	21,10	61,49	25,07	7,95	5,49	0,41

	atomes		types de liaisons				ratio
	C	O	C-H	C-O	C=O	N-C=O	(C-O)/ (C-H)
chitine pure	73,10	22,49	53	30,3	11,16	4,11	0,57

Tableau 4. Répartition de certains atomes et des liaisons à la surface de la chitine

i) Représentation de la cuticule par microscopie par fluorescence bi-photon

5

La purification partielle de la chitine par voie enzymatique selon le procédé selon l'invention permet le maintien de la souplesse de l'ensemble par la préservation de « remplissage » protéique des structures chitiniques, comparé à une purification chimique, tout en enlevant la surcharge protéique à l'extérieur de la structure (voir Figure 43).

10

La terminologie employée sur la Figure 43 est la même que celle définie au point III h) ci-avant.

j) Degré de cristallinité

15

Quels que soient l'insecte ou l'enzyme étudié, le degré de cristallinité, *i.e.* le rapport des aires cristallines et amorphes, de la chitine obtenue est compris entre 0,42 et 0,61.

Généralement, on parle dans la littérature de l'index de cristallinité, *i.e.* rapport des hauteurs des pics (et non des aires). Cette mesure comporte un risque d'erreur important. Néanmoins, et à des fins de comparaison, l'index de cristallinité des échantillons a également été mesuré, et il se situe entre 88 et 95% pour l'ensemble des insectes, et est même supérieur à 90% pour les coléoptères et les lépidoptères

20

25 **Exemple 6 : Procédé selon l'invention avec récupération de la fraction protéique issue du jus de presse**

I. **Matériel et méthodes**

a) Matériel

Insecte

30

L'insecte suivant a été étudié :

- un coléoptère : *Tenebrio molitor* (*T. molitor* ou TM).

Enzyme

La Prollyve a été mise en œuvre au cours de l'hydrolyse.

enzyme	Prollyve
Activité enzymatique voulue	3789,52
Activité enzymatique / g	3789,52
m (g)	1,00

5 b) Procédés de production

Procédé de production avec broyage suivi d'un pressage (désigné « broyage +pressage » dans les figures)

Plusieurs batchs ont été transformés de façon suivante : 600 g de larves de *T. molitor*, frais sont introduite dans une enceinte où ils sont abattus à la vapeur d'eau
 10 (115 °C, 5 minutes). Les insectes sont ensuite introduits dans un appareil de mixage et 75 mL d'eau pour 100 g d'insectes sont ajoutés, l'ensemble est ensuite mixé et pressé (presse bi-vis, ou filtre presse, ou autre système de pressage).

Le gâteau de presse est ensuite séché, 70 °C durant la nuit. Le jus de presse, en revanche, est centrifugé pendant 30 minutes avec une force de 3000 g et la partie
 15 solide est récupérée – protéines insolubles de l'hémolymph.

125 g de gâteau de presse et 125 g (poids humide, 30% poids sec environ) de protéines insolubles de l'hémolymph sont ensuite introduits dans un ballon tricol muni d'un réfrigérant et d'un agitateur magnétique, 1250 mL d'eau sont ajoutés ainsi qu'une enzyme protéolytique d'une activité équivalente à 9500 SAPU. La réaction est ensuite
 20 portée à 45 °C pendant 4 heures. La température est ensuite portée à 90 °C pendant 15 minutes, le mélange réactionnel est enfin filtré (0,40 – 0,45 µm). Le résidu est séché pendant 24 heures à 70 °C : il s'agit donc de la chitine obtenue par voie enzymatique de purification ; le filtrat est congelé et est lyophilisé : il s'agit donc de l'hydrolysate.

25 c) Analyses

La mesure du taux de cendres, la mesure de la teneur en lipides, l'abondance relative en acides aminés et la mesure de la taille des protéines ont été réalisées comme dans l'exemple 5.

5 II. Caractérisation des produits obtenus

Les produits obtenus, la chitine et l'hydrolysate, ont été analysés et caractérisés (Tableau 5, Figure 45).

	hydrolysate	Chitine
Cendres	4.1	0.5
Lipides	12.85	3.7
digestibilité	95	n.a.
Acides aminés (abondance relative (%))		
ASP	9.7	5.4
GLU	12.8	6.7
ALA	9.0	13.7
ARG	2.5	3.6
CYS	1.1	0.5
GLY	5.9	9.4
HIS	3.3	3.9
ILE	5.4	4.8
LEU	8.5	8.0
LYS	6.5	2.9
MET	1.5	0.4
PHE	4.0	2.6
PRO	6.9	8.3
SER	4.4	5.8

	hydrolysate	Chitine
THR	4.9	3.5
TYR	4.7	11.3
VAL	7.7	9.0
TRP	1.3	0.6

n.a. non applicable

Tableau 5 : Caractérisation

REVENDICATIONS

1. Chitine comportant un taux d'acides aminés inférieur ou égal à 45% en poids sur le poids total de matière sèche, un taux de cendres inférieur ou égal à 3,5% en poids sur le poids total de matière sèche et une pureté par différence supérieure ou égale à 45%.
5
2. Hydrolysats comportant au moins 40% de protéines en poids sur le poids total de matière sèche, au maximum 10% en poids de cendres sur le poids total de matière sèche, et un taux de protéines hydrosolubles ayant une taille supérieure à 12400 g/mol inférieur à 50%.
10
3. Procédé de production d'au moins un produit d'intérêt à partir d'insectes, comportant les étapes suivantes :
 - (i) le broyage des cuticules d'insectes,
 - (ii) le pressage des cuticules d'insectes, puis,
 - 15 (iii) l'hydrolyse enzymatique des cuticules d'insectes par une enzyme protéolytique.
4. Procédé selon la revendication 3, comportant une étape d'abattage des insectes préalable à l'étape de broyage.
5. Procédé selon la revendication 3 ou 4, comportant en outre une étape de traitement des cuticules des insectes par un agent oxydant préalablement à l'hydrolyse enzymatique.
20
6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 3 à 5, dans lequel le ou les insecte(s) est/sont choisi(s) parmi le groupe constitué par les coléoptères, les lépidoptères, les orthoptères et les diptères.
- 25 7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 3 à 6, 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.
8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 3 à 7, dans lequel le produit d'intérêt est la chitine et/ou le chitosan.
30
9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 3 à 7, dans lequel le produit d'intérêt est un hydrolysats.
10. Procédé de production de chitine à partir de cuticules d'insectes, comportant les étapes suivantes :
35 a) l'abattage des insectes,

- b) le broyage des insectes,
 - c) le pressage des insectes,
 - d) l'hydrolyse enzymatique des cuticules d'insectes par une enzyme protéolitique,
 - 5 e) la récupération de la chitine,
- les cuticules d'insectes pouvant optionnellement être traitées avec un agent oxydant avant l'étape d).
11. Chitine susceptible d'être obtenue par un procédé selon l'une quelconque des revendications 3 à 8, 10.
- 10 12. Procédé de production d'un hydrolysats à partir d'insectes, comportant les étapes suivantes :
- a) l'abattage des insectes,
 - b) le broyage des insectes,
 - c) le pressage des insectes,
 - 15 d) l'hydrolyse enzymatique des cuticules d'insectes par une enzyme protéolitique,
 - e) la récupération de l'hydrolysats,
- les cuticules d'insectes pouvant optionnellement être traitées avec un agent oxydant avant l'étape d).
- 20 13. Hydrolysats susceptible d'être obtenu par un procédé selon l'une quelconque des revendications 3 à 7, 9, 12.
14. Procédé de production de chitosan à partir de cuticules d'insectes, comportant les étapes suivantes :
- a) l'abattage des insectes,
 - 25 b) le broyage des insectes,
 - c) le pressage des insectes,
 - d) l'hydrolyse enzymatique des cuticules d'insectes par une protéase,
 - e) la récupération de la chitine,
 - f) la désacétylation de la chitine récupérée,
 - 30 g) la récupération du chitosan,
- les cuticules d'insectes pouvant optionnellement être traitées avec un agent oxydant avant l'étape d).

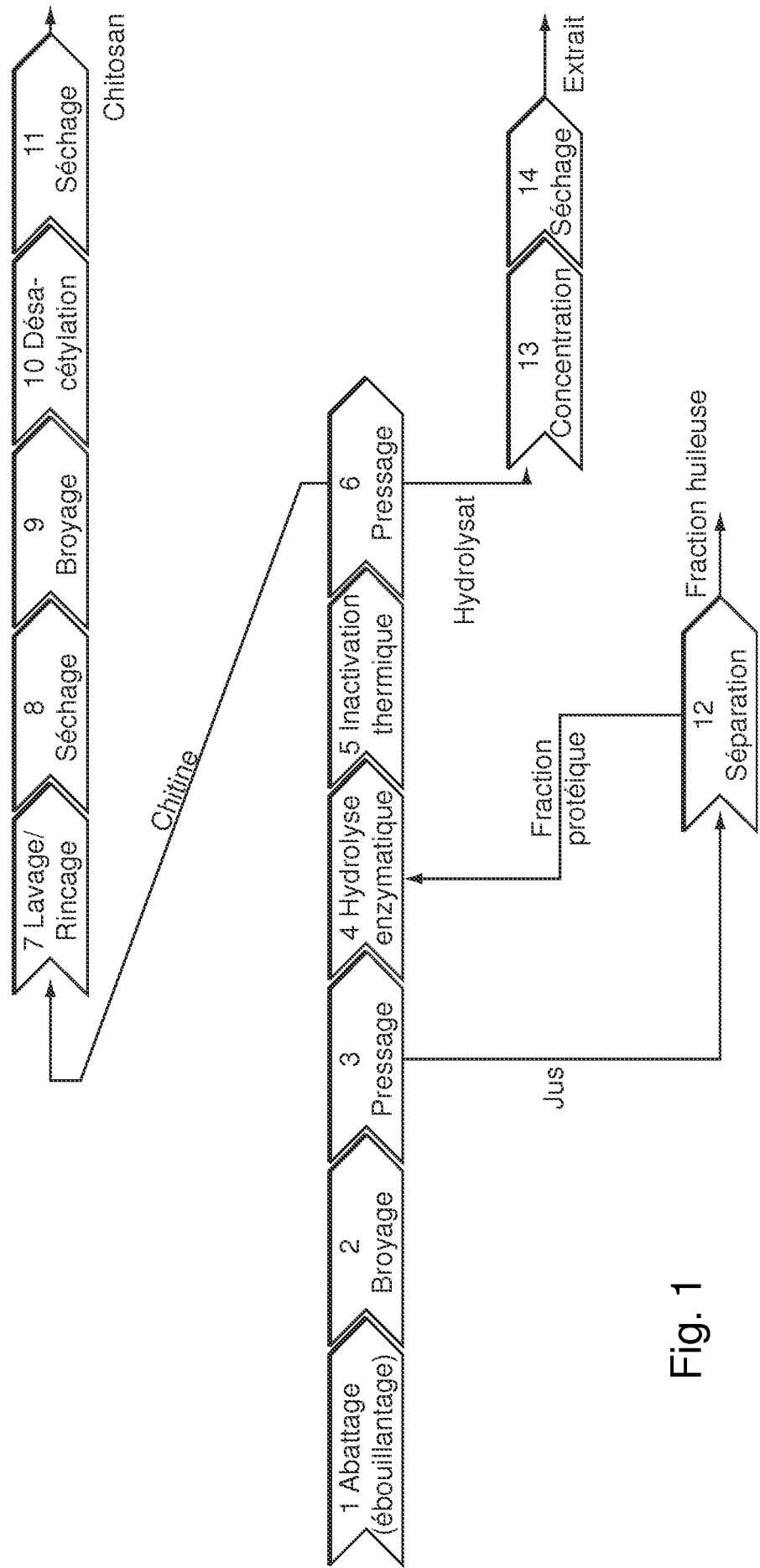


Fig. 1

Fig.2

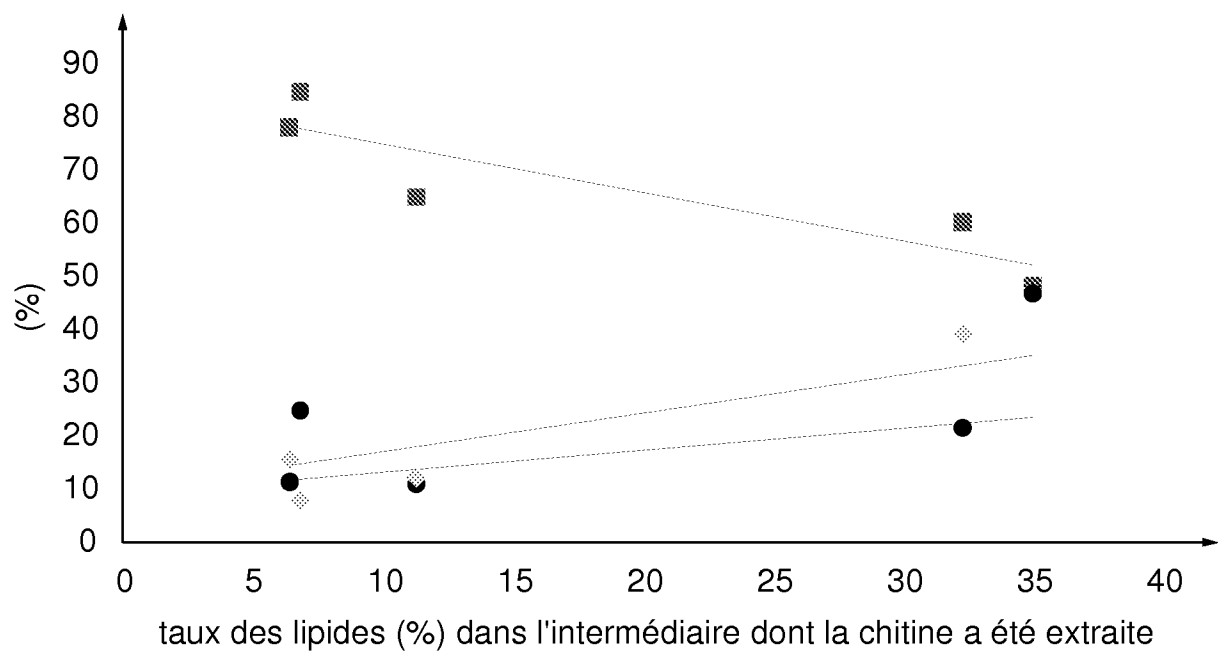
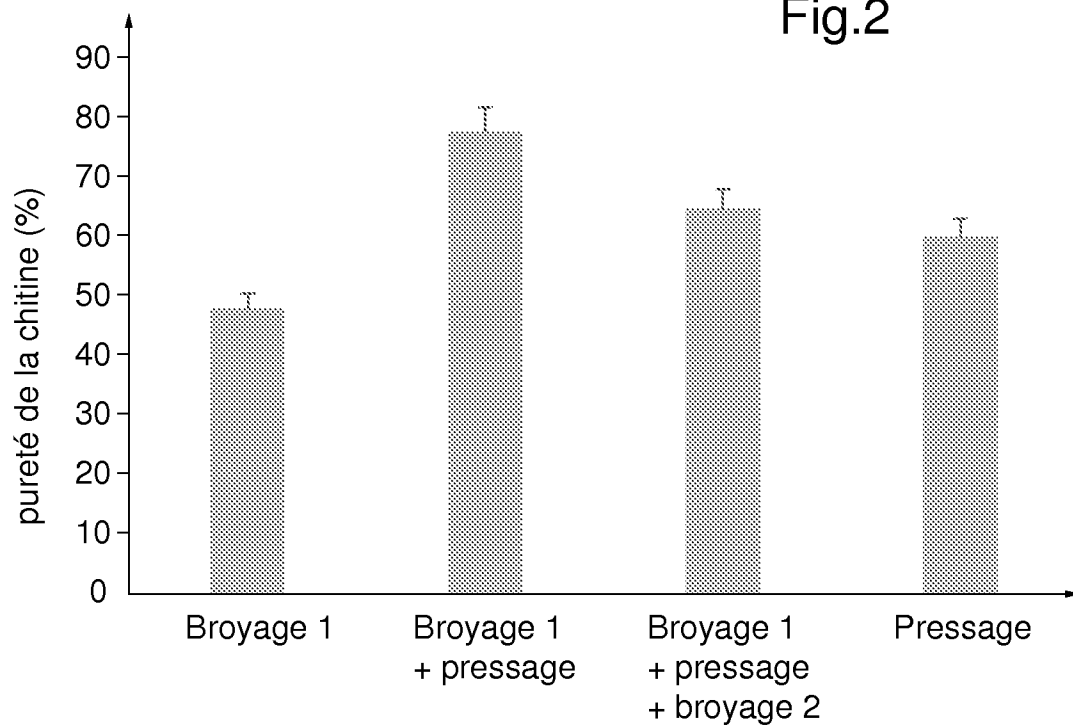


Fig. 3

■ pureté de la chitine
● tx des lipides dans l'hydrolysat
◆ tx des lipides dans la chitine

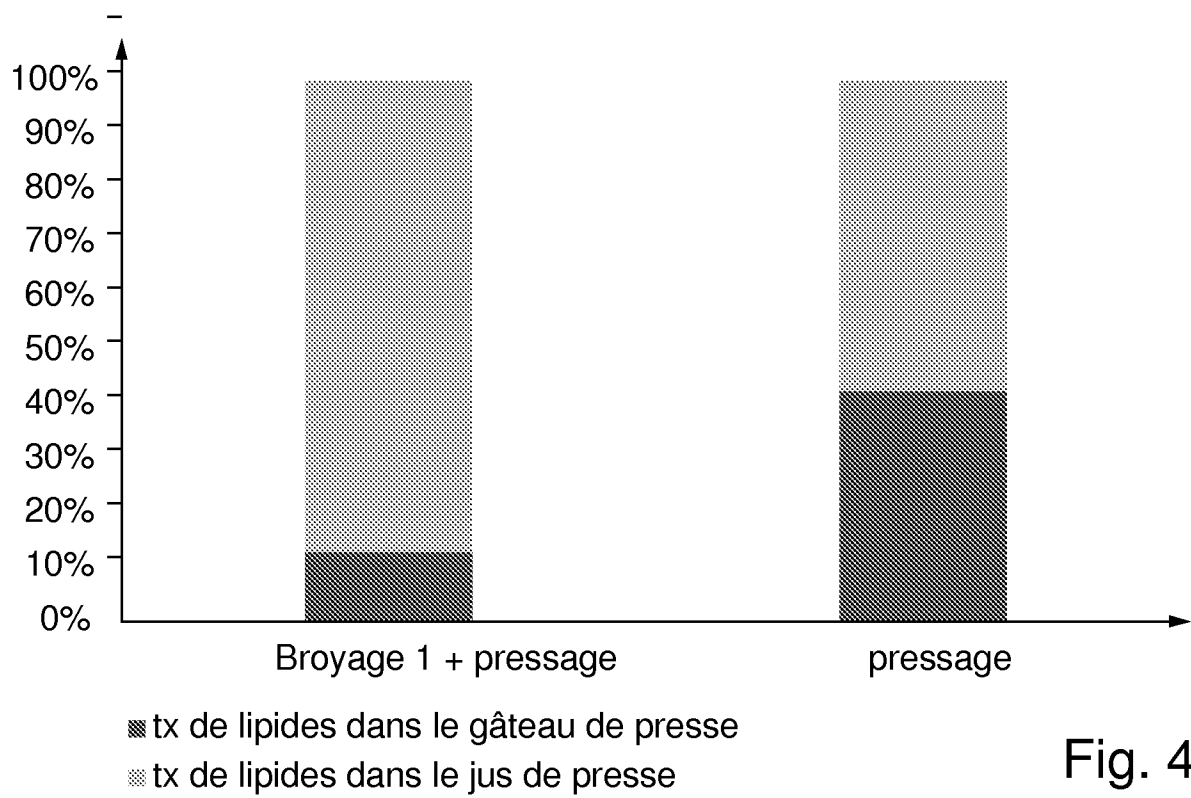


Fig. 4

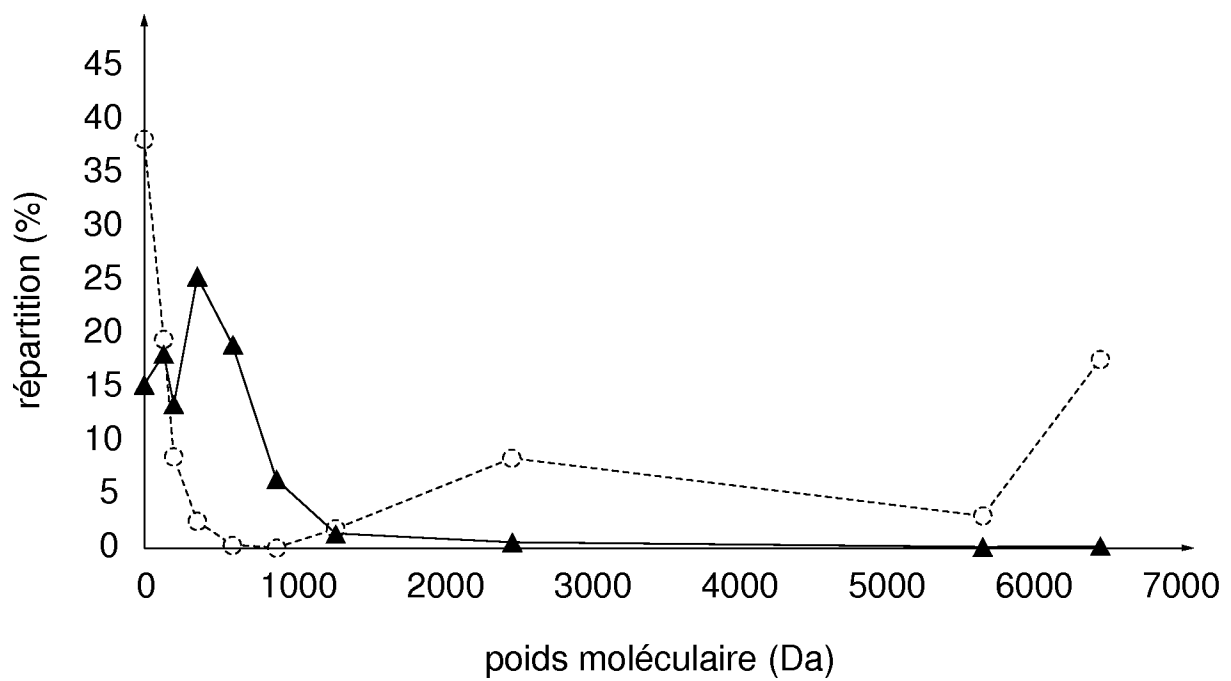
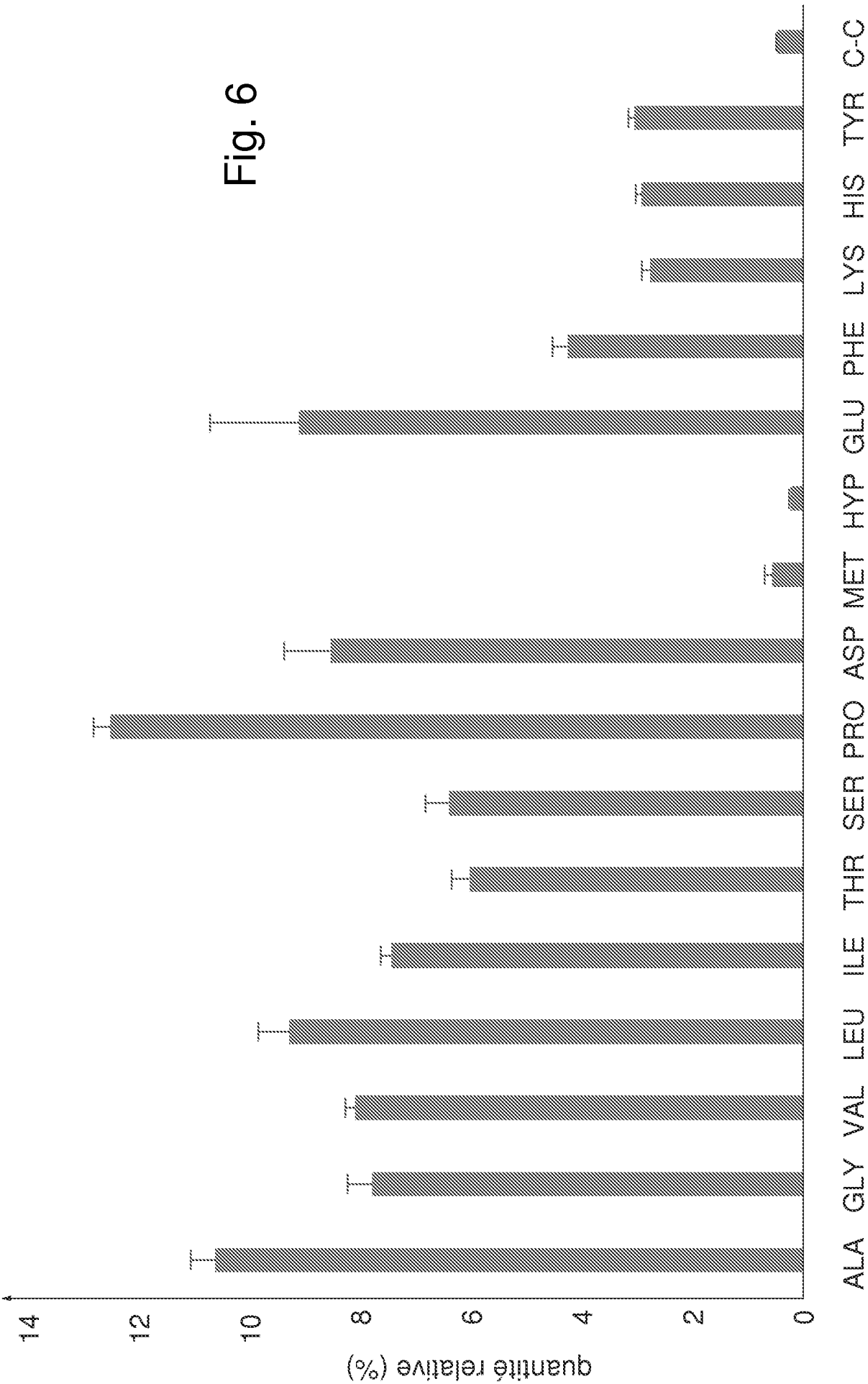
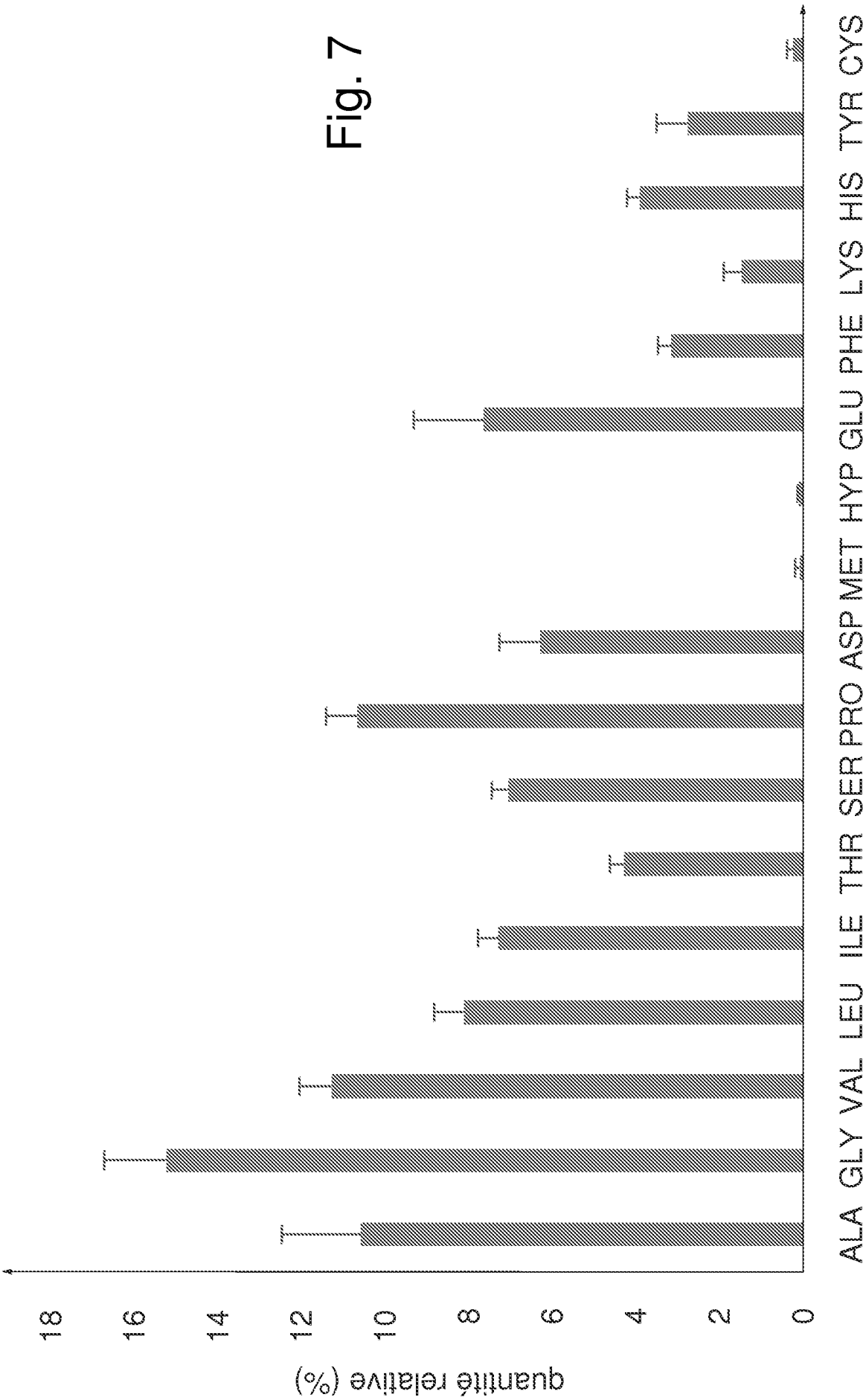


Fig. 5

---○--- jus de presse —▲— hydrolysat





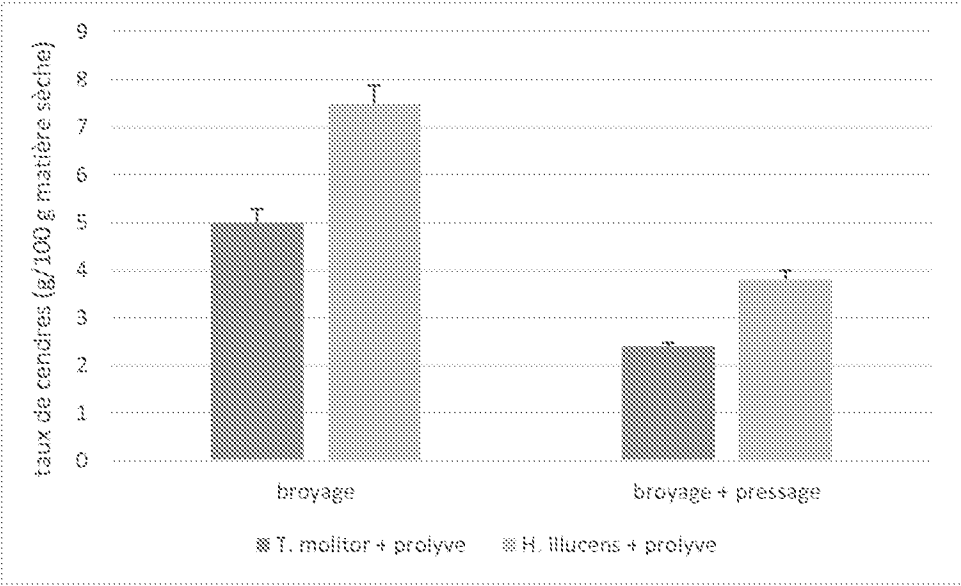


Fig. 8

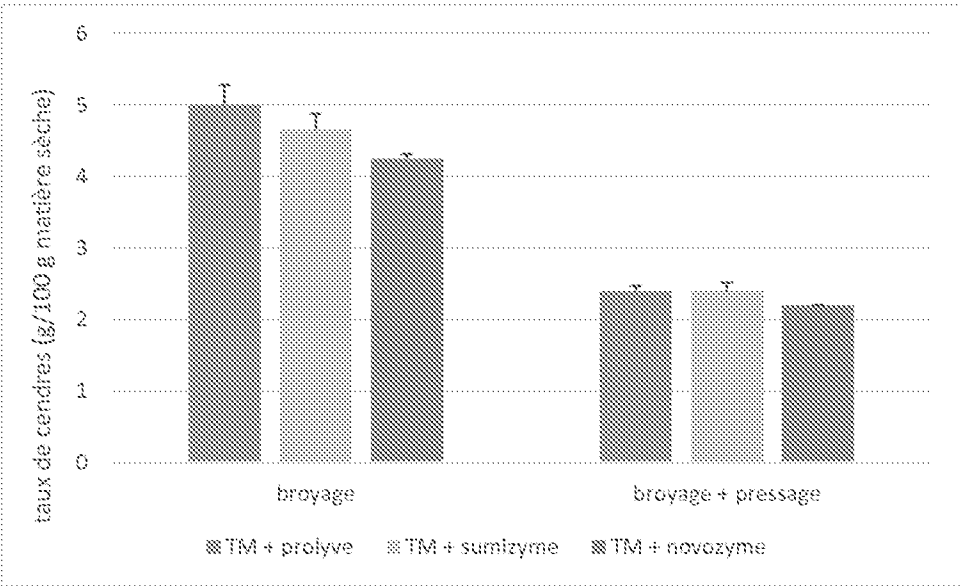


Fig. 9

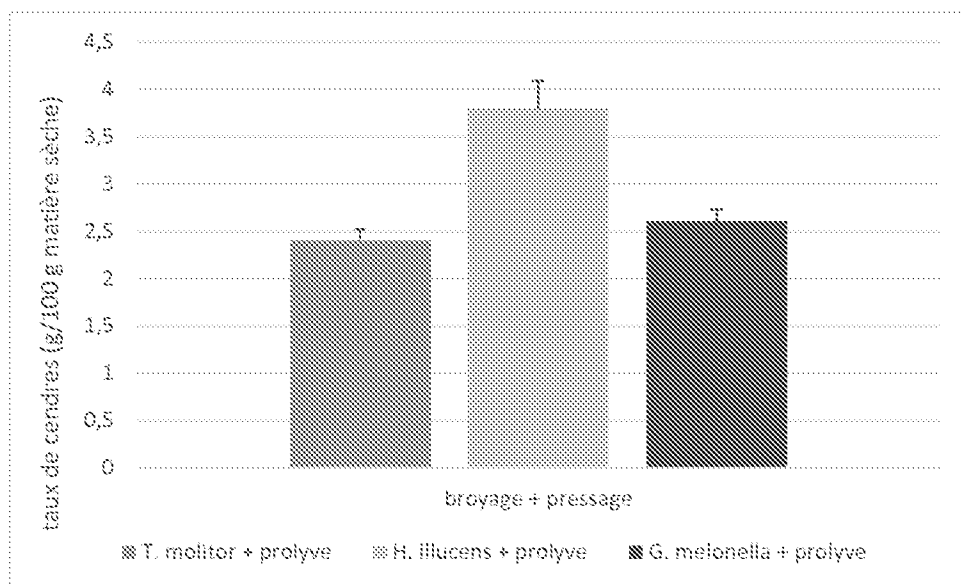


Fig. 10

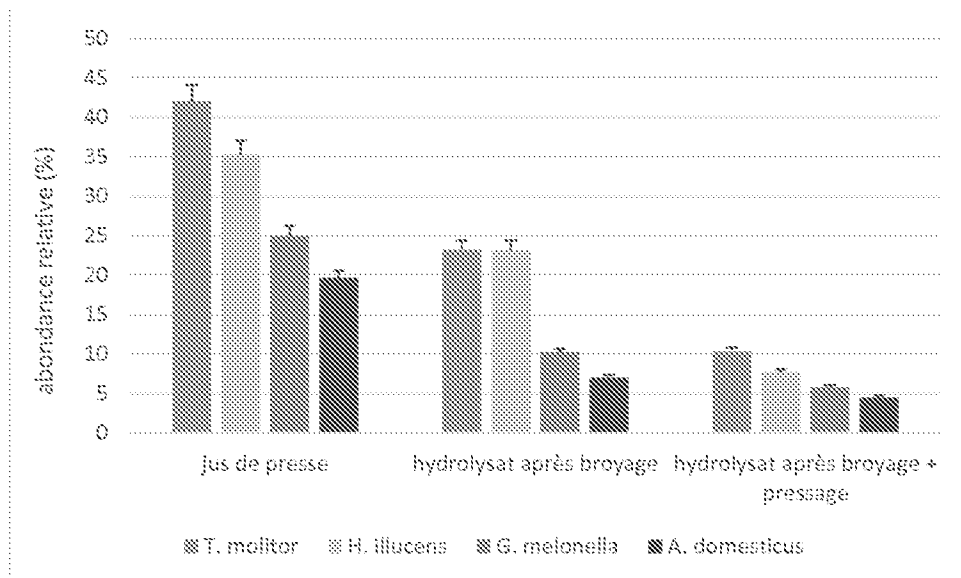


Fig. 11

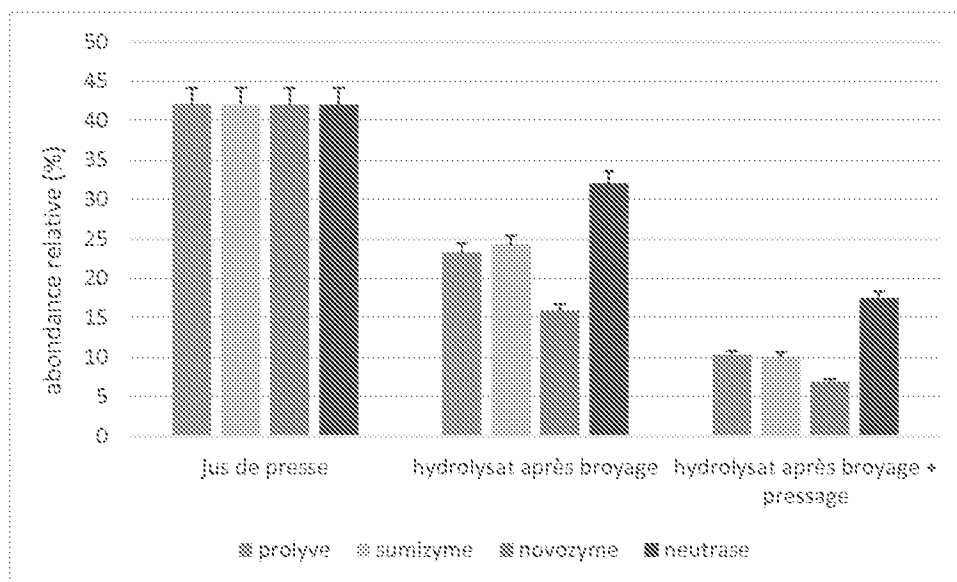


Fig. 12

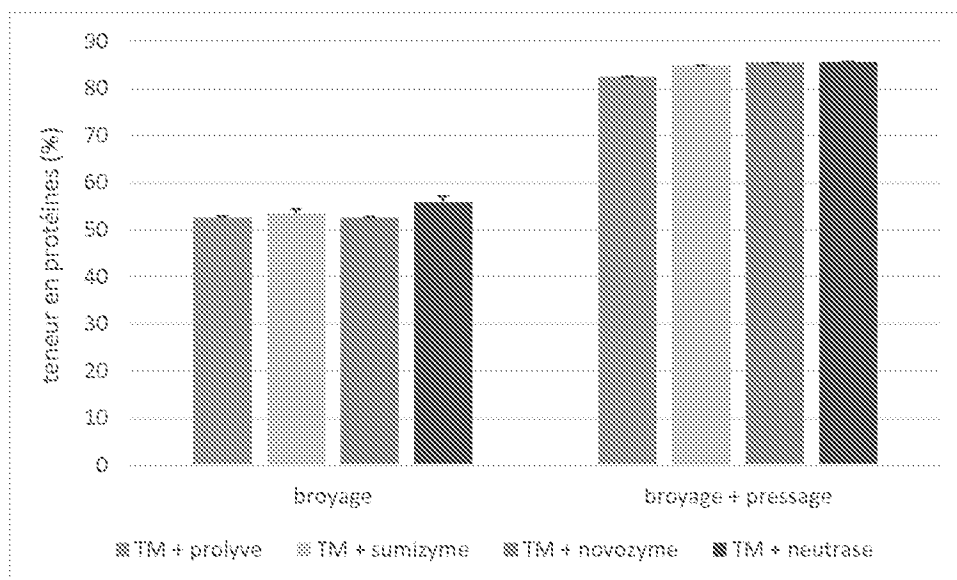


Fig. 13

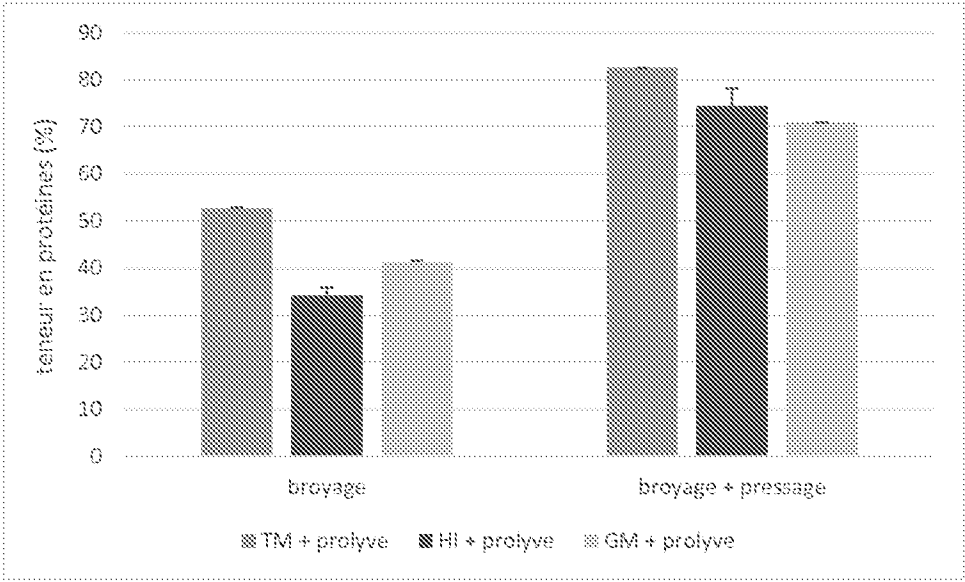


Fig. 14

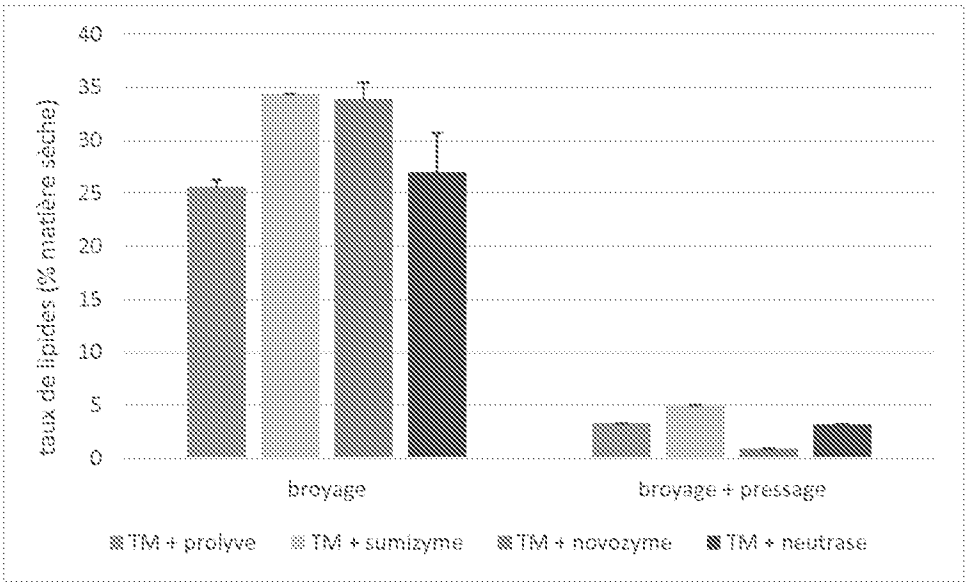


Fig. 15

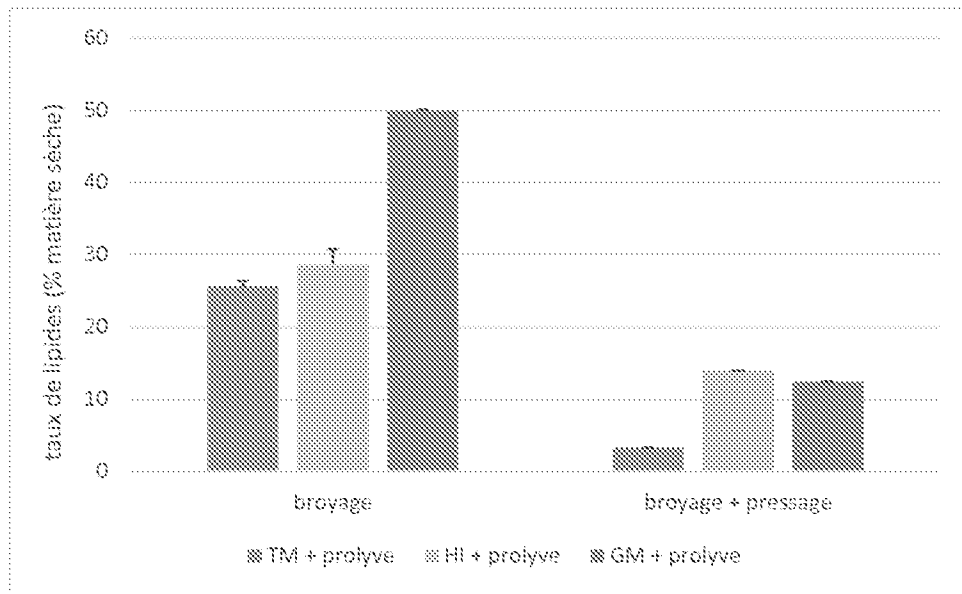


Fig. 16

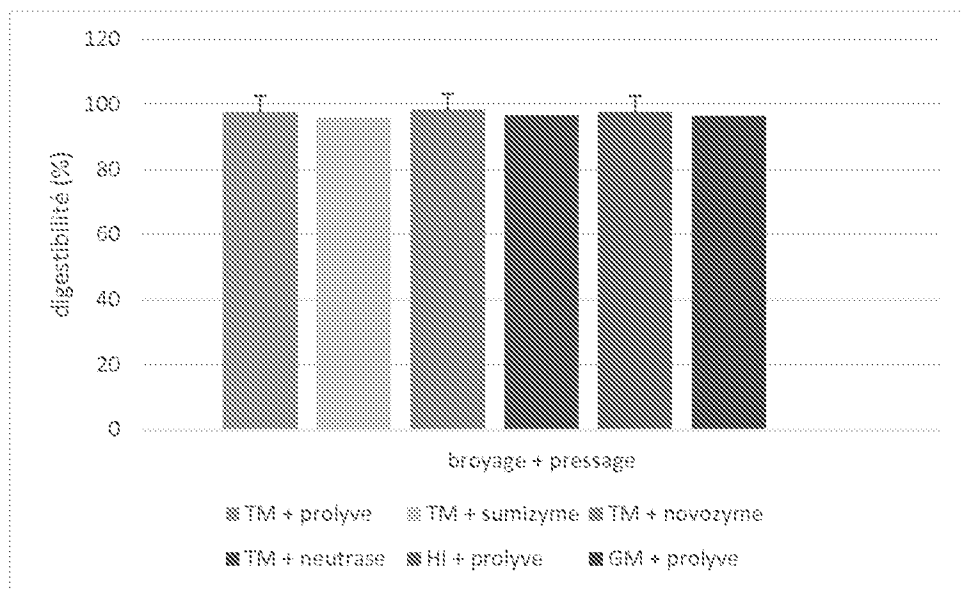


Fig. 17

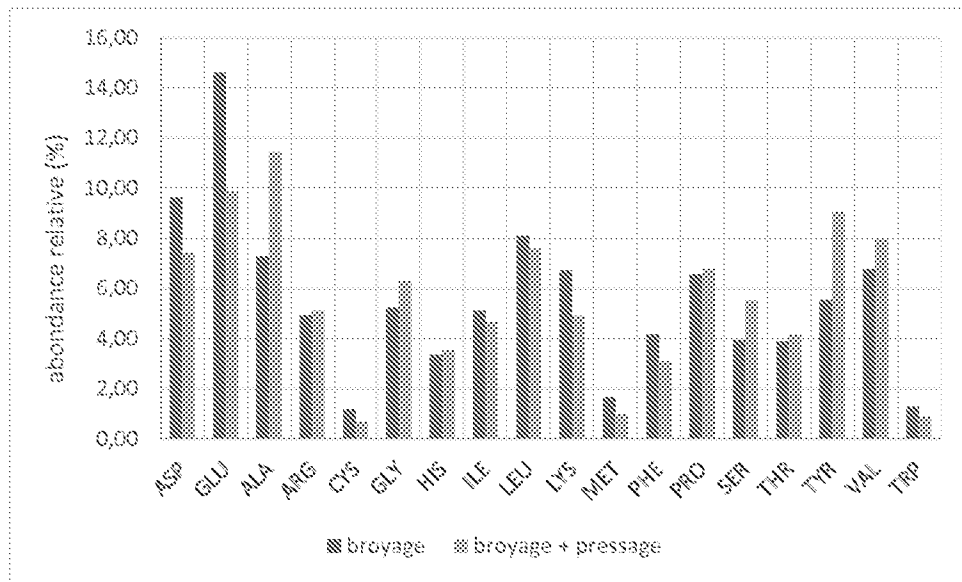


Fig. 18

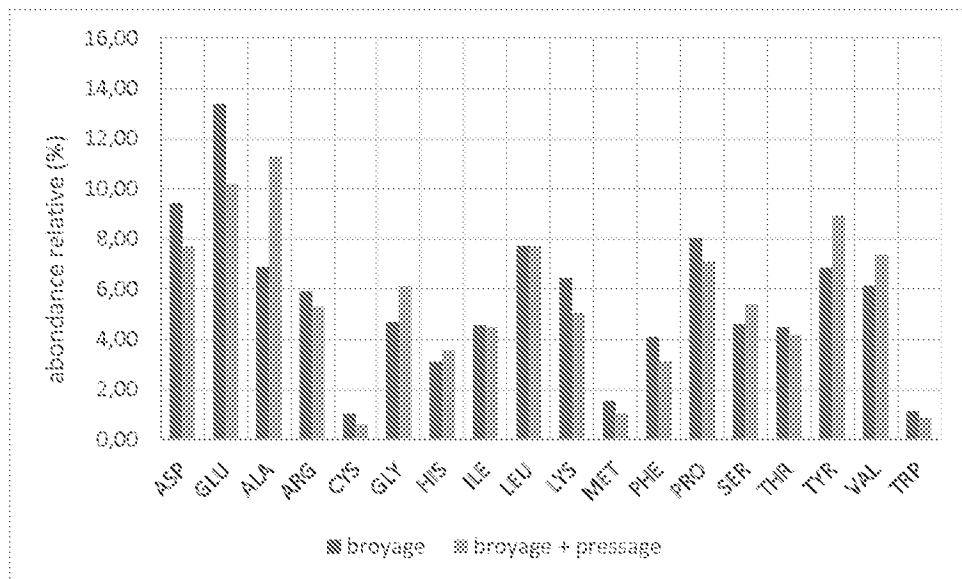


Fig. 19

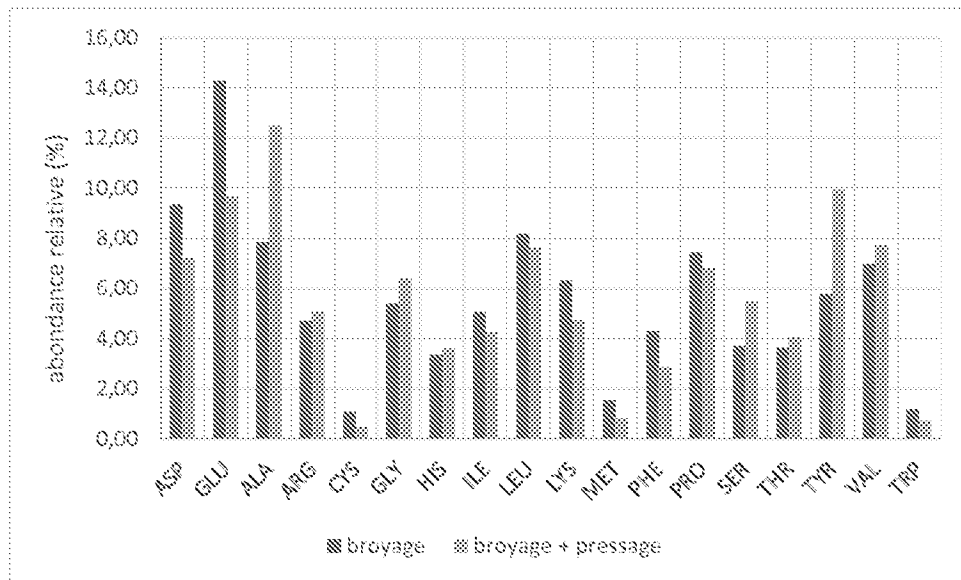


Fig. 20

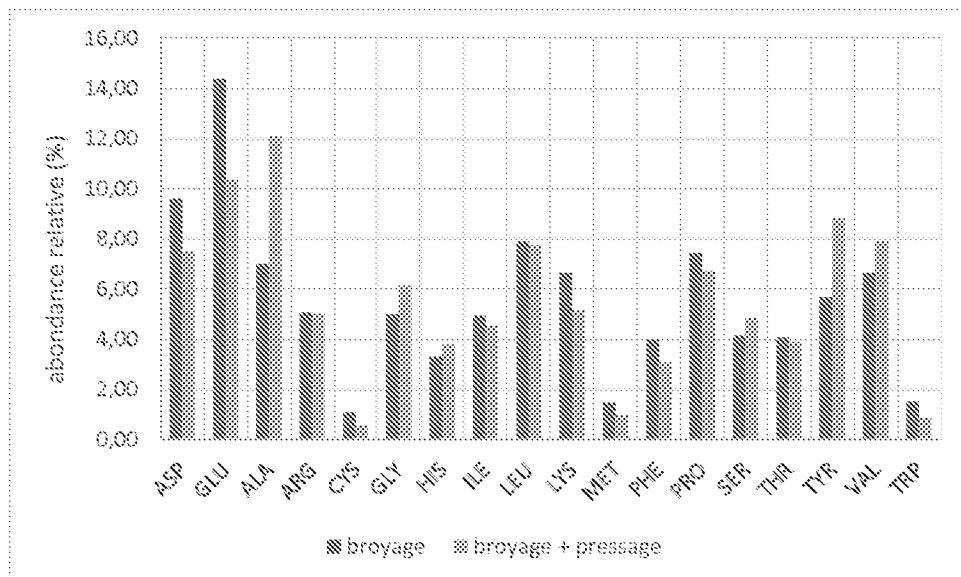


Fig. 21

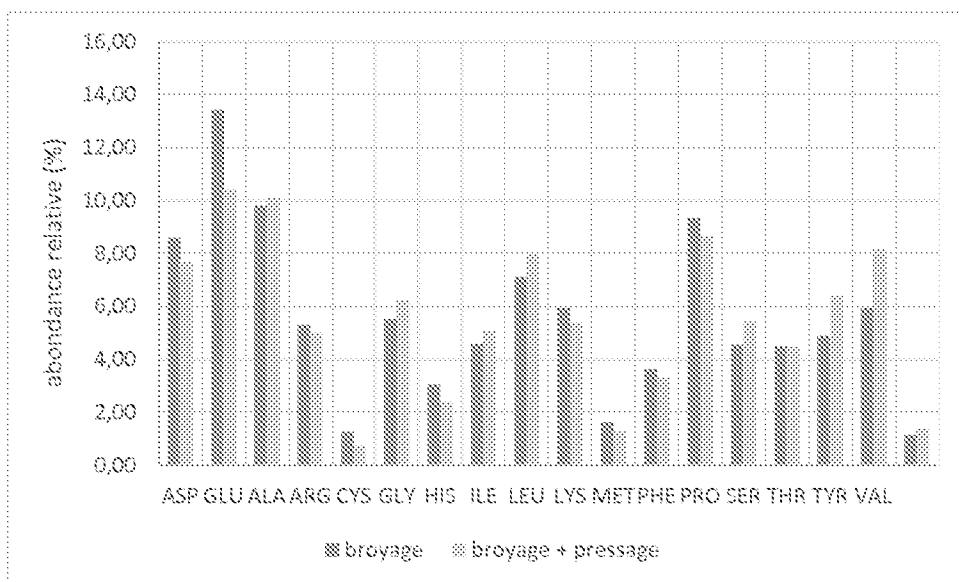


Fig. 22

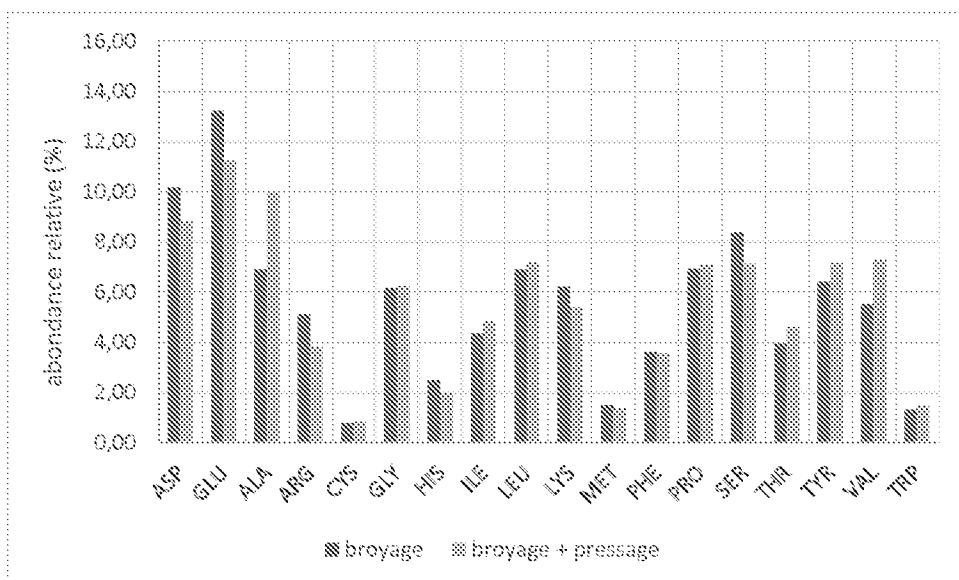


Fig. 23

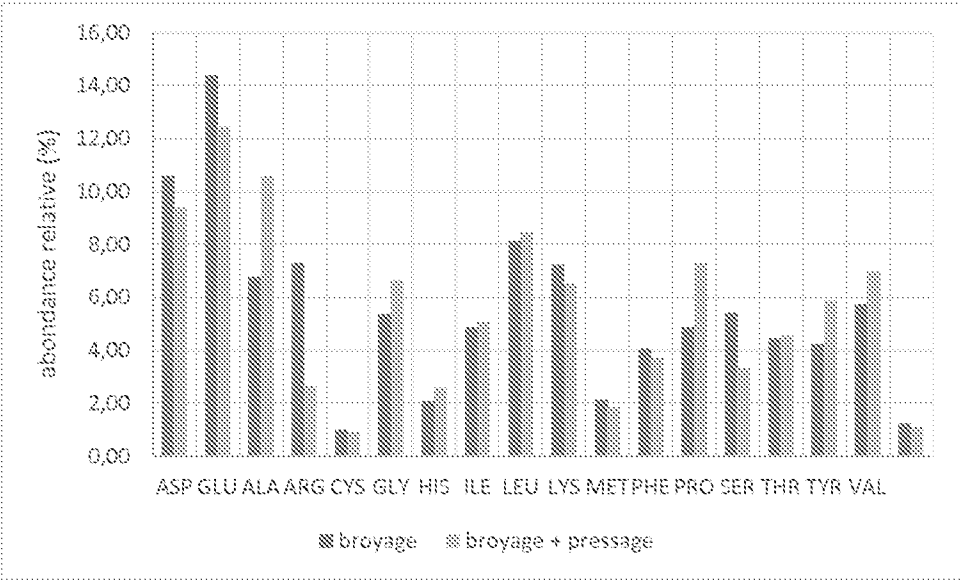


Fig. 24

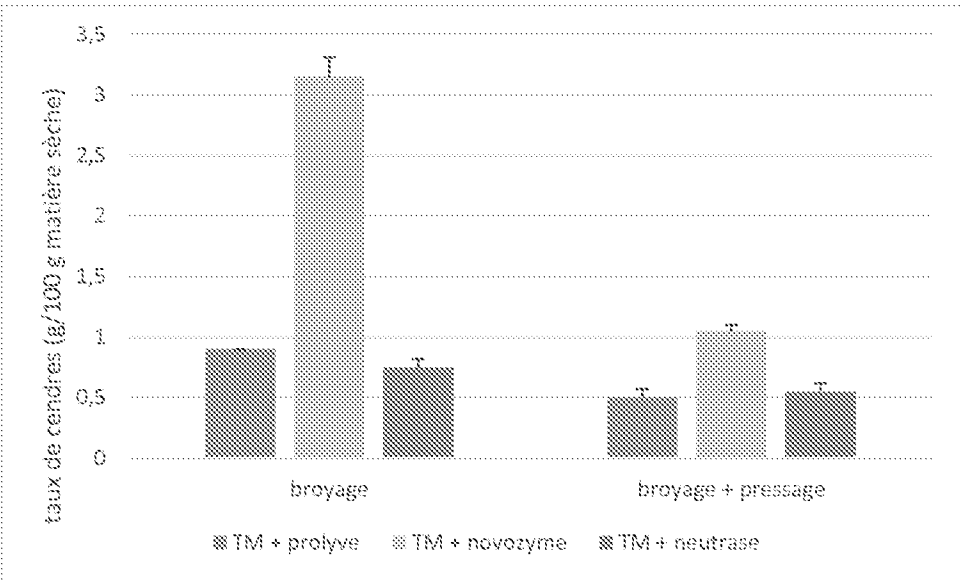


Fig. 25

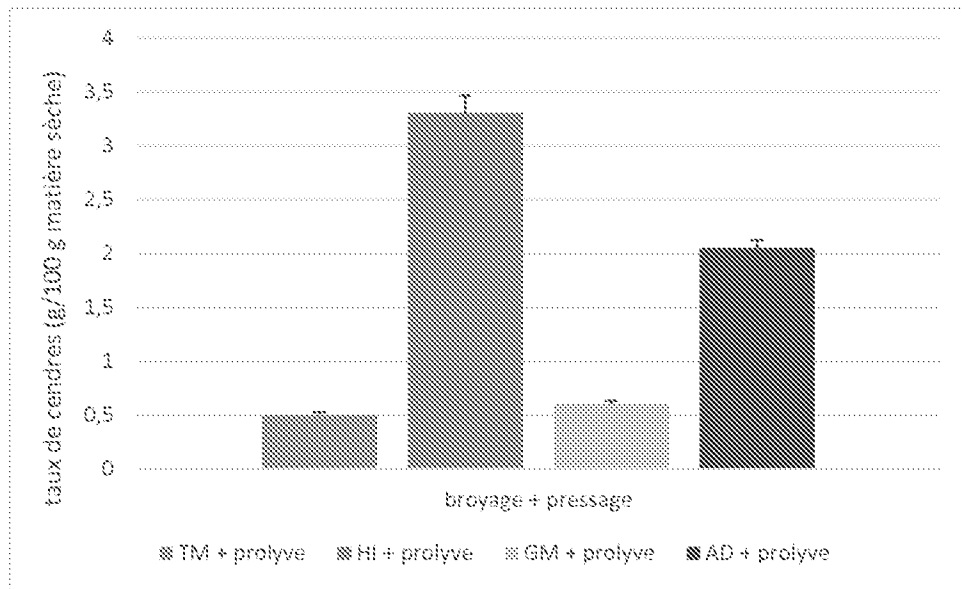


Fig. 26

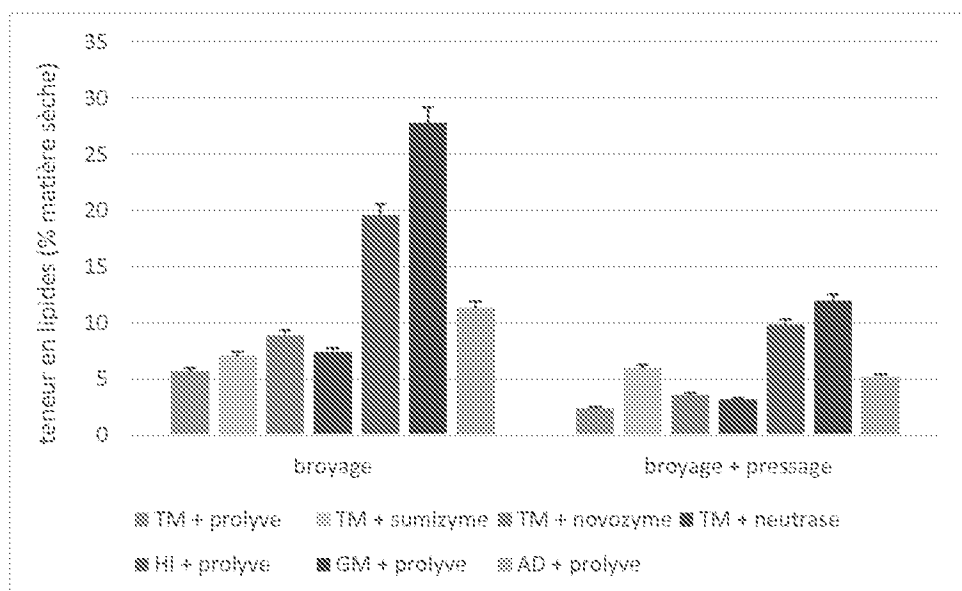


Fig. 27

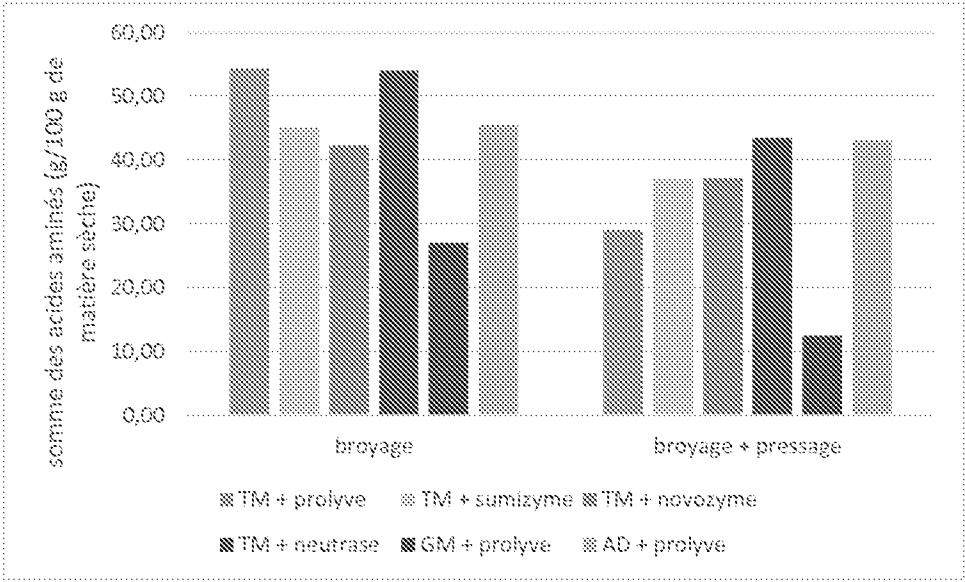


Fig. 28

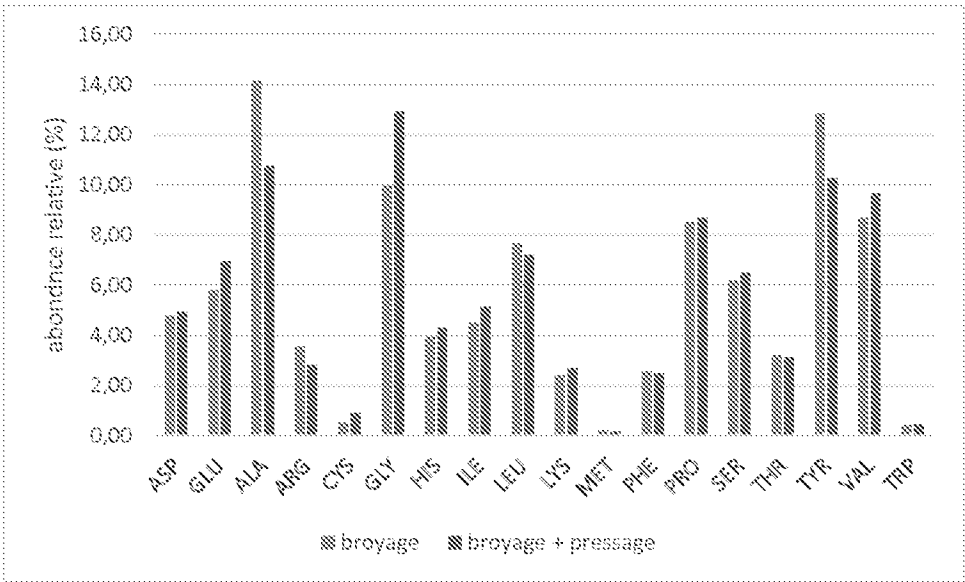


Fig. 29

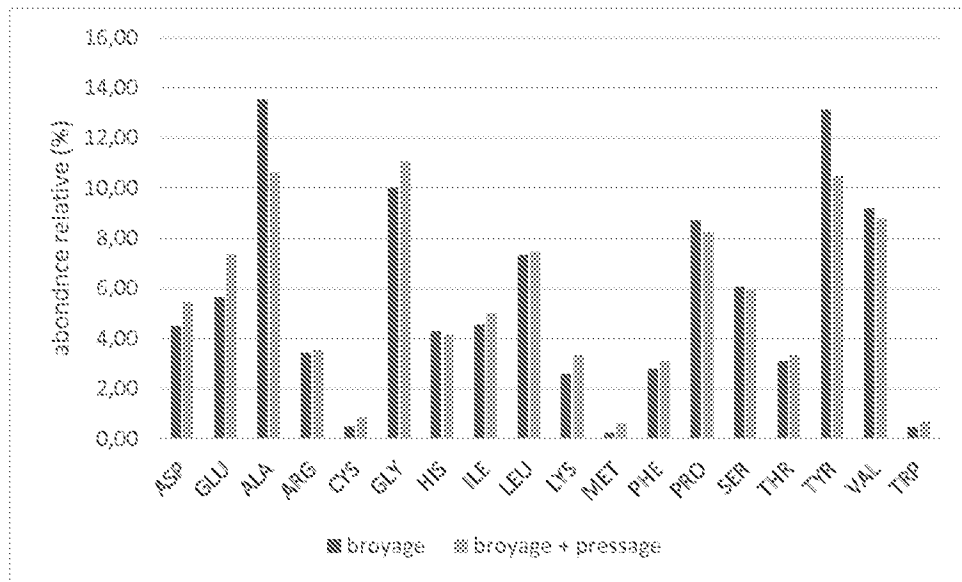


Fig. 30

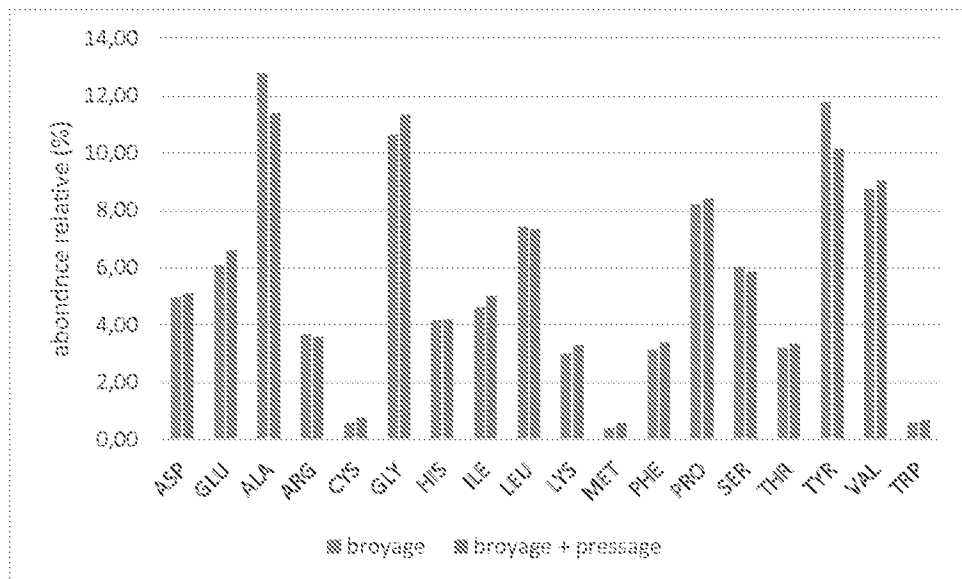


Fig. 31

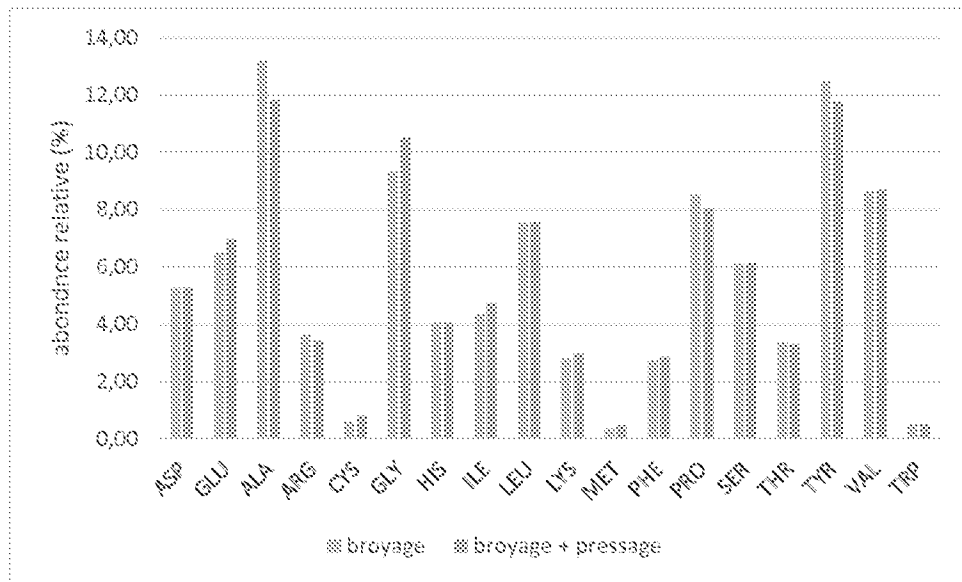


Fig. 32

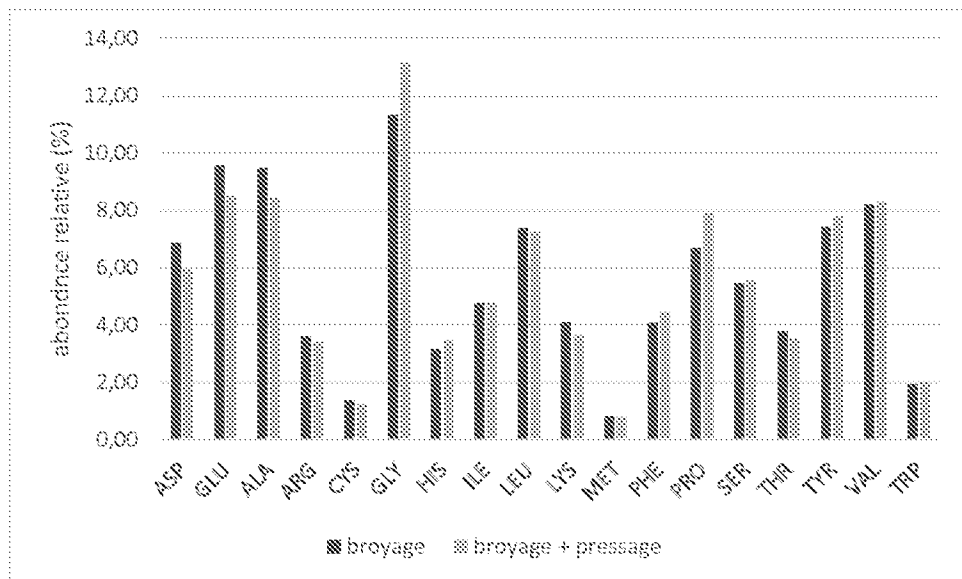


Fig. 33

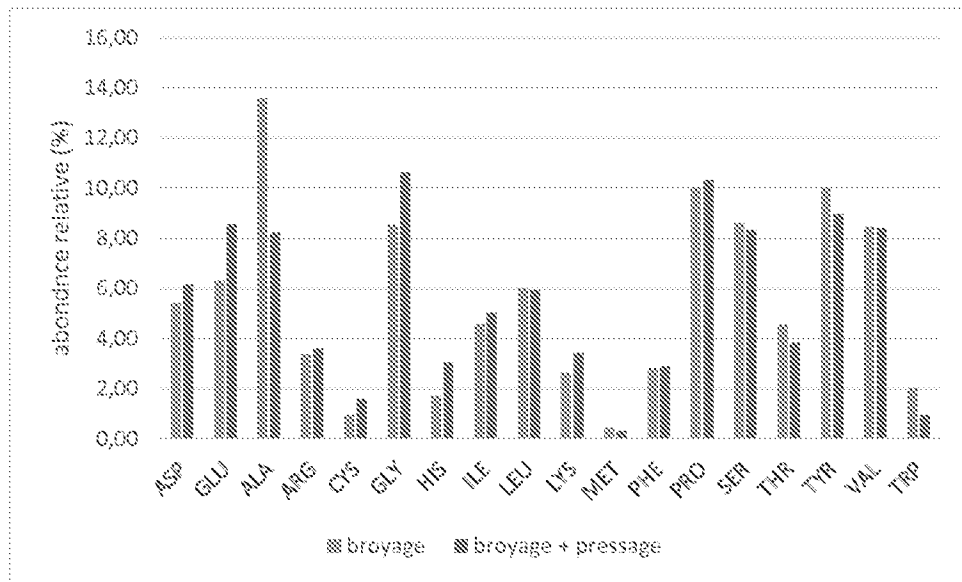


Fig. 34

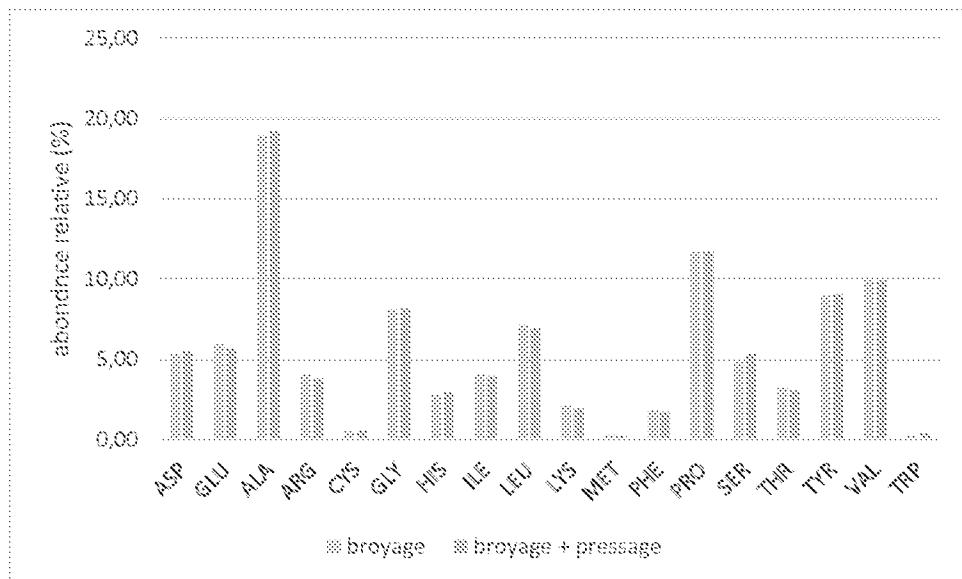


Fig. 35

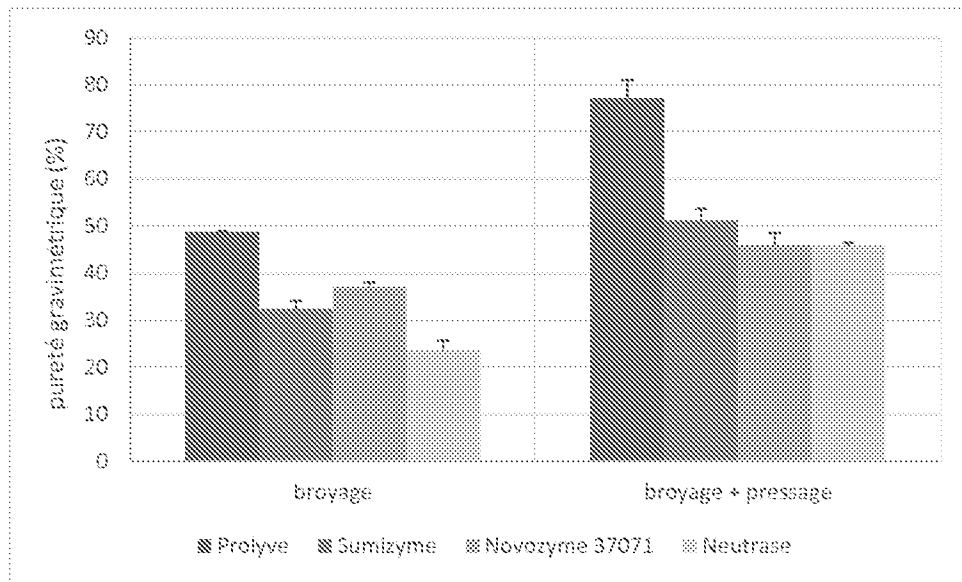


Fig. 36

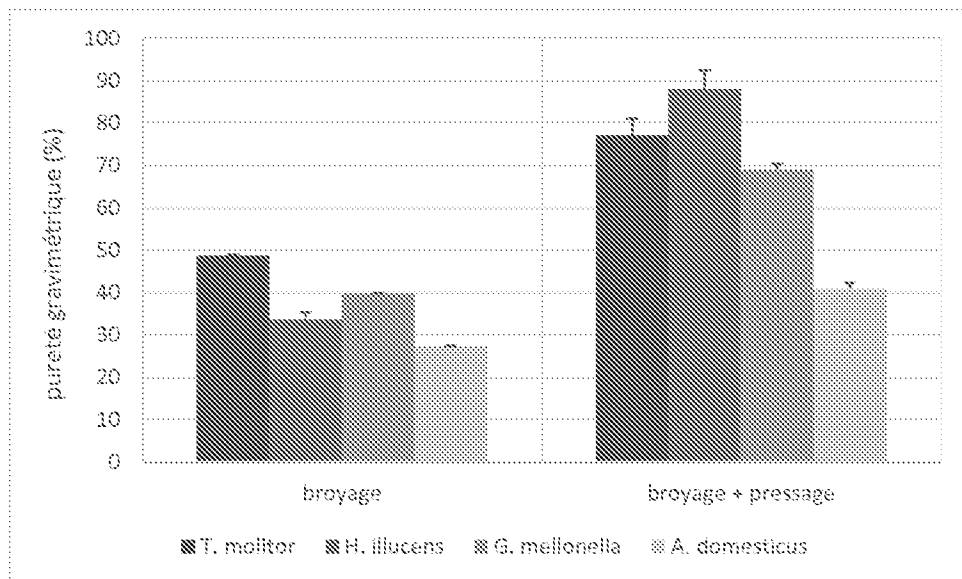


Fig. 37

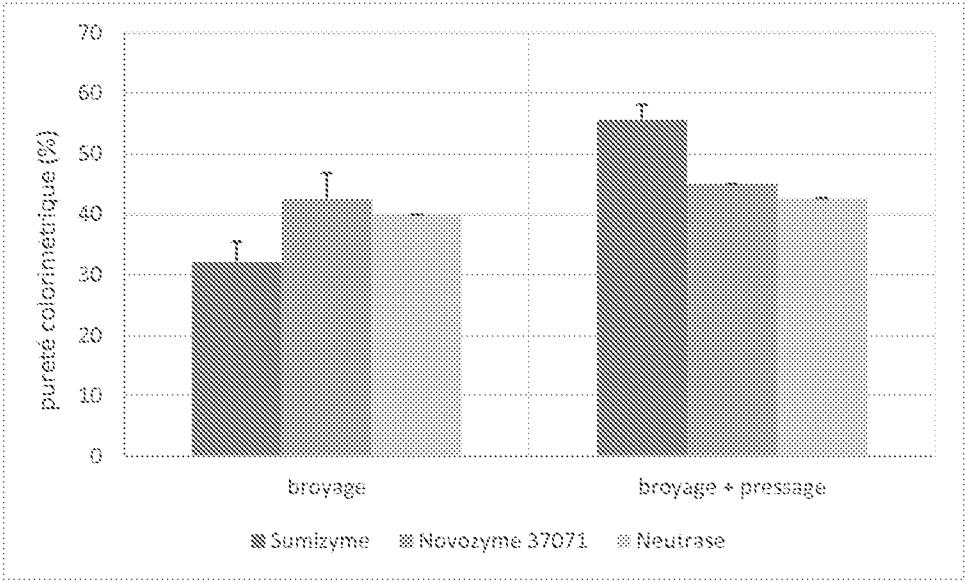


Fig. 38

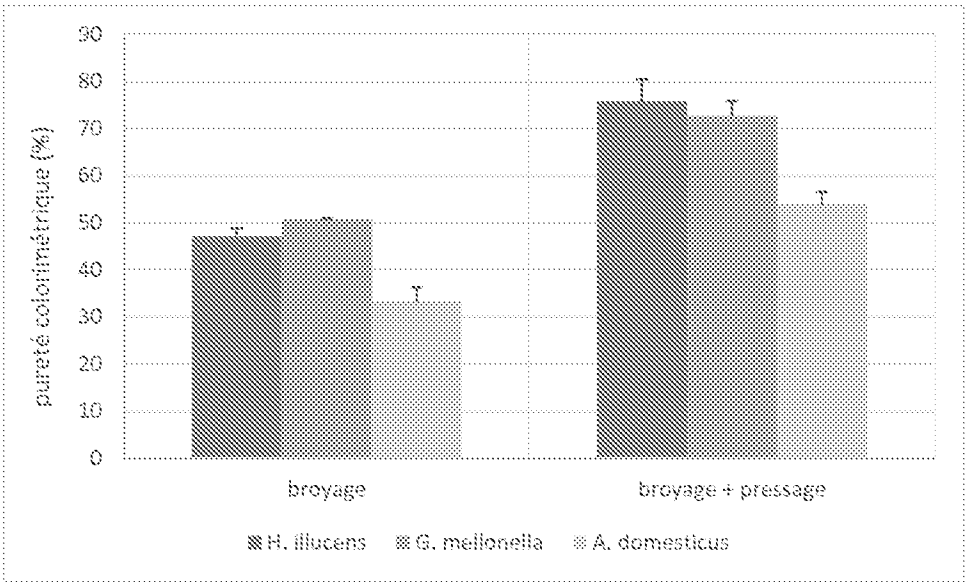


Fig. 39

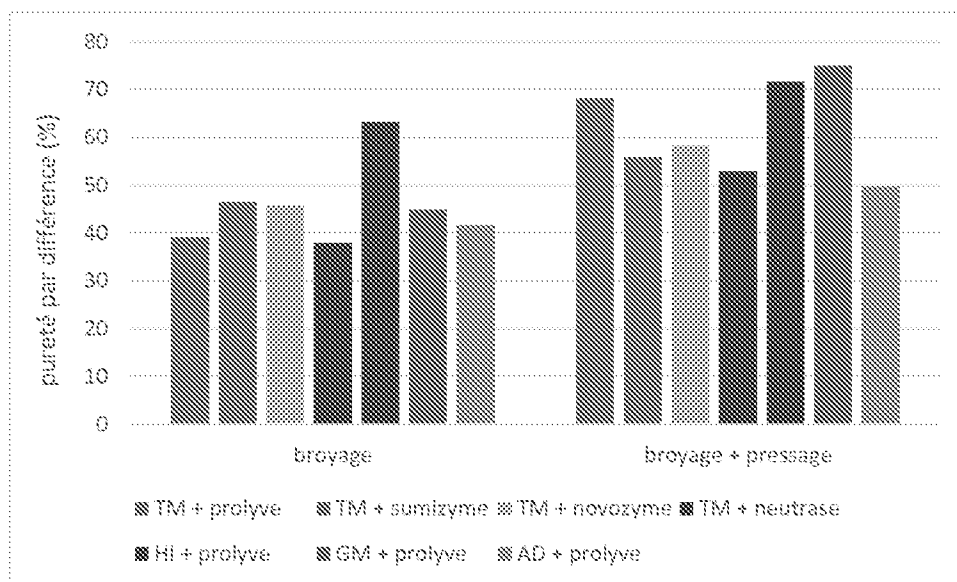


Fig. 40

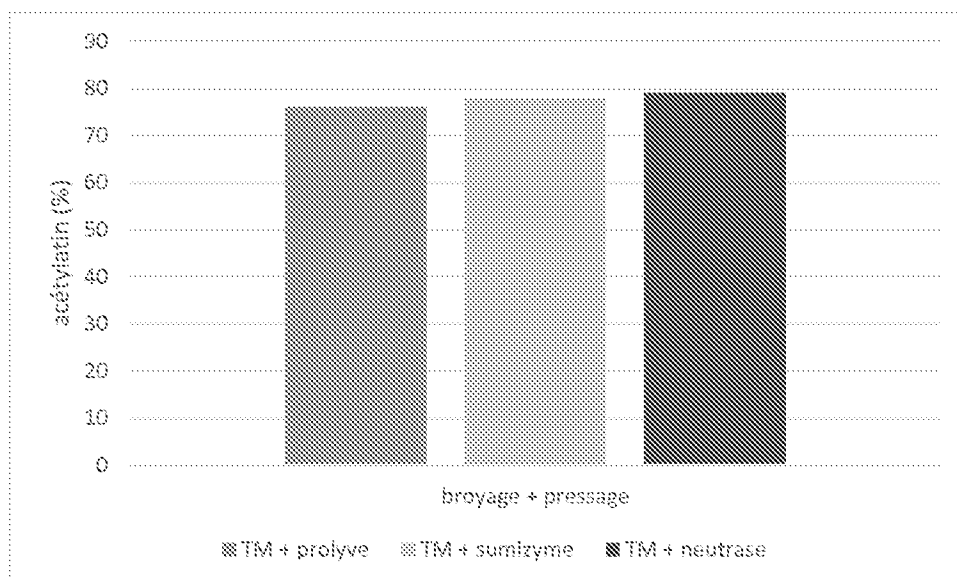


Fig. 41

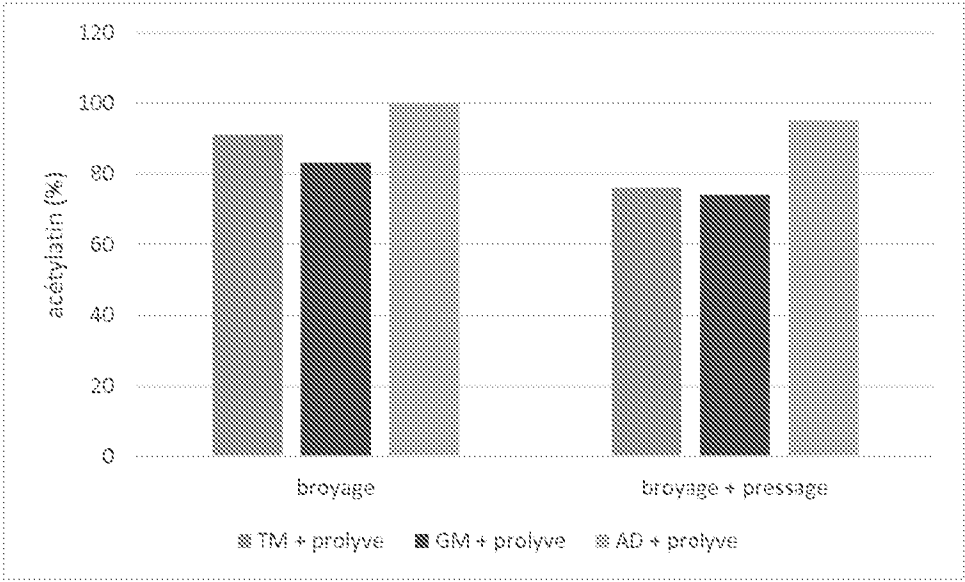


Fig. 42

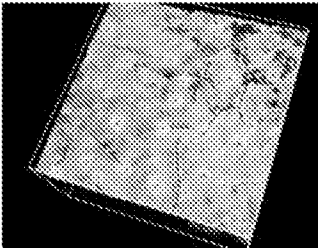
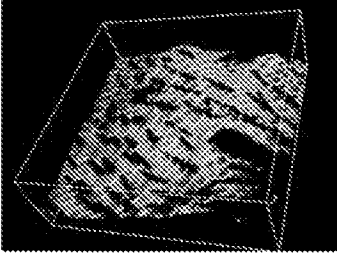
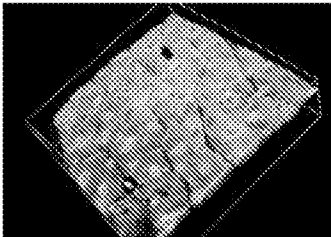
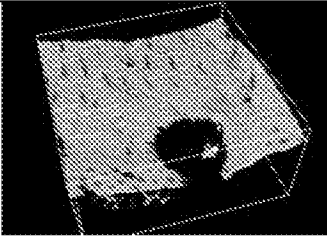
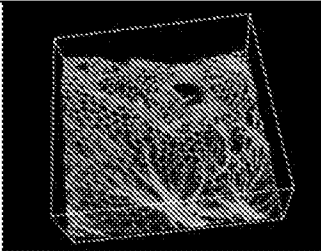
Cuticule brute	
Chitine purifiée enzymatiquement	
Chitine pure	

Figure 43

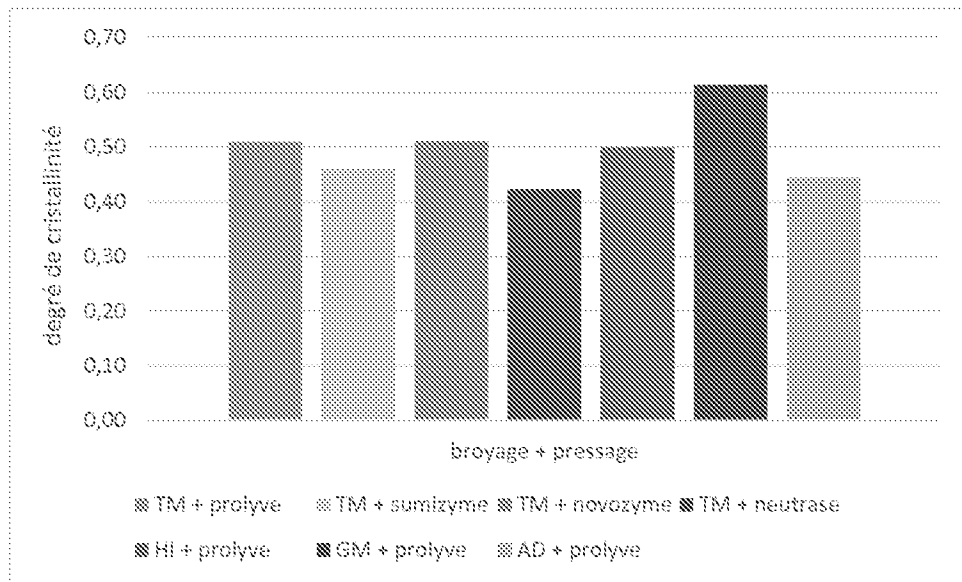


Fig. 44

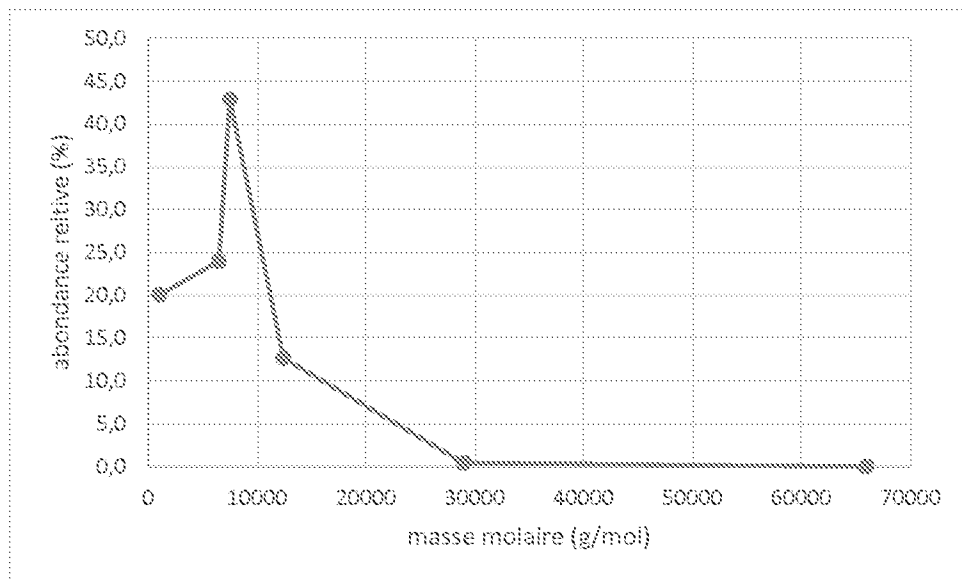


Fig. 45

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2015/053781

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12P19/26 C08B37/08 C12P21/06
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12P C08B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, FSTA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 101 144 097 B (CHONGQING BAIADIKI MICROECOLO [CN]) 1 December 2010 (2010-12-01) abstract; examples 2, 5 -----	3,4,6-14
X A	CN 101 775 085 A (ZHEJIANG PUJIANG CHENGYUE PLAN) 14 July 2010 (2010-07-14) abstract ----- -/-	11 3-8,10, 14



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 March 2016

Date of mailing of the international search report

24/03/2016

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Schröder, Gunnar

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2015/053781

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE WPI Week 201301 2012 Thomson Scientific, London, GB; AN 2012-M24188 XP002747930, - & CN 102 558 387 A (QINGDAO ZHONGREN PHARMACY CO LTD) 11 July 2012 (2012-07-11)	11
A	abstract	3-8,10, 14
X	----- CN 1 297 691 A (INST OF ZOOLOGY ACADEMIA SINIC [CN]) 6 June 2001 (2001-06-06)	11,13
A	abstract; claim 1	9,12
A	----- Nitar Nwe ET AL: "Chitin and Chitosan from Terrestrial Organisms" In: "Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives: Biological Activities and Applications", 1 October 2010 (2010-10-01), CRC Press, XP055221223, ISBN: 978-1-4398-1603-5 pages 3-10, paragraph [1.2.2]	5
X	----- FR 2 975 706 A1 (IFREMER [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; UNIV NANTES [FR]) 30 November 2012 (2012-11-30)	1
A	abstract; figure 1 pages 20-23; table 1	2
X	----- US 4 958 011 A (BADE MARIA L [US]) 18 September 1990 (1990-09-18) column 13, line 35 - column 15, line 68	1
X	----- FR 2 927 336 A1 (CIE DES PECHES SAINT MALO SANT [FR]) 14 August 2009 (2009-08-14) abstract; claim 1	2
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2015/053781

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JUAN WANG ET AL: "Housefly larvae hydrolysate: orthogonal optimization of hydrolysis, antioxidant activity, amino acid composition and functional properties", BMC RESEARCH NOTES, BIOMED CENTRAL LTD, GB, vol. 6, no. 1, 17 May 2013 (2013-05-17), page 197, XP021151554, ISSN: 1756-0500, DOI: 10.1186/1756-0500-6-197 abstract page 7, right-hand column, paragraph 2 - last paragraph page 2, right-hand column, paragraph 2; figure 2	2,13
A	----- DAI CHUNHUA ET AL: "Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived fromTenebrio molitor(L.) larva protein hydrolysate", EUROPEAN FOOD RESEARCH AND TECHNOLOGY, SPRINGER VERLAG, HEIDELBERG, DE, vol. 236, no. 4, 1 February 2013 (2013-02-01), pages 681-689, XP035311054, ISSN: 1438-2377, DOI: 10.1007/S00217-013-1923-Z [retrieved on 2013-02-01] abstract; figure 2; table 1 page 685, left-hand column, line 3 - right-hand column, paragraph 2 page 682, right-hand column, paragraph 2-3 -----	2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2015/053781

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
CN 101144097	B	01-12-2010	NONE
CN 101775085	A	14-07-2010	NONE
CN 102558387	A	11-07-2012	NONE
CN 1297691	A	06-06-2001	NONE
FR 2975706	A1	30-11-2012	EC SP13013114 A 31-05-2014 EP 2714918 A1 09-04-2014 FR 2975706 A1 30-11-2012 JP 2014522240 A 04-09-2014 US 2014100361 A1 10-04-2014 WO 2012168618 A1 13-12-2012
US 4958011	A	18-09-1990	NONE
FR 2927336	A1	14-08-2009	CA 2714155 A1 20-08-2009 EP 2247745 A1 10-11-2010 FR 2927336 A1 14-08-2009 JP 5543375 B2 09-07-2014 JP 2011511783 A 14-04-2011 US 2011124570 A1 26-05-2011 US 2014221293 A1 07-08-2014 WO 2009101146 A1 20-08-2009

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2015/053781

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C12P19/26 C08B37/08 C12P21/06 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C12P C08B		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, FSTA		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	CN 101 144 097 B (CHONGQING BAIADIKI MICROECOLO [CN]) 1 décembre 2010 (2010-12-01) abrégé; exemples 2, 5 -----	3,4,6-14
X	CN 101 775 085 A (ZHEJIANG PUJIANG CHENGYUE PLAN) 14 juillet 2010 (2010-07-14) abrégé -----	11
A	----- -/-	3-8,10, 14
☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée	"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets	
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 16 mars 2016	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 24/03/2016	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé Schröder, Gunnar	

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	DATABASE WPI Week 201301 2012 Thomson Scientific, London, GB; AN 2012-M24188 XP002747930, -& CN 102 558 387 A (QINGDAO ZHONGREN PHARMACY CO LTD) 11 juillet 2012 (2012-07-11)	11
A	abrégé	3-8,10, 14
X	----- CN 1 297 691 A (INST OF ZOOLOGY ACADEMIA SINIC [CN]) 6 juin 2001 (2001-06-06)	11,13
A	abrégé; revendication 1	9,12
A	----- 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, alinéa [1.2.2]	5
X	----- FR 2 975 706 A1 (IFREMER [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; UNIV NANTES [FR]) 30 novembre 2012 (2012-11-30)	1
A	abrégé; figure 1 pages 20-23; tableau 1	2
X	----- US 4 958 011 A (BADE MARIA L [US]) 18 septembre 1990 (1990-09-18) colonne 13, ligne 35 - colonne 15, ligne 68	1
X	----- FR 2 927 336 A1 (CIE DES PECHEES SAINT MALO SANT [FR]) 14 août 2009 (2009-08-14) abrégé; revendication 1	2
	----- -/--	

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	JUAN WANG ET AL: "Housefly larvae hydrolysate: orthogonal optimization of hydrolysis, antioxidant activity, amino acid composition and functional properties", BMC RESEARCH NOTES, BIOMED CENTRAL LTD, GB, vol. 6, no. 1, 17 mai 2013 (2013-05-17), page 197, XP021151554, ISSN: 1756-0500, DOI: 10.1186/1756-0500-6-197 abrégé page 7, colonne de droite, alinéa 2 - dernier alinéa page 2, colonne de droite, alinéa 2; figure 2	2,13
A	----- DAI CHUNHUA ET AL: "Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived fromTenebrio molitor(L.) larva protein hydrolysate", EUROPEAN FOOD RESEARCH AND TECHNOLOGY, SPRINGER VERLAG, HEIDELBERG, DE, vol. 236, no. 4, 1 février 2013 (2013-02-01), pages 681-689, XP035311054, ISSN: 1438-2377, DOI: 10.1007/S00217-013-1923-Z [extrait le 2013-02-01] abrégé; figure 2; tableau 1 page 685, colonne de gauche, ligne 3 - colonne de droite, alinéa 2 page 682, colonne de droite, alinéa 2-3 -----	2

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2015/053781

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
CN 101144097	B	01-12-2010	AUCUN	
CN 101775085	A	14-07-2010	AUCUN	
CN 102558387	A	11-07-2012	AUCUN	
CN 1297691	A	06-06-2001	AUCUN	
FR 2975706	A1	30-11-2012	EC SP13013114 A	31-05-2014
			EP 2714918 A1	09-04-2014
			FR 2975706 A1	30-11-2012
			JP 2014522240 A	04-09-2014
			US 2014100361 A1	10-04-2014
			WO 2012168618 A1	13-12-2012
US 4958011	A	18-09-1990	AUCUN	
FR 2927336	A1	14-08-2009	CA 2714155 A1	20-08-2009
			EP 2247745 A1	10-11-2010
			FR 2927336 A1	14-08-2009
			JP 5543375 B2	09-07-2014
			JP 2011511783 A	14-04-2011
			US 2011124570 A1	26-05-2011
			US 2014221293 A1	07-08-2014
			WO 2009101146 A1	20-08-2009