



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0031003

(51)⁸ C12P 19/26; C12P 21/06; C08B 37/08

(13) B

(21) 1-2017-02929

(22) 30/12/2015

(86) PCT/FR2015/053781 30/12/2015

(87) WO2016/108033 07/07/2016

(30) 1463512 31/12/2014 FR

(45) 25/02/2022 407

(43) 25/10/2017 355A

(73) YNSECT (FR)

1 Rue Pierre Fontaine, 91058 Evry Cedex, France

(72) BEREZINA, Nathalie (FR); HUBERT, Antoine (FR); BERRO, Fabrice (FR);

LEVON, Jean-Gabriel (FR); LE ROUX, Karine (FR); SOCOLSKY, Cecilia (AR);

SANCHEZ, Lorena (MX); LAURENT, Sophie (FR).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) SẢN PHẨM THỦY PHÂN VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA ÍT NHẤT MỘT SẢN PHẨM MONG MUỐN TỪ CÔN TRÙNG

(57) Sáng chế đề cập đến chitin, sản phẩm thủy phân và phương pháp tạo ra ít nhất một sản phẩm mong muốn từ côn trùng. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra ít nhất một sản phẩm mong muốn từ côn trùng, bao gồm lớp bước ép cuticun côn trùng, tiếp theo là bước thủy phân bằng enzym các lớp cuticun của côn trùng bằng cách sử dụng enzym phân giải protein.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra ít nhất một sản phẩm mong muốn từ côn trùng. Cụ thể hơn nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra chitin và/hoặc chitosan bằng cách thủy phân bằng enzym các lớp cuticun của côn trùng. Sáng chế cũng đề cập đến chitin và sản phẩm thủy phân đặc trưng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Theo sáng chế, "chitin" có nghĩa là loại dẫn xuất chitin bất kỳ, tức là, loại dẫn xuất polysacarit bất kỳ bao gồm các đơn vị N-axetylglucosamin và các đơn vị D-glucosamin, đặc biệt là các copolyme chitin-polypeptit (đôi khi còn được gọi là "phức hợp chitin/polypeptit").

Chitin được cho là polyme được tổng hợp phổ biến đứng thứ hai trong thế giới sinh vật sống sau xenluloza. Trên thực tiễn, chitin được tổng hợp bởi nhiều loài trong thế giới sinh vật sống: nó cấu thành một phần của bộ xương ngoài của các loài giáp xác và côn trùng và vách bên bao xung quanh và bảo vệ nấm. Cụ thể hơn nữa, ở côn trùng, chitin như vậy cấu thành 3 đến 60% bộ xương ngoài của chúng.

Theo sáng chế, "chitosan" có nghĩa là các sản phẩm của quá trình khử axetyl của chitin. Ranh giới thông thường giữa chitosan và chitin được xác định bằng mức độ axetyl hóa: hợp chất có mức độ axetyl hóa dưới 50% được gọi là chitosan, và hợp chất có mức độ axetyl hóa lớn hơn 50% được gọi là chitin.

Chitin và/hoặc chitosan được sử dụng trong nhiều ứng dụng: mỹ phẩm (chế phẩm mỹ phẩm), y và dược (dược phẩm, điều trị bỏng, vật liệu sinh học, băng giãc mạc, vật liệu khâu), chế biến dinh dưỡng và thực phẩm, kỹ thuật (các chất lọc, kết cấu, keo tụ hoặc chất hấp phụ, đặc biệt là trong lọc và tinh chế nước), v.v.. Trên thực tiễn, chitin và/hoặc chitosan là nguyên liệu có khả năng tương thích sinh học, có thể phân hủy sinh học và không độc tính.

Theo truyền thống, chitin được chiết theo phương thức hóa học từ các loài giáp xác, từ lớp chân đầu, nhưng cá biệt hơn, còn được chiết từ nấm. Con đường hóa học sử

dùng số lượng lớn các chất phản ứng (như axit clohydric, natri hydroxit và chất tẩy trắng), các chất này có tác dụng làm biến tính cấu trúc của chitin như khi nó tồn tại ở trạng thái tự nhiên, ví dụ như khi có mặt trong vỏ của các loài giáp xác. Hơn nữa, hầu hết các chất phản ứng hóa học gây hại cho con người và môi trường và sinh ra lượng lớn chất thải cần phải được xử lý. Sau cùng, chitin và/hoặc chitosan xuất phát từ các loài giáp xác có thể sinh ra các phản ứng dị ứng ở những người nhạy cảm.

Con đường chiết chitin khác là con đường enzym. Con đường này được xem là ôn hòa hơn, do đó có thể bảo quản tốt hơn chitin và/hoặc chitosan. Tuy nhiên, chitin thu được bằng con đường này có màu nâu nhạt, đòi hỏi phải có các bước tinh chế để thu được bột có thể tung ra thị trường được, tức là có màu trắng. Do đó, các phương pháp hiện có thường bao gồm một hoặc nhiều bước để loại bỏ tạp chất ra khỏi chitin, như bước khử khoáng bằng axit, được thực hiện trước bước thủy phân bằng enzym, và/hoặc bước tẩy trắng chitin bằng chất oxy hóa, được thực hiện sau bước thủy phân bằng enzym. Không may, hai bước để tinh chế chitin này tác động làm thay đổi cấu trúc hóa học của chitin.

Công trình được tiến hành bởi các tác giả sáng chế đã chứng minh rằng, có thể thu được chitin vừa tinh khiết hơn và vừa có cấu trúc sát gần hơn với cấu trúc nguyên ủy của chitin bằng cách thực hiện bước xử lý cơ học trước khi thủy phân, cụ thể là bước ép các lớp cuticun của côn trùng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra ít nhất một sản phẩm mong muốn từ côn trùng, bao gồm các bước sau:

- i) ép các lớp cuticun của côn trùng, và sau đó
- ii) thủy phân bằng enzym các lớp cuticun của côn trùng bằng cách sử dụng enzym phân giải protein.

"Sản phẩm mong muốn" cụ thể hơn có nghĩa là chitin và/hoặc chitosan và/hoặc sản phẩm thủy phân.

"Sản phẩm thủy phân" để chỉ một sản phẩm mà nó bao gồm các protein, protein thủy phân, peptit, axit amin và/hoặc các hợp chất khác có nguồn gốc từ protein, có thể

thu được bằng cách thủy phân bằng enzym các protein.

Sản phẩm hoặc các sản phẩm mong muốn thu được từ côn trùng. "Côn trùng" có nghĩa là côn trùng ở giai đoạn phát triển bất kỳ, như giai đoạn trưởng thành, giai đoạn ấu trùng hoặc giai đoạn nhộng. Côn trùng sử dụng trong phương pháp theo sáng chế tốt hơn có thể ăn được.

Cụ thể hơn, các côn trùng có thể được lựa chọn từ nhóm bao gồm bộ Cánh cứng (Coleoptera), bộ Hai cánh (Diptera), bộ Cánh vảy (Lepidoptera), bộ Cánh đều (Isoptera), bộ Cánh thẳng (Orthoptera), bộ Cánh màng (Hymenoptera), bộ Gián (Blattoptera), bộ Cánh nửa (Hemiptera), phân bộ Cánh nửa (Heteroptera), bộ Phù du (Ephemeroptera) và bộ Cánh dài (Mecoptera), tốt hơn từ bộ Cánh cứng, bộ Hai cánh, bộ Cánh thẳng và bộ Cánh vảy.

Côn trùng tốt hơn được lựa chọn từ nhóm bao gồm *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* và *Samia ricini*.

Côn trùng tốt hơn nữa được lựa chọn từ nhóm bao gồm *Tenebrio molitor*, *Hermetia illucens*, *Galleria mellonella*, *Alphitobius diaperinus*, *Zophobas morio*, *Blattella fusca*, *Musca domestica*, *Chrysomya megacephala*, *Locusta migratoria*, *Schistocerca gregaria*, *Acheta domesticus* và *Samia ricini*, và thậm chí tốt hơn nữa là *T. molitor*.

Một hoặc nhiều loài côn trùng có thể được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế, tốt hơn là duy nhất một loài côn trùng. Nếu như nhiều loài được sử dụng, tốt hơn hai loài quan hệ gần gũi sẽ được lựa chọn, ví dụ *Hermetia illucens* và *Musca domestica*.

Côn trùng tốt hơn được nuôi, hơn là thu được trong tự nhiên. Ví dụ, côn trùng được nuôi trong một trang trại côn trùng. Việc nuôi côn trùng trong một trang trại riêng biệt khiến cho không những có thể kiểm soát và loại bỏ được các nguy cơ kết hợp với các bệnh nguồn gốc từ côn trùng, mà còn hạn chế được các nguy cơ kết hợp với độc tính của các sản phẩm thức ăn xuất phát từ côn trùng, ví dụ do sự có mặt của các thuốc diệt

côn trùng. Hơn nữa, việc nuôi trong trang trại giúp cho có thể kiểm soát được chất lượng cung cấp côn trùng và hạn chế chi phí cung cấp.

"Các lớp cuticun của côn trùng" không chỉ có nghĩa là các lớp cuticun khi mà các lớp này đã được tách ra khỏi côn trùng, mà còn cả các lớp cuticun bao gồm cả một số hoặc tất cả các thành phần cấu tạo khác của côn trùng, bao gồm cả toàn bộ côn trùng. Trên thực tiễn, có thể áp dụng phương pháp theo sáng chế đối với toàn bộ côn trùng, như côn trùng nghiền, hoặc chỉ áp dụng đối với một bộ phận của côn trùng bao gồm các lớp cuticun, ví dụ xác lột và/hoặc các áo lột của côn trùng, được tách ra theo cách tự nhiên và được tập hợp bằng phương pháp thích hợp.

Lớp cuticun là lớp bên ngoài (hoặc bộ xương ngoài) được tiết bởi biểu bì của côn trùng. Nói chung nó được tạo ra từ ba lớp:

- lớp trên cuticun, đây là lớp mỏng nhất, ngoài cùng nhất của lớp cuticun (dưới 4 μ m); lớp này không thấm nước và bao gồm lớp sáp đẩy nước, cũng như lượng nhỏ các protein và chitin;
- lớp ngoại cuticun, đây là lớp trung gian của cuticun; lớp này chủ yếu bao gồm các protein đã được hóa cứng bằng cách ngâm tẩm và chịu trách nhiệm về độ cứng của lớp cuticun; chitin, và tùy ý là melanin; và
- lớp cuticun trong, đây là lớp mỏng, linh hoạt, cấu thành bởi hỗn hợp của các protein và chitin.

Mục tiêu chính của việc ép các lớp cuticun của côn trùng là để loại bỏ dịch ép giàu chất béo và/hoặc để làm giàu bánh ép để thu được nền để thủy phân.

Trong phương pháp theo sáng chế, việc ép các lớp cuticun của côn trùng giúp cho có thể thu được bánh ép bao gồm lượng dầu (hoặc lipid) thấp hơn hoặc bằng 20%, tốt hơn thấp hơn hoặc bằng 15%, tốt hơn nữa thấp hơn hoặc bằng 12%, thậm chí tốt hơn nữa thấp hơn hoặc bằng 10%.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là lưu đồ của phương án ưu tiên về phương pháp theo sáng chế.

Fig. 2 là đồ thị so sánh mức độ tinh khiết của chitin thu được bằng phương pháp enzym bao gồm một hoặc nhiều bước nghiền và ép sơ bộ.

Fig. 3 là đồ thị so sánh hàm lượng lipid được đo ở các phần khác nhau của hợp chất trung gian mà chitin được chiết từ đó.

Fig. 4 thể hiện sự phân bố các lipid trong dịch ép và bánh ép thu được bằng phương pháp enzym bao gồm các bước nghiền và ép sơ bộ hoặc bước ép sơ bộ.

Fig. 5 là đồ thị thể hiện sự phân bố của các protein/peptit theo khối lượng mol của chúng (tính theo %) trong sản phẩm thủy phân theo sáng chế và trong dịch ép.

Fig. 6 là đồ thị thể hiện sự phân bố tương đối của axit amin cấu thành sản phẩm thủy phân theo sáng chế.

Fig. 7 là đồ thị thể hiện độ phong phú tương đối của các axit amin trong chitin.

Fig.8 thể hiện tác dụng của việc ép lên hàm lượng tro trong sản phẩm thủy phân - các côn trùng khác nhau.

Fig.9 thể hiện tác dụng của việc ép lên hàm lượng tro trong sản phẩm thủy phân - các enzym khác nhau.

Fig.10 thể hiện hàm lượng tro trong sản phẩm thủy phân bằng phương pháp nghiền + ép - các côn trùng khác nhau.

Fig.11 thể hiện độ phong phú tương đối của các protein lớn làm chức năng của các phương pháp khác nhau và các côn trùng khác nhau trong thủy phân được thực hiện bằng Prolyve.

Fig.12 thể hiện độ phong phú tương đối của các protein lớn làm chức năng của các phương pháp khác nhau và các enzym khác nhau được áp dụng cho *T. Molitor*.

Fig.13 thể hiện tác dụng của việc ép lên hàm lượng protein của sản phẩm thủy phân - các enzym khác nhau.

Fig.14 thể hiện tác dụng của việc ép lên hàm lượng protein của sản phẩm thủy phân - các côn trùng khác nhau.

Fig.15 thể hiện tác dụng của việc ép lên hàm lượng lipid của sản phẩm thủy phân - các enzym khác nhau.

Fig.16 thể hiện tác dụng của việc ép lên hàm lượng lipid của sản phẩm thủy phân - các côn trùng khác nhau.

Fig.17 thể hiện khả năng tiêu hóa pepsin của sản phẩm thủy phân thu được – tạm thời.

Fig.18 thể hiện TM + Prolyve: độ phong phú tương đối của các axit amin trong sản phẩm thủy phân.

Fig.19 thể hiện TM + Sumizyme: độ phong phú tương đối của các axit amin trong sản phẩm thủy phân.

Fig.20 thể hiện TM + Novozyme: độ phong phú tương đối của các axit amin trong sản phẩm thủy phân.

Fig. 21 thể hiện TM + Neutrase: độ phong phú tương đối của các axit amin trong sản phẩm thủy phân.

Fig. 22 thể hiện HII + Prolyve: độ phong phú tương đối của các axit amin trong sản phẩm thủy phân.

Fig. 23 thể hiện GM + Prolyve: độ phong phú tương đối của các axit amin trong sản phẩm thủy phân.

Fig. 24 thể hiện AD + Prolyve: độ phong phú tương đối của các axit amin trong sản phẩm thủy phân.

Fig. 25 thể hiện tác dụng của việc ép lên hàm lượng tro trong chitin - các enzym khác nhau.

Fig. 26 thể hiện hàm lượng tro trong chitin từ các côn trùng khác nhau.

Fig. 27 thể hiện hàm lượng lipid trong chitin.

Fig. 28 thể hiện hàm lượng axit amin trong chitin.

Fig. 29 thể hiện TM + Prolyve: độ phong phú tương đối của các axit amin trong chitin.

Fig. 30 thể hiện TM + Sumizyme: độ phong phú tương đối của các axit amin trong chitin.

Fig. 31 thể hiện TM + Novozyme: độ phong phú tương đối của các axit amin trong chitin.

Fig. 32 thể hiện TM + Neutrase: độ phong phú tương đối của các axit amin trong chitin.

Fig. 33 thể hiện HI + Prolyve: độ phong phú tương đối của các axit amin trong sản phẩm thủy phân.

Fig. 34 thể hiện GM + Prolyve: độ phong phú tương đối của các axit amin trong sản phẩm thủy phân.

Fig. 35 thể hiện AD + Prolyve: độ phong phú tương đối của các axit amin trong sản phẩm thủy phân.

Fig. 36 thể hiện độ tinh khiết trọng lực của chitin làm chức năng của các phương pháp khác nhau và các enzym khác nhau áp dụng cho *T. Molitor*.

Fig. 37 thể hiện độ tinh khiết trọng lực của chitin làm chức năng của các phương pháp khác nhau và các côn trùng khác nhau bằng Prolyve.

Fig. 38 thể hiện độ tinh khiết đo màu của chitin làm chức năng của các phương pháp khác nhau và các enzym khác nhau với *T. Molitor*.

Fig. 39 thể hiện độ tinh khiết đo màu của chitin làm chức năng của các phương pháp khác nhau và các côn trùng khác nhau với Prolyve.

Fig. 40 thể hiện độ tinh khiết theo sự chênh lệch của chitin.

Fig. 41 thể hiện mức độ axetyl hóa của chitin thu được bằng phương pháp đối với *T. Molitor*.

Fig. 42 thể hiện mức độ axetyl hóa của chitin thu được bằng phương pháp đối với Prolyve,

Fig. 43 thể hiện hình ảnh của lớp cuticun trên hiển vi huỳnh quang hai photon.

Fig. 44 thể hiện mức độ kết tinh của các chitin thu được.

Fig. 45 thể hiện kích thước của các protein trong sản phẩm thủy phân.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trong đơn sáng chế này, các khoảng giá trị được hiểu là bao gồm tất cả. Tuy nhiên, khi thuật ngữ "xấp xỉ" hoặc "vào khoảng" đứng trước con số, điều này tương

đương với hơn hoặc kém 10% của giá trị của con số này.

Tương tự, nhằm để làm giàu bánh ép vào trong nền để thủy phân, việc ép các lớp cuticun của côn trùng giúp cho có thể thu được bánh ép có hàm lượng chất khô nằm trong khoảng từ 30% đến 60%, tốt hơn nằm trong khoảng từ 40% đến 55%, và tốt hơn nữa nằm trong khoảng từ 45% đến 50%.

Hệ thống ép bất kỳ có thể được sử dụng để thực hiện việc ép các lớp cuticun của côn trùng, ví dụ hệ thống ép trục vít đơn hoặc trục vít đôi (trục vít đôi kiểu Angel), hệ lọc ép (hệ lọc ép kiểu Choquet), hệ ép tấm, v.v.. Các hệ thống này đã biết đối với người có kỹ năng trong lĩnh vực, họ có khả năng xác định các điều kiện ép sao cho thu được các hàm lượng dầu và/hoặc nước nêu trên.

Trong phương pháp theo sáng chế, việc ép các lớp cuticun của côn trùng được tiếp theo bằng bước thủy phân bằng enzym.

Bước thủy phân bằng enzym tốt hơn được thực hiện bằng ít nhất một enzym phân giải protein, tốt hơn là proteaza. Trong đơn sáng chế này, các tên hoặc hậu tố "peptidaza" và "proteaza" được sử dụng theo cách không phân biệt để chỉ một enzym gây ra sự phân giải liên kết peptit của các protein. Một cách thuận lợi, bước này được thực hiện trong thời gian nằm trong khoảng từ 4 đến 8 giờ, tốt hơn trong thời gian nằm trong khoảng từ 4 đến 5 giờ, ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C, tốt hơn từ 45 đến 55°C và ở độ pH nằm trong khoảng từ 6 đến 8, tốt hơn nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,5.

Phản ứng thủy phân bằng enzym có thể được thực hiện bằng duy nhất proteaza hoặc theo cách khác, bằng hỗn hợp các enzym chứa ít nhất một proteaza, tốt hơn nữa bằng hỗn hợp của các enzym chứa nhiều proteaza, như hỗn hợp chứa endoproteaza và exoproteaza, hoặc proteaza và polysacaraza.

Proteaza tốt hơn được lựa chọn từ nhóm bao gồm các aminopeptidaza, metallocarboxypeptidaza, serin endopeptidaza, xystein endopeptidaza, aspartic endopeptidaza, metalloendopeptidaza.

Tốt hơn các enzym có thể được lựa chọn từ bảng sau:

(Các) enzym	Loại	Số EC	Nhà cung cấp	Thành phố	Quốc gia
Flavourzyme	Amino-peptidaza	EC 3.4.11.1	Novozyme	Bagsvaerd	Đan Mạch
Fungal proteaza 500		EC 3.4.11.1	BioCat	Troy	Mỹ
Kojizyme		EC 3.4.11.1	Novozyme	Bagsvaerd	Đan Mạch
Protex P	serin endopeptidaza	EC 3.4.21	Genencor Internationa l B.V.	Leiden	Hà Lan
Chymotrypsin		EC 3.4.21.1	Novozyme	Bagsvaerd	Đan Mạch
Protamex		EC 3.4.21	Novozyme	Bagsvaerd	Đan Mạch
Elastaza		EC 3.4.21.1 4	Novozyme	Bagsvaerd	Đan Mạch
Trypsin		EC 3.4.21.3 6	Novozyme	Bagsvaerd	Đan Mạch
Alcalaza		EC 3.4.21.4	Novozyme	Bagsvaerd	Đan Mạch
Papain	Xystein endopeptidaza	EC 3.4.22.2	BioCat	Troy	Mỹ
Bromelain (ananase)		EC 3.4.22.3 2	BioCat	Troy	Mỹ
Prolyve NP	Aspartic endopeptidaza	EC 3.4.23	Lyven	Colombelles	Pháp

Pepsin		EC 3.4.23.1	Sigma Aldrich	Saint- Quentin- Fallavier	Pháp
Proteaza trung tính	Endo- peptidaza chứa kim loại	EC 3.4.24.2 8	BioCat	Troy	Mỹ
Protex 50FP	Endo- peptidaza	EC 3.4.21	Genencor Internationa l B.V.	Leiden	Hà Lan
Pancrealyve	Exo & endo peptidaza (hỗn hợp của proteaza + amylaza)	n.a.*	Lyven	Colombelles	Pháp
Izyme BA	Aspartic proteaza	EC 3.4.23	Novozyme	Bagsvaerd	Đan Mạch
Sumizyme	Hỗn hợp Enzym	n.a.*	Takabio – Shin Nihon	Aichi	Nhật Bản
Neutraza	Endoproteaza Zn bazơ của β amylo- liquefacien	EC 3.4.24	Novozyme	Bagsvaerd	Đan Mạch
Novozyme 37071	Proteaza	n.a.*	Novozyme	Bagsvaerd	Đan Mạch

*n.a.: không thể áp dụng được

Tốt hơn, enzym sử dụng trong phản ứng thủy phân là aspartic endopeptidaza, như Prolyve NP. Loại enzym này giúp cho có thể thu được kết quả rất tốt về độ tinh khiết của chitin thu được, nhất là khi loại enzym này được áp dụng trong thủy phân bánh ép thu được từ bộ cánh cứng (Coleoptera) và cụ thể hơn là từ *T. molitor*.

Enzyme hoặc hỗn hợp các enzym được đưa vào với lượng nằm trong khoảng từ

0,2 đến 10% trọng lượng của chất khô lượng tính, tốt hơn từ 0,4 đến 8% trọng lượng và tốt hơn nữa từ 0,5 đến 2%. "Trọng lượng của chất khô lượng tính" cụ thể hơn có nghĩa là trọng lượng của chất khô từ côn trùng hoặc (các) bộ phận của côn trùng, như có thể được lượng tính khi đưa vào bước thủy phân bằng enzym.

Về hoạt tính enzym, chất lượng của enzym hoặc hỗn hợp enzym đưa vào tương đương với hoạt tính nằm trong khoảng từ 2000 đến 5000 SAPU ("*Spectrophotometric Acid proteaza Unit*", được mô tả trong ví dụ 5 dưới đây), tốt hơn nằm trong khoảng từ 3000 đến 4000 SAPU, trên 100g trọng lượng ẩm, với hàm lượng nước nằm trong khoảng từ 30 đến 70% của cơ chất cần được chuyển dạng, tức là, của côn trùng hoặc (các) bộ phận được hydrat hóa của côn trùng.

Tốt hơn, bước thủy phân bằng enzym được thực hiện với sự có mặt của nước, như nước ngọt. Lượng nước sử dụng trong bước thủy phân bằng enzym được xác định như sau: tỷ lệ của thể tích nước tính bằng mL trên trọng lượng côn trùng tính bằng g tốt hơn nằm trong khoảng từ 0,3 đến 10, tốt hơn nữa nằm trong khoảng từ 0,5 đến 5, thậm chí tốt hơn nữa nằm trong khoảng từ 0,7 đến 3, thậm chí tốt hơn nữa bằng 1. Cần lưu ý rằng, tỷ lệ này cũng tương ứng với tỷ lệ của trọng lượng nước trên trọng lượng côn trùng, tỷ trọng của nước là 1,0g/mL trong các điều kiện nhiệt độ và áp suất bình thường.

Phương pháp theo sáng chế giúp cho có thể thu được chitin có độ tinh khiết (hoặc độ tinh khiết trọng lực) nằm trong khoảng từ 40 đến 90%, tốt hơn nằm trong khoảng từ 50 đến 90%, tốt hơn nữa nằm trong khoảng từ 60 đến 85%, và thậm chí tốt hơn nữa là 80% (xem trong ví dụ 2 và hình vẽ trên Fig. 2).

Tuy nhiên, phương pháp theo sáng chế giúp cho có thể thu được sản phẩm thủy phân có một số đặc tính thuận lợi, đặc biệt là về khả năng tiêu hóa, hàm lượng của các lipid và/hoặc protein, kích thước của protein hoặc thành phần axit amin.

Tốt hơn, phương pháp theo sáng chế bao gồm bước nghiền trước bước ép.

Do đó, phương án đặc biệt ưu tiên theo sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra ít nhất một sản phẩm mong muốn từ côn trùng, bao gồm các bước sau:

i) nghiền các lớp cuticun của côn trùng,

ii) ép các lớp cuticun của côn trùng, và sau đó

iii) thủy phân bằng enzym các lớp cuticun của côn trùng bằng cách sử dụng enzym phân giải protein.

Bước nghiền này có mục đích khử các lớp cuticun và/hoặc côn trùng thành các phần tử nhằm để tạo thuận lợi cho sự tiếp cận của các enzym với cơ chất trong quá trình thủy phân bằng enzym. Bước này cũng giúp cho có thể, khi nó được tiếp theo bằng bước ép, tạo thuận lợi cho việc lấy dịch ép và tách chất rắn.

Bước nghiền này cũng giúp cho có thể cải thiện sự phân bố các lipid nguồn gốc từ côn trùng giữa bánh ép và dịch ép xuất phát từ sự ép. Thực tiễn, như được thể hiện ở hình vẽ trên Fig. 4, bánh ép xuất phát từ phương pháp bao gồm cả hai bước nghiền và ép có hàm lượng lipid giảm so với bánh ép từ phương pháp bao gồm duy nhất bước ép.

Cụ thể hơn, trong phương pháp theo sáng chế, việc nghiền và ép các lớp cuticun của côn trùng giúp cho có thể thu được bánh ép chứa hàm lượng lipid (hoặc dầu) thấp hơn hoặc bằng 15%, tốt hơn thấp hơn hoặc bằng 12%, thậm chí tốt hơn nữa thấp hơn hoặc bằng 10%.

Bước nghiền tốt hơn có thể được thực hiện bằng máy nghiền trộn, như máy nghiền dao cắt.

Tốt hơn, tại thời điểm kết thúc nghiền, kích thước của các hạt côn trùng là nhỏ hơn 1cm (kích thước hạt lớn nhất có thể quan sát được sử dụng kính hiển vi), tốt hơn nhỏ hơn 0,5cm, thậm chí tốt hơn nữa kích thước nằm trong khoảng từ 300µm đến 0,5cm, tốt hơn từ 500µm đến 0,5cm và thậm chí tốt hơn nữa từ 500µm đến 1mm.

Lượng nước có thể được bổ sung để tạo thuận lợi cho bước nghiền. Lượng nước này được xác định như sau: tỷ lệ của thể tích nước tính bằng mL trên trọng lượng côn trùng tính bằng g tốt hơn nằm trong khoảng từ 0,3 đến 10, tốt hơn nữa nằm trong khoảng từ 0,5 đến 5, thậm chí tốt hơn nữa nằm trong khoảng từ 0,7 đến 3, thậm chí tốt hơn nữa bằng 1.

Một cách thuận lợi, phương pháp theo sáng chế cũng bao gồm bước giết côn trùng trước bước ép và/hoặc bước nghiền.

Bước giết này có thể được thực hiện bằng các phương pháp thông thường trong

trang trại nuôi động vật máu lạnh và/hoặc động vật kích thước nhỏ (cua, cá, ốc, v.v.), như phương pháp lạnh (kết đông), nóng (đun nóng), lấy hết oxy, v.v.. Tốt hơn, bước giết côn trùng được thực hiện bằng cách đun nóng. Đun nóng không chỉ giết các côn trùng, mà còn làm giảm tải lượng vi khuẩn (làm giảm nguy cơ tổn hại và nguy cơ cho sức khỏe) và bất hoạt các nội enzym của các côn trùng mà chúng có thể khởi phát sự tự phân giải và do đó, nhanh chóng làm chín vàng chúng. Việc đun nóng được thực hiện theo cách để làm chết nhanh nhất có thể, để tôn trọng quyền lợi của động vật và theo các khuyến cáo khoa học.

Theo cách khác, việc giết có thể được thực hiện bằng cách chần nước sôi. Chần nước sôi có các lợi thế tương tự như đun nóng nêu trên.

Tốt hơn, côn trùng được giết, ví dụ bằng cách đun nóng hoặc chần nước sôi và sau đó, được nghiền trước khi ép.

Tốt hơn, bước đun nóng được thực hiện trong nước, như nước ngọt, ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 95 đến 105°C, tốt hơn là 100°C và trong thời gian từ 2 đến 20 phút, tốt hơn từ 5 đến 15 phút.

Lượng nước đưa vào trong bước đun nóng này được xác định như sau: tỷ lệ của thể tích nước tính bằng mL trên trọng lượng côn trùng tính bằng g tốt hơn nằm trong khoảng từ 0,3 đến 10, tốt hơn nữa nằm trong khoảng từ 0,5 đến 5, thậm chí tốt hơn nữa nằm trong khoảng từ 0,7 đến 3, thậm chí tốt hơn nữa bằng 1.

Theo cách khác, bước chần nước sôi được thực hiện bằng hơi và/hoặc bằng nước ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 80°C và 130°C, tốt hơn nằm trong khoảng từ 90°C đến 120°C.

Phương pháp theo sáng chế có thể còn bao gồm bước xử lý các lớp cuticun của côn trùng bằng chất oxy hóa trước bước thủy phân bằng enzym.

Tốt hơn, trong phương pháp theo sáng chế, chất oxy hóa sử dụng trong xử lý các lớp cuticun được lựa chọn từ nhóm bao gồm hydro peroxit, kali permanganat, ozon và natri hypoclorit, thậm chí tốt hơn nữa hydro peroxit.

Tốt hơn, khi chất oxy hóa là hydro peroxit, lượng chất này được đưa vào để xử lý các lớp cuticun của côn trùng là lượng sao cho, hàm lượng hydro peroxit nằm trong

khoảng từ 1 đến 33% trọng lượng tính theo tổng trọng lượng của côn trùng, tốt hơn nằm trong khoảng từ 2 đến 12% trọng lượng tính theo tổng trọng lượng của côn trùng, tốt hơn là 6% trọng lượng .

Tốt hơn, việc xử lý các lớp cuticun của côn trùng bằng chất oxy hóa được thực hiện với sự có mặt của nước, như nước ngọt. Tốt hơn, lượng nước sử dụng trong xử lý các lớp cuticun được xác định như sau: tỷ lệ của thể tích nước tính bằng mL trên trọng lượng côn trùng tính bằng g tốt hơn nằm trong khoảng từ 0,3 đến 10, tốt hơn nữa nằm trong khoảng từ 0,5 đến 5, thậm chí tốt hơn nữa nằm trong khoảng từ 0,7 đến 3, thậm chí tốt hơn nữa bằng 1.

Việc xử lý các lớp cuticun của côn trùng bằng chất oxy hóa có thể được thực hiện trong một hoặc nhiều bước sau:

- đồng thời với bước đun nóng và/hoặc sau bước đun nóng, tốt hơn nữa đồng thời với bước đun nóng. Theo cách khác, đồng thời với bước chần nước sôi và/hoặc sau bước chần nước sôi, tốt hơn nữa đồng thời với bước chần nước sôi. Cụ thể hơn, khi việc xử lý các lớp cuticun của côn trùng được thực hiện trong quá trình đun nóng hoặc chần nước sôi, chất oxy hóa tốt hơn có thể được bổ sung vào nước sử dụng để đun nóng côn trùng.

- trước, đồng thời và/hoặc sau khi nghiền. Cụ thể hơn, khi việc xử lý các lớp cuticun của côn trùng được thực hiện trong khi nghiền, chất oxy hóa tốt hơn có thể được bổ sung vào nước sử dụng để nghiền.

- trước và/hoặc đồng thời với bước ép.

- trong bước xử lý đặc trưng các lớp cuticun của côn trùng.

Tốt hơn, bước thủy phân bằng enzym có thể được tiếp theo bằng bước bất hoạt bằng nhiệt nhằm mục đích bất hoạt enzym hoặc hỗn hợp enzym sử dụng trong thủy phân bằng enzym.

Tại thời điểm kết thúc phương pháp theo sáng chế, chitin có thể được thu hồi bằng cách ép hoặc ly tâm hỗn hợp phản ứng thủy phân bằng enzym. Tại giai đoạn này, sản phẩm phụ của chitin cũng được thu hồi, cụ thể là sản phẩm thủy phân.

Một phương án ưu tiên về phương pháp theo sáng chế được mô tả chi tiết hơn

dưới đây.

Cụ thể, phương án ưu tiên này mô tả các bước tiện lợi khác nhau của phương pháp theo sáng chế, như các bước tinh chế trong điều kiện êm dịu của chitin: bước ép thứ hai, các thao tác rửa, lọc và sấy khô tùy ý.

Sau cùng, vì chitin thường được đưa ra thị trường ở dạng bột, nên bước nghiền thứ hai cũng có thể được thực hiện. Bước nói sau cũng có thể được thực hiện để thúc đẩy phản ứng khử axetyl, để bào chế chitosan từ chitin. Các điều kiện của phản ứng khử axetyl được mô tả đầy đủ hơn trong bước 10 của phương án ưu tiên được mô tả chi tiết dưới đây.

Phương pháp đặc biệt thuận lợi để tạo ra chitin từ các lớp cuticun của côn trùng bao gồm các bước sau:

a) giết côn trùng,

b) nghiền côn trùng,

c) ép côn trùng,

d) thủy phân bằng enzym các lớp cuticun của côn trùng bằng cách sử dụng enzym phân giải protein,

e) thu hồi chitin,

trong đó, các lớp cuticun của côn trùng có thể được xử lý tùy ý bằng chất oxy hóa trước bước d).

Các phương án ưu tiên gồm các bước khác nhau từ a) đến e) cũng như bước xử lý bằng chất oxy hóa được thông báo như ở trên hoặc trong bước tương ứng ở phương án ưu tiên dưới đây.

Sáng chế cũng đề cập đến chitin, như chitin có thể thu được bằng phương pháp theo sáng chế. Nhờ các điều kiện êm dịu sử dụng trong phương pháp theo sáng chế, chitin này có cấu trúc gần với cấu trúc của chitin như nó xuất hiện ở trạng thái tự nhiên trong lớp cuticun côn trùng trong khi có mức độ tinh khiết cao, như mức độ tinh khiết nằm trong khoảng từ 40 đến 90%, tốt hơn nằm trong khoảng từ 50 đến 90%, tốt hơn nữa nằm trong khoảng từ 60 đến 85%, và thậm chí tốt hơn nữa là 80%.

Chitin theo sáng chế có ít nhất một đặc tính thuận lợi bất kỳ trong số các đặc tính thuận lợi sau:

- hàm lượng tro thấp hơn 4%, tốt hơn thấp hơn 3,5%, tốt hơn nữa thấp hơn hoặc bằng 2,5% (nhất là khi chitin được bào chế từ các côn trùng ăn chay), tốt hơn nữa thấp hơn 2%, và thậm chí tốt hơn nữa thấp hơn hoặc bằng 1,5% (nhất là khi chitin được bào chế từ *T. molitor*), và thậm chí tốt hơn nữa thấp hơn 1% trọng lượng tính theo tổng trọng lượng của chất khô,
- độ tinh khiết (hoặc độ tinh khiết trọng lực) nằm trong khoảng từ 40 đến 90%, tốt hơn nằm trong khoảng từ 50 đến 90%, tốt hơn nữa nằm trong khoảng từ 60 đến 85%, và thậm chí tốt hơn nữa là 80%,
- độ phong phú bề mặt chức năng có tỷ lệ (C-O)/(C-H) nằm trong khoảng từ 0,30 đến 0,56, tốt hơn nằm trong khoảng từ 0,31 đến 0,53,
- hàm lượng lipit $\leq 14\%$ theo tổng trọng lượng tính theo tổng trọng lượng của chất khô,
- hàm lượng lipit $\leq 5\%$ khi chitin được bào chế từ các côn trùng không biết bay,
- tổng lượng axit amin $\leq 45\%$,
- tổng lượng axit amin $\leq 16\%$ khi chitin được bào chế từ các côn trùng biết bay,
- độ phong phú tương đối của ít nhất 3 axit amin bất kỳ từ Ala, Gly, Leu, Pro, Ser, Tyr, Val $\leq 10\%$,
- độ phong phú tương đối của Leu, Pro, Val $\leq 10\%$ khi chitin được bào chế từ *T. molitor*,
- độ phong phú tương đối của Ala $\leq 12\%$ khi chitin được bào chế từ *T. molitor*,
- độ tinh khiết đo màu $\geq 40\%$,
- độ tinh khiết đo màu $\geq 50\%$ khi chitin được bào chế bằng enzym Prolyve NP trong quá trình thủy phân bằng enzym,
- độ tinh khiết theo sự chênh lệch $\geq 45\%$, tốt hơn là $\geq 49\%$,
- độ tinh khiết theo sự chênh lệch $\geq 52\%$ khi chitin được bào chế từ *T. molitor*,
- độ tinh khiết theo sự chênh lệch $\geq 70\%$ khi chitin được bào chế từ các côn trùng biết bay,
- mức độ axetyl hóa $\geq 70\%$ và mức độ kết tinh $\leq 0,61$,
- mức độ axetyl hóa $\geq 70\%$ và mức độ kết tinh $\geq 0,42$.

Chitin chứa hàm lượng axit amin thấp hơn hoặc bằng 45%, hàm lượng tro thấp hơn hoặc bằng 3,5%, tốt hơn thấp hơn hoặc bằng 2,5%, và độ tinh khiết theo sự chênh lệch cao hơn hoặc bằng 45%, tốt hơn là cao hơn hoặc bằng 49%.

Tốt hơn, chitin có toàn bộ các đặc tính ở trên.

Tất cả các đơn vị và phương pháp đo các đặc điểm thông báo ở trên được mô tả trong phần ví dụ và cụ thể hơn là trong ví dụ 5.

Một phương pháp đặc biệt thuận lợi để tạo ra sản phẩm thủy phân từ côn trùng, bao gồm các bước sau:

- a) giết côn trùng,
 - b) nghiền côn trùng,
 - c) ép côn trùng,
 - d) thủy phân bằng enzym các lớp cuticun của côn trùng bằng enzym phân giải protein,
 - e) thu hồi sản phẩm thủy phân,
- trong đó, các lớp cuticun của côn trùng có thể được xử lý tùy ý bằng chất oxy hóa trước bước d).

Các phương án ưu tiên gồm các bước khác nhau từ a) đến e) cũng như bước xử lý bằng chất oxy hóa được thông báo như ở trên hoặc trong bước tương ứng ở phương án ưu tiên dưới đây.

Sáng chế cũng đề cập đến sản phẩm thủy phân, như sản phẩm thủy phân có thể thu được bằng phương pháp theo sáng chế.

Sản phẩm thủy phân theo sáng chế có ít nhất một đặc tính thuận lợi bất kỳ trong số các đặc tính thuận lợi sau:

- hàm lượng tro thấp hơn 4%, tốt hơn thấp hơn 3% trọng lượng (nhất là khi sản phẩm thủy phân được bào chế từ các côn trùng ăn chay) tính theo tổng trọng lượng của chất khô,
- khả năng tiêu hóa tuyệt vời, đặc biệt là khả năng tiêu hóa pepsin, cao hơn 95%, tốt hơn là cao hơn hoặc bằng 96% và tốt hơn nữa cao hơn hoặc bằng 98%, và tốt

hơn nữa cao hơn hoặc bằng 99%, khả năng tiêu hóa pepsin được đo theo phương pháp tuân theo quy định số Decision 72/188/EEC;

- hàm lượng protein/các peptit cao hơn hoặc bằng 70%, tốt hơn là cao hơn hoặc bằng 71%, và tốt hơn nữa cao hơn hoặc bằng 75%, và tốt hơn nữa cao hơn hoặc bằng 80% (đặc biệt khi sản phẩm thủy phân được bào chế từ các côn trùng không biết bay);
- hàm lượng protein hòa tan trong nước lớn hơn 12400g/mol, thấp hơn 20%, tốt hơn thấp hơn 18% trọng lượng tính theo tổng trọng lượng của các protein hòa tan trong nước;
- hàm lượng lipid thấp hơn 14%, tốt hơn thấp hơn 10%, tốt hơn nữa thấp hơn hoặc bằng 5% (nhất là khi sản phẩm thủy phân được bào chế từ các côn trùng không biết bay), tốt hơn nữa thấp hơn hoặc bằng 2%, và thậm chí tốt hơn nữa thấp hơn hoặc bằng 1%;
- thành phần trong đó, các axit amin phong phú nhất là prolin, alanin, leuxin, axit aspartic, glutamin và/hoặc valin. "Phong phú nhất" có nghĩa là lượng tương đối của axit amin trong thành phần cao hơn 5%, tốt hơn là cao hơn 7% trọng lượng tính theo tổng trọng lượng của các axit amin. Hàm lượng prolin cao là đặc biệt được quan tâm;
- độ phong phú tương đối của ít nhất 5 axit amin bất kỳ được chọn từ Asp, Glu, Ala, Gly, Leu, Pro, Tyr, Val, Lys $\geq 6\%$;
- độ phong phú tương đối của ít nhất 3 axit amin bất kỳ được chọn từ Asp, Glu, Ala, Leu, Pro, Tyr, Val $\geq 8\%$.

Cụ thể hơn, thuật ngữ "các protein hòa tan trong nước" có nghĩa là, trong số các protein (hoặc các protein thô), các protein có thể hòa tan trong dung dịch nước mà độ pH của nó nằm trong khoảng từ 6 đến 8, tốt hơn nằm trong khoảng từ 7,2 và 7,6.

Tốt hơn, dung dịch nước là dung dịch đệm mà độ pH của nó nằm trong khoảng từ 6 đến 8, tốt hơn nằm trong khoảng từ 7,2 đến 7,6.

Tốt hơn, dung dịch đệm là dung dịch NaCl đệm phosphat, độ pH của dung dịch này tương đương $7,4 \pm 0,2$.

Sản phẩm thủy phân bao gồm ít nhất 40% các protein, tối đa 10% tốt hơn tối đa 8% tro và hàm lượng protein hòa tan trong nước lớn hơn 12400g/mol thấp hơn 50%, tốt hơn thấp hơn 43%.

Thuật ngữ "côn trùng ăn chay" có nghĩa là côn trùng mà nó không có các protein động vật trong khẩu phần ăn thông thường của nó. Theo cách ví dụ về côn trùng ăn chay, bộ cánh cứng, bộ cánh vảy hoặc bộ cánh thẳng có thể được kể đến.

Thuật ngữ "côn trùng biết bay" có nghĩa là côn trùng có khả năng bay khi trưởng thành, ngược lại với côn trùng được gọi là "không biết bay". Theo cách ví dụ về côn trùng biết bay, bộ cánh vảy hoặc bộ hai cánh có thể được kể đến. Theo cách ví dụ về côn trùng không biết bay, bộ cánh cứng hoặc bộ cánh thẳng có thể được kể đến.

Tất cả các đơn vị và phương pháp đo các đặc điểm thông báo ở trên được mô tả trong phần ví dụ và cụ thể hơn là trong ví dụ 5.

Tốt hơn, sản phẩm thủy phân có toàn bộ các đặc tính ở trên.

Đặc biệt lưu ý rằng, sản phẩm thủy phân theo sáng chế có thể được phân biệt với loại sản phẩm thủy phân khác bất kỳ nhờ bởi hàm lượng glucosamin của nó và/hoặc chất dẫn xuất của nó (tốt hơn là N-axetylglucosamin), cụ thể hơn là hàm lượng cao hơn hoặc bằng 0,01%, tốt hơn là cao hơn hoặc bằng 0,08% trọng lượng tính theo tổng trọng lượng chất khô của sản phẩm thủy phân.

Trong đơn sáng chế này, tham khảo bất kỳ về quy định hoặc hướng dẫn liên quan đến quy định hoặc hướng dẫn có hiệu lực vào ngày nộp đơn của đơn sáng chế này.

Sản phẩm thủy phân tốt hơn có thể được bổ sung bằng các chất phụ gia để cân bằng các thành phần dinh dưỡng của nó sao cho thích hợp đối với nhiều loại động vật khác nhau.

Sản phẩm thủy phân tốt hơn có thể được cô và tiếp theo, được sấy khô để thu được sản phẩm thủy phân khô. Theo cách khác, sản phẩm thủy phân có thể ở dạng lỏng. Các sản phẩm thủy phân này có thể được sử dụng làm thực phẩm hoặc thành phần của thực phẩm đặc biệt là cho động vật hoặc theo cách khác, chúng có thể được xử lý, ví dụ để tách riêng các axit amin.

Một phương pháp đặc biệt thuận lợi để tạo ra chitosan từ các lớp cuticun của côn

trùng bao gồm các bước sau:

- a) giết côn trùng,
 - b) nghiền côn trùng,
 - c) ép côn trùng,
 - d) thủy phân bằng enzym các lớp cuticun của côn trùng bằng cách sử dụng men proteaza,
 - e) thu hồi chitin,
 - f) khử axetyl của chitin đã thu hồi,
 - g) thu hồi chitosan,
- trong đó, các lớp cuticun của côn trùng có thể được xử lý tùy ý bằng chất oxy hóa trước bước d).

Các phương án ưu tiên về các bước khác nhau từ a) đến g) cũng như bước xử lý bằng chất oxy hóa được thông báo như ở trên hoặc trong bước tương ứng trong phương án ưu tiên dưới đây.

Sáng chế cũng đề cập đến chitosan có thể thu được bằng phương pháp theo sáng chế.

Chitin và/hoặc chitosan có thể thu được bằng phương pháp theo sáng chế tốt hơn có thể được sử dụng trong các ứng dụng khác nhau:

- trong mỹ phẩm, dược phẩm, thực phẩm chức năng hoặc chế phẩm dinh dưỡng,
- làm vật liệu sinh học trong điều trị bỏng, làm làn da thứ hai, để tạo ra màng giác mạc hoặc vật liệu khâu,
- làm vật liệu lọc, chế biến, keo tụ và/hoặc hấp phụ đặc biệt là trong lọc và tinh khiết nước.

Theo phương án ưu tiên của sáng chế, phương pháp bao gồm các bước sau, được mô tả bằng sơ đồ ở hình vẽ Fig. 1. Cần lưu ý rằng, một số bước xác định được chỉ rõ là tối ưu trong phương án ưu tiên này.

- Bước 1: giết côn trùng

Bước giết 1 này khiến cho có thể giết côn trùng trong khi làm giảm tải lượng vi khuẩn (giảm nguy cơ tổn hại và nguy cơ đối với sức khỏe) và bằng cách bất hoạt các nội enzyme của côn trùng mà chúng có thể khởi phát sự tự phân giải, và do đó, nhanh chóng làm chín vàng chúng.

Thao tác giết có thể được thực hiện bằng cách đun sôi.

Côn trùng, tốt hơn là ấu trùng, được đun sôi theo cách như vậy với nước trong thời gian từ 2 đến 20 phút, tốt hơn từ 5 đến 15 phút. Tốt hơn, nước là ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 95 đến 105°C, tốt hơn là 100°C.

Lượng nước đưa vào trong bước đun sôi 1 này được xác định như sau: tỷ lệ của thể tích nước tính bằng mL trên trọng lượng côn trùng tính bằng g tốt hơn nằm trong khoảng từ 0,3 đến 10, tốt hơn nữa nằm trong khoảng từ 0,5 đến 5, thậm chí tốt hơn nữa nằm trong khoảng từ 0,7 đến 3, thậm chí tốt hơn nữa bằng 1.

Theo cách khác, việc giết có thể được thực hiện bằng cách chần nước sôi. Tốt hơn, các côn trùng được chần bằng hơi (các vôi hoặc giàn hơi) ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 80 đến 130°C, tốt hơn nằm trong khoảng từ 90 đến 120°C, tốt hơn nữa từ 95 đến 105°C, thậm chí tốt hơn nữa 98°C hoặc bằng nước ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 95 đến 105°C, tốt hơn là 100°C (bằng các vôi phun) hoặc theo phương thức kết hợp (nước + hơi) ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 80 đến 130°C, tốt hơn nằm trong khoảng từ 90 đến 120°C, tốt hơn nữa từ 95 đến 105°C. Thời gian duy trì ở ngăn chần nước sôi nằm trong khoảng từ 1 đến 15 phút, tốt hơn nằm trong khoảng từ 3 đến 7 phút.

Trong bước này, cũng có thể xử lý các lớp cuticun của côn trùng sử dụng nước đun sôi hoặc nước sôi chần bao gồm chất oxy hóa theo các chi tiết được chỉ rõ trong bước trung gian dưới đây.

- Bước trung gian (tùy ý): xử lý các lớp cuticun bằng chất oxy hóa

Bước xử lý riêng các lớp cuticun bằng chất oxy hóa có thể được kết hợp trong phương pháp. Tốt hơn, bước trung gian xử lý các lớp cuticun này được thực hiện ở giữa bước giết 1 và bước nghiền 2.

Bước trung gian này tốt hơn được thực hiện bằng chất oxy hóa được chọn từ nhóm bao gồm hydro peroxit (H_2O_2), kali permanganat (KMnO_4), ozon (O_3) và natri

hypoclorit (NaClO), tốt hơn nữa hydro peroxit.

Theo phương án thứ nhất, ở cuối bước 1, khi phương thức nêu sau được thực hiện bằng cách đun sôi, chất oxy hóa được đưa trực tiếp vào trong bể đun sôi, sau khi làm nguội tùy ý nước đun sôi xuống nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C, tốt hơn là 50°C.

Hydro peroxit khi được đưa ra thị trường thường ở dạng dung dịch nước, ví dụ dung dịch ở nồng độ 30% trọng lượng tính theo tổng trọng lượng của nước.

Lượng hydro peroxit được đưa vào để xử lý là lượng sao cho, hàm lượng hydro peroxit nằm trong khoảng từ 1 đến 33% trọng lượng tính theo tổng trọng lượng của côn trùng, tốt hơn từ 2 đến 12% trọng lượng tính theo tổng trọng lượng của côn trùng, tốt hơn là 6% trọng lượng.

Theo phương án thứ hai, côn trùng được lấy ra khỏi bể đun sôi, được rây và lại được đưa vào bể.

Sau đó, hydro peroxit được đưa vào trong bể ở dạng dung dịch nước pha loãng, hàm lượng hydro peroxit khi đó nằm trong khoảng từ 1 đến 33% trọng lượng dựa trên trọng lượng của nước, tốt hơn từ 2 đến 12% trọng lượng dựa trên trọng lượng của nước và tốt hơn là 6% trọng lượng.

• Bước 2: nghiền

Côn trùng được lấy ra khỏi bể đun sôi hoặc bể xử lý hoặc từ ngăn chặn nước sôi, sau đó chúng được rây và được đưa vào trong thiết bị nghiền, như máy nghiền dao cắt, giúp cho có thể biến đổi côn trùng thành các hạt.

Để tạo thuận lợi cho bước nghiền, lượng nước có thể được bổ sung. Lượng nước này tương tự như lượng đưa vào trong bước đun nóng 1: tỷ lệ của thể tích nước tính bằng mL trên trọng lượng côn trùng tính bằng g tốt hơn nằm trong khoảng từ 0,3 đến 10, tốt hơn nữa nằm trong khoảng từ 0,5 đến 5, thậm chí tốt hơn nữa nằm trong khoảng từ 0,7 đến 3, thậm chí tốt hơn nữa bằng 1. Cũng có thể duy trì nước đun sôi và/hoặc nước phát sinh từ bước trung gian để thực hiện bước này. Nước này có thể có chứa chất oxy hóa. Trong trường hợp này, việc xử lý các lớp cuticun có thể diễn ra trong bước đun nóng 1 và bước nghiền 2 hoặc trong bước trung gian xử lý các lớp cuticun và

trong bước nghiền.

Tốt hơn, khi hoàn thành bước nghiền, kích thước của hạt côn trùng nhỏ hơn 1cm (kích thước hạt lớn nhất có thể quan sát được sử dụng kính hiển vi), tốt hơn nhỏ hơn 0,5cm. Tốt hơn, kích thước hạt nằm trong khoảng từ 500µm đến 0,5cm và thậm chí tốt hơn nữa nằm trong khoảng từ 500µm đến 1mm.

Không cần thiết phải giảm quá mức kích thước hạt, ví dụ tới kích thước nhỏ hơn 250µm.

Bước nghiền này 2 thúc đẩy sự tiếp xúc của các enzym với cơ chất của chúng.

Trong bước này, có thể đưa chất oxy hóa vào trong máy nghiền để xử lý các lớp cuticun theo các phương pháp được nêu trong bước trung gian trước đó.

Trường hợp việc xử lý các lớp cuticun không được thực hiện đồng thời với bước nghiền, trong bước này, có thể bổ sung các chất phụ gia chống oxy hóa mà thông thường được sử dụng trong bảo quản và ổn định sản phẩm.

- Bước 3: ép các lớp cuticun của côn trùng

Hỗn hợp nhão ướt sinh ra từ bước nghiền 2 sau đó được đưa vào trong máy ép theo phương thức giúp cho có thể ép và tách riêng dịch ép bao gồm cả phần chất béo và phần protein.

Tốt hơn, bước ép giúp cho có thể thu được bánh ép chứa hàm lượng dầu thấp hơn hoặc bằng 20%, tốt hơn thấp hơn hoặc bằng 15%, tốt hơn nữa thấp hơn hoặc bằng 12%, thậm chí tốt hơn nữa thấp hơn hoặc bằng 10%.

Tương tự, bước ép giúp cho có thể thu được bánh ép có hàm lượng chất khô nằm trong khoảng từ 30% đến 60%, tốt hơn nằm trong khoảng từ 40% đến 55%, và tốt hơn nữa nằm trong khoảng từ 45% đến 50%.

Hệ thống ép bất kỳ có thể được sử dụng để thực hiện bước ép, ví dụ như hệ thống ép trục vít đơn hoặc trục vít đôi (trục vít đôi kiểu Angel), hệ lọc ép (hệ lọc ép kiểu Choquenot), hệ ép tấm, v.v.. Các hệ thống này đã biết đối với người có kỹ năng trong lĩnh vực, người mà có khả năng xác định các điều kiện ép để thu được các hàm lượng dầu và/hoặc nước nêu trên.

Nếu hỗn hợp nhão ướt từ bước nghiền 2 thu được bằng nước chứa chất oxy hóa, tốt hơn có thể loại bỏ ít nhất một phần chất oxy hóa này trước bước ép 3.

Bước ép 3 này tùy ý có thể được thực hiện trước bước nghiền 2 khởi đầu từ các côn trùng được đun sôi. Tuy nhiên, tốt hơn thực hiện bước ép 3 sau bước nghiền 2.

Do đó, bước ép 3 này giúp cho có thể thu được dịch ép và bánh ép.

- Bước 4: thủy phân bằng enzym

Hỗn hợp nhão ướt thu được từ bước nghiền 2 hoặc bánh ép thu được từ bước ép 3 được đặt vào trong bể thủy phân bằng nước.

Một cách tùy ý và như được mô tả dưới đây, phần protein thu được từ bước tách 12 có thể lại được đưa vào trong bước thủy phân bằng enzym 4 này, bằng cách kết hợp nó với bánh ép.

Một cách tùy ý và trong trường hợp mà nước đun sôi không chứa chất oxy hóa, nước đun sôi có thể được thu hồi và lại được đưa vào trong bước thủy phân. Thực tiễn, nước này chứa các phần côn trùng mà đã được hòa tan bằng hoạt động đun sôi này và bằng cách sử dụng thao tác nêu sau trong thủy phân, có thể giảm bớt sự thất thoát. Một cách tùy ý, nước từ bước đun sôi này có thể được loại bỏ mỡ, vì một số sáp có thể đã hòa tan trong nước.

Lượng nước đưa vào trong bước thủy phân bằng enzym 4 này tương tự như lượng nước đưa vào trong bước đun nóng 1: tỷ lệ của thể tích nước tính bằng mL trên trọng lượng côn trùng tính bằng g tốt hơn nằm trong khoảng từ 0,3 đến 10, tốt hơn nữa nằm trong khoảng từ 0,5 đến 5, thậm chí tốt hơn nữa nằm trong khoảng từ 0,7 đến 3, thậm chí tốt hơn nữa bằng 1.

Bước thủy phân bằng enzym được thực hiện bằng men proteaza, như proteaza có trên thị trường, trong thời gian từ 4 đến 8 giờ, tốt hơn trong thời gian từ 4 đến 5 giờ, ở độ pH nằm trong khoảng từ 6 đến 8, tốt hơn từ 6,5 đến 7,5, ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C, tốt hơn từ 45 đến 55°C.

Lượng enzym được đưa vào trong bước thủy phân này thấp hơn 10% trọng lượng tính theo tổng trọng lượng ước tính của chất khô đưa vào thủy phân, tốt hơn thấp hơn 6%, tốt hơn nữa là 2%.

Bước thủy phân phân giải protein dẫn đến sự tạo ra pha hòa tan chứa các peptit, glucosamin và oligochitin và phần cặn rắn tạo ra từ chitin, chủ yếu là chitin-polypeptit copolyme.

- Bước 5: bất hoạt bằng nhiệt

Để làm dừng hoạt tính của các enzym của phản ứng và làm ổn định pha hòa tan của bước thủy phân, việc bất hoạt bằng nhiệt được thực hiện bằng cách gia nhiệt dịch này ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 80 đến 105° trong thời gian từ 10 đến 25 phút, tốt hơn từ 15 đến 20 phút. Theo một phương thức, bước bất hoạt bằng nhiệt 5 này được thực hiện theo các kỹ thuật vô trùng thông thường trong ngành công nghiệp thực phẩm nông nghiệp. Theo phương thức khác, việc bất hoạt enzym được thực hiện bằng cách gia nhiệt trong điều kiện chiếu xạ IR hoặc UV hoặc bằng cách gia nhiệt bằng vi sóng.

- Bước 6: ép

Phần cặn rắn, chủ yếu bao gồm chitin, nó được thu hồi và sau đó được ép trong máy ép để xả ra tối đa phần cặn này, nhằm để bơm dịch ép này trở lại pha hòa tan. Phần cặn ép tạo ra theo cách như vậy cơ bản bao gồm chitin, chủ yếu ở dạng chitin-polypeptit copolyme.

- Các bước 7 và 8 (tùy ý): rửa và sấy khô

Sau đó, phần cặn rắn được rửa, lọc, lại được rửa và sau đó, được sấy khô bằng các công nghệ thông thường đã biết đối với người có kỹ năng trong lĩnh vực.

Một cách thuận lợi, hệ thống sấy khô được thiết kế để bảo vệ cấu trúc của chitin-polypeptit copolyme: việc đo tỷ trọng nước, thông khí và thành phần của không khí được kiểm soát. Một cách thuận lợi, việc sấy khô có thể được thực hiện trong lò sấy thông gió ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60 đến 80°C, tốt hơn là 70°C.

Một cách tùy ý, các bước này có thể bao gồm bước loại lipit cuối cùng: phần cặn rắn được xử lý bằng HCl nhằm để loại bỏ các cặn lipit cuối cùng, nhất là các sáp cuticun.

Các bước 9 đến 11 tiếp theo là để chuyển dạng chitin thành chitosan và do đó, chỉ được sử dụng khi sản phẩm mong muốn là chitosan.

- Bước 9 (tùy ý): nghiền

Phần cặn rắn khô, bao gồm chủ yếu là chitin, sau đó được nghiền, ví dụ trong máy nghiền cắt (bằng dao).

Việc tạo ra chitosan từ chitin, bằng phản ứng khử axetyl, phụ thuộc nhiều vào kích thước của các hạt chitin. Do đó, việc nghiền thật mịn phần cặn rắn khô trước khi khử axetyl giúp cho có thể gia tăng hiệu suất và tốc độ của phản ứng khử axetyl một cách đáng kể, như được thể hiện trong bảng 1 dưới đây:

Bảng 1: Hiệu quả của phản ứng khử axetyl sau khi nghiền chitin trước đó

		Nghiền 30 giây	Nghiền 45 giây	Nghiền 60 giây	Nghiền 120 giây
50% số hạt		< 174 μ m	< 117 μ m	< 95 μ m	< 67 μ m
90% số hạt		< 310 μ m	< 244 μ m	< 157 μ m	< 159 μ m
DA*		99%	90%	85%	80%

*Đo mức độ axetyl hóa DA

Các điều kiện của phản ứng khử axetyl được thực hiện trong thử nghiệm được thông báo trong bảng 1 như sau: thời gian phản ứng 4 giờ, nhiệt độ 100°C, NaOH trong dung dịch nước ở nồng độ 30% thể tích, theo tỷ lệ của chitin ước tính: dung dịch NaOH trong đường 1:20.

Sau đó, phần cặn rắn tốt hơn được nghiền tới kích thước hạt thấp hơn 200 μ m, tốt hơn nữa thấp hơn 160 μ m.

- Bước 10: khử axetyl

Phần cặn rắn, tùy ý được nghiền trong bước 9, sau đó được đưa vào trong bể phản ứng, dung dịch natri hydroxit đặc được bổ sung vào đó, trong thời gian 4 đến 24 giờ và tốt hơn từ 6 đến 18 giờ. Natri hydroxit trong dung dịch nước ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 30% đến 40% được bổ sung theo tỷ lệ trọng lượng tính bằng g của chitin nghiền / thể tích tính bằng mL của natri hydroxit trong dung dịch nước nằm trong khoảng từ 1:50 đến 1:10, tốt hơn là 1:20. Sau đó, bể được gia nhiệt, nhiệt độ khử axetyl nằm trong khoảng từ 80 đến 150°C, tốt hơn nằm trong khoảng từ 90 đến 120°C và tốt hơn nữa là 100°C.

Do đó, thu được chitosan ở dạng bột.

Sau đó, chitosan có thể trải qua thao tác bất kỳ đã biết đối với người có kỹ năng trong lĩnh vực cho phép nó được chức năng hóa, đặc biệt là bằng cách bổ sung các gốc (carboxyl hóa, hydroxyl hóa, v.v.).

- Bước 11 (tùy ý): sấy khô

Bột chitosan sau đó được sấy khô ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30 đến 80°C, tốt hơn nằm trong khoảng từ 50 đến 70°C và tốt hơn ở nhiệt độ khoảng 60°C, để thu được bột có hàm lượng chất khô cao hơn 85%, tốt hơn nữa cao hơn 90%.

Các bước tiếp theo là để thu hồi phần chất béo và phần protein từ dịch ép thu được trong bước ép 3 và do đó chỉ được sử dụng khi việc thu hồi này là cần thiết.

- Bước 12: tách

Dịch ép trải qua một hoặc nhiều bước tách, để tách phần chất béo (dầu côn trùng) ra khỏi phần protein (các protein huyết dịch côn trùng). Các bước này có thể được thực hiện bằng kỹ thuật tách dầu bất kỳ đã biết đối với người có kỹ năng trong lĩnh vực, như ly tâm, lắng gạn, tách bằng thẩm thấu ngược, siêu âm, CO₂ siêu tới hạn, v.v., hoặc sự kết hợp của các kỹ thuật này.

Việc tách phần chất béo có thể phức tạp, theo quan điểm về sự có mặt của các dầu với các thành phần thay đổi nhiều ở côn trùng và các axit béo có thể có mạch ngắn (C2-C5) cũng như mạch rất dài (ví dụ, đối với các sáp: > C25). Gia tăng nhiệt độ cao hơn điểm nóng chảy của các dầu này (xấp xỉ 38°C) trong quá trình ly tâm giúp cho có thể hòa tan vàng mỡ này và tạo thuận lợi cho việc tách phần chất béo ra khỏi phần dịch ép còn lại. Sau đó, dịch ly tâm trải qua thao tác lắng gạn theo phương thức (thuộc loại thiết bị lắng gạn hoặc Tricanter), để có thể tách tốt nhất các dầu và protein.

Do đó, các bước này giúp cho có thể thu được phần chất béo.

Khi được tách ra khỏi phần chất béo, phần protein có thể được kết hợp với bánh ép thu được từ bước ép 3 ngay trước bước thủy phân 4. Trên thực tiễn, thường nhiều hơn 20% các protein bị thất thoát trong dịch ép ở bước ép 3, do đó tốt hơn là thu hồi phần này và đưa nó sang bước thủy phân.

- Bước 13 (tùy ý): cô

Theo một phương thức, bước cô được thực hiện bằng cách cho bay hơi trong chân không đối với phần nước. Phần cô có tỷ lệ chất chiết khô cao hơn 10%, tốt hơn là cao hơn 20%. Thao tác này tạo thuận lợi cho việc sấy khô và các chất phụ gia thông thường sử dụng trong bảo quản và ổn định sản phẩm có thể được bổ sung trong bước này.

• Bước 14 (tùy ý): sấy khô

Phần cô sau cùng được sấy khô bằng các công nghệ đã biết đối với người có kỹ năng trong lĩnh vực, ví dụ kỹ thuật phun/phun bụi ("phun-sấy khô"), các kỹ thuật này giúp cho có thể thu được chất chiết, tức là, bột cô đặc khô giàu các peptit và glucosamin, các glucosamin đặc biệt là thu được từ thủy phân một phần chitin bằng H_2O_2 (chủ yếu).

Các dấu hiệu và lợi thế khác của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng từ phần ví dụ sau, được đưa ra theo cách minh họa, với việc tham chiếu hình vẽ trên các hình vẽ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Ví dụ về phương pháp theo sáng chế

600g ấu trùng *T. molitor* được đưa vào trong cốc mổ, đặt vào trong một chậu nước ở nhiệt độ $100^\circ C$ chứa 600mL nước, được đun sôi trước. Sau thời gian 5 phút, cốc mổ được lấy ra khỏi bình nước, ấu trùng được xả ra, và sau đó được kết hợp với một thể tích nước 600mL. Dịch thu được theo cách như vậy được ép bằng hệ ép trục vít đôi kiểu Angel trong các điều kiện sau:

- Tốc độ = 82 vòng/phút;
- W (năng lượng) = 3 HP (mã lực) hoặc $2,68 \times 10^6$ J;
- Độ xộp (xấp xỉ) = 0,5mm ở phần thử nhất và 0,2mm ở phần sau cùng.

Dịch ép và bánh ép có trọng lượng ẩm $136,49 \pm 4,48g$ thu được theo cách như vậy, $100,22 \pm 0,22g$ của nó được sử dụng trong các bước tiếp theo. Tuy nhiên, kiểu hệ ép khác bất kỳ có thể được sử dụng, với điều kiện nó cho phép chiết và thu được bánh ép mà cơ bản tương tự về hàm lượng nước và/hoặc hàm lượng lipid. Theo cách ví dụ, các thử nghiệm khác được thực hiện bằng hệ ép lọc kiểu Choquetnet có các đặc điểm sau:

- Diện tích bề mặt lọc của ngăn = $50cm^2$;
- Áp suất = 2 đến 8 bar;

- Nhiệt độ = 20 đến 80°C,
- Độ xốp = 25 đến 80µm;
- Tốc độ dòng khí kết thúc lọc = 100 đến 250mL/giờ.

Bánh ép được chuyển sang bình Erlenmeyer chứa 600mL dung dịch chứa proteaza (Prolyve NP conc) ở nồng độ 1% (so với trọng lượng ẩm của bánh ép), và toàn bộ được đặt trong điều kiện khuấy từ trong thời gian 4 giờ ở nhiệt độ 45°C (ở độ pH xấp xỉ 6,5). Bình Erlenmeyer sau đó được để trong thời gian 15 phút trong một chậu nước ở nhiệt độ 90°C để bất hoạt các enzym, và dung dịch sau đó được lọc nóng với cỡ lọc 0,45-0,5µm. Chitin thu được theo cách như vậy được sấy khô trong thời gian 24 giờ ở nhiệt độ 70°C. Như vậy, thu được $16,99 \pm 1,77$ g chitin bằng phương pháp này. Trong những điều kiện này, sản phẩm thủy phân (dịch lọc thu được sau khi thủy phân) chiếm $609,98 \pm 10,9$ g với hàm lượng chất khô 5,05%, mà sau khi sấy khô lạnh, có thể thu được $30,8 \pm 0,55$ g sản phẩm thủy phân khô.

Ví dụ 2: Sự ảnh hưởng của các bước cơ học trước bước thủy phân bằng enzym lên mức độ tinh khiết của chitin thu được

Các kiểu xử lý cơ học sơ bộ khác nhau được thử nghiệm, chỉ duy nhất nghiền ("nghiền 1"), nghiền sau đó ép, nghiền sau đó ép và nghiền lần hai ("nghiền 2"), cũng như chỉ duy nhất ép.

Để ép, hệ ép kiểu Angel mô tả trong ví dụ 1 được sử dụng.

1. Vật liệu và phương pháp

Sản xuất chitin bằng nghiền một lần

200g ấu trùng *T. molitor* được đưa vào một cốc nhỏ, và đặt vào trong một chậu nước ở nhiệt độ 100°C chứa 200mL nước được đun sôi trước. Sau thời gian 5 phút, cốc nhỏ được lấy ra khỏi bình nước, ấu trùng được xả ra, và sau đó được kết hợp với một thể tích nước 200mL. Dịch thu được theo cách như vậy được chuyển sang bình Erlenmeyer chứa 2g proteaza (Prolyve), và toàn bộ được đặt trong điều kiện khuấy từ trong thời gian 4 giờ ở nhiệt độ 45°C (ở độ pH xấp xỉ 6,5). Bình Erlenmeyer sau đó được để trong thời gian 15 phút trong một chậu nước ở nhiệt độ 90°C để bất hoạt các enzym, và dung dịch sau đó được lọc nóng với cỡ lọc 0,45-0,5µm. Chitin thu được theo cách như vậy được

sấy khô trong thời gian 24 giờ ở nhiệt độ 70°C. Như vậy, thu được $8,13 \pm 0,27$ g chitin bằng phương pháp này.

Sản xuất chitin bằng cách nghiền nghiền, sau đó ép

200g ấu trùng *T. molitor* được đưa vào một cốc nhỏ, và đặt vào trong một chậu nước ở nhiệt độ 100°C chứa 200mL nước được đun sôi trước. Sau thời gian 5 phút, cốc nhỏ được lấy ra khỏi bình nước, ấu trùng được xả ra, và sau đó được kết hợp với một thể tích nước 200mL. Dịch thu được theo cách như vậy được chuyển vào trong hệ ép kiểu trục vít đôi. 30g bánh ép thu được theo cách như vậy được chuyển sang bình Erlenmeyer chứa 150mL nước và 0,3g proteaza (Prolyve), và toàn bộ được đặt trong điều kiện khuấy từ trong thời gian 4 giờ ở nhiệt độ 45°C (ở độ pH xấp xỉ 6,5). Bình Erlenmeyer sau đó được để trong thời gian 15 phút trong một chậu nước ở nhiệt độ 90°C để bất hoạt các enzym, và dung dịch sau đó được lọc nóng với cỡ lọc 0,45-0,5µm. Chitin thu được theo cách như vậy được sấy khô trong thời gian 24 giờ ở nhiệt độ 70°C. Như vậy, thu được $4,71 \pm 0,11$ g chitin bằng phương pháp này.

Sản xuất chitin bằng bước nghiền thứ nhất ("nghiền 1") sau đó ép và nghiền lần hai ("nghiền 2")

200g ấu trùng *T. molitor* được đưa vào một cốc nhỏ, và đặt vào trong một chậu nước ở nhiệt độ 100°C chứa 200mL nước được đun sôi trước. Sau thời gian 5 phút, cốc nhỏ được lấy ra khỏi bình nước, ấu trùng được xả ra, và sau đó được kết hợp với một thể tích nước 200mL. Dịch thu được theo cách như vậy được chuyển vào trong hệ ép kiểu trục vít đôi. Bánh ép thu được theo cách như vậy được sấy khô trong thời gian 24 giờ trong lò sấy ở nhiệt độ 70°C, và sau đó được nghiền tới 250µm. 10g bột thu được theo cách như vậy được chuyển sang bình Erlenmeyer chứa 50 mL nước và 0,1 g proteaza (Prolyve), và toàn bộ được đặt trong điều kiện khuấy từ trong thời gian 4 giờ ở nhiệt độ 45°C (ở độ pH xấp xỉ 6,5). Bình Erlenmeyer sau đó được để trong thời gian 15 phút trong một chậu nước ở nhiệt độ 90°C để bất hoạt các enzym, và dung dịch sau đó được lọc nóng với cỡ lọc 0,45-0,5µm. Chitin thu được theo cách như vậy được sấy khô trong thời gian 24 giờ ở nhiệt độ 70°C. Như vậy, thu được $4,93 \pm 0,12$ g chitin bằng phương pháp này.

Sản xuất chitin chỉ bằng cách ép duy nhất

200g ấu trùng *T. molitor* được đưa vào một cốc nhỏ, và đặt vào trong một chậu nước ở nhiệt độ 100°C chứa 200mL nước được đun sôi trước. Sau thời gian 5 phút, cốc nhỏ được lấy ra khỏi bình nước, ấu trùng được xả ra, và sau đó được chuyển vào trong hệ ép kiểu trục vít đôi. 90g bánh ép thu được theo cách như vậy được chuyển sang bình Erlenmeyer chứa 450mL nước và 0,9g proteaza (Prolyve), và toàn bộ được đặt trong điều kiện khuấy từ trong thời gian 4 giờ ở nhiệt độ 45°C (ở độ pH xấp xỉ 6,5). Bình Erlenmeyer sau đó được để trong thời gian 15 phút trong một chậu nước ở nhiệt độ 90°C để bất hoạt các enzym, và dung dịch sau đó được lọc nóng với cỡ lọc 0,45-0,5µm. Chitin thu được theo cách như vậy được sấy khô trong thời gian 24 giờ ở nhiệt độ 70°C. Như vậy, thu được $6,48 \pm 0,28$ g chitin bằng phương pháp này.

Sản xuất chitin bằng con đường hóa học

50g ấu trùng *T. molitor* được đưa vào một cốc nhỏ, và đặt vào trong một chậu nước ở nhiệt độ 100°C chứa 50mL nước, được đun sôi trước. Sau thời gian 5 phút, cốc nhỏ được lấy ra khỏi bình nước, ấu trùng được xả ra, và sau đó được kết hợp với một thể tích nước 60mL. Dịch thu được theo cách như vậy được chuyển sang bình thể tích 1L và 500mL dung dịch HCl 1M được bổ sung vào đó. Toàn bộ được đặt trong điều kiện khuấy ở nhiệt độ 90°C trong thời gian 1 giờ. Các lượng sau đó được lọc và phần cặn rắn được chuyển vào bình thể tích 1 L chứa 500 mL dung dịch NaOH 1M; toàn bộ được đặt trong điều kiện khuấy ở nhiệt độ 90°C trong thời gian 24 giờ. Sau đó, phần cặn được lọc và đặt trong lò thông gió ở nhiệt độ 70°C trong thời gian 24 giờ. Như vậy, thu được $0,944 \pm 0,005$ g chitin tinh khiết theo phương thức hóa học.

Tính toán mức độ tinh khiết

Mức độ tinh khiết của chitin được xác định bằng cách so sánh trọng lượng của phần cặn khô thu được so với trọng lượng thu được từ chiết hóa học, xấp xỉ 5% của chất khô ban đầu.

Đo hàm lượng lipid

2g mẫu được đặt vào trong một cốc nhỏ, 0,2g Na₂SO₄ và 15mL CHCl₃/MeOH (tỷ lệ 2/1 thể tích/thể tích) được bổ sung vào đó. Toàn bộ được đặt trong điều kiện khuấy từ trong thời gian 20 phút, sau đó dung dịch được lọc và phần cặn lại được đặt vào trong

cốc mở với 10mL $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (tỷ lệ 2/1 thể tích/thể tích). Toàn bộ được đặt trong điều kiện khuấy từ trong thời gian 15 phút, sau đó dung dịch được lọc, các pha dung môi được kết hợp và làm bay hơi tới khối lượng ổn định. Hàm lượng lipit được xác định là tỷ lệ % trọng lượng sau khi chiết - làm bay hơi so với trọng lượng ban đầu của mẫu (2g).

2. Kết quả

Như có thể quan sát thấy ở hình vẽ trên Fig. 2, phương pháp có sự ảnh hưởng đến độ tinh khiết của chitin thu được, kết quả tốt nhất đạt được bằng cách ép tối thiểu. Kết quả tốt nhất đạt được bằng cách nghiền sau đó ép, cụ thể là chitin có mức độ tinh khiết 78% và kết quả kém nhất với phương pháp nghiền duy nhất, cụ thể chitin có mức độ tinh khiết là 48%.

Phân tích chính xác hơn về sản phẩm trung gian mà chitin được chiết từ đó cho thấy rằng, hàm lượng lipit thấp dẫn đến độ tinh khiết cao hơn của chitin thu được (hình vẽ trên Fig. 3). "Sản phẩm trung gian" có nghĩa là sản phẩm đưa vào thủy phân bằng enzym, tức là, xuất phát từ bước sau cùng trước khi thủy phân, cụ thể theo các phương pháp tạo ra sản phẩm nêu trên, bước nghiền 1 hoặc nghiền 2 hoặc bước ép.

Phân tích về hàm lượng lipit trong chitin và dịch thủy phân trên thực tiễn cho thấy rằng, khi chức năng của hàm lượng lipit đầu tiên có mặt trong sản phẩm trung gian, hàm lượng lipit trong chitin là tương đối ổn định, nằm trong khoảng từ 7 đến 15%, trong khi đó hàm lượng lipit trong sản phẩm thủy phân thay đổi trong khoảng từ 11 đến 47% (hình vẽ trên Fig. 3).

Cụ thể hơn, nếu sản phẩm trung gian có hàm lượng lipit 35%, thì:

- chitin thu được từ bước thủy phân sẽ chỉ có độ tinh khiết 50% và sẽ bao gồm 10% lipit, và
- hàm lượng lipit của sản phẩm thủy phân bản thân nó sẽ gần khoảng 40%.

Tuy nhiên, nếu hàm lượng lipit của sản phẩm trung gian là 7%, thì:

- chitin thu được sau bước thủy phân sẽ có độ tinh khiết 80% và sẽ có hàm lượng lipit 8% và sản phẩm thủy phân cũng sẽ có hàm lượng lipit thấp, khoảng 10%.

Điều này chỉ ra rằng, khi hàm lượng lipid ban đầu cao, cao hơn 12%, enzym chịu trách nhiệm thủy phân dẫn đến sản phẩm thủy phân không chỉ protein, mà còn cả lipid bởi hỗn hợp xúc tác. Như vậy, thu được hàm lượng lipid tương tự trong chitin, cụ thể là 8,6 và 7,9%, trong trường hợp khi các lipid ban đầu lần lượt là 35 và 7%. Tuy nhiên, độ tinh khiết của chitin trong trường hợp này lần lượt vượt trên khoảng từ 48 đến 84%. Như vậy, một mặt trong số 52% tạp chất và 16% về mặt khác, 8% trung bình là do lipid và do đó, lượng protein vẫn bám vào chitin trong trường hợp này vẫn cao hơn 38 điểm khi nhiều lipid hơn có mặt trong sản phẩm trung gian được cho tiến hành thủy phân.

Sau cùng, tầm quan trọng của việc nghiền ngược hướng ép cũng có thể được nghiên cứu (hình vẽ trên Fig. 4). Như vậy, có thể nhận thấy một cách rõ ràng rằng, sự phân bố các lipid giữa bánh ép và dịch ép đạt hiệu quả cao hơn, 12,9 so với 87,1, đối với 42,7 so với 57,3 khi bước nghiền sơ bộ được thực hiện.

Ví dụ 3: Phân tích sản phẩm thủy phân

Phân tích chi tiết được thực hiện trên sản phẩm thủy phân thu được trong ví dụ 1.

1. Hàm lượng glucosamin

Hàm lượng glucosamin và một số đường khác trong sản phẩm thủy phân được phân tích bằng phương pháp sắc ký khí sau khi metanol phân và silyl hóa.

Quy trình:

10mg mẫu và 50µg chất nội chuẩn được đặt vào trong 500µL hỗn hợp metanol/axit clohydric 3N trong thời gian 4 giờ ở nhiệt độ 110°C (hoặc 24 giờ ở nhiệt độ 130°C). Sau đó, hỗn hợp được trùng hòa bằng Ag_2CO_3 . 50µL anhydrit axetic được bổ sung để tái axetyl hóa bất kỳ osamine nào có mặt. Sau khi để qua đêm trong bóng tối ở nhiệt độ môi trường, các mẫu được ly tâm (15 phút, 3000 vòng/phút) và lớp nổi trên mặt được làm bay hơi. Sau đó, các hợp chất được hòa tan trong 100µL pyridin và được ủ qua đêm ở nhiệt độ môi trường với 100µL BSTFA (Supelco). Sau đó, các chất phản ứng được làm bay hơi và phần cặn được kết hợp vào trong 700µL CH_2Cl_2 và được bơm vào trong GC.

Lập trình nhiệt độ: 1 phút ở nhiệt độ 120°C, gradient 1,5°C/phút tới 180°C, tiếp theo 2°C/phút tới 200°C.

Phát hiện: FID

Cột: HP-5MS (30m, đường kính bên trong 0,25mm)

Chất nội chuẩn: myo-inositol

Các lượng khác được đo và tính toán theo hai cách khác nhau (bảng 2). Có thể thấy rằng, glucosamin được chứa trong sản phẩm thủy phân với hàm lượng 0,1-0,15% trọng lượng và với tỷ lệ 0,04-0,05 so với glucoza.

Bảng 2: Sự phân bố của glucosamin, manozơ và glucoza trong sản phẩm thủy phân

	Metanol phân ở nhiệt độ 110°C		Metanol phân ở nhiệt độ 130°C	
	% trọng lượng	Tỷ lệ mol	% trọng lượng	Tỷ lệ mol
Glucoza	$1,6 \pm 0,3$	1	$2 \pm 0,4$	1
Manozơ	$0,3 \pm 0,05$	$0,15 \pm 0,005$	$0,4 \pm 0,08$	$0,15 \pm 0,007$
Glucosamin	$0,1 \pm 0,02$	$0,04 \pm 0,007$	$0,15 \pm 0,04$	$0,05 \pm 0,003$

2. Kích thước của các protein

Kích thước của các protein/peptit trong sản phẩm thủy phân được đánh giá bằng phương pháp HPLC, thiết bị Shimadzu 20A, ở nhiệt độ môi trường, trên cột Superdex Peptide 10/300 GL, trong dung dịch đệm chứa axetonitril (ACN) 30%, axit trifloaxetic (TFA) 0,1%, với tốc độ dòng 0,4mL/phút. Việc phát hiện được thực hiện tại bước sóng 205nm và thể tích mẫu được bơm là 20μL.

Tuy nhiên, kích thước của các protein/peptit trong dịch ép bào chế trong ví dụ 1 cũng được đánh giá trong các điều kiện tương tự nhằm mục đích so sánh.

Việc so sánh kích thước của các protein giữa dịch ép và sản phẩm thủy phân (hình vẽ trên Fig. 5) rõ ràng cho thấy rằng, lượng lớn peptit, 76%, có mặt trong sản phẩm thủy phân có khối lượng mol nằm trong khoảng từ 130 đến 900 Da. Tuy nhiên, tỷ lệ các protein có khả năng tiêu hóa thấp (khối lượng mol cao hơn 1300 Da) giảm từ 31% xuống 2%. Tương tự, tỷ lệ các peptit có đoạn ký tự ngắn (khối lượng mol thấp hơn 130 Da) giảm từ 38% xuống 15%. Do đó, các tiêu chuẩn về khả năng tiêu hóa và khả năng dễ chấp nhận được cải thiện bằng cách xử lý enzym đề xuất.

3. Khả năng tiêu hóa

Mức độ về khả năng tiêu hóa pepsin của sản phẩm thủy phân được lượng tính ở mức 99,6% của tổng lượng protein. Mức độ này được đo ở phòng thí nghiệm bên ngoài, phương pháp sử dụng tuân theo Hướng dẫn số 72/199/EEC và được thực hiện không cần loại bỏ chất béo.

4. Hàm lượng protein

Hàm lượng protein trong sản phẩm thủy phân được lượng tính ở mức 84,8%. Hàm lượng này được đo bởi phòng thí nghiệm bên ngoài, theo phương pháp Kjeldahl với hệ số điều chỉnh là 6,25. Phương pháp sử dụng tuân thủ theo tiêu chuẩn châu Âu EC Regulation 152/2009.

5. Hàm lượng lipit

Hàm lượng lipit trong sản phẩm thủy phân được lượng tính ở mức $0,7 \pm 0,5\%$. Hàm lượng này được đo bởi phòng thí nghiệm bên ngoài theo phương pháp được gọi là "thủy phân" tuân theo tiêu chuẩn châu Âu EC Regulation 152/2009 (phương pháp B).

6. Thành phần axit amin

Sản phẩm thủy phân thu được sau khi xử lý bằng các enzym khác nhau được phân tích về thành phần axit amin của nó (hình vẽ trên Fig. 6). Phân tích này cho thấy sự chiếm ưu thế của prolin, cùng với sự có mặt của hydroxyprolin (HYP) – sản phẩm chuyển hóa của prolin và axit amin không có mặt trong một số sinh vật, ví dụ các động vật giáp xác. Bây giờ, prolin và sản phẩm chuyển hóa của nó, hydroxyprolin, đóng vai trò quan trọng trong chuyển hóa, nhất là bằng cách cho phép tổng hợp các axit amin khác như arginin và glutamat. Mặc dù hầu hết động vật có vú đều có khả năng tổng hợp prolin, nhưng việc sản xuất ra axit amin này bởi các động vật sơ sinh, chim và cá là không đủ, điều này giải thích vì sao việc bổ sung prolin và hydroxyprolin đôi khi được sử dụng để tăng cường sự sinh trưởng của một số động vật. Tuy nhiên, prolin là axit amin hàng đầu chứa trong sữa động vật có vú, ở đó nó có mặt với hàm lượng 12%, nhưng hàm lượng của nó trong các protein thực vật quá thấp, chỉ 2,9% trong đậu tương và 0,8% trong ngô. Do đó, sản phẩm thủy phân này được phát hiện là có hàm lượng prolin cao như trong sữa và cũng như ở trên được phát hiện trong các protein thực vật.

Các axit amin khác có mặt với lượng lớn là alanin, leuxin và glutamat (cùng với glutamin). Lượng tương đối của chúng cao hơn 9%. Tuy nhiên, các axit amin chứa lưu huỳnh như xystein và methionin có mặt với lượng thấp, khoảng 0,5%.

Phương pháp sử dụng để xác định các kết quả này (thủy phân axit) không giúp cho có thể phát hiện được các axit amin như tryptophan và arginin. Tuy nhiên, asparagin được chuyển dạng hoàn toàn thành axit aspartic và glutamin thành axit glutamic, và thứ được quan sát thấy dưới các đỉnh Asp và Glu trên thực tiễn tương ứng là tổng của axit aspartic và asparagin về một mặt và axit glutamic và glutamin về mặt khác, ban đầu có mặt trong sản phẩm thủy phân.

Ví dụ 4: Phân tích về chitin

Phân tích axit amin chi tiết được thực hiện trên chitin thu được trong ví dụ 1.

Tổng hàm lượng của các axit amin là 32,3g trên 100g copolyme (được xác định là tổng số các axit amin). Các axit amin có mặt chiếm ưu thế là valine, glyxin, alanin và tyrosin (hình vẽ trên Fig. 7).

Các phân tích được khấu trừ và kết quả thu được bằng phương pháp NF EN ISO 13904 đối với tryptophan và NF EN ISO 13903 đối với các axit amin khác.

Ví dụ 5: Mô tả đặc điểm của sản phẩm thủy phân và chitin theo phương pháp tạo ra chúng được sử dụng

I. Vật liệu và phương pháp

a) Vật liệu

Côn trùng

Các côn trùng khác nhau được nghiên cứu:

- côn trùng cánh cứng: *Tenebrio molitor* (*T. molitor* hoặc TM),
- côn trùng cánh vảy: *Galleria mellonella* (*G. melonella* hoặc GM),
- côn trùng hai cánh: *Hermetia illucens* (*H. illucens* hoặc HI), và
- côn trùng cánh thẳng: *Acheta domesticus* (*A. domesticus* hoặc AD).

Enzym

Các enzym khác nhau được sử dụng trong bước thủy phân.

Phép đo hoạt tính enzym này được dựa trên nguyên lý đo sự giải phóng tyrosin tại 275nm trong thủy phân casein bằng enzym phân giải protein (Valley Research SAPU Assay method, by Karen PRATT).

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

SAPU/g = một đơn vị đo ảnh phổ của proteaza

ΔA = hệ số hấp thu tương quan

i = y-trục gốc

11 = thể tích phản ứng cuối cùng

M = độ dốc của đường cong hiệu chỉnh

30 = thời gian phản ứng (tính bằng phút)

C = nồng độ của enzym (g/mL) trong dung dịch enzym bổ sung

1 = 1 mL thể tích của dung dịch enzym bổ sung

Đường cong hiệu chỉnh thu được bằng cách đo hệ số hấp thu của các dung dịch tyrosin có các nồng độ khác nhau trong dung dịch đệm phosphat (0,2 M, pH 7).

5mL dung dịch chứa casein (0,7% trọng lượng/thể tích, dung dịch đệm phosphat 0,2 M, pH 7, được gia nhiệt trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ 90°C và với 3,75g/L dung dịch bổ sung) được ủ với 1mL dung dịch enzym (0,15g trong 100mL dung dịch đệm glyxin, 0,05M) để được thử nghiệm ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 30 phút. Tiếp theo, 5mL dung dịch TCA được bổ sung (18g TCA, 11,35g natri axetat khan, 21mL axit axetic băng, được kết hợp với nước khử khoáng thành 1L dung dịch), trộn tạo xoáy, lọc và đo hệ số hấp thu tại 275nm.

Đối chứng được bào chế tương tự nhưng không bổ sung enzym, thay vào đó, 1mL nước khử khoáng được bổ sung để có cùng thể tích phản ứng.

Các hoạt tính được đo theo cách như vậy đối với các enzym khác nhau (Prolyve NP, Novozyme 37071, Neutrase và Sumizyme) được liệt kê trong bảng 3.

Bảng 3: Sự tương ứng của các hoạt tính và khối lượng enzym của các enzym được sử dụng

Enzym	Prolyve	Novozyme	Neutraza	Sumizyme
Hoạt tính enzym mong muốn	3789,52	3789,52	3789,52	3789,52
Hoạt tính enzym / g	3789,52	1662,35	2213,24	3237,19
m (g)	1,00	2,28	1,71	1,17

b) Các phương pháp sản xuất

Phương pháp sản xuất chỉ bằng cách nghiền (được ký hiệu là "nghiền" trong hình vẽ trên các Fig)

600g côn trùng tươi sống (ấu trùng trong trường hợp *T. molitor*, *G. melonella* hoặc *H. illucens*; đê trong trường hợp *A. domesticus*) được đưa vào trong một ngăn, ở đó chúng được giết bằng hơi nước (115°C, 5 phút). Tiếp theo, côn trùng được đưa vào dụng cụ trộn và 75mL nước được bổ sung trên 100g côn trùng, và tiếp theo, toàn bộ được khuấy trộn. 100g (trọng lượng ẩm) sản phẩm thu được theo cách như vậy sau đó được đưa vào bình thót cổ 3 cổ có trang bị bộ ngưng tụ và bộ khuấy cơ học và enzym phân giải protein với hoạt tính tương đương 3789 SAPU sau đó được bổ sung. Phản ứng sau đó được gia nhiệt đến 45°C trong thời gian 4 giờ. Tiếp theo, nhiệt độ được gia tăng lên 90°C trong thời gian 15 phút, và hỗn hợp phản ứng sau cùng được lọc (0,40-0,45µm). Phần cặn được sấy khô trong thời gian 24 giờ ở nhiệt độ 70°C: do đó, thu được chitin thông qua con đường tinh chế bằng enzym; phần dịch lọc được làm đông lạnh và đông khô: do đó thu được sản phẩm thủy phân.

Phương pháp giống hệt bất luận côn trùng hoặc enzym nào được nghiên cứu.

Phương pháp sản xuất bằng cách nghiền sau đó ép (được ký hiệu là "nghiền + ép" trong hình vẽ trên các Fig)

600g côn trùng tươi sống (ấu trùng trong trường hợp *T. molitor*, *G. melonella*

hoặc *H. illucens*, hoặc để trong trường hợp *A. domesticus*) được đưa vào trong một ngăn, ở đó chúng được giết bằng hơi nước (115°C, 5 phút). Tiếp theo, côn trùng được đưa vào dụng cụ trộn và 75mL nước được bổ sung trên 100 g côn trùng, và tiếp theo, toàn bộ được khuấy trộn và ép (hệ ép trực vít đôi, hoặc hệ ép lọc hoặc hệ ép khác). Tiếp theo, 100g (trọng lượng ẩm) sản phẩm thu được theo cách như vậy được đưa vào bình thốt cổ 3 cổ có trang bị bộ ngưng tụ và bộ khuấy từ, 500mL nước được bổ sung, cũng như enzyme phân giải protein có hoạt tính tương đương với 3789 SAPU. Tiếp theo, phản ứng được gia nhiệt ở nhiệt độ 45°C trong thời gian 4 giờ. Tiếp theo, nhiệt độ được gia tăng lên 90°C trong thời gian 15 phút, và hỗn hợp phản ứng sau cùng được lọc (0,40-0,45µm). Phần cặn được sấy khô trong thời gian 24 giờ ở nhiệt độ 70°C: do đó, thu được chitin bằng cách tinh chế thông qua con đường enzyme; phần dịch lọc được làm đông lạnh và đông khô: do đó thu được sản phẩm thủy phân.

Phương pháp giống hệt bất luận côn trùng hoặc enzyme nào được nghiên cứu.

c) Phân tích

Đo hàm lượng tro

Hàm lượng tro được xác định bằng phương pháp dựa trên tiêu chuẩn châu Âu EC Regulation 152/2009 ngày 27-01-2009.

Đo kích thước của các protein

100mg mẫu được đưa vào 10 mL dung dịch đệm phosphat/NaCl (pH 7,4, 0,137mM). Mẫu được khuấy trong thời gian 1 phút (xoáy), ly tâm ở tốc độ 900 g trong thời gian 1 phút và tiếp theo, được lọc qua màng lọc cỡ 0,45µm. Phân tích được thực hiện trên hệ thống sắc ký loại trừ không gian, với cột Nucleogel GFC-300, dung môi rửa giải sử dụng là dung dịch đệm phosphat/NaCl (pH 7,4, 0,137mM), tốc độ dòng là 1,0mL/phút, với việc phát hiện bằng bộ dò UV tại bước sóng 280 nm.

Đo hàm lượng protein

Hàm lượng protein thu được bằng phương pháp Dumas, với hệ số chuyển đổi bằng 6,25, được điều chỉnh thích hợp theo tiêu chuẩn NF EN ISO 16634-1.

Đo hàm lượng lipid

Hàm lượng lipid thu được bằng phương pháp được điều chỉnh thích hợp tiêu chuẩn châu Âu EC Regulation 152/2009 – phương pháp B – SN.

Khả năng tiêu hóa pepsin

Khả năng tiêu hóa pepsin được đo bằng phương pháp được mô tả trong Hướng dẫn số 72/199/EC.

Độ phong phú tương đối của các axit amin

Độ phong phú của các axit amin được xác định bằng phương pháp tuân theo tiêu chuẩn châu Âu EC Regulation 152/2009 ngày 27-01-2009 – SN. Hàm lượng tryptophan được xác định riêng biệt bằng phương pháp được điều chỉnh thích hợp theo tiêu chuẩn châu Âu EC Regulation 152/2009 ngày 27-01-2009 – SN. Độ phong phú tương đối được tính toán bằng cách tạo hệ thức liên hệ giữa hàm lượng của mỗi một axit amin với hàm lượng axit amin.

Hàm lượng axit amin

Hàm lượng axit amin được xác định bằng cách bổ sung đồng thời các giá trị riêng biệt thu được đối với mỗi một axit amin, bao gồm cả tryptophan.

Độ tinh khiết trọng lực

Độ tinh khiết trọng lực được xác định bằng cách so sánh trọng lượng của phần cặn khô thu được so với trọng lượng thu được từ chiết hóa học, trọng lượng nêu sau được đánh giá ở mức xấp xỉ 5% của chất khô ban đầu.

Độ tinh khiết đo màu

Màu của mẫu được lượng tính bằng cách phân tích ảnh của các mẫu sử dụng phần mềm ImageJ theo ba màu đỏ, xanh lục và xanh lơ (RGB), giá trị trung bình của các màu này biểu thị sự đánh giá màu sắc thực. Mẫu chitin của tôm được đưa ra thị trường bởi Chitine France được sử dụng làm tiêu chuẩn (độ tinh khiết 100%) và độ tinh khiết đo màu của các mẫu tạo ra được tính toán là tỷ lệ % của màu này (tỷ lệ màu của mẫu trên màu của tiêu chuẩn).

Độ tinh khiết theo sự chênh lệch

Đối với phép đo này, lấy giá trị độ tinh khiết tuyệt đối (100%) trừ đi các lượng

tạp chất đã biết (các axit amin, lipid và tro) để thu được giá trị độ tinh khiết được lượng tính theo sự chênh lệch; tức là, một mẫu chứa 30% protein, 10% lipid và 1% tro do đó được ấn định độ tinh khiết là $100-30-10-1=59\%$.

Mức độ kết tinh

Các phép đo được thực hiện theo kỹ thuật phân tán tia X góc rộng (WAXS - wide angle X-ray scattering) trên thiết bị Bruker D8 Advance (A25 DaVinci design) có trang bị bộ dò Lynxeye XE. Kết quả được diễn giải theo phương pháp mô tả trong tài liệu Loelovich, M. Res. Rev.: J. Chem. 2014, 3, 7-14.

Mức độ axetyl hóa

Các phép đo được thực hiện sử dụng thiết bị ^{13}C NMR CP/MAS (Bruker), có trang bị nam châm 800 MHz.

Kết quả được phân tích như mô tả trong tài liệu Simionatto Guinesi, L.; Gomes Cavalheiro, E. T. *Thermochimica Acta* **2006**, 444, 128-133 và Heux, L.; Brugnerotto, J.; Desbrières, J.; Versali, M.-F.; Rinaudo, M. *Biomacromolecules* **2000**, 1, 746-751.

Đo độ phong phú bề mặt nguyên tử và chức năng

Các phép đo được thực hiện sử dụng thiết bị XPS Escalab 250 (VG Scientific), có trang bị nguồn RX Ka A1 (1486,6 eV), máy đơn sắc và thấu kính từ.

Các mẫu, đã chuyển thành bột trước đó được để trong điều kiện chân không trong thời gian 48 đến 72 giờ và sau đó được phân tích.

Hình ảnh của lớp cuticun trên hiển vi huỳnh quang hai photon

Kính hiển vi đa photon trên thiết bị DISCO (Synchrotron Soleil).

$\text{Lambda exc}=810\text{nm}$, hiệu suất 18%, màu ngọc lam và lọc màu vàng 406/15 (SHG), lọc màu xanh lơ 460/60, lọc màu xanh lục 550/88.

II. Sản phẩm thủy phân

a) Tro

Thao tác ép có tác dụng rất đáng kể lên hàm lượng tro trong sản phẩm thủy phân thu được, bất luận côn trùng nào được nghiên cứu (hình vẽ trên Fig. 8). Thực tiễn, giảm

hàm lượng tro có thể đạt 52%, và tỷ lệ giảm là khá giống nhau bất luận các côn trùng có giàu về khoáng chất hay không trong tự nhiên. Như vậy, trong trường hợp *H. illucens*, hàm lượng tro thay đổi từ 7,5g/100 g chất khô khi phương pháp có nghiền được sử dụng, thành 3,8g/100 g chất khô khi bước ép được bổ sung, tức là, tỷ lệ giảm 49%; trong trường hợp *T. molitor*, hàm lượng thay đổi từ 5g/100g thành 2,4g/100g, tức là, tỷ lệ giảm 52%.

Thao tác ép cũng có tác dụng đáng kể lên hàm lượng tro trong sản phẩm thủy phân thu được, bất luận enzym nào được sử dụng (hình vẽ trên Fig. 9). Cụ thể, lưu ý rằng, đối với *T. molitor*, bất luận enzym nào, hàm lượng tro trong sản phẩm thủy phân là thấp hơn 3% khi phương pháp có thao tác ép được sử dụng.

Hàm lượng tro trong sản phẩm thủy phân (thu được bằng phương pháp nghiền + ép) là thấp hơn 4g/100g chất khô, bất luận côn trùng nào được nghiên cứu (hình vẽ trên Fig. 10).

b) Kích thước của các protein trong sản phẩm thủy phân

Việc sử dụng bước ép rõ ràng giúp cho có thể cải thiện được đặc tính của các enzym phân giải protein, bất luận côn trùng nào (hình vẽ trên Fig. 11) hoặc enzym nào được sử dụng (hình vẽ trên Fig. 12). Do đó, độ phong phú tương đối của các protein lớn giảm đáng kể so với phương pháp chỉ bao gồm bước nghiền, sản phẩm thủy phân cuối cùng không bao gồm nhiều hơn tối đa 10,3% số protein lớn nêu trên trong trường hợp thủy phân được thực hiện bằng Prolyve, bất luận côn trùng nào; và không cao hơn 17,5% trong trường hợp thủy phân *T. molitor*, bất luận enzym nào được sử dụng.

c) Hàm lượng protein

Hàm lượng protein của sản phẩm thủy phân phụ thuộc nhiều vào phương pháp sử dụng. Do đó, khi chỉ áp dụng duy nhất bước nghiền, thì các protein chỉ chiếm $53,59 \pm 1,5\%$ chất khô của sản phẩm thủy phân từ *T. molitor* thu được theo cách như vậy, bất luận enzym nào được sử dụng (hình vẽ trên Fig. 13). Tuy nhiên, khi nghiền được tiếp theo bằng ép, hàm lượng protein trong sản phẩm thủy phân đạt tới $84,58 \pm 1,4\%$, như vậy nó đạt sự gia tăng 53-62%, tùy thuộc vào enzym sử dụng.

Sự gia tăng này lớn hơn nếu như côn trùng ban đầu nghèo protein, như vậy, trong

trường hợp *G. melonella*, hàm lượng protein thay đổi từ 41,25% thành 71%, đạt sự gia tăng gần 86%, và trong trường hợp *H. illucens*, sự gia tăng thậm chí đạt 118%, khi nó thay đổi từ 34,2% sang 74,5% (hình vẽ trên Fig. 14).

d) Hàm lượng lipit

Thao tác ép có ảnh hưởng lớn lên hàm lượng lipit của sản phẩm thủy phân, bất luận enzym nào (hình vẽ trên Fig. 15) hoặc côn trùng nào được nghiên cứu (hình vẽ trên Fig. 16). Thực tiễn, hàm lượng lipit giảm đáng kể ở mức 51,4-97,7%, như vậy thay đổi từ 28,6 thành 13,9% trong trường hợp *H. illucens* (tỷ lệ giảm 51,4%) và từ 33,85 thành 0,9% trong trường hợp *T. molitor* bằng Novozyme (tỷ lệ giảm 97,3%).

e) Khả năng tiêu hóa pepsin

Khả năng tiêu hóa pepsin của sản phẩm thủy phân thu được theo cách như vậy là rất cao, cao hơn 96%, bất luận enzym hoặc côn trùng nào được nghiên cứu (hình vẽ trên Fig. 17).

f) Độ phong phú của axit amin

Việc sử dụng bước ép giúp cho có thể thu được sự chiết tốt hơn các axit amin khác có mặt trong cuticun, như alanin và tyrosin và ở mức độ ít hơn là valine, serin và glyxin, bất luận enzym hoặc côn trùng nào được nghiên cứu (hình vẽ trên các Fig 18-24). Các kết quả này cũng cần được so sánh với các kết quả liên quan đến các axit amin có mặt trong chitin tinh khiết bằng enzym (hình vẽ trên Fig. 29-35).

Lưu ý: mặc dù độ phong phú tương đối của một số axit amin, bao gồm axit aspartic và glutamat nói riêng suy giảm, nhưng lượng của chúng vẫn giống nhau hoặc thậm chí chỉ giảm chút ít trong một số trường hợp, vì tổng lượng của các axit amin chiết bằng phương pháp có bước ép tăng lên (so với hàm lượng protein trong sản phẩm thủy phân).

III. Chitin

a) Tro

Hàm lượng tro trong chitin cũng chịu ảnh hưởng của bước ép, mặc dù mức độ thấp hơn trong sản phẩm thủy phân. Tỷ lệ giảm nằm trong khoảng từ 25% đến 28,6%

khi chức năng của enzym sử dụng được quan sát theo cách như vậy (hình vẽ trên Fig. 25).

Hàm lượng tro trong chitin (thu được bằng phương pháp nghiền + ép) là cực kỳ thấp, bất luận côn trùng nào (hình vẽ trên Fig. 26) được nghiên cứu. Như vậy, trong trường hợp *T. molitor*, hàm lượng tro tối đa là 1,05g/100g chất khô, và thậm chí đối với các côn trùng trong tự nhiên giàu chất khoáng, hàm lượng này vẫn thấp hơn 3,5g/100g chất khô.

b) Hàm lượng lipid trong chitin

Mặc dù mức độ thấp hơn một chút trong sản phẩm thủy phân, nhưng hàm lượng lipid trong chitin cũng giảm khi bước ép được bổ sung vào phương pháp (hình vẽ trên Fig. 27). Hiệu quả chủ yếu phụ thuộc vào enzym, từ 15% đối với Sumizyme và lên tới 60% đối với Novozyme. Bất luận côn trùng nào, sự giảm này nằm trong khoảng từ 50% trong trường hợp *H. illucens* đến 58% trong trường hợp *T. molitor*, khi phản ứng được thực hiện bằng Prolyve.

Đối với tất cả các côn trùng, hàm lượng lipid thấp hơn 12%, và đối với côn trùng không biết bay thậm chí là $\leq 6\%$.

c) Hàm lượng và độ phong phú tương đối của các axit amin trong chitin

Bước ép giúp cho có thể loại bỏ tỷ lệ lớn hơn của các protein gắn vào chitin. Vì phép đo trực tiếp hàm lượng protein khó thực hiện do chức năng amit có mặt trong cấu trúc thực của chitin, nên hàm lượng protein này được lấy xấp xỉ bởi tổng của các axit amin (hình vẽ trên Fig. 28). Như vậy, có thể thấy rằng, tổng của các axit amin giảm tới 5 đến 54%, khi bước ép được bổ sung vào phương pháp, bất luận enzym hoặc côn trùng nào được nghiên cứu.

Độ phong phú tương đối của các axit amin ít bị tác động bởi bước ép, mặc dù một số axit amin, bao gồm cả alanin, hình như được chiết tốt hơn khi bước ép được thực hiện (hình vẽ trên các Fig. 29 đến 35). Tuy nhiên, có thể thấy rằng, đối với tất cả các côn trùng, alanin, tyrosin và prolin, cũng như trong chừng mực thấp hơn đối với valine, glyxin, leuxin và serin, là các axit amin chủ yếu gắn vào chitin, hàm lượng của chúng trung bình nằm trong khoảng từ 23 đến 40% của toàn bộ các axit amin, và trong số các

axit amin này cũng có thể thấy rằng, sự giảm nhiều nhất được quan sát thấy ở chitin và sự tăng nhiều nhất (đạt tối đa 7-30%) trong sản phẩm thủy phân (hình vẽ trên các Fig. 18-24) khi bước ép được bổ sung vào phương pháp.

d) Độ tinh khiết trọng lực

Bất luận enzym nào (hình vẽ trên Fig. 36) hoặc côn trùng nào (hình vẽ trên Fig. 37) được nghiên cứu, độ tinh khiết trọng lực được cải thiện bằng cách sử dụng bước ép. Như vậy, giá trị này thay đổi từ 48,7% thành 77,1% trong trường hợp *T. molitor* với Prolyve và từ 33,7% thành 87,9% trong trường hợp *H. illucens* với Prolyve.

e) Độ tinh khiết đo màu

Sự cải thiện về độ tinh khiết đo màu, thừa nhận là ít rõ ràng hơn đối với độ tinh khiết trọng lực, cũng được quan sát khi bước ép tạo thành một phần của phương pháp, bất luận enzym hoặc côn trùng nào được nghiên cứu (hình vẽ trên các Fig. 38 và 39).

f) Độ tinh khiết theo sự chênh lệch

Do sự giảm về hàm lượng lipid, tro và axit amin trong chitin thu được sau phương pháp có bước ép, độ tinh khiết theo sự chênh lệch của chitin này tăng lên đáng kể, tới 13% trong trường hợp *H. illucens* và tới 74% trong trường hợp *T. molitor* với Prolyve, bất luận côn trùng nào hoặc enzym nào được nghiên cứu (hình vẽ trên Fig. 40).

g) Mức độ axetyl hóa của chitin

Mức độ axetyl hóa bị ảnh hưởng đáng kể bằng việc bổ sung bước ép vào phương pháp (hình vẽ trên các Fig. 41 và 42). Thực tiễn, việc loại bỏ các lipid và axit amin ra khỏi huyết dịch cho phép khả năng tiếp cận tốt hơn các enzym với bề mặt của cuticun, điều này góp phần vào sự cải thiện về sự cắt các liên kết peptit của các protein liên kết với chitin, nhưng cũng thông qua hỗn hợp xúc tác, cắt các liên kết amit của chitin. Như vậy, mức độ axetyl hóa của chitin của *T. molitor* thu được từ phương pháp nằm trong khoảng từ 76 đến 79%, trong khi đó nếu không có bước ép, mức này là 91% và ngay cả thủy phân hóa học, được thực hiện trong các điều kiện nghiêm ngặt về nhiệt độ và các chất phản ứng, dẫn đến mức độ axetyl hóa là 85%.

Đối với các côn trùng khác được xem xét, cụ thể là *G. melonella* và *A. domesticus*, mức độ axetyl hóa cũng chịu ảnh hưởng bởi phương pháp, như vậy mức này lần lượt

thay đổi từ 83 thành 74% trong một trường hợp và từ 100 thành 95% trong trường hợp khác.

Vì độ hòa tan và khả năng xử lý của chitin liên quan khác đặc biệt với mức độ axetyl hóa của nó, nên việc thủy phân đồng thời này của liên kết amit của các đơn vị N-axetylglucosamin của chitin là tác dụng dương tính bất ngờ của việc thủy phân bằng enzym được thực hiện trong những điều kiện này.

h) Độ phong phú bề mặt nguyên tử và chức năng

Khi bước tinh chế bắt đầu, sự phân bố của các nguyên tử trên bề mặt của chitin thể hiện sự gia tăng về hàm lượng oxy tương đối và sự giảm về hàm lượng cacbon tương đối (bảng 4).

Tuy nhiên, liên kết của các nguyên tử cacbon trên bề mặt có xu hướng chuyển từ các liên kết kiểu hydrocacbon (C-H, C-C) chiếm ưu thế, sang các liên kết kiểu rượu (C-O) hoặc kiểu cacbonyl (C=O). Cũng có sự giảm về các liên kết kiểu amit (N-C=O).

Tuy nhiên, thứ mà hình như tiêu biểu nhất đó là tỷ lệ liên kết rượu/liên kết hydrocacbon (C-O/C-H), và trong ngữ cảnh của chitin tinh khiết bằng enzym, tỷ lệ này nằm trong khoảng từ 0,31 đến 0,56, nhưng tốt hơn nằm trong khoảng từ 0,39 đến 0,41.

Trong bảng 4:

- thuật ngữ "cuticun thô" có nghĩa là chitin của lớp cuticun ở trạng thái tự nhiên, được phân tích trực tiếp sau khi chiết từ côn trùng bằng cách cắt;
- thuật ngữ "chitin tinh khiết bằng enzym (Novozyme)" có nghĩa là chitin thu được từ phương pháp bao gồm bước nghiền + ép và thủy phân bằng enzym với sự có mặt của enzym Novozyme 37071;
- thuật ngữ "chitin tinh khiết bằng enzym (Prolyve)" có nghĩa là chitin thu được từ phương pháp bao gồm bước nghiền + ép và thủy phân bằng enzym với sự có mặt của enzym Prolyve NP;
- thuật ngữ "chitin tinh khiết bằng enzym" có nghĩa là chitin thu được từ phương pháp bao gồm bước nghiền + ép và thủy phân bằng enzym với sự có mặt của enzym Prolyve;

- thuật ngữ "chitin tinh khiết" có nghĩa là chitin thu được bằng tinh chế hóa học, giống như loại được sử dụng để xác định lượng chitin trong côn trùng.

Bảng 4. Sự phân bố của một số nguyên tử và liên kết trên bề mặt của chitin

		các nguyên tử		các kiểu liên kết				tỉ lệ
		C	O	C-H	C-O	C=O	N-C=O	(C-O)/ (C-H)
TM	cuticun thô	78,85	16,23	68,88	20,16	6,87	3,53	0,29
	chitin tinh khiết bằng enzym (Novozyme)	75,71	18,50	62,88	24,21	9,93	2,98	0,39
	chitin tinh khiết bằng enzym (Prolyve)	75,64	19,40	57,54	29,57	10,67	2,22	0,51
	chitin tinh khiết	64,24	30,31	39,5	42,36	16,21	1,92	1,07
AD	chitin tinh khiết bằng enzym	78,49	16,37	68,16	20,84	8,48	2,32	0,31
	chitin tinh khiết	67,27	27,30	42,32	40,46	13,59	3,63	0,96
GM	chitin tinh khiết bằng enzym	76,24	19,29	63,15	25,15	8,9	2,81	0,40
	chitin tinh khiết	64,93	28,87	34,1	45,39	18,07	2,44	1,33
HI	cuticun thô	86,09	12,69	83,35	8,41	2,55	5,68	0,10
	chitin tinh khiết bằng enzym	74,46	21,10	61,49	25,07	7,95	5,49	0,41
	chitin tinh khiết	73,10	22,49	53	30,3	11,16	4,11	0,57

i) Hình ảnh của lớp cuticun trên hiển vi huỳnh quang hai photon

Việc tinh chế một phần của chitin thông qua con đường enzym bằng phương pháp theo sáng chế giúp cho có thể duy trì được độ linh hoạt tổng thể bằng cách bảo toàn việc “nạp đầy” protein của các cấu trúc chitin, so với việc tinh chế hóa học, trong khi loại bỏ

được sự quá tải protein ở bên ngoài cấu trúc (xem hình vẽ trên Fig. 43).

Thuật ngữ sử dụng trong hình vẽ trên Fig. 43 là giống như thuật ngữ được xác định trong phần III h) ở trên.

j) Mức độ kết tinh

Bất luận côn trùng hoặc enzym nào được nghiên cứu, mức độ kết tinh, tức là, tỷ lệ giữa các vùng kết tinh và vùng vô định hình, của chitin thu được nằm trong khoảng từ 0,42 đến 0,61.

Nói chung, thuật ngữ chỉ số độ kết tinh được sử dụng trong tài liệu, tức là, tỷ lệ giữa các độ cao đỉnh (và không của các vùng). Phép đo này có nguy cơ sai số đáng kể. Tuy nhiên, nhằm mục đích so sánh, chỉ số độ kết tinh của các mẫu cũng được đo và chỉ số này nằm trong khoảng từ 88 đến 95% đối với tất cả các côn trùng, và thậm chí còn cao hơn 90% đối với bộ cánh cứng và bộ cánh vảy.

Ví dụ 6: Phương pháp theo sáng chế có bước thu hồi phần protein xuất phát từ dịch ép

I. Vật liệu và phương pháp

a) Vật liệu

Côn trùng

Côn trùng sau đây được nghiên cứu:

- côn trùng cánh cứng: *Tenebrio molitor* (*T. molitor* hoặc TM).

Enzym

Prolyve được sử dụng trong thủy phân.

Enzym	Prolyve
Hoạt tính enzym mong muốn	3789,52
Hoạt tính enzym / g	3789,52
m (g)	1,00

b) Các phương pháp sản xuất

Phương pháp sản xuất bằng cách nghiền, sau đó ép (được ký hiệu là "nghiền+ép" trong hình vẽ trên các Fig.)

Một vài mẻ được chuyển đổi như sau: 600g cầu trùng *T. molitor* tươi sống được đưa vào trong một ngăn, ở đó chúng được giết bằng hơi nước (115°C, 5 phút). Tiếp theo, côn trùng được đưa vào dụng cụ trộn và 75mL nước được bổ sung trên 100 g côn trùng, và tiếp theo, toàn bộ được khuấy trộn và ép (hệ ép trực vít đôi, hoặc hệ ép lọc hoặc hệ ép khác).

Bánh ép sau đó được sấy khô ở nhiệt độ 70°C qua đêm. Dịch ép, mặt khác, được ly tâm trong thời gian 30 phút với lực ly tâm 3000g và phần rắn được thu hồi – các protein không hòa tan của huyết dịch.

Tiếp theo, 125g bánh ép và 125g (trọng lượng ẩm, xấp xỉ 30% trọng lượng khô) của các protein huyết dịch không hòa tan được đưa vào bình thót cổ 3 cổ có trang bị bộ ngưng tụ và bộ khuấy từ, 1250mL nước được bổ sung cũng như enzym phân giải protein có hoạt tính tương đương với 9500 SAPU. Tiếp theo, phản ứng được gia nhiệt ở nhiệt độ 45°C trong thời gian 4 giờ. Tiếp theo, nhiệt độ được gia tăng lên 90°C trong thời gian 15 phút, và hỗn hợp phản ứng sau cùng được lọc (0,40-0,45 µm). Phần cặn được sấy khô trong thời gian 24 giờ ở nhiệt độ 70°C: do đó, thu được chitin bằng cách tinh chế thông qua con đường enzym; phần dịch lọc được làm đông lạnh và đông khô: do đó thu được sản phẩm thủy phân.

c) Phân tích

Việc đo hàm lượng tro, đo hàm lượng lipid, độ phong phú tương đối của các axit amin và đo kích thước của các protein được thực hiện như trong ví dụ 5.

II. Mô tả đặc tính của các sản phẩm thu được

Các sản phẩm thu được, chitin và sản phẩm thủy phân, được phân tích và được mô tả đặc tính (bảng 5, hình vẽ trên Fig. 45).

Bảng 5: Mô tả đặc tính

	Sản phẩm thủy phân	Chitin
Tro	4,1	0,5
Lipit	12,85	3,7
Khả năng tiêu hóa	95	không áp dụng
Các axit amin (độ phong phú tương đối, %)		
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
Thr	4,9	3,5
Tyr	4,7	11,3
Val	7,7	9,0
Trp	1,3	0,6

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Sản phẩm thủy phân được tạo ra từ côn trùng chứa chất khô với lượng ít nhất là 40% trọng lượng các protein tính theo tổng trọng lượng của chất khô, tro với lượng nhỏ hơn 3% trọng lượng tính theo tổng trọng lượng của chất khô, và hàm lượng protein hòa tan trong nước có kích thước lớn hơn 12400g/mol là nhỏ hơn 50%.
2. Phương pháp tạo ra ít nhất một sản phẩm mong muốn từ côn trùng bao gồm các bước sau:
 - (i) nghiền các lớp cuticun của côn trùng,
 - (ii) ép các lớp cuticun của côn trùng, và sau đó,
 - (iii) thủy phân bằng enzym các lớp cuticun của côn trùng bằng cách sử dụng enzym phân giải protein.
3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó phương pháp này bao gồm bước giết côn trùng trước bước nghiền.
4. Phương pháp theo điểm 2 hoặc 3, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước xử lý các lớp cuticun của côn trùng bằng chất oxy hóa trước bước thủy phân bằng enzym.
5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 4, trong đó côn trùng hoặc các côn trùng được lựa chọn từ nhóm bao gồm bộ Cánh cứng, bộ Cánh vảy, bộ Cánh thẳng và bộ Hai cánh.
6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 5, trong đó proteaza được lựa chọn từ nhóm bao gồm aminopeptidaza, metallocarboxypeptidaza, serin endopeptidaza, xystein endopeptidaza, aspartic endopeptidaza, metalloendopeptidaza.
7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 6, trong đó sản phẩm mong muốn là chitin và/hoặc chitosan.
8. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 6, trong đó sản phẩm mong muốn là sản phẩm thủy phân.
9. Phương pháp tạo ra chitin từ các lớp cuticun của côn trùng bao gồm các bước sau:

a) giết côn trùng,

b) nghiền côn trùng,

c) ép côn trùng,

d) thủy phân bằng enzym các lớp cuticun của côn trùng bằng cách sử dụng enzym phân giải protein, và

e) thu hồi chitin,

các lớp cuticun của côn trùng tùy ý có khả năng được xử lý bằng chất oxy hóa trước bước d).

10. Chitin thu được bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 7, và điểm 9.

11. Phương pháp tạo ra sản phẩm thủy phân từ côn trùng bao gồm các bước sau:

a) giết côn trùng,

b) nghiền côn trùng,

c) ép côn trùng,

d) thủy phân bằng enzym các lớp cuticun của côn trùng bằng cách sử dụng enzym phân giải protein,

e) thu hồi sản phẩm thủy phân,

các lớp cuticun của côn trùng tùy ý có khả năng được xử lý bằng chất oxy hóa trước bước d).

12. Sản phẩm thủy phân thu được bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 6, 8, và 11.

13. Phương pháp tạo ra chitosan từ các lớp cuticun của côn trùng bao gồm các bước sau:

a) giết côn trùng,

b) nghiền côn trùng,

c) ép côn trùng,

d) thủy phân bằng enzym các lớp cuticun của côn trùng bằng cách sử dụng men

proteaza,

e) thu hồi chitin,

f) khử axetyl của chitin đã thu hồi, và

g) thu hồi chitosan,

các lớp cuticun của côn trùng tùy ý có khả năng được xử lý bằng chất oxy hóa trước bước d).

14. Chitin chứa hàm lượng axit amin thấp hơn hoặc bằng 45% trọng lượng tính theo tổng trọng lượng của chất khô, hàm lượng tro thấp hơn hoặc bằng 2,5% trọng lượng tính theo tổng trọng lượng của chất khô và độ tinh khiết theo sự chênh lệch cao hơn hoặc bằng 45%, mức độ axetyl hóa bằng hoặc lớn hơn 70% và mức độ kết tinh lớn hơn hoặc bằng 0,42.

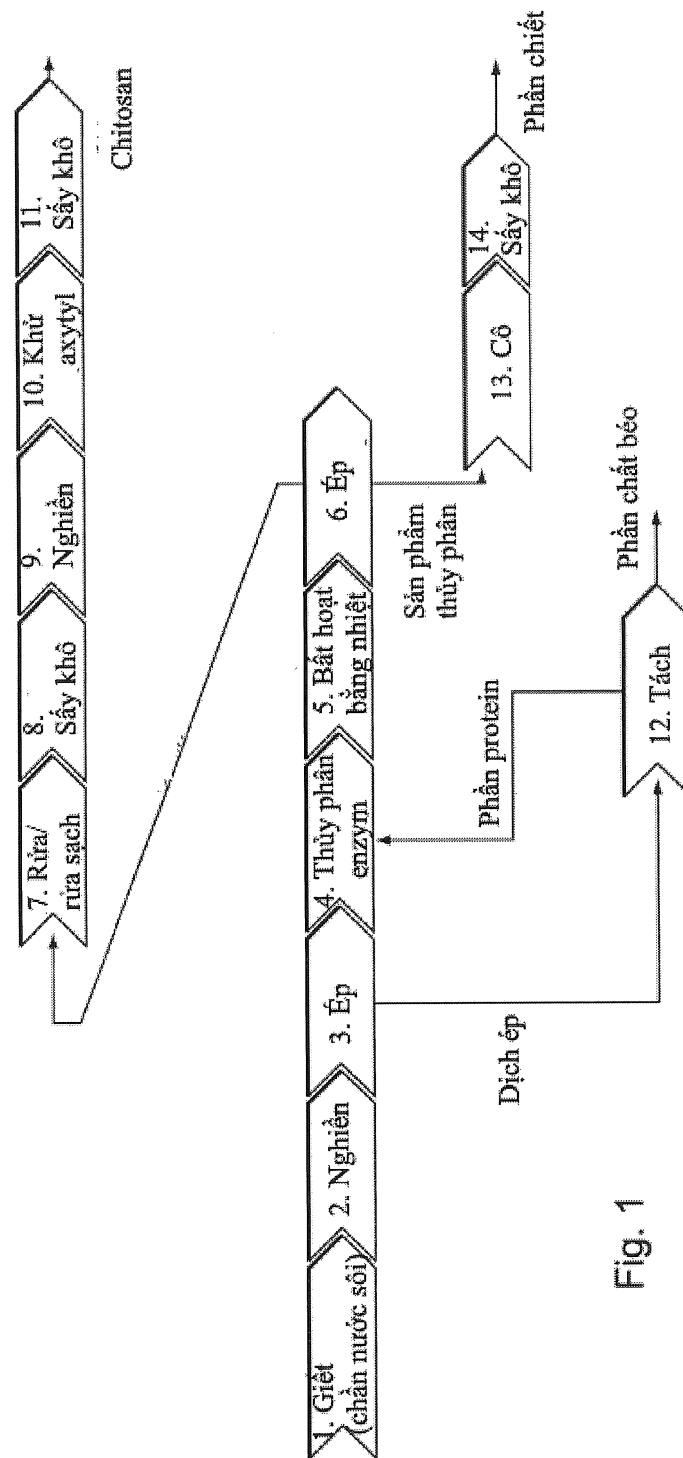


Fig. 1

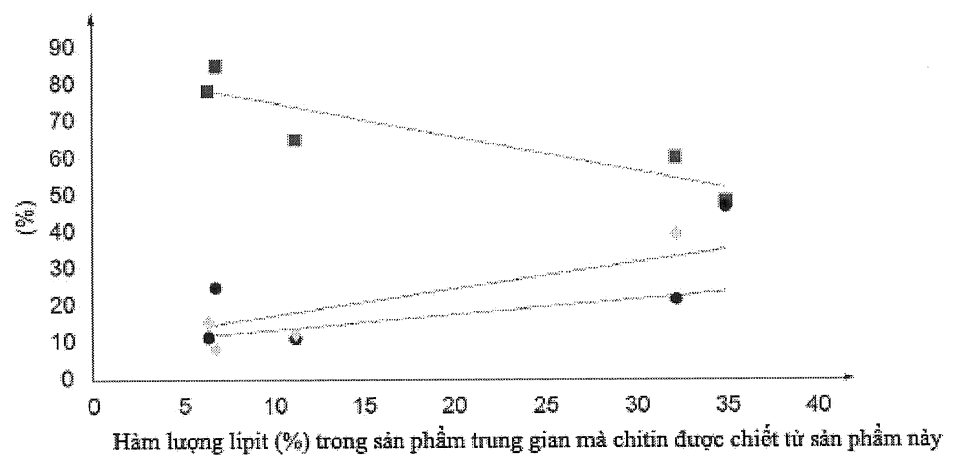
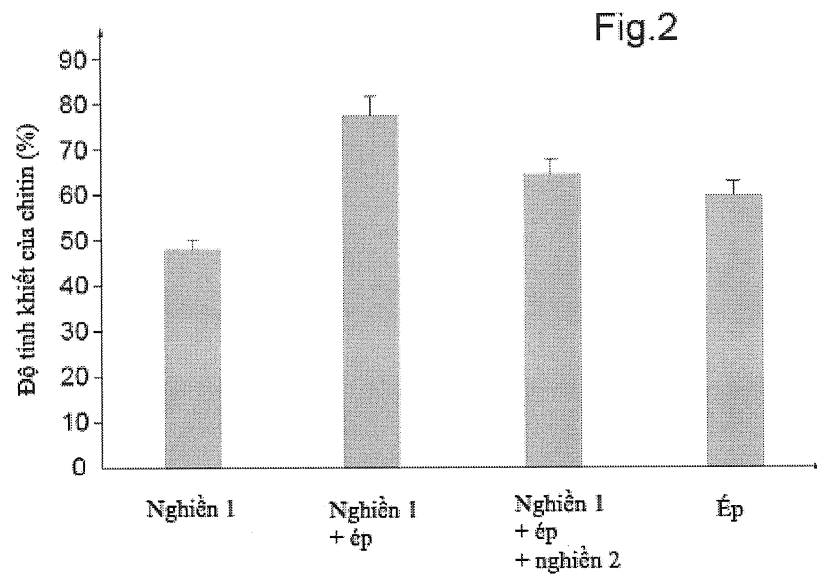


Fig. 3

- độ tinh khiết của chitin
- hàm lượng lipid trong sản phẩm thủy phân
- ◆ hàm lượng lipid trong chitin

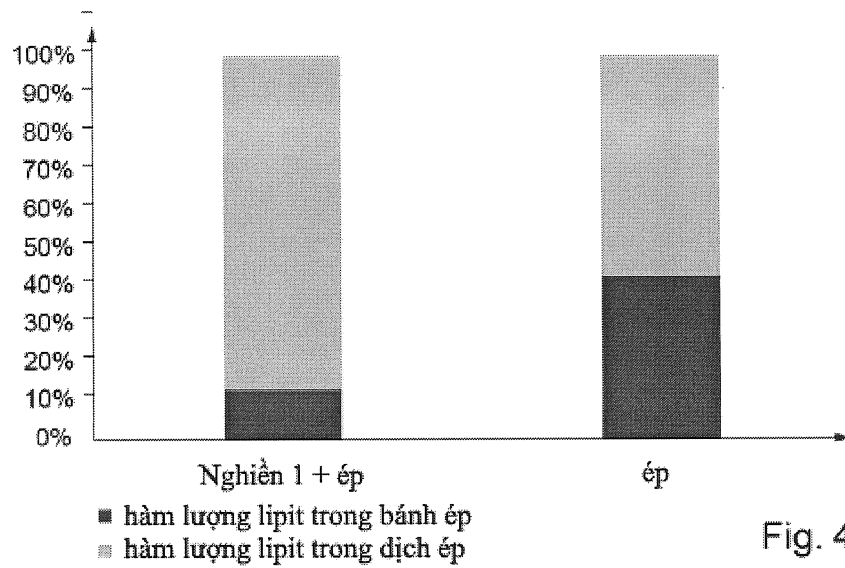


Fig. 4

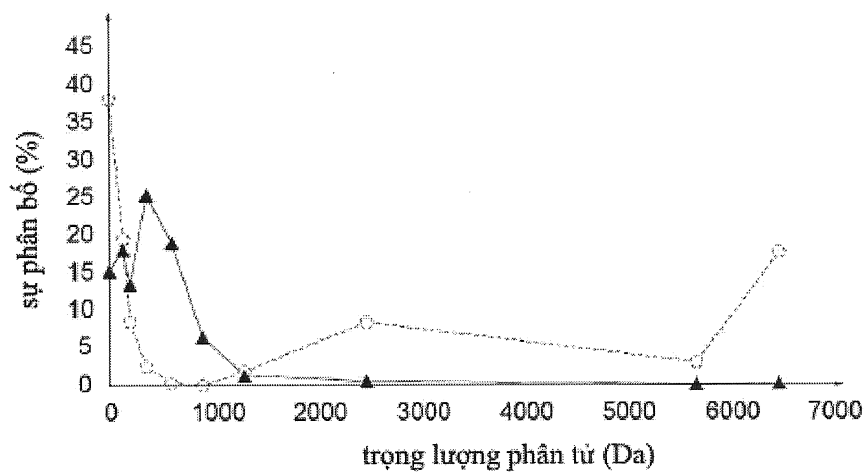
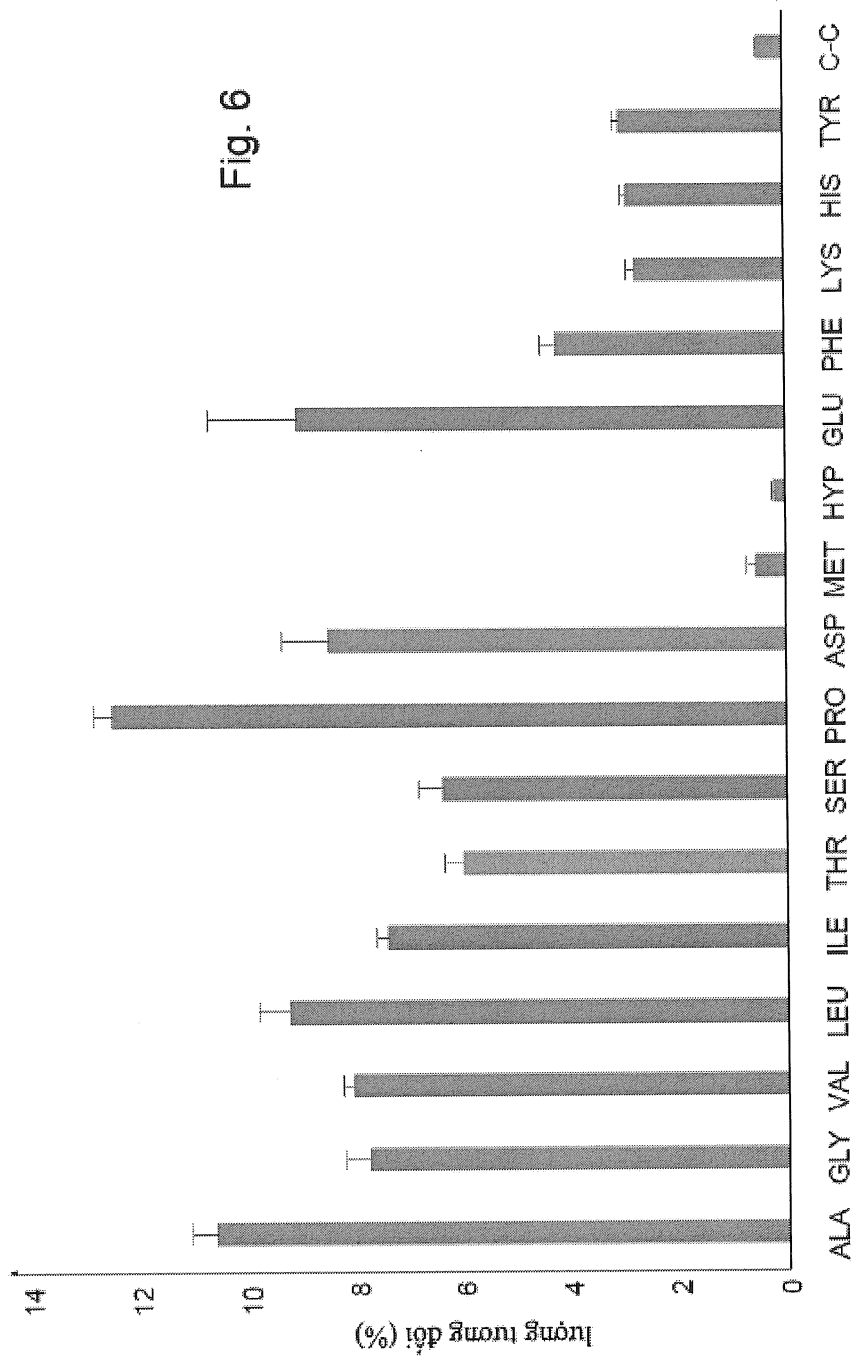
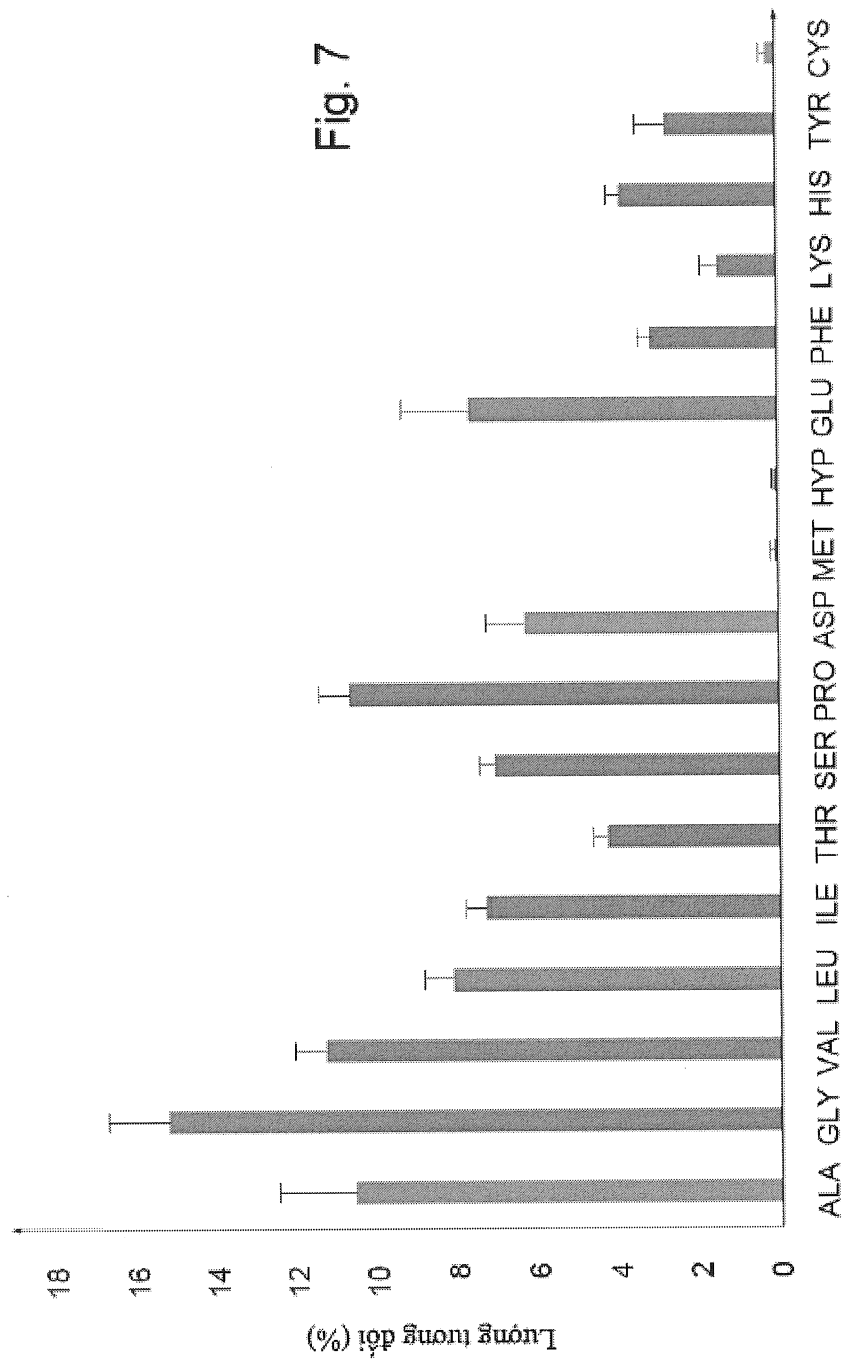


Fig. 5

—○— dịch ép

—▲— sản phẩm thủy phân





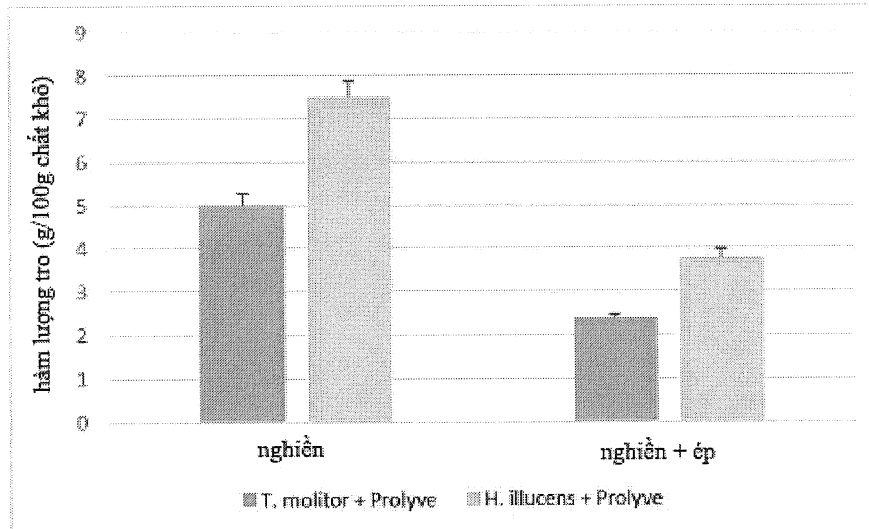


Fig. 8

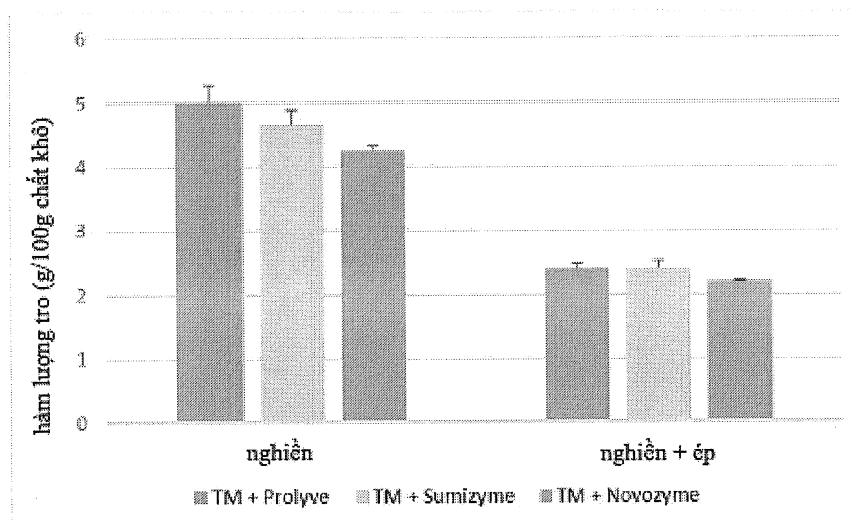


Fig. 9

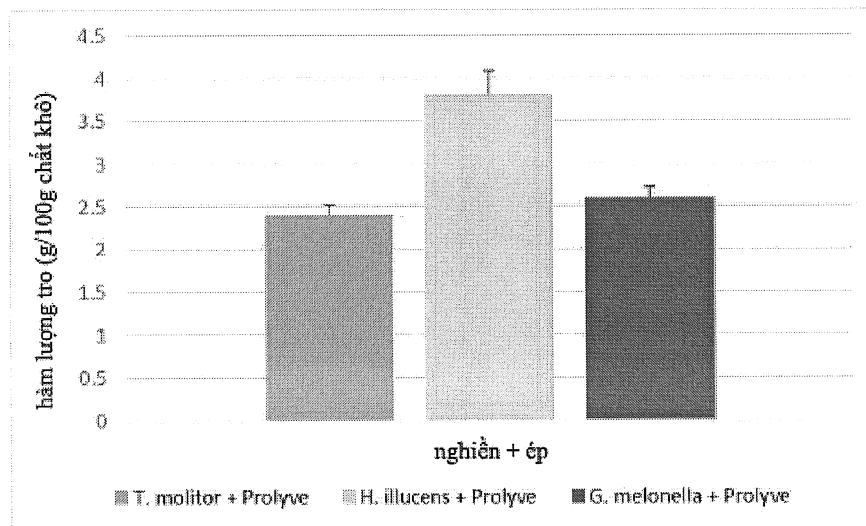


Fig. 10

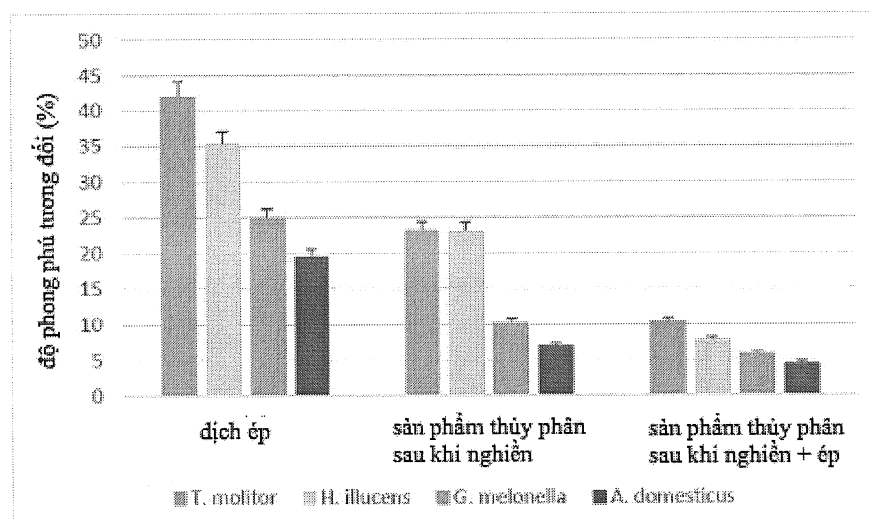


Fig. 11

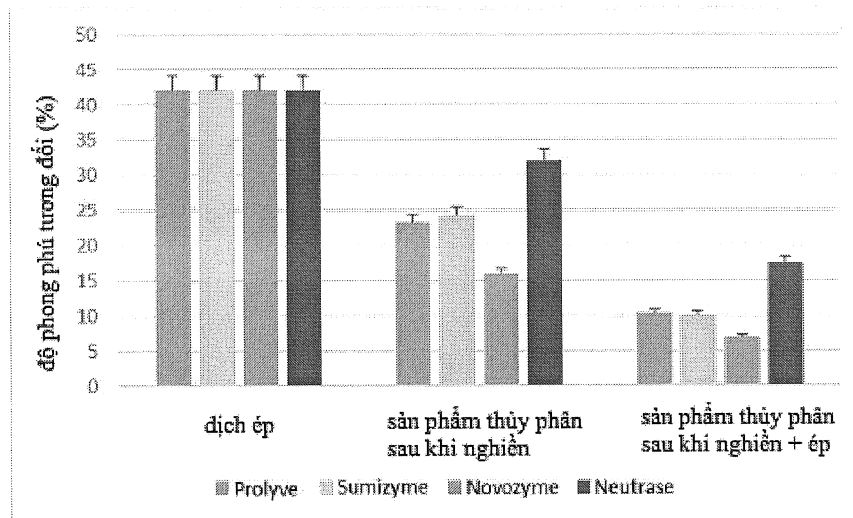


Fig. 12

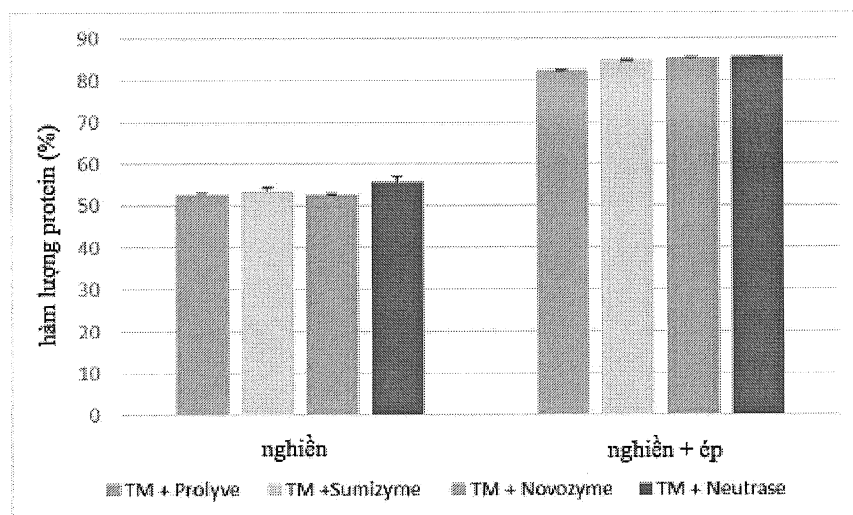


Fig. 13

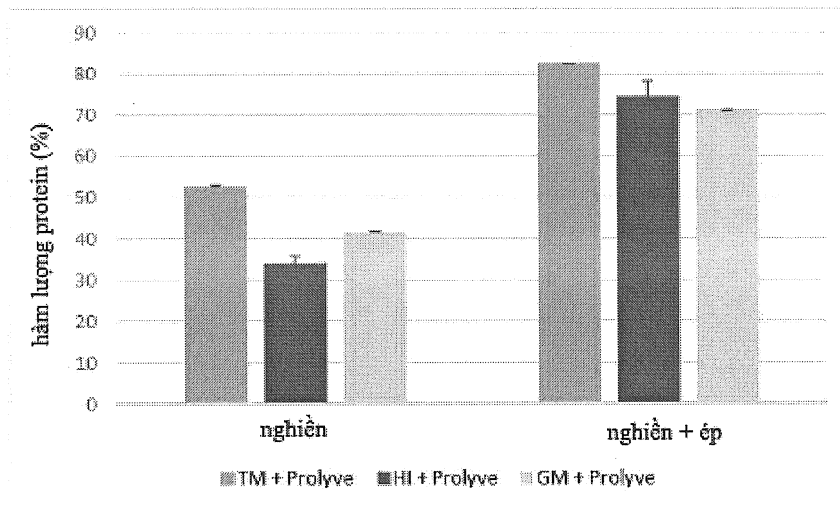


Fig. 14

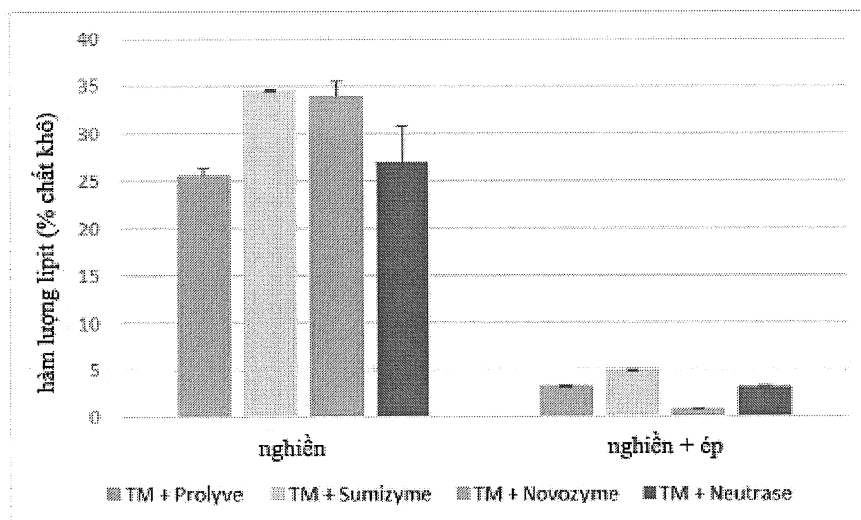


Fig. 15

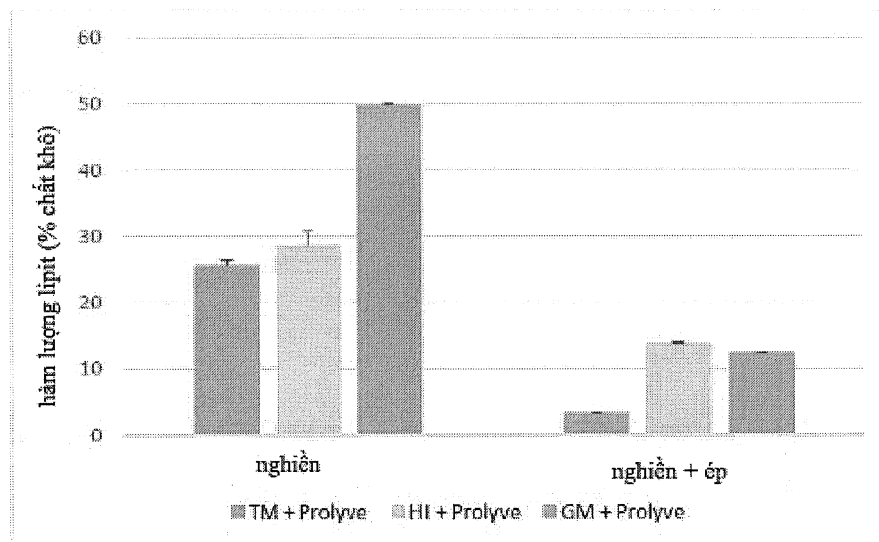


Fig. 16

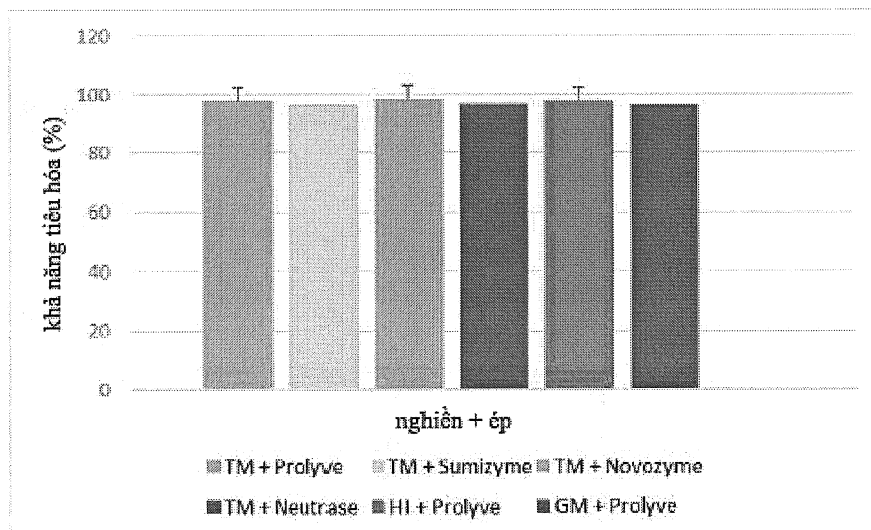


Fig. 17

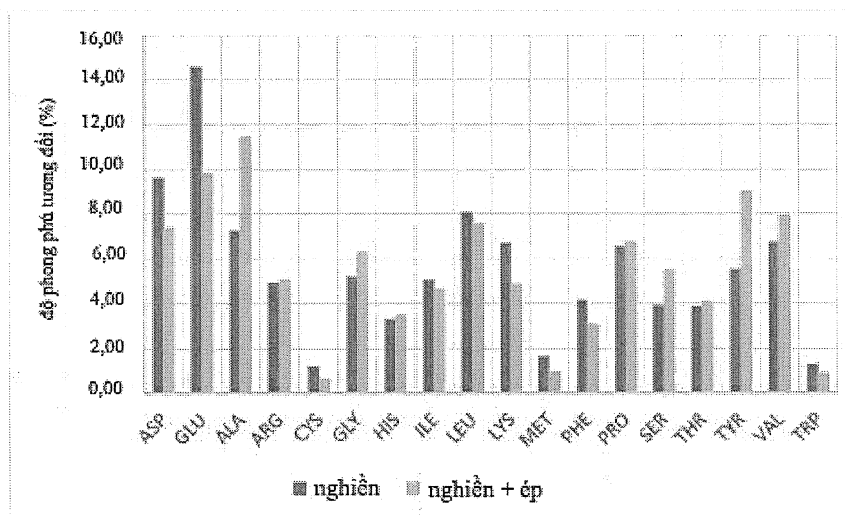


Fig. 18

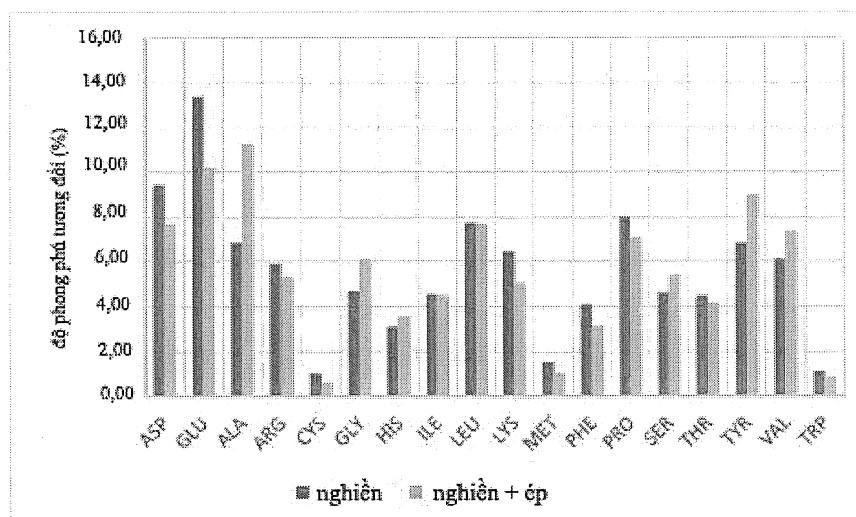


Fig. 19

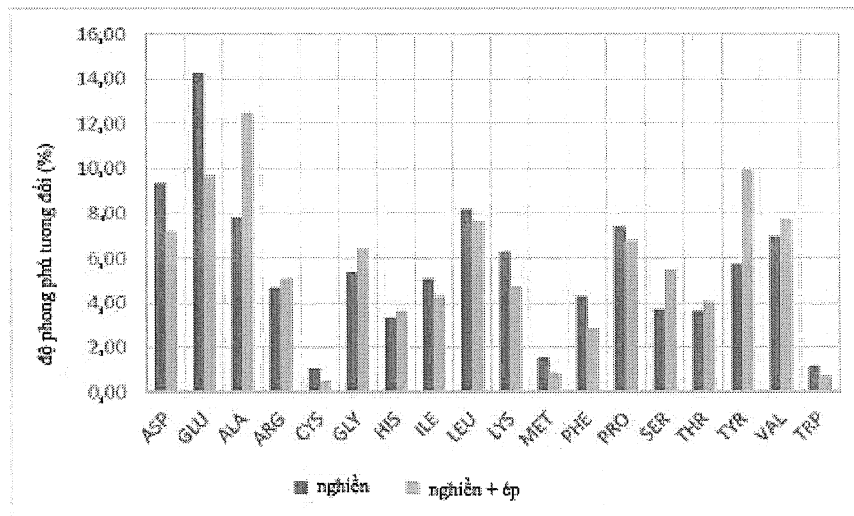


Fig. 20

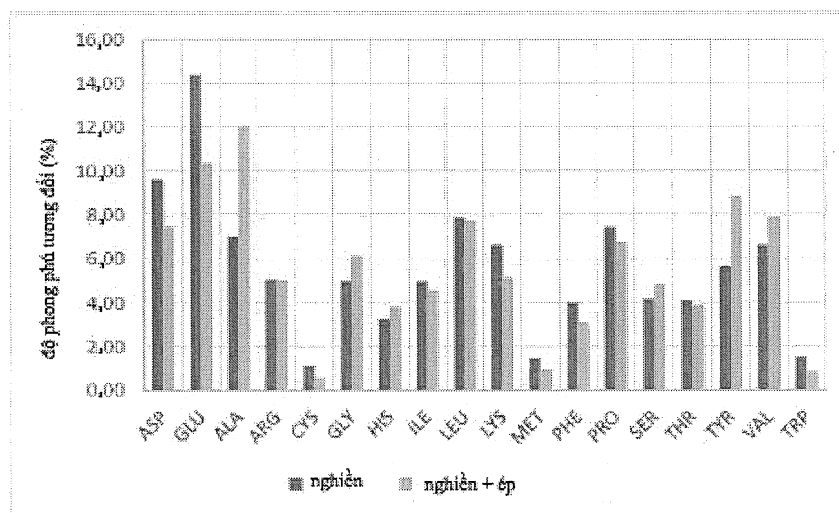


Fig. 21

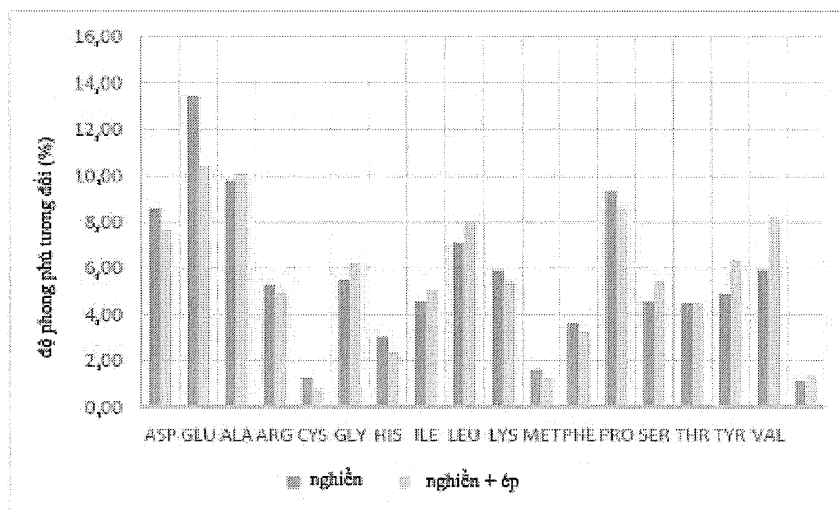


Fig. 22

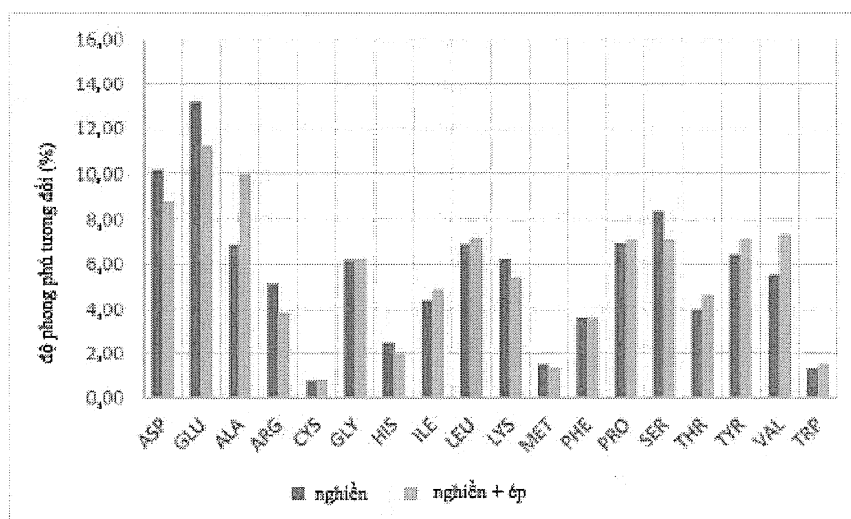


Fig. 23

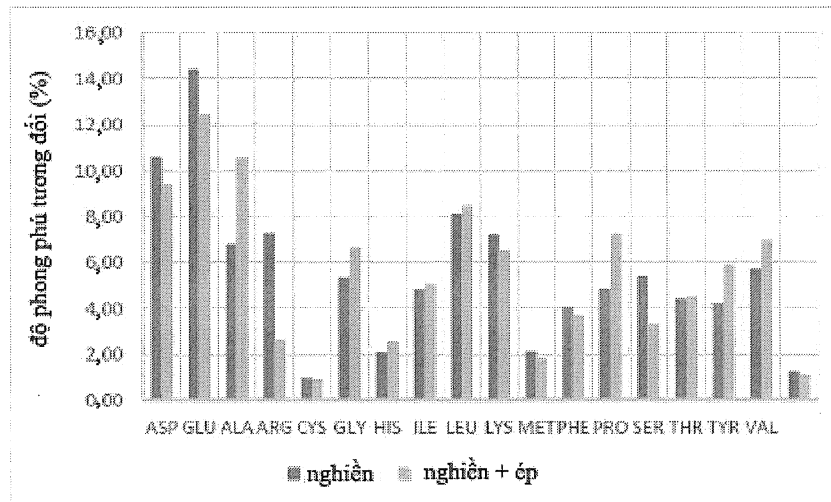


Fig. 24

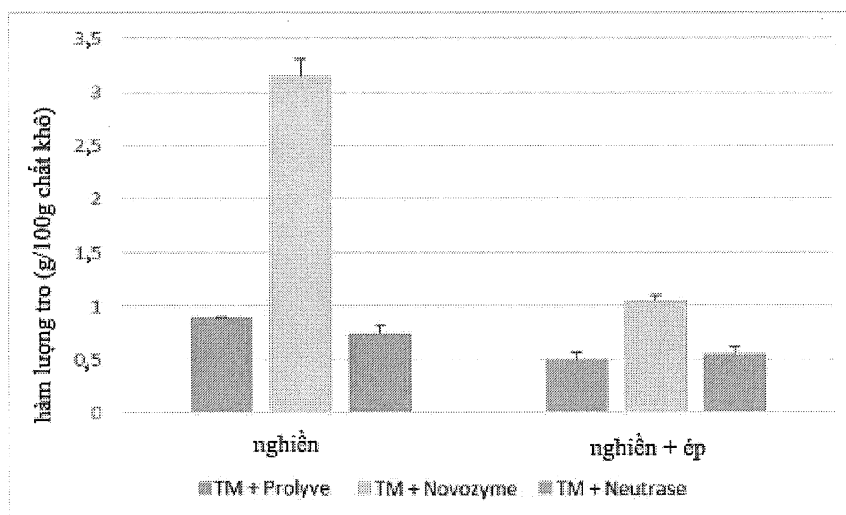


Fig. 25

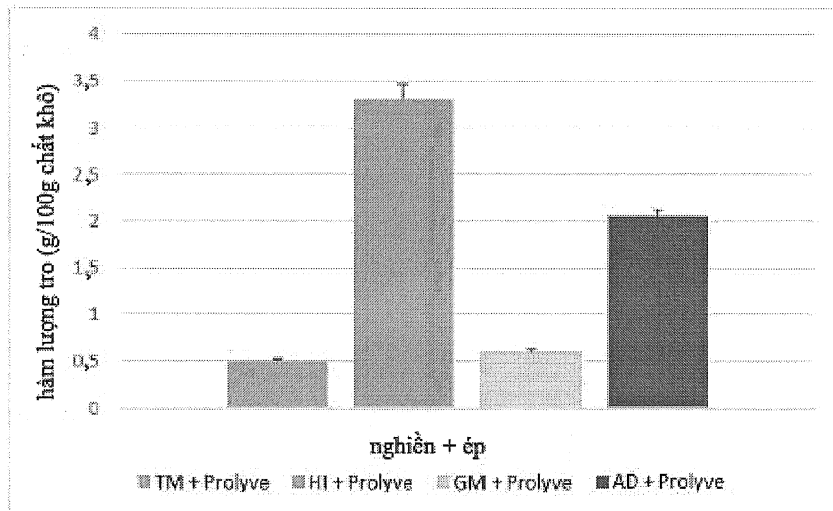


Fig. 26

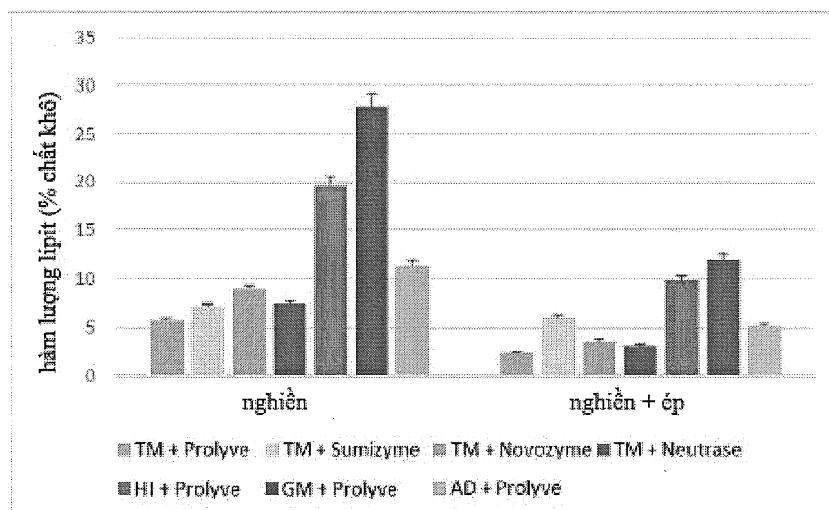


Fig. 27

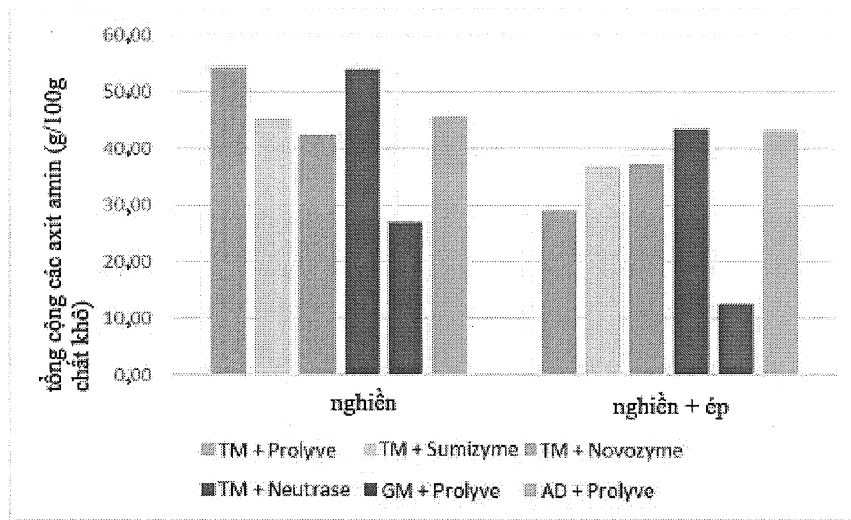


Fig. 28

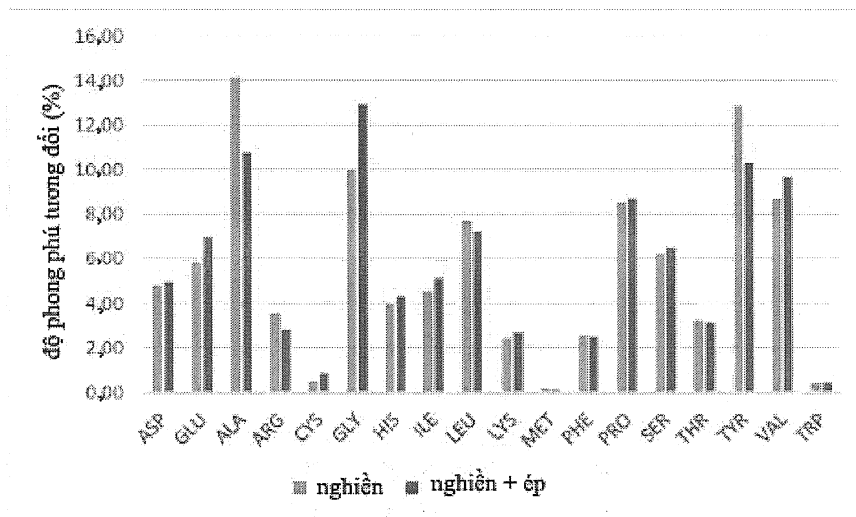


Fig. 29

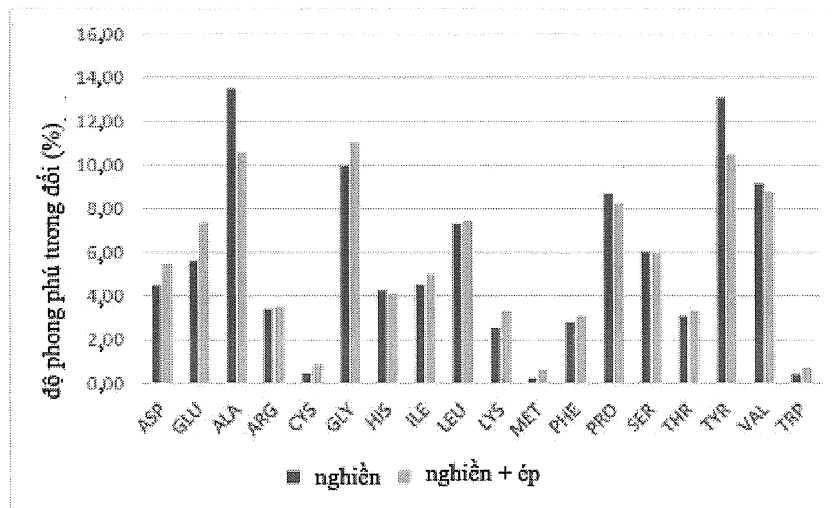


Fig. 30

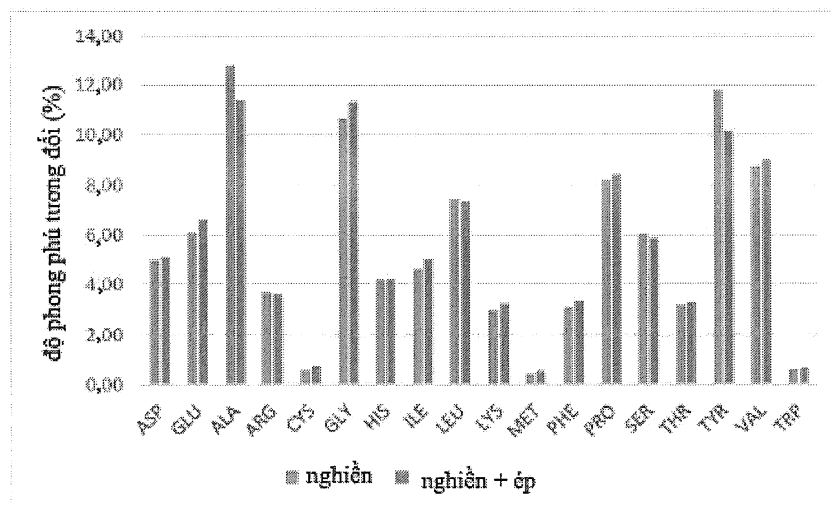


Fig. 31

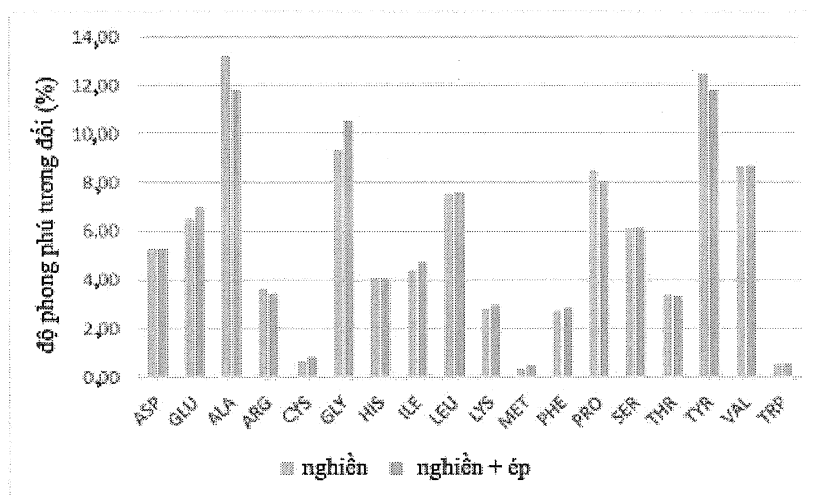


Fig. 32

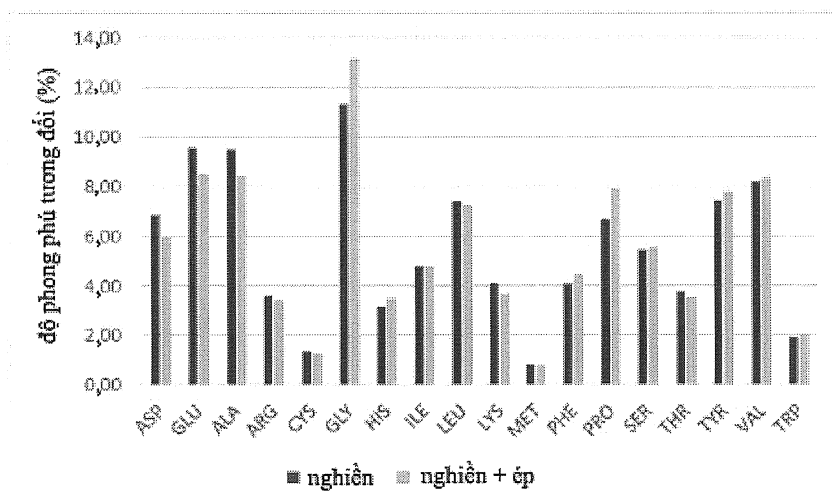


Fig. 33

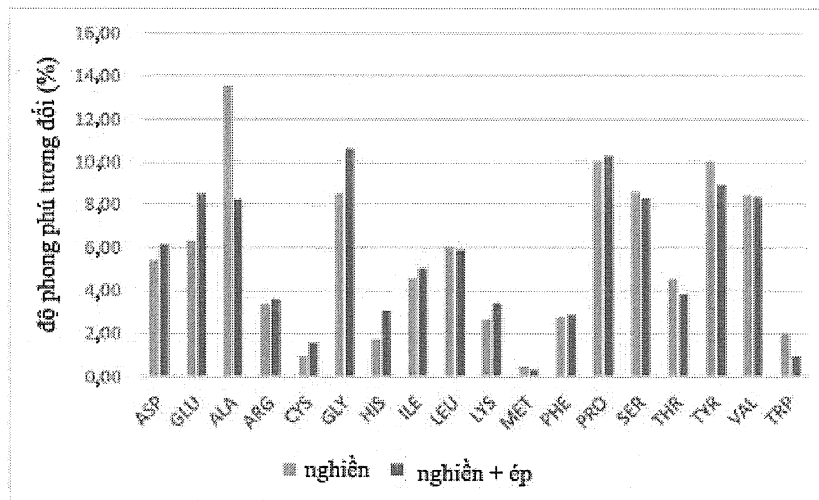


Fig. 34

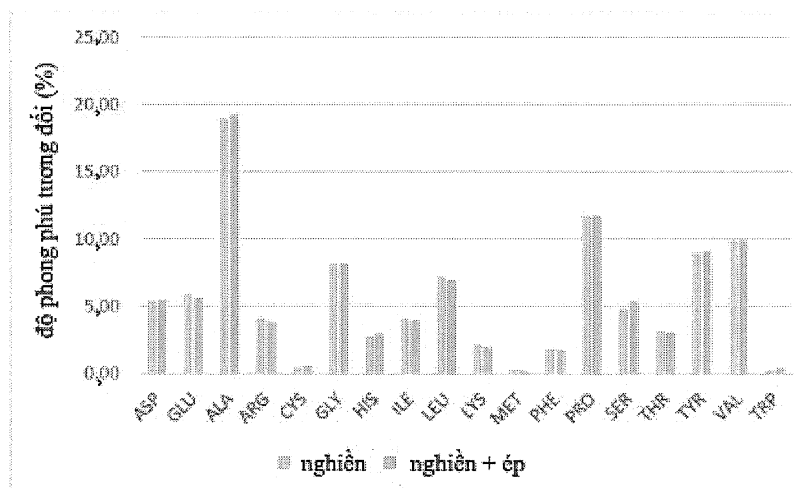


Fig. 35

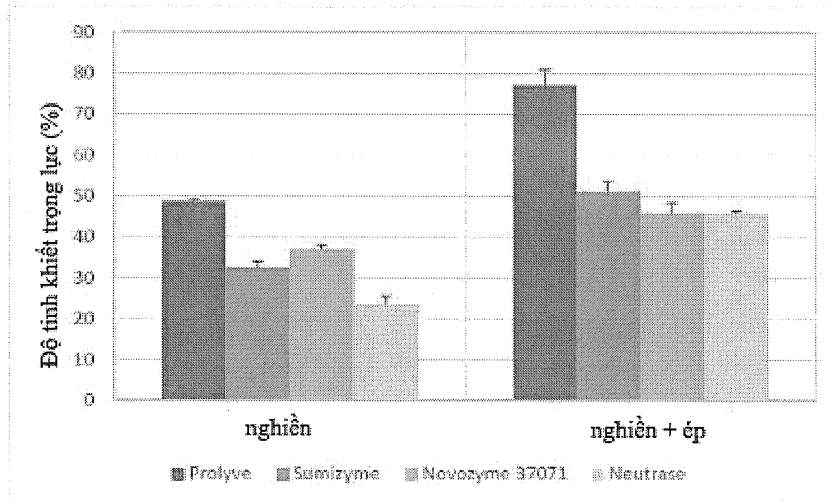


Fig. 36

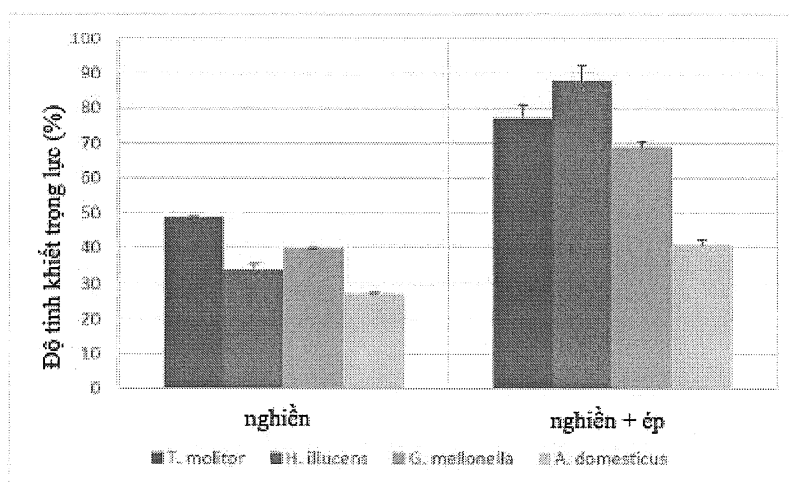


Fig. 37

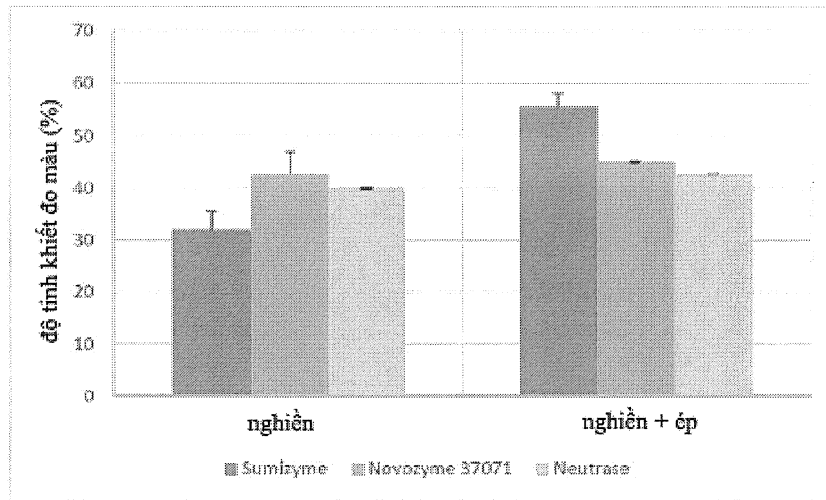


Fig. 38

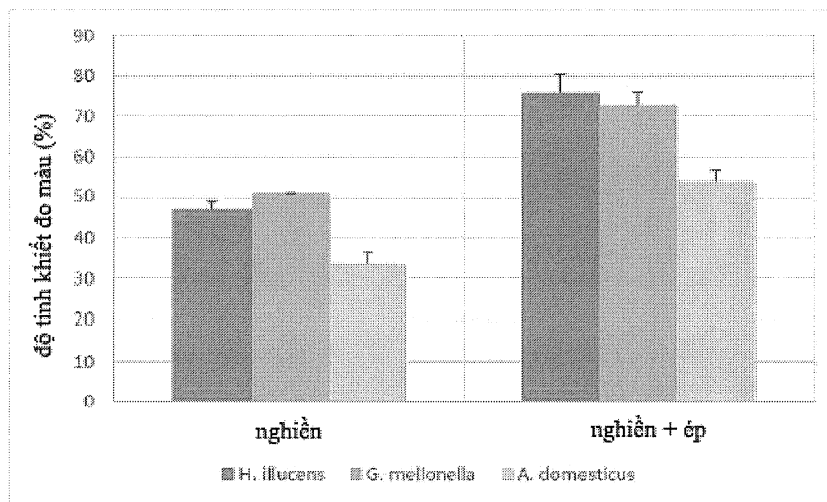


Fig. 39

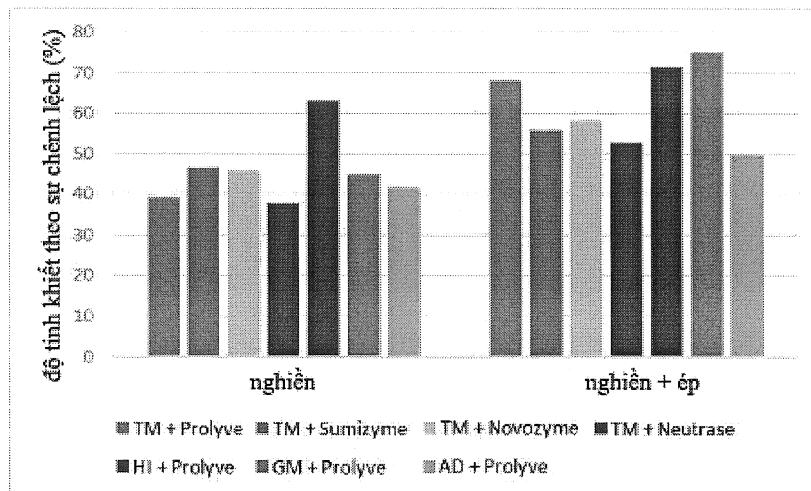


Fig. 40

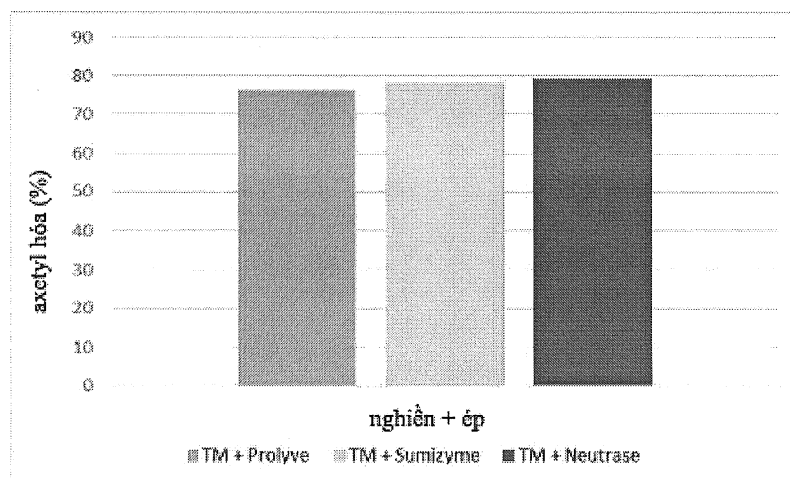


Fig. 41

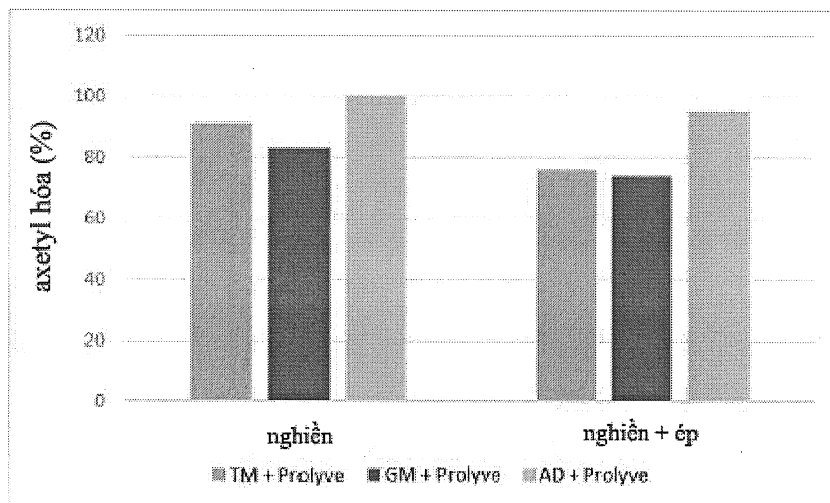


Fig. 42

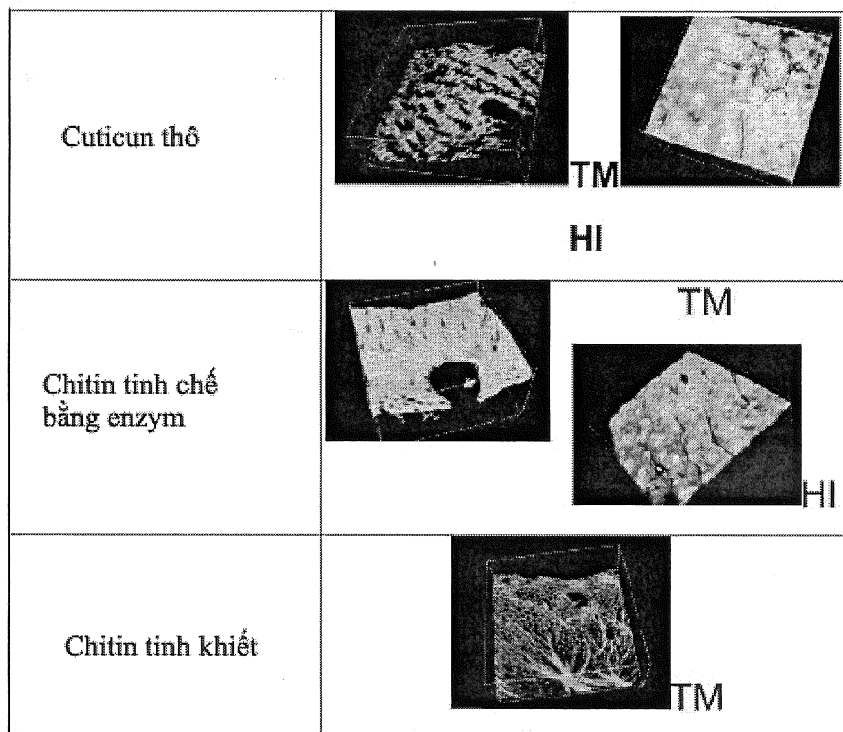


Fig. 43

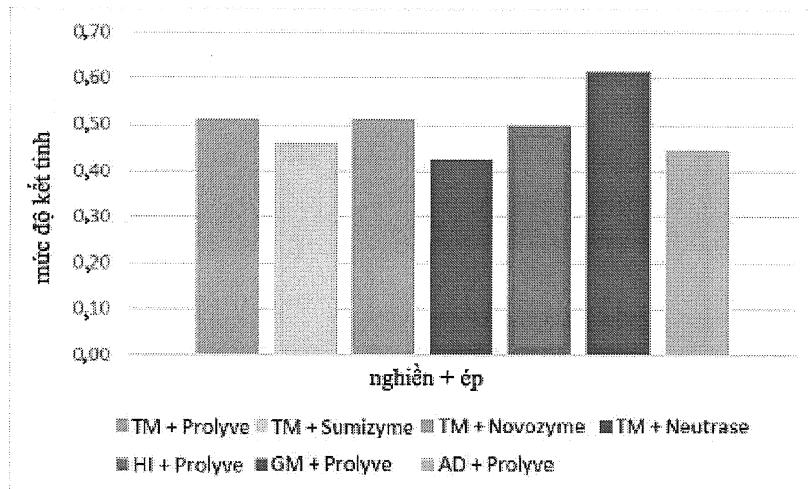


Fig. 44

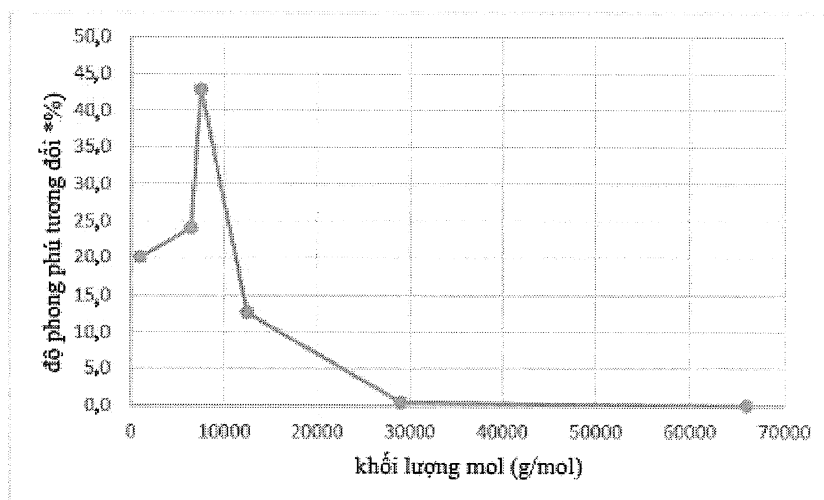


Fig. 45