MÉTODO DE TRATAMIENTO DE INSECTOS QUE COMPRENDE LA SEPARACIÓN DE CUTÍCULAS DE LA PARTE BLANDA DE LOS INSECTOS Y DESPUÉS LA SEPARACIÓN DE LA PARTE BLANDA EN TRES FRACCIONES

La presente invención se refiere a un método de tratamiento de insectos. La invención se refiere también a polvos, en particular a un polvo susceptible de obtenerse mediante el método de tratamiento de insectos de acuerdo con la invención, y el uso de estos polvos en la alimentación, particularmente en la alimentación animal.

Los polvos preparados a partir de animales se utilizan durante mucho tiempo en la alimentación animal.

Uno de los polvos más utilizados es la harina de pescado que representa una de las principales fuentes de proteínas en la alimentación animal. La harina de pescado es muy rica en proteínas animales (rica en aminoácidos tipo lisina y metionina) fáciles de digerir. Una creciente demanda acompañada de una oferta limitada ha resultado, en particular, en un aumento significativo de su precio. Por lo tanto, existe una fuerte demanda de fuentes alternativas de proteínas de alta calidad y, en la medida de lo posible, de proteínas renovables que podrían utilizarse en la alimentación animal.

En los últimos años, se ha propuesto utilizar harinas preparadas a partir de insectos como sustituto de la harina de pescado.

Las harinas de insectos ofrecen fuentes de proteínas naturales para el reemplazo y la posibilidad de producción en masa con una huella ecológica mínima. Particularmente, algunos coleópteros tales como *Tenebrio molitor*, tienen la ventaja de ser adecuados para la producción en masa intensiva.

A modo de ejemplo, la solicitud WO2016/108037 describe particularmente un polvo de coleópteros que contiene al menos 67% en peso de proteínas y al menos 5% en peso de quitina, que puede usarse en la alimentación animal.

Para los fines de la presente solicitud, “quitina” significa cualquier tipo de derivado de la quitina, es decir, de un derivado de polisacáridos que comprende unidades N-acetil-glucosamina y unidades D-glucosaminas, particularmente copolímeros de quitina-polipéptidos (a veces denominados como “compuesto de quitina-polipéptidos”). Estos copolímeros también pueden estar asociados con pigmentos, a menudo de tipo melanina.

La quitina es el segundo polímero más sintetizado en el mundo después de la celulosa. En efecto, la quitina se sintetiza por muchas especies del mundo vivo: constituye en parte del exoesqueleto de los crustáceos y de los insectos y la pared lateral que rodea y protege a los hongos. Más particularmente, en los insectos, la quitina constituye de esta manera de 3 % a 60 % de su exoesqueleto.

Sin embargo, la quitina se considera generalmente como un compuesto difícil de digerir por ciertos animales.

Por lo tanto, existe la necesidad de polvos preparados de insectos que tengan un contenido reducido de quitina.

El trabajo de los inventores hizo posible demostrar que era posible obtener tales polvos, cuando

los insectos a partir de los que se preparan estos polvos se sometieron a un tratamiento específico.

Por lo tanto, la invención se refiere a un método de tratamiento de insectos que comprende las siguientes etapas:

- la separación de cutículas de la parte blanda de los insectos, después
- la separación de la parte blanda de los insectos en una fracción oleosa, una fracción sólida y una fracción acuosa.

Por “insectos”, se entiende insectos en cualquier etapa de desarrollo, como adulto, larva o pupa.

La cutícula es la capa externa (o exoesqueleto) secretada por la epidermis de los insectos. Por lo general, está formada de tres capas : la epicutícula, la exocutícula y la endocutícula.

Por “parte blanda”, se entiende la carne (que incluye los músculos y las vísceras) y el jugo (incluidos particularmente los líquidos biológicos, el agua y la hemolinfa) de los insectos. En particular, la parte blanda no consiste en el jugo de los insectos.

Ventajosamente, los insectos utilizados en el método de acuerdo con la invención están en una etapa larvaria.

Preferiblemente, los insectos utilizados en el método de acuerdo con la invención son comestibles.

Ventajosamente, los insectos preferidos para llevar a cabo el método de acuerdo con la invención son, por ejemplo, coleópteros, dípteros, lepidópteros, isópteros, ortópteros, himenópteros, blatópteros, hemípteros, heterópteros, efemerópteros y mecópteros, preferiblemente, coleópteros, dípteros, ortópteros, lepidópteros o sus mezclas, aún más preferiblemente coleópteros.

Los coleópteros utilizados preferiblemente en el método de acuerdo con la invención pertenecen a las familias Tenebrionidae, Melolonthidae, Dermestidae, Coccinellidae, Cerambycidae, Carabidae, Buprestidae, Cetoniidae, Dryophthoridae, o mezclas de las mismas.

Más preferiblemente, se trata de los siguientes coleópteros: *Tenebrio molitor, Alphitobius diaperinus, Zophobas morio, Tenebrio obscurus, Tribolium castaneum* y *Rhynchophorus ferrugineus*, o sus mezclas.

La fracción oleosa tiene un contenido de lípidos mayor o igual a 90 %, preferiblemente mayor o igual a 95 %, aún más preferiblemente mayor o igual a 99 % en peso con respecto al peso total de la fracción oleosa.

Cabe señalar que, en el contexto de la presente solicitud, y salvo que se indique lo contrario, los intervalos de valores indicados son inclusivos.

La fracción sólida tiene un contenido de materia seca entre 45 % y 65 % en peso con respecto al peso total de la fracción sólida.

La fracción acuosa tiene un contenido de carbohidratos comprendido entre 15 % y 40 % en peso, preferiblemente entre 20 % y 30% en peso con respecto al peso seco total de la fracción acuosa.

Al final de la etapa de separación de la parte blanda, y antes de su concentración, la fracción acuosa tiene un contenido de materia seca menor o igual a 20 % en peso, preferiblemente menor o igual a 15 % en peso del peso total de la fracción acuosa.

De acuerdo con una primera modalidad, la separación de cutículas de la parte blanda de los insectos se realiza con la ayuda de un filtro prensa.

Un filtro prensa está compuesto de mallas filtrantes y permite una separación de acuerdo con el principio de filtración bajo presión.

De acuerdo con una segunda modalidad, la separación de cutículas de la parte blanda de los insectos se realiza con la ayuda de un separador de banda.

Por separador de banda se entiende un dispositivo para separar la parte sólida de la parte blanda de un producto y que comprende una banda de sujeción (o banda de presión) y un tambor perforado.

La separación de cutículas de la parte blanda de los insectos se describe más detalladamente en la etapa 2 del método detallado de tratamiento de insectos de acuerdo con la invención a continuación.

Esta separación de cutículas de la parte blanda del insecto permite en particular separar la quitina de la parte blanda. En efecto, las cutículas obtenidas al final de esta etapa de separación tienen un alto contenido de quitina del orden de 10 % a 30 % en peso del peso total de las cutículas, como se indica a continuación.

Particularmente, la etapa de separación de cutículas de la parte blanda se lleva a cabo sin ninguna etapa previa de moler a los insectos, particularmente en forma de partículas.

Asimismo, la separación de la parte blanda de los insectos en una fracción oleosa, una fracción sólida y una fracción acuosa se describe más detalladamente en la etapa 4 del método detallado de tratamiento de insectos de acuerdo con la invención a continuación.

El método de tratamiento de insectos de acuerdo con la invención puede comprender una etapa de sacrificio antes de la etapa de separación de las cutículas de la parte blanda.

Ventajosamente, después de la etapa 1 de sacrificio, los insectos se usan directamente para la implementación de la etapa 2 de separación de cutículas de la parte blanda de los insectos, es decir, que los insectos no se someten a tratamiento alguno, como molienda, congelación o deshidratación entre la etapa 1 y la etapa 2.

Esta etapa de sacrificio se describe más detalladamente en la etapa 1 del método detallado de tratamiento de insectos de acuerdo con la invención a continuación.

Opcionalmente, el método de tratamiento de insectos de acuerdo con la invención comprende además una etapa de maduración de la parte blanda de los insectos, entre la etapa de separación de las cutículas de la parte blanda y la etapa de separación de la parte blanda de los insectos en una fracción oleosa, una fracción sólida y una fracción acuosa.

Por “etapa de maduración de la parte blanda de los insectos”, se entiende más particularmente una etapa durante la cual la parte blanda de los insectos se somete a agitación.

Esta etapa se describe más detalladamente en la etapa 3 del método detallado de tratamiento de insectos de acuerdo con la invención a continuación.

Particularmente, el método de tratamiento de insectos de acuerdo con la invención puede comprender las siguientes etapas:

- la separación de las cutículas de la parte blanda de los insectos,

- la maduración de la parte blanda de los insectos, después
- la separación de la parte blanda de los insectos en una fracción oleosa, una fracción sólida y una fracción acuosa.

Opcionalmente, el método de tratamiento de insectos de acuerdo con la invención comprende una etapa de concentración de la fracción acuosa, para obtener una fracción acuosa concentrada.

Esta etapa se describe más detalladamente en la etapa 5 del método detallado de tratamiento de insectos de acuerdo con la invención que se describe a continuación.

Opcionalmente, el método de tratamiento de insectos de acuerdo con la invención comprende, entre otros, una etapa de mezclado de la fracción sólida:

- con todo o parte de la fracción acuosa concentrada; y/o
- todo o parte de las cutículas,

para obtener una mezcla.

Esta etapa se describe más detalladamente en la etapa 6 del método detallado de tratamiento de insectos de acuerdo con la invención a continuación.

Preferiblemente, el método de tratamiento de insectos de acuerdo con la invención comprende una etapa de secado de la fracción sólida o de mezclado para obtener una fracción sólida seca o una mezcla seca, respectivamente.

Esta etapa se describe más detalladamente en la etapa 7 del método detallado de tratamiento de insectos de acuerdo con la invención a continuación.

Preferiblemente, el método de tratamiento de insectos de acuerdo con la invención comprende, entre otros, una etapa de triturado de la fracción sólida seca o de mezcla seca.

Esta etapa se describe más detalladamente en la etapa 8 del método detallado de tratamiento de insectos de acuerdo con la invención a continuación.

Más particularmente, el método de acuerdo con la invención se lleva a cabo sin que sea necesario agregar un solvente, tal como agua. Particularmente, la dilución de la parte blanda no se realiza durante el método de acuerdo con la invención.

De acuerdo con una modalidad preferida del método de tratamiento de insectos de acuerdo con la invención, este es un método para preparar un polvo y especialmente un polvo de insectos, y comprende las siguientes etapas:

i) sacrificio de los insectos;

ii) la separación de las cutículas de la parte blanda de los insectos;

iii) opcionalmente, la maduración de la parte blanda de los insectos;

iv) la separación de la parte blanda de los insectos en una fracción sólida, una fracción acuosa y una fracción oleosa;

v) opcionalmente, la concentración de la fracción acuosa para obtener una fracción acuosa concentrada;

vi) opcionalmente, el mezclado de la fracción acuosa concentrada y/o de las cutículas con la fracción sólida para obtener una mezcla;

vii) el secado de la fracción sólida obtenida en la etapa iv) o de la mezcla obtenida en la etapa vi) para obtener una fracción sólida seca o una mezcla seca; y

viii) la molienda de la fracción sólida seca o de la mezcla seca obtenida en la etapa vii).

Método detallado de tratamiento de los insectos de acuerdo con la invención

- **Etapa 1: Sacrificio de los insectos**

Esta etapa 1 de sacrificio se puede realizar ventajosamente por choque térmico, como ebullición o blanqueo. Esta etapa 1 permite sacrificar a los insectos mientras se reduce la carga microbiana (reduciendo el riesgo de degradación y sanitario) y se inactivan las enzimas propias de los insectos que pueden desencadenar una autolisis y, por lo tanto, un rápido pardeamiento de los mismos.

Para el escaldado, los insectos, preferiblemente las larvas, se escaldan con agua durante 2 minutos a 20 minutos, preferiblemente, de 5 minutos a 15 minutos. Preferiblemente, el agua se encuentra a una temperatura comprendida entre 87 °C a 100 °C, preferiblemente de 92 °C a 95 °C.

La cantidad de agua introducida durante el escaldado se determina de la siguiente manera: la relación entre el volumen de agua en mL y el peso en g de insecto es preferiblemente entre 0.3 y 10, más preferiblemente entre 0.5 y 5, aún más preferiblemente entre 0.7 y 3, aún más preferiblemente de 1.

Para el blanqueamiento, los insectos, preferiblemente las larvas, se blanquean con agua o vapor (boquillas o lecho de vapor) a una temperatura comprendida entre 80 °C y 105 °C, preferiblemente entre 87 y 105°C, más preferiblemente entre 95 °C y 100 °C, aún más preferiblemente 98 °C o con agua a una temperatura comprendida entre 90 °C y 100 °C, preferiblemente entre 92 °C y 95 °C (por boquillas de pulverización) o en modo mixto (agua + vapor) a una temperatura comprendida entre 80 °C y 130 °C, preferiblemente entre 90 °C y 120 °C, más preferiblemente entre 95 °C y 105 °C, aún más preferiblemente 98 °C. Cuando los insectos se blanquean solo con vapor, el blanqueo se lleva a cabo ventajosamente en blanqueadores de vapor de circulación forzada ("formación forzada de vapor"). El tiempo de permanencia en el cuarto de blanqueo está comprendido entre 5 segundos y 15 minutos, preferiblemente entre 1 minuto y 7 minutos.

Ventajosamente, después de la etapa 1 de sacrificio, los insectos se usan directamente para la implementación de la etapa 2 de separación de cutículas de la parte blanda de los insectos, es decir, que los insectos no se someten a tratamiento alguno, como molienda, congelación o deshidratación entre la etapa 1 y la etapa 2.

- **Etapa 2: Separación de cutículas de la parte blanda de los insectos**

La etapa 2 tiene como objetivo separar las cutículas de la parte blanda de los insectos.

La separación de cutículas de la parte blanda de los insectos se puede realizar con la ayuda de cualquier tipo de separador adecuado.

De acuerdo con una primera modalidad, la separación de cutículas de la parte blanda de los insectos se realiza con la ayuda de un filtro prensa.

Ventajosamente, el filtro prensa utilizado en el método de tratamiento de insectos de acuerdo con la invención es un filtro prensa de banda.

Un filtro prensa de banda comprende dos bandas de sujeción perforadas (también llamadas “mallas filtrantes”). Los insectos se colocan entre las dos bandas de sujeción perforadas para presionar la parte blanda de los insectos a través de las perforaciones de las bandas de sujeción, mientras que la parte sólida de los insectos permanece entre las 2 bandas de sujeción perforadas.

El técnico en la materia es capaz de determinar el diámetro de las perforaciones de las bandas de sujeción y la presión a ejercer, permitiendo que las cutículas se separen de la parte blanda de los insectos.

A modo de ejemplo, se puede citar el filtro prensa de bandas (o “prensa de bandas”) de la compañía Flottweg, o los filtros de prensa de bandas de la compañía ATR Créations.

De acuerdo con una segunda modalidad, la separación de cutículas de la parte blanda se realiza con la ayuda de un separador de banda.

A modo de ejemplo, un separador de banda puede comprender una banda de sujeción y un tambor perforado, la banda de sujeción rodea al menos una parte del tambor perforado.

La banda de sujeción permite el aporte y aplicación de los insectos contra el tambor perforado para presionar la parte blanda de los insectos a través de las perforaciones del tambor, mientras que la parte sólida de los insectos (cutículas) permanece fuera del tambor.

Las cutículas se pueden recuperar posteriormente utilizando un cuchillo raspador.

A modo de ejemplo, se pueden citar los separadores de banda que provienen de la compañía Baader, como los separadores de banda 601 a 607 (“separador de intervalo 601 a 607), o también los separadores de banda SEPAmatic® de BFD Corporation (intervalo 410 a 4,000V).

Ventajosamente, el diámetro de las perforaciones del tambor está comprendido entre 0.5 mm y 3 mm, preferiblemente entre 1 mm y 2 mm.

Con respecto a la presión, el técnico en la materia puede determinar la presión a ejercer para la separación de las cutículas de la parte blanda de los insectos.

Esta etapa de separación de insectos difiere de un prensado clásico en que se puede realizar, por ejemplo, con una prensa de un solo tornillo o de dos tornillos, ya que permite una separación (neta) de la parte blanda y de las cutículas de los insectos y no una separación de un jugo de una fracción sólida.

Ventajosamente, la separación de cutículas de la parte blanda de los insectos se realiza con la ayuda de un separador de banda.

Las cutículas obtenidas en la etapa 2 comprenden entre 10 % y 30 %, preferiblemente entre 15 % y 25 % en peso de quitina con respecto al peso seco total de las cutículas.

La determinación del contenido de quitina se realiza por extracción de la misma. Por ejemplo, un método para determinar el nivel de quitina que se puede usar es el método ADAC 991.43.

Además, las cutículas comprenden menos de 25%, preferiblemente menos de 10%, más preferiblemente menos de 5%, aún más preferiblemente menos de 3% en peso de lípidos con respecto al peso seco total de las cutículas.

Los métodos de determinación del contenido de materia grasa (lípidos) son bien conocidos por el

técnico en la materia. A modo de ejemplo y de manera preferida, la determinación de este contenido se llevará a cabo de acuerdo con el método del reglamento CE 152/2009.

A lo largo de la solicitud, cuando no se especifica una fecha para un reglamento, norma o directiva, se considera que es el reglamento, norma o directiva vigente en la fecha de presentación.

Entre otros, las cutículas que contienen entre 55 % y 90 %, ventajosamente entre 60 % y 85 %, preferiblemente entre 65 % y 80 % en peso de proteínas del peso seco total de cutículas.

En el marco de la presente solicitud, por “proteínas” se refiere a la cantidad de proteína cruda. La cuantificación de las proteínas crudas es bien conocida por el técnico en la materia. A modo de ejemplo, se puede citar el método Dumas o el método Kjeldahl. Preferiblemente, se utiliza el método Kjeldahl.

Cabe señalar, sin embargo, que este método se basa en medir el contenido de nitrógeno total. La quitina tiene un contenido denitrógeno de un 8 %. Por consiguiente, el contenido de nitrógeno de la quitina se restó del contenido de nitrógeno medido antes de la conversión para obtener el contenido de proteína.

Las cutículas contienen entre 0.5 % y 30 %, ventajosamente entre 1 % y 20 %, preferiblemente entre 5 % y 15% en peso de carbohidratos con respecto al peso seco total de cutículas.

El contenido de carbohidratos se calculó por diferencia. De acuerdo con este método, el contenido de carbohidratos es igual al contenido de materia seca al que se le resta el contenido de cenizas, proteínas y lípidos.

Entre otros, las cutículas comprenden preferiblemente al menos 0.08 % en peso, más preferiblemente al menos 0.1 % en peso, aún más preferiblemente al menos 0.12 % en peso de trehalosa en peso seco total de cutículas.

La cantidad de trehalosa se determina mediante el análisis por GC-MS. Este análisis se describe más detalladamente en el Ejemplo 1 a continuación.

La parte blanda obtenida en la etapa 2 contiene entre 20 % y 50 % en peso de lípidos, preferiblemente entre 30 % y 40 % en peso de lípidos del peso seco total de la parte blanda.

Entre otros, la parte blanda contiene al menos 45 %, preferiblemente al menos 48 %, más preferiblemente al menos 50 % en peso de proteínas con respecto al peso seco total de la parte blanda.

- **<u>Etapa 3: Maduración de la parte blanda de los insectos</u>**

La parte blanda de los insectos se somete a agitación, opcionalmente en un tanque.

Ventajosamente, la maduración se lleva a cabo durante un período de entre 15 minutos y 3 horas, preferiblemente durante 1 hora.

Ventajosamente, la maduración se lleva a cabo a una temperatura entre 65 °C y 100 °C, preferiblemente entre 85 °C y 100 °C, más preferiblemente a una temperatura de alrededor de 90 °C.

Este paso permite facilitar la separación de la parte blanda de los insectos en la etapa 4 a continuación.

Preferiblemente, el método de acuerdo con la invención comprende una tal etapa.

Particularmente, en esta etapa no es necesaria la dilución de la parte blanda de los insectos en un solvente como el agua.

Ventajosamente, esta etapa de maduración es inmediatamente seguida de la etapa de separación de la parte blanda en una fracción sólida, una fracción acuosa y una fracción oleosa.

Particularmente, no es necesaria una etapa de dilución adicional en un solvente como el agua y/o el calentamiento para efectuar la separación en tres fracciones.

Por el contrario, como se muestra en el Ejemplo 3, este paso de dilución tiene el efecto de:

- evitar una buena separación de las tres fracciones (sólida, acuosa y aceitosa),
- degradar las propiedades de las tres fracciones y
- generar costos significativamente más altos.

- **<u>Etapa 4: Separación de la parte blanda en una fracción sólida, una fracción acuosa y una fracción oleosa</u>**

Esta etapa tiene como objetivo extraer las tres fracciones a partir de la parte blanda de los insectos, obtenida en la etapa 2 o 3, es decir una fracción sólida, una fracción acuosa y una fracción oleosa.

De acuerdo con una primera modalidad, esta etapa de separación de la parte blanda se realiza en dos etapas secundarias.

En la primera etapa secundaria, la parte blanda de los insectos se somete a una decantación con la ayuda de un decantador bifásico, para obtener una fracción sólida y una fracción líquida.

En la segunda etapa secundaria, la fracción líquida se centrifuga, para recuperar una fracción oleosa y una fracción acuosa.

Ventajosamente, en esta segunda etapa secundaria, se utiliza una centrífuga de placas.

De acuerdo con una segunda modalidad de la etapa 4, la parte blanda de los insectos se somete a una decantación con la ayuda de un decantador trifásico, para obtener directamente una fracción acuosa, una fracción oleosa y una fracción sólida.

Los decantadores trifásicos adecuados son, por ejemplo, Tricanter® de la compañía Flottweg, o los decantadores trifásicos de la compañía GEA, tal como el decantador CA 225-03-33.

Ventajosamente, la separación de la parte blanda se realiza de acuerdo con la segunda modalidad.

En efecto, el uso de un decantador trifásico permite obtener una separación de fases particularmente eficaz. Más particularmente, la fracción sólida obtenida tiene un contenido alto de materia seca, la fracción acuosa tiene poco sedimento insoluble (de la fracción sólida) y aceite, y la fracción oleosa tiene poco sedimento insoluble (que proviene de la fracción sólida) y agua.

- **<u>Etapa 5: Concentración de la fracción acuosa</u>**

La fracción acuosa obtenida en la etapa 4 se concentra después opcionalmente para obtener una fracción acuosa concentrada.

Ventajosamente, la concentración se lleva a cabo por evaporación.

Ventajosamente, la evaporación se lleva a cabo a una temperatura de entre 30 °C y 100 °C, preferiblemente entre 60 °C y 80 °C.

Preferiblemente, la evaporación se lleva a cabo a una presión de entre 5 kPa (50 mbar) y 101.3

kPa (1013 mbar), preferiblemente a 101.3 kPa (1013 mbar).

La evaporación se realiza preferiblemente durante un período comprendido entre 5 minutos y 20 minutos.

La concentración se lleva a cabo preferiblemente utilizando un evaporador de película descendente, un evaporador de placa flotante ascendente o un evaporador de película delgada.

Este tipo de material estándar se puede utilizar sin encontrar problemas de adherencia, gracias a la pequeña cantidad de sedimento presente en la fracción acuosa.

Generalmente, las fracciones acuosas no pueden concentrar más del 42 % de materia seca, ya que tienden a gelificarse (agua retenida) a partir de esta concentración.

En el caso de la presente invención, la fracción acuosa comprende proteínas solubles de tamaño pequeño (al menos 45 %, preferiblemente al menos 60 % de las proteínas solubles de la fracción acuosa tienen un tamaño menor a 550 g/mol, como se describe más completamente a continuación), que permite evitar la gelificación y, por lo tanto, obtener una fracción acuosa con una alta concentración de materia seca (hasta 70 %) y con una viscosidad menor a 30 Pa·s (30,000 cPs (centipoise)).

Por “proteínas solubles” se entiende, entre la proteína cruda, las que son solubles en una solución acuosa cuyo pH está comprendido entre 6 y 8, ventajosamente entre 7.2 y 7.6.

Cuando el término “proteína” se utiliza en la presente solicitud, se refiere a la proteína cruda.

Preferiblemente, la solución acuosa es una solución tampón cuyo pH está comprendido entre 6 y 8, ventajosamente entre 7.2 y 7.6. Preferiblemente, la solución tampón es una solución tampón de fosfato NaCl, cuyo pH es igual a 7.4 +/- 0.2.

Además, la etapa de concentración de la fracción acuosa presenta un doble interés, ya que permite:

- un ahorro de vapor: en ausencia de la etapa 5 de concentración, el agua debe evaporarse durante la etapa de secado 7 descrita a continuación, con un secador cuyo consumo de vapor específico es mayor al de un concentrador como se describe anteriormente; y

- evitar las contaminaciones biológicas, gracias a una reducción de volumen y de la presión osmótica debido a la fuerte concentración de materia seca en la fracción acuosa concentrada.

- **<u>Etapa 6: Mezclado de la fracción acuosa concentrada y/o de cutículas con la fracción sólida</u>**

Todo o parte de las cutículas obtenidas en la etapa 2 y/o todo o parte de la fracción acuosa concentrada obtenida en la etapa 5 puede/pueden mezclarse opcionalmente con la fracción sólida obtenida en la etapa 4 para obtener una mezcla.

Ventajosamente, la mezcla se homogeneiza para facilitar su tratamiento posterior.

Los mezcladores que se pueden usar son, por ejemplo, mezcladores de tornillo cónico, como los de la compañía Vrieco-Nauta®, o mezcladores pendulares, tales como los de la compañía PMS.

Se observará que, en promedio, para un kilogramo de fracción sólida obtenida, se obtienen de 500 a 650 g de cutículas, por ejemplo, aproximadamente 550, y de 250 a 350 g de fracción acuosa, por ejemplo, aproximadamente 300 g.

- **<u>Etapa 7: Secado de la fracción sólida obtenida en la etapa 4 o de la mezcla obtenida en la etapa 6</u>**

La fracción sólida obtenida en la etapa 4 o la mezcla obtenida en la etapa 6 se pueden secar para obtener una fracción sólida seca o una mezcla seca.

Ventajosamente, el secado se realiza con la ayuda de un secador de discos, un secador tubular, un secador con hélices, un secador de tipo flash, un secador de capa delgada o un secador con atomización.

Preferiblemente, el secado se realiza con la ayuda de un secador de discos o tubular.

Los secadores tubulares adaptados son, por ejemplo, los de la compañía Tummers (Simon Dryers Technology).

Los secadores de discos adecuados son, por ejemplo, los de la compañía Haarslev.

El secado se puede realizar durante 1 hora y 10 horas, preferiblemente entre 3 horas y 5 horas.

Ventajosamente, el secado se realiza a una temperatura comprendida entre 60 °C y 225 °C, preferiblemente entre 80 °C y 100°C.

Preferiblemente, la evaporación se realiza a presión atmosférica.

- **<u>Etapa 8: Molienda de la fracción sólida seca o de la mezcla obtenida en la etapa 7</u>**

Después del secado, se puede moler y se obtiene un polvo.

Por “polvo” se entiende una composición en forma de partículas.

Preferiblemente, el polvo de acuerdo con la invención es un polvo de insectos, es decir un polvo preparado únicamente a partir de insectos y eventualmente agua.

Por ejemplo, se puede utilizar un molino, como un molino de martillos o un molino cónico (como los molinos cónicos “Kek cone mills” de la compañía Kemutec).

Ventajosamente, al final de la molienda, el tamaño de las partículas es menor a 0.5 cm (el tamaño más grande de partícula que se observa con la ayuda de un microscopio), preferiblemente de 1 mm. Más particularmente, el tamaño de las partículas está comprendido entre 300 µm y 1 mm, aún más preferiblemente entre 500 µm y 800 µm.

Cuando el polvo se muele a un tamaño de partícula aceptable para el consumo humano o animal, puede denominarse “harina” y particularmente “harina de insectos”. Por “tamaño de partículas aceptable para la alimentación humana o animal” se entiende un tamaño de partícula comprendido entre 100 µm y 1.5 mm, preferiblemente comprendido entre 300 µm y 1 mm, más preferiblemente entre 500 y 800 µm.

Dependiendo de si las etapas 5 y/o 6 opcionales se implementan o no, se pueden obtener diferentes polvos, es decir:

- un polvo que resulta únicamente de la fracción sólida (etapa 6 no implementada);
- un polvo que resulta de la mezcla de la fracción sólida y todo o parte de las cutículas;
- un polvo que resulta de la mezcla de la fracción sólida y todo o parte de la fracción acuosa concentrada;
- un polvo que resulta de la mezcla de la fracción sólida, todo o parte de las cutículas y todo o parte de la fracción acuosa concentrada.

La invención se refiere también a los productos resultantes del método de acuerdo con la invención.

La invención se refiere además a una fracción sólida susceptible de obtenerse por el método de tratamiento de insectos de acuerdo con la invención.

La invención también se refiere a una fracción sólida que comprende al menos 71 % en peso de proteínas y entre 0.1 % y 2 % en peso de quitina, los porcentajes en peso están indicados con respecto al peso seco total de la fracción sólida.

Preferiblemente, la fracción sólida comprende al menos 73 % en peso, más preferiblemente al menos 74 % en peso, aún más preferiblemente al menos 75 % en peso de proteínas, los porcentajes en peso están indicados con respecto al peso seco total de la fracción sólida.

Ventajosamente, la fracción sólida comprende entre 0.5 % y 1.7 % en peso de quitina con respecto al peso seco total de la fracción sólida.

Ventajosamente, la fracción contiene entre 5 % y 17 % en peso de lípidos, preferiblemente entre 10 % y 15 % en peso de lípidos con respecto al peso seco total de la fracción sólida.

Preferiblemente, la fracción sólida contiene entre 1 % y 10 % en peso, preferiblemente entre 2 % y 6 % en peso de ceniza con respecto al peso seco total de la fracción sólida.

El método de determinación del contenido de cenizas es bien conocido por el técnico en la materia. Preferiblemente, las cenizas se determinaron de acuerdo con el método establecido en el reglamento CE 152/2009 del 27-01-2009.

Además, la fracción sólida contiene preferiblemente entre 5 % y 15 % en peso, más preferiblemente entre 7 % y 13 % en peso de carbohidratos con respecto al peso seco total de la fracción sólida.

Más particularmente, la fracción sólida comprende preferiblemente al menos 0.2 % en peso, más preferiblemente al menos 0.3 % en peso, aún más preferiblemente al menos 0.35 % en peso, aún más preferiblemente al menos 0.5 % en peso y todavía más preferiblemente al menos 0.7 % en peso de trehalosa con respecto al peso seco total de la fracción sólida.

Además, la digestibilidad de las proteínas en humanos y animales está fuertemente condicionada por el tamaño de las proteínas. En nutrición animal, es común reducir el tamaño de las proteínas, para facilitar la digestión de los animales. Esta reducción de tamaño de proteínas se hace generalmente por métodos de hidrólisis (por ejemplo, enzimáticos), cuya realización es particularmente costosa.

La fracción sólida contiene proteínas solubles cuyo tamaño es lo suficientemente pequeño para facilitar la digestión por los animales.

Ventajosamente, al menos 75 %, preferiblemente al menos 80 %, más preferiblemente al menos 85 % de proteínas solubles de la fracción sólida tienen un tamaño menor o igual a 12,400 g/mol.

Más particularmente, al menos 55 %, preferiblemente al menos 60 %, más preferiblemente al menos 65 % de proteínas solubles de la fracción sólida tienen un tamaño menor o igual a 550 g/mol.

La invención se refiere igualmente a una fracción acuosa susceptible de obtenerse por el método de tratamiento de insectos de acuerdo con la invención.

La invención se refiere además a una fracción acuosa que comprende al menos 48 % en peso de proteínas, al menos 2 % en peso de trehalosa y presenta un contenido de lípidos inferior a 7 % en peso, los porcentajes en peso están indicados con respecto a peso seco total de la fracción acuosa.

Preferiblemente, la fracción acuosa comprende al menos 55 % en peso, más preferiblemente al menos 60 % en peso, aún más preferiblemente al menos 65 % en peso de proteínas, con respecto al peso seco total de la fracción acuosa.

Ventajosamente, la fracción acuosa comprende al menos 2.5 % en peso, más preferiblemente al menos 3 % en peso de trehalosa con respecto al peso seco total de la fracción acuosa.

Preferiblemente, la fracción acuosa muestra un contenido de lípidos menor a 6 % en peso, más preferiblemente menor a 4 % en peso, aún más preferiblemente menor a 2 % en peso con respecto peso seco total de la fracción acuosa.

Ventajosamente, la fracción acuosa contiene entre 5 % y 20 % en peso de cenizas, preferiblemente entre 7 % y 15 % en peso de cenizas con respecto al peso seco total de la fracción acuosa.

Además, la fracción acuosa comprende menos de 2 % en peso de sedimentos insolubles, preferiblemente menos de 1 % en peso de sedimentos insolubles, preferiblemente menos de 0.5 % en peso de sedimentos insolubles con respecto al peso total de la fracción acuosa.

La fracción acuosa no contiene quitina.

Igual a la fracción sólida, la fracción acuosa contiene proteínas solubles cuyo tamaño es lo suficientemente pequeño para facilitar la digestión por los animales.

Ventajosamente, al menos 90 %, preferiblemente al menos 95 %, más preferiblemente al menos 97 % de proteínas solubles de la fracción acuosa tienen un tamaño menor o igual a 12,400 g/mol.

Más particularmente, al menos 45 %, preferiblemente al menos 50 %, más preferiblemente al menos 53 %, aún más preferiblemente al menos 60 % de proteínas solubles de la fracción acuosa tienen un tamaño menor o igual a 550 g/mol.

Más particularmente, la fracción acuosa tiene un contenido de materia seca entre 5 % y 15 % en peso con respecto al peso total de la fracción acuosa.

Cuando se concentra, la fracción acuosa concentrada tiene un contenido de materia seca de entre 55 % y 75% en peso con respecto al peso total de la fracción acuosa concentrada.

La invención también se refiere a una fracción acuosa concentrada que puede obtenerse mediante el método de tratamiento de insectos de acuerdo con la invención, comprendiendo dicho método de tratamiento la etapa de concentración opcional.

La invención se refiere además a una fracción acuosa susceptible de obtenerse por el método de tratamiento de insectos de acuerdo con la invención.

La invención se refiere igualmente a un polvo susceptible de obtenerse por el método de tratamiento de insectos que comprende las siguientes etapas:

- la separación de cutículas de la parte blanda de los insectos,
- la separación de la parte blanda de los insectos en una fracción oleosa, una fracción sólida y

una fracción acuosa,

- opcionalmente, la concentración de la fracción acuosa,
- opcionalmente, el mezclado de la fracción sólida con:
  - todo o parte de la fracción acuosa concentrada; y/o
  - todo o parte de las cutículas,

para obtener una mezcla,

- el secado de la fracción sólida o de la mezcla para obtener una fracción sólida seca o una mezcla seca, respectivamente;
- la molienda de la fracción sólida seca o de la mezcla seca.

Este método de tratamiento de los insectos puede comprender además una pluralidad de características descritas a continuación.

La invención se refiere más particularmente a un polvo susceptible de obtenerse mediante el método de preparación de un polvo, y particularmente un polvo de insectos, de acuerdo con la invención, tal como se describe a continuación.

Como se indicó anteriormente, dependiendo de si se usa(n) o no las etapas opcionales 5 y/o 6 del método de tratamiento de insectos de acuerdo con la invención, es decir, la etapa de concentración de la fracción acuosa y la etapa de mezcla de todo o parte de la cutícula y/o todo o parte de la fracción acuosa concentrada, con la fracción sólida, y, cuando corresponde, de acuerdo con las condiciones de su implementación, se pueden obtener diferentes polvos.

La invención también se refiere a un polvo, y particularmente a un polvo de insectos, que comprende al menos 71 % en peso de proteínas y entre 0.1 % y 4 % en peso de quitina, los porcentajes en peso están indicados con respecto al peso seco total del polvo.

Preferiblemente, este polvo tiene un contenido de proteína mayor o igual a 72 % en peso, más preferiblemente mayor o igual a 74 % en peso, aún más preferiblemente mayor o igual a 75 % en peso con respecto al peso seco total del polvo.

Más particularmente, este polvo tiene un contenido de quitina de entre 0.5 % y 3 % en peso, más preferiblemente entre 0.8 % y 2 % en peso, más preferiblemente entre 0.8 % y 1.7 % en peso con respecto al peso seco total del polvo.

Preferiblemente, este polvo comprende entre 5 % y 20 % en peso, preferiblemente entre 7 % y 17 % en peso de lípidos con respecto al peso seco total del polvo.

Más particularmente, este polvo comprende entre 1 % y 10 % en peso, preferiblemente entre 2 % y 6 % en peso de cenizas con respecto al peso seco total del polvo.

Además, este polvo comprende preferiblemente entre 3 % y 20 % en peso de carbohidratos con respecto al peso seco total del polvo

Más particularmente, este polvo comprende preferiblemente al menos 0.1 % en peso, más preferiblemente al menos 0.2 % en peso de trehalosa con respecto al peso seco total del polvo.

Cuando las etapas opcionales 5 y/o 6 no están implementadas, se obtiene un polvo, y en particular un polvo de insectos, que resulta únicamente de la fracción sólida.

Este polvo comprende al menos 71 % en peso de proteínas y entre 0.1 % y 2 % en peso de quitina, los porcentajes en peso están indicados con respecto al peso seco total del polvo.

Preferiblemente, este polvo tiene un contenido de proteína mayor o igual a 72 % en peso, más preferiblemente mayor o igual a 74 % en peso, aún más preferiblemente mayor o igual a 75 % en peso con respecto al peso seco total del polvo.

Más particularmente, este polvo tiene un contenido de quitina comprendido entre 0.5 % y 1.7 % en peso de quitina con respecto al peso seco total del polvo.

Preferiblemente, este polvo comprende entre 5 % y 17 % en peso, preferiblemente entre 10 % y 15 % en peso de lípidos con respecto al peso seco total del polvo.

Más particularmente, este polvo comprende entre 1 % y 10 % en peso, preferiblemente entre 2 % y 6 % en peso de cenizas con respecto al peso seco total del polvo.

Además, este polvo contiene preferiblemente entre 5 % y 15 % en peso, más preferiblemente entre 7 % y 13 % en peso de carbohidratos con respecto al peso seco total del polvo.

Más particularmente, este polvo contiene preferiblemente menos de 0.2 % en peso, más preferiblemente al menos 0.3 % en peso, aún más preferiblemente al menos 0.35 % en peso de trehalosa con respecto al peso seco total del polvo.

Cuando se realizan las etapas 5 y 6 del método de acuerdo con la invención, también se puede obtener un polvo resultante de la mezcla de la fracción sólida, de todo o parte de las cutículas y de todo o parte de la fracción acuosa concentrada.

La invención también se refiere, por lo tanto, a un polvo, y particularmente a un polvo de insectos, que comprende al menos 65 % en peso de proteínas, al menos 10 % en peso de carbohidratos y entre 0.1 % y 2 % en peso de quitina, los porcentajes en peso están indicados con respecto al peso seco total del polvo.

Preferiblemente, este polvo tiene un contenido de proteína mayor o igual a 70 % en peso, más preferiblemente mayor o igual a 74 % en peso con respecto al peso seco total del polvo.

Más particularmente, este polvo tiene un contenido de quitina de entre 0.2 % y 1.5 % en peso, más preferiblemente entre 0.5 % y 1.3 % en peso con respecto al peso seco total del polvo.

Preferiblemente, este polvo tiene un contenido de carbohidratos mayor o igual a 12 % en peso, más preferiblemente mayor o igual a 14 % en peso con respecto al peso seco total del polvo.

Más particularmente, este polvo comprende preferiblemente al menos 0.7 % en peso, más preferiblemente al menos 0.9 % en peso, incluso más preferiblemente al menos 1 % en peso, e incluso más preferiblemente al menos 1.2 % en peso de trehalosa con respecto al peso seco total del polvo.

Preferiblemente, este polvo comprende entre 5 % y 15 % en peso, preferiblemente entre 7 % y 13 % en peso de lípidos con respecto al peso seco total del polvo.

Más particularmente, este polvo comprende entre 3 % y 10 % en peso, preferiblemente entre 4 % y 8 % en peso de cenizas, con respecto al peso seco total del polvo.

El contenido de humedad residual de los polvos de acuerdo con la invención está entre 2 % y 15 %, preferiblemente entre 5 % y 10%, más preferiblemente entre 4 % y 8 %. El contenido de humedad

puede determinarse, por ejemplo, de acuerdo con el método resultante del reglamento CE 152/2009 del 27-01-2009 (103 °C/4 h).

Ventajosamente, las proteínas de los polvos de acuerdo con la invención tienen una digestibilidad mayor o igual a 85 % en peso con respecto al peso total de proteínas crudas.

La digestibilidad es una digestibilidad pépsica medida por el método descrito en la Directiva 72/199/CE.

Preferiblemente, la digestibilidad es mayor o igual a 88 %, más preferiblemente, mayor o igual a 92 %.

La invención se refiere además al uso de una fracción acuosa de acuerdo con la invención, una fracción acuosa concentrada de acuerdo con la invención, o un polvo que comprende al menos 65 % de proteínas, al menos 10 % en peso de carbohidratos y entre 0.1 % y 2 % en peso de quitina de acuerdo con la invención descrita anteriormente, como sabor, ventajosamente en el alimento para animales.

La invención se refiere finalmente al uso de un polvo de acuerdo con la invención en alimentos, preferiblemente en alimentos para animales.

Otras características y ventajas de la invención se harán evidentes en los ejemplos que siguen, proporcionados a modo de ilustración, con referencia a las figuras:

- La figura 1 es un esquema que ilustra el método detallado de tratamiento de insectos de acuerdo con la invención;
- Las figuras 2A y 2B muestran dos fotografías de la parte blanda, por un lado, en la salida del reactor después de la etapa de maduración (Figura 2A) y, por otro lado, después de la centrifugación para separar las fases (Figura 2B).
- La figura 3 es una curva estándar utilizada para realizar el ensayo de trehalosa;
- La figura 4 es un diagrama que ilustra el contenido de humedad de la fracción oleosa obtenida por el método de acuerdo con la invención y de la fracción oleosa obtenida por los métodos comparativos;
- La figura 5 es un diagrama que ilustra el contenido de sedimentos de la fracción oleosa obtenida por el método de acuerdo con la invención y de la fracción oleosa obtenida por los métodos comparativos;
- La figura 6 es un diagrama que ilustra el índice de peróxido de la fracción oleosa obtenida por el método de acuerdo con la invención y de la fracción oleosa obtenida por un método comparativo;
- La figura 7 es un diagrama que ilustra el contenido de materia seca de la fracción acuosa obtenida por el método de acuerdo con la invención y de la fracción acuosa obtenida por los métodos comparativos;
- La figura 8 es un diagrama que ilustra el contenido de sedimentos de la fracción acuosa obtenida por el método de acuerdo con la invención y de la fracción acuosa obtenida por un método comparativo;
- La figura 9 es un diagrama que ilustra el porcentaje de emulsión presente en la fracción acuosa obtenida por el método de acuerdo con la invención y de la fracción acuosa obtenida por un

método comparativo;

- La figura 10 es un diagrama que ilustra el porcentaje (en porcentaje de materia seca) de lípidos presentes en la fracción acuosa obtenida por el método de acuerdo con la invención y de la fracción acuosa obtenida por métodos comparativos;
- La figura 11 es un diagrama que ilustra la digestibilidad pépsica de las proteínas de la fracción acuosa obtenida por el método de acuerdo con la invención y la de las proteínas de la fracción acuosa obtenida por métodos comparativos;
- La figura 12 es un diagrama que ilustra el contenido de trehalosa de la fracción acuosa obtenida por el método de acuerdo con la invención y de la fracción acuosa obtenida por métodos comparativos;
- La figura 13 comprende tres fotografías que ilustran el color de la fracción acuosa obtenida por el método de acuerdo con la invención y el de la fracción acuosa obtenida por métodos comparativos;
- La figura 14 es un diagrama que ilustra el contenido de trehalosa de la fracción sólida obtenida por el método de acuerdo con la invención y de la fracción sólida obtenida por métodos comparativos;
- La figura 15 es un diagrama que ilustra el porcentaje de la porción soluble en agua de la fracción sólida obtenida por el método de acuerdo con la invención y la fracción sólida obtenida por métodos comparativos;
- La figura 16 es un diagrama que ilustra el porcentaje de porción soluble en la fase móvil de la fracción sólida obtenida por el método de acuerdo con la invención y la fracción sólida obtenida por métodos comparativos; y
- La figura 17 es un diagrama que ilustra la distribución del tamaño de las proteínas en la fracción sólida obtenida por el método de acuerdo con la invención y en la fracción sólida obtenida por métodos comparativos.

EJEMPLO 1: Método de tratamiento de insectos de acuerdo con la invención

Se han utilizado larvas de *Tenebrio molitor*. Al recibir las larvas, se pueden almacenar a 4 °C durante 0 días a 15 días en sus tanques de reproducción antes del sacrificio degradación importante. El peso de las larvas (edad) utilizadas es variable y, por lo tanto, su composición puede variar, como se ilustra en la Tabla 1 a continuación:

Biomasa (insectos)	**mg**	**23**	**35**	**58**	**80**	**108**	**154**
Materia seca	%*	34	34	34.2	37.9	39.6	39.5
Cenizas	%*	1.59	1.52	1.6	1.75	1.67	1.43
Proteínas crudas	%*	22.6	22.2	22	23.2	23.1	23.2
Lípidos	%*	6.62	6.88	7.98	10.3	10.9	11.7

* Los % se expresan en peso seco con respecto al peso húmedo de las larvas.

Tabla 1: Composición bioquímica de las larvas de *Tenebrio molitor* de acuerdo con su peso.

- **Etapa 1: Sacrificio de los insectos**

Las larvas vivas (+4°C a +25°C) se transportan en una capa de espesor comprendida entre 2 cm y 10 cm, en una cinta transportadora perforada (1 mm) a una cámara de blanqueo. De este modo, los insectos se blanquean a vapor (boquillas o lecho de vapor) a 98 °C bajo ventilación forzada o con agua a 92-95°C (boquillas de pulverización) o en modo mixto (agua + vapor). El tiempo de permanencia en el cuarto de blanqueo está comprendido entre 5 segundos y 15 minutos, preferiblemente 5 minutos.

La temperatura de las larvas a la salida del blanqueamiento está comprendida entre 75 °C y 98 °C.

- **Etapa 2: Separación de la parte blanda de las cutículas de insectos**

Las larvas, una vez blanqueadas, se transportan a la tolva de alimentación de un separador de banda, para separar las cutículas de la parte blanda de las larvas.

Ventajosamente, la separación se lleva a cabo inmediatamente después del sacrificio para que las larvas no tengan tiempo de enfriarse a temperatura ambiente.

El separador de banda utilizado es un separador de banda 601 de la compañía Baader.

El diámetro de las perforaciones del tambor es de 1.3 mm.

La parte blanda de los insectos se recupera en un tanque.

Las cutículas se pueden recuperar con la ayuda de un cuchillo raspador.

Determinación de la cantidad de trehalosa de las cutículas

La cantidad de trehalosa en las cutículas recuperadas en la etapa 2 se han medido de la siguiente manera:

La trehalosa se analiza por GC-MS.

Programa de temperatura: 150 °C, seguido de una rampa de 10 °C/min hasta 260 °C, después de 5 minutos a esta temperatura, una rampa de 25 °C/minuto hasta 310 °C y se mantiene a esta temperatura durante 2 minutos. Temperatura del inyector: 280 °C, de la interfase; 250 °C, la relación de división es de 10, el volumen de inyección es de 1 µL. Por ejemplo, se utiliza una columna sH-RXI-5mS, 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm.

La preparación de la muestra para el análisis se realiza de la siguiente manera: se pesa una cantidad precisa de la muestra (entre 10 mg y 300 mg) en un tubo Falcon, se agregan 9.75 mL de metanol y 250 µL de una solución estándar interna (mio-inositol, 25 µg/mL) en DMSO. La mezcla se agitó a 80 °C durante 10 minutos, después se agregaron 100 µL de BSTFA y la mezcla de reacción se agitó durante otros 30 minutos a temperatura ambiente, después se agregó 1 mL de acetonitrilo y la muestra preparada de esta manera se inyectó en un dispositivo GC-MS.

La cantidad medida de threhalosa por g de materia seca es de 1.2 mg.

- **Etapa 3: Maduración de la parte blanda de los insectos**

La parte blanda de los insectos se deja reposar en el tanque de recuperación de la etapa 2, bajo agitación durante 1 h y a una temperatura de aproximadamente 90 °C.

- **Etapa 4: Separación de la parte blanda en una fracción sólida, una fracción**

acuosa y una fracción oleosa

La parte blanda se separa en seguida en tres fracciones con la ayuda de un decantador trifásico. El decantador utilizado es Tricanter® Z23 de Flottweg.

Condiciones de la separación:

- Velocidad de flujo: hasta 500 kg/h;
- Vt tanque: 4806 t/mm (3000 G);
- Y min: 5 % (1.4 t/mm).

Se han obtenido tres fracciones al final de esta fase de separación: una fracción oleosa, una fracción sólida y una fracción acuosa.

Estas fracciones tienen las características indicadas en la Tabla 2 a continuación:

	Materia seca (%)	Proteínas (%)*	Aceite (%)*	Cenizas (%)*	Carbohidratos (%)*
Fracción sólida	56	74.1	12.9	4	10
Fracción acuosa	10	57	4	9	23
Fracción oleosa	> 99.5	< 0.5	> 99.5	< 0.25	< 0.25

* Los resultados promedio calculados en varias muestras de cada una de las fracciones, expresados en el % de materia seca

Tabla 2: Características de la fracción oleosa, de la fracción sólida y de la fracción acuosa

Determinación del tamaño de las proteínas solubles de la fracción sólida y de la fracción acuosa

Preparación de la muestra sólida (fracción sólida): 30 mg de la muestra se solubilizan en 1 L de fase móvil y se filtran utilizando el filtro Chromafil Xtra PES-45/25.

Preparación de la muestra líquida (fracción acuosa): 400 µL se solubilizan en 1,600 µL de la fase móvil y se filtran usando el filtro Chromafil xtra PES-45/25 justo antes de la inyección. 1.5 mL de la muestra preparada de esta manera se centrifugan durante 15 minutos a 12,000 rpm (10625 g).

Las condiciones de implementación de la cromatografía (HPLC Nexera XR de Shimadzu) son las siguientes: la columna utilizada es una Superdex Peptide GL 10/300 (GE Healthcare), la detección se realiza mediante un detector DAD a 215 nm, el flujo de la fase móvil es de 0.3 mL/min y está compuesta de ACN (acetonitrilo)/H_2O/TFA (ácido trifluoroacético) (30/70/0.1), el análisis se realiza a 25 °C.

La distribución de tamaño de las proteínas solubles de la fracción sólida se muestra en la Tabla 3

a continuación:

Peso molecular (kDa)	%
> 12.4	13.8
12.4 - 6.5	14
6.5 - 1.4	3.8
1.4 - 0.55	2.1
< 0.55	67.3

Tabla 3: Distribución del tamaño de proteínas solubles en la fracción sólida

La distribución de tamaño de las proteínas solubles de la fracción acuosa se muestra en la Tabla 4 a continuación:

Peso molecular (kDa)	%
> 12.4	2.7
12.4 - 6.5	13.4
6.5 - 1.4	19
1.4 - 0.55	11.5
< 0.55	53.4

Tabla 4: Distribución del tamaño de proteínas solubles en la fracción acuosa

Determinación de la cantidad de trehalosa en la fracción sólida y la fracción acuosa

La cantidad de trehalosa en las fracciones se midió de la siguiente manera:

La trehalosa se analiza por GC-MS.

Programa de temperatura: 150 °C, seguido de una rampa de 10 °C/min hasta 260 °C, después de 5 minutos a esta temperatura, una rampa de 25 °C/minuto hasta 310 °C y se mantiene a esta temperatura durante 2 minutos. Temperatura del inyector: 280 °C, de la interfaz; 250 °C, la relación de división es de 10, el volumen de inyección es de 1 µL.

La preparación de la muestra para el análisis se realiza de la siguiente manera: se pesa una cantidad precisa de la muestra (entre 10 mg y 300 mg) en un tubo Falcon, se agregan 9.75 mL de metanol y 250 µL de una solución estándar interna (mio-inositol, 25 µg/mL) en DMSO. La mezcla se agita a 80 °C durante 10 minutos, después se agregan 100 µL de BSTFA y la mezcla de reacción se agita durante otros 30 minutos a temperatura ambiente, después se agrega 1 mL de acetonitrilo y la muestra

preparada de esta manera se inyecta en un dispositivo GC-MS.

La cantidad medida en la fracción sólida es de 3.82 mg de trehalosa por g de materia seca.

La cantidad medida en la fracción acuosa es de 33.2 mg de trehalosa por g de materia seca.

Además, la fracción acuosa contiene menos de 1 % en peso de sedimentos insolubles con respecto al peso total de la fracción acuosa.

- **Etapa 5: Concentración de la fracción acuosa**

La fracción acuosa obtenida en la etapa 4 se concentra en seguida por evaporación, con la ayuda de un evaporador flotante descendente.

La fracción acuosa concentrada obtenida tiene una concentración de materia seca de aproximadamente 65 %.

- **Etapa 6 (opcional): Mezclado de la fracción acuosa concentrada y/o de cutículas con la fracción sólida**

La etapa 6 no se ha implementado en este ejemplo.

- **Etapa 7: Secado de la fracción sólida**

La fracción sólida obtenida en la etapa 4 se seca con la ayuda de un secador de discos de la compañía Haarslev durante 5 horas con el fin de obtener una fracción sólida seca o una mezcla seca.

Del punto de vista microbiológico, la fracción sólida contiene menos de 10 UFC/g de enterobacterias.

- **Etapa 8: Molienda**

La fracción sólida seca se muele finalmente con la ayuda de molino de martillos continuo (6 móviles reversibles - espesor 8 mm). El molino se alimenta por una tolva con tapa de control de velocidad de flujo (180 kg/hora). La rejilla perforada utilizada para controlar el tamaño de grano en la salida es de 0.8 mm. La velocidad de rotación del motor es de 3000 rpm *(motorización eléctrica, consumo de energía 4kW (5.5 CV)).*

Las características de un polvo de insectos obtenido se muestran en la Tabla 5 a continuación.

Proteínas	Quitina	Cenizas	Lípidos	Carbohidratos	Trehalosa
75.1 %	1.3 %	4 %	12.5 %	10 %	0.38 %

*Los porcentajes indicados son porcentajes en peso con respecto al peso seco total del polvo de insectos.

Tabla 5: Características de un polvo de insectos obtenido en el Ejemplo 1.

EJEMPLO 2: Método de tratamiento de insectos de acuerdo con la invención

Las etapas 1 a 5 se implementan tal como se describe en el Ejemplo 1.

- **Etapa 6 (opcional): Mezclado de la fracción acuosa concentrada y de cutículas con la fracción sólida**

Toda (100 %) la fracción acuosa concentrada obtenida en la etapa 5, así como 0.05 % en peso de las cutículas recuperadas en la etapa 2, se mezclaron con toda la fracción sólida obtenida en la etapa

4, para obtener una mezcla.

Se utilizó un mezclador de tornillo cónico de la compañía Vrieco-Nauta®.

- **Etapa 7: Secado de la mezcla**

La mezcla obtenida en la etapa 6 se seca con la ayuda de un secador de discos de la compañía Haarslev durante 5 horas con el fin de obtener una mezcla seca.

Del punto de vista microbiológico, la mezcla seca contiene menos de 10 UFC/g de enterobacterias.

- **Etapa 8: Molienda**

La mezcla seca se muele finalmente con la ayuda de un molino de martillos continuo (6 móviles reversibles - espesor 8 mm). El molino se alimenta por una tolva con tapa de control de velocidad de flujo (180 kg/hora). La rejilla perforada utilizada para controlar el tamaño de grano en la salida es de 0.8 mm. La velocidad de rotación del motor es de 3000 rpm *(motorización eléctrica, consumo de energía 4kW (5.5 CV)).*

Las características de un polvo de insectos obtenido se muestran en la Tabla 6 a continuación.

Proteínas	Quitina	Cenizas	Lípidos	Carbohidratos	Trehalosa
66 %	1 %	6 %	11 %	13 %	1.1 %

*Los porcentajes indicados son porcentajes en peso con respecto al peso seco total del polvo de insectos.

Tabla 6: Características del polvo de insectos obtenido en el Ejemplo 2.

EJEMPLO 3: Método de acuerdo con la invención y métodos comparativos

I. Preparación de muestras

Se ha reproducido el método de acuerdo con la invención para convertir la pulpa de larvas *Tenebrio molitor* en aceite (fracción oleosa o Aceite de Tenebrio Molitor «TMO», por sus siglas en inglés), en fase acuosa (fracción acuosa o Agua Retenida «SW», por sus siglas en inglés) y en proteínas sólidas (fracción sólida o Torta de Proteína Sólida «SPC», por sus siglas en inglés) y un método comparativo.

El objetivo es comparar la calidad de productos obtenidos por los 2 métodos.

1. Método de acuerdo con la invención

Primeramente, las larvas se sacrifican por blanqueamiento (vaporizados) y después las cutículas de las larvas se separan de la parte blanda (“descuticulados”) a través de un separador de banda de la marca Baader.

8 kg de la parte blanda que resultan de la etapa de separación se envían para su maduración en un reactor piloto de una capacidad de 10 litros, dicho reactor se calienta previamente a 50 °C, bajo

agitación mecánica a 350 rpm para garantizar una homogeneización en el centro de la parte blanda. Después de un aumento gradual de la temperatura de la parte blanda, la temperatura se regula directamente en su masa a 90 °C. Después de una hora de calentamiento a 90 °C, el reactor se vacía. Después se separa la parte blanda calentada. La parte blanda calentada se separa enseguida. El uso de un decantador no es posible a escala de laboratorio, la parte blanda se centrifuga a 10,000 g durante 15 minutos para separar las diferentes fases obtenidas (ver figuras 2A y 2B). Cada fase (TMO, SW y SPC) se recolecta manualmente y se almacena a -20°C en espera de los análisis fisicoquímicos.

2. Método comparativo

Se utilizan 8 kg de parte blanda que resultan de la etapa de separación. Esta parte blanda provino del mismo lote de parte blanda que la utilizada para el método de acuerdo con la invención.

El método comparativo difiere del método de acuerdo con la invención por dos etapas:

- al final de la separación, se realiza una etapa adicional de coagulación de la parte blanda a partir de 4 kg de parte blanda, en un reactor piloto, bajo agitación (350 rpm) con una temperatura de las paredes del reactor fijada a 100 °C durante 20 minutos; después

- la parte blanda se diluye por adición de agua y se calienta. Se realizaron dos diluciones de la parte blanda para estas pruebas, 1:0.5 (m/m, masa/masa) y 1:0.75 (m/m). Específicamente, un volumen de agua a 50 °C (2 litros o 3 litros en función de la dilución) se agrega en el reactor piloto. La regulación de la temperatura en la masa de la pulpa se realiza a 90 °C durante una hora, después el reactor se vacía. La parte blanda diluida se centrifuga después en las mismas condiciones que antes y las 3 fases se recolectan y almacenan a -20°C en espera de los análisis fisicoquímicos.

II. Análisis de las muestras

Determinación de la materia seca de las muestras

La materia seca de TMO, SW y SPC se determina por secado hasta una masa constante a 105°C de acuerdo con la norma ISO 6496. La diferencia en la masa del producto antes y después del secado sirve como medida para el contenido de materia seca. Los contenidos se expresan como porcentaje de masa. El contenido de humedad se obtiene restando la materia seca del valor 100.

Determinación del índice de peróxido en TMO

El índice de peróxido se determina de acuerdo con la norma francesa NF EN ISO 3960 (junio 2010) y se expresa en MEQ de oxígeno activo/kg de aceite.

Contenido de sedimentos de TMO y SW

El filtro utilizado es un tamiz de acero inoxidable de poros de 50 µm, previamente calibrado. La cuantificación de sedimentos se realiza después de pasar 300 mL de TMP o 750 mL de SW (750 mL) pesando los residuos en el tamiz.

En el caso de SW, la materia seca de los sedimentos se determina como se describe anteriormente.

Evaluación de la emulsión en SW

La evaluación de la emulsión en SW se realiza después de la centrifugación de 50 mL de SW recolectado. La recolección de la emulsión (sobrenadante) se realiza después de colocar los tubos a -20°C para facilitar la separación. La emulsión se pesa después y el resultado se expresa como un porcentaje de emulsión en el agua de la barra.

Determinación de la materia grasa en SW

La determinación de la materia grasa o lípidos en las muestras de SW se efectuó mediante la extracción con éter de petróleo después de la hidrólisis de acuerdo con el reglamento CE 152/2009. La cantidad de lípidos está relacionada con la materia seca de la muestra considerada (SW o PC).

Determinación de la digestibilidad pépsica de SW

La digestibilidad pépsica se determina en SW de acuerdo con la Directiva 72/199/CE, sin desengrasar.

Dosificación de trehalosa en SW y SPC

La trehalosa se determina en SW y SPC después de su liofilización. Se extraen 40 mg de muestra seca con 2 mL de DMSO durante 1 hora, con agitación a 80 °C. Se extraen 250 µL del extracto con 50 µL de mio-inositol, utilizado como estándar interno (1 g/L en DMSO). Después de la homogeneización, 100 µL de esta mezcla se derivó con 100 µL de BSTFA-TMCS (99 :1) directamente en el vial GC-MS durante 30 minutos a 60°C. Antes de la inyección, 600 µL de acetonitrilo se agregan al vial GC-MS. Los resultados se expresan/ en mg de trehalosa/g en seco utilizando un rango estándar de trehalosa realizado en las mismas condiciones (Fig. 3).

Los extractos derivados y los diferentes puntos de rango estándar se analizan en un GC-MS-QP2010 de Shimadzu. La columna utilizada es una columna SH-Rxi 5 ms (Schimadzu) de 30 m de longitud, de 0.25 mm de diámetro y tamaño de partícula de 0.25 µm. El programa de temperatura del GC-MS es el siguiente: 100 °C, seguido de una rampa de 10 °C/minuto hasta 300 °C mantenida durante 2 minutos.

La temperatura del inyector es de 280 °C, la de la interfaz es de 250 °C, la relación de división es de 10, el volumen de inyección es de 1 µL. La detección se realiza en modo SIM (Monitoreo de iones seleccionado, por sus siglas en inglés) con m/z específico de 305 para mio-inositol y de 361 para trehalosa.

Medición del color de SW liofilizada

El color se ha comparado con una carta de colores (Carta de colores RAL Classic K7) y se caracterizó por el código de color de esta carta de colores.

Determinación de la fracción soluble de SPC

Los experimentos se realizaron a partir de SPC liofilizadas. 1 g de muestra se pesa (m_i) en un tubo de 50 mL previamente calibrado. Se agregan 30 mL de agua a temperatura ambiente y el tubo se agita (con un vórtex) durante varios minutos. Después de la centrifugación, el líquido sobrenadante se elimina y se realiza un segundo lavado con 30 mL de agua en las mismas condiciones que el primero. Después de retirar el sobrenadante, el sedimento de SPC lavado se coloca en un horno a 60°C durante 48 horas y luego se pesa. Asimismo, se coloca un control (SPC sin lavar) en el horno para determinar el

porcentaje de materia seca real y corregir el peso inicial de las muestras antes del lavado (% MS).

El porcentaje de producto soluble se determina como:

$$\frac{(\mathrm{mi} \times \%\mathrm{MS}) - \mathrm{mSPC\ sin\ lavar}}{\mathrm{mi} \times \%\mathrm{MS}}$$

Determinación del tamaño de proteínas solubles de SPC

El tamaño de las proteínas solubles de SPC es determinado por cromatografía de exclusión molecular.

Se solubilizan 40 mg de muestra liofilizada en la fase móvil compuesta de acetonitrilo/H_2O/TFA (ácido trifluoroacético) (30/70/0.1) para alcanzar una concentración de 30 mg/mL y se filtraron a 45 µm después de la centrifugación utilizando el filtro chromafil xtra PES-45/25. En paralelo, la solubilidad de SW seca y SPC en la fase móvil se determina después de secar los residuos de centrifugación en el horno.

Las condiciones para llevar a cabo la cromatografía realizada en una cadena de HPLC Nexera XR de Shimadzu son las siguientes: la columna utilizada es una Superdex Peptide GL 10/300 (GE Healthcare), la detección se realiza mediante un detector DAD a 215 nm, el flujo/ de la fase móvil (modo isocrático) es de 0.3 mL/min. Está compuesta por una mezcla de acetonitrilo/H_2O/TFA (ácido trifluoroacético) (30/70/0.1), el análisis se lleva a cabo a 25°C.

Para determinar la distribución del peso molecular, primero se inyectaron cuatro proteínas “estándar” de peso molecular conocido para definir los intervalos de tiempo de retención correspondientes a diferentes pesos moleculares. Para analizar la distribución molecular de las muestras, el área total del cromatograma se integra primero a 215 nm y después se separa en fracciones correspondientes a las cinco categorías de peso molecular. Los resultados se expresan en porcentaje de proteínas solubles por categorías de peso molecular.

La determinación de la parte soluble en la fase móvil se obtiene de manera análoga a la del agua, pero al 25 % (temperatura del análisis).

III. Resultados

1. Fracción oleosa

Los resultados para la fracción oleosa se muestran en las figuras 4, 5 y 6.

Las figuras 4 y 5 relacionadas con el contenido de humedad y el contenido de sedimentos muestran la separación de la fracción oleosa es significativamente mejor en el método de acuerdo con la invención. En efecto, vemos en estas figuras un mayor contenido de humedad y sedimento en la fracción oleosa de acuerdo con el método comparativo. Este resultado es inesperado porque es bien conocido por los técnicos en la materia que el aumento de una fase y/o el calentamiento generalmente mejora la separación de fases de un medio complejo.

Además, en la figura 6, se puede ver que el índice de peróxido de la fase oleosa obtenida por el proceso de acuerdo con la invención es menor al de la fase oleosa obtenida por el método comparativo. La fase oleosa obtenida por el método de acuerdo con la invención presenta una mejor capacidad de

conservación. Esto es particularmente ventajoso ya que permite evitar o reducir la adición de conservadores como antioxidantes.

2. Fracción acuosa

Los resultados para la fracción oleosa se muestran en las figuras 7 a 13.

En la figura 7, hay un menor contenido de humedad para la fracción acuosa obtenida por el método de acuerdo con la invención. Debido a la dilución, el contenido de materia seca es menos importante en el método comparativo, que en consecuencia requiere mayor maquinaria para recuperar la parte (materia seca) que es de interés y un uso más intenso en términos de consumo de energía y particularmente agua.

Las figuras 8 a 10 relacionadas con el contenido de sedimentos, el contenido de emulsión y el contenido de lípidos muestran que la separación de la fracción acuosa es significativamente mejor en el método de acuerdo con la invención En efecto, en estas figuras se muestra un mayor contenido de sedimentos, emulsión y lípidos en la fracción oleosa de acuerdo con el método comparativo. Este resultado es inesperado porque es bien conocido por los técnicos en la materia que el aumento de una fase y/o el calentamiento generalmente mejora la separación de fases de un medio complejo.

También se observa que:

- en la figura 11, la digestibilidad pépsica de las proteínas de la fracción acuosa obtenida por el método de acuerdo con la invención es mejor que la obtenida por el método comparativo; y
- en la figura 12, el contenido de trehalosa de la fracción acuosa obtenida por el método de acuerdo con la invención es mejor que el obtenido por el método comparativo.

La presencia de trehalosa es interesante porque la trehalosa tiene la capacidad de estabilizar las proteínas y, por lo tanto, se considera un conservador biológico natural.

Finalmente, la figura 13 muestra 3 fotografías de la fracción acuosa obtenida mediante el método de acuerdo con la invención, o mediante el método comparativo, y posteriormente se liofilizó. La fracción acuosa obtenida por el método de acuerdo con la invención tiene un color particularmente más claro. De estas figuras se deduce que se obtiene un producto diferente mediante el método de acuerdo con la invención. Esta diferencia de color puede explicarse potencialmente por la reacción de Maillard que puede tener lugar durante las etapas de coagulación y calentamiento acuoso que se llevan a cabo en el método comparativo. En la reacción de Maillard, las proteínas de tamaño pequeño presentes en el medio tienen más probabilidades de reaccionar, reduciendo el contenido de proteínas pequeñas en el medio. Esto puede resultar en particular una disminución en la digestibilidad de la fracción acuosa.

3. Fracción sólida

Los resultados para la fracción sólida se muestran en las figuras 14 a 17.

En la figura 14, se puede ver que el contenido de trehalosa de la fracción sólida obtenida por el método de acuerdo con la invención es mejor que el obtenido por el método comparativo

En la figura 15, se puede constatar que el contenido parcialmente soluble de la fracción sólida

obtenida por el método de acuerdo con la invención es mejor que el obtenido por el método comparativo. Es ventajoso tener un contenido significativo parcialmente soluble porque la porción soluble facilita la formulación de los alimentos y proporciona una mejor biodisponibilidad, incluida la liberación de proteínas más pequeñas.

En las figuras 16 y 17, se muestra que el contenido de proteínas pequeñas, es decir, proteínas menores a 550 Da, es mayor en la fracción sólida obtenida por el método de acuerdo con la invención que en la obtenida por el método comparativo.

Por lo tanto, se puede constatar que las proteínas pequeñas se conservan mejor mediante el método de acuerdo con la invención. Esto resulta en una mayor solubilidad en agua o en la fase móvil y en una proporción de proteínas más importante de tamaño pequeño en esta fracción sólida, el método comparativo probablemente contribuya a la degradación de estos productos durante las fases de coagulación y calefacción.

4. Consumo de energía

Finalmente, se realizaron cálculos de consumo de energía para comparar el método de acuerdo con la invención con los dos métodos comparativos.

El método comparativo a una dilución 1:0.5 genera un costo 19.8 veces mayor que el del método de acuerdo con la invención y el método comparativo a una dilución de 1:0.75 genera un costo 20.2 veces mayor que el del método de acuerdo con la invención.