

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 534**

51 Int. Cl.:

C12P 19/26 (2006.01)

C08B 37/08 (2006.01)

C12P 21/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.12.2015 PCT/FR2015/053785**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.07.2016 WO16108037**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.12.2015 E 15830828 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2019 EP 3240905**

54 Título: **Polvo de coleóptero**

30 Prioridad:

31.12.2014 FR 1463512
20.10.2015 FR 1560012

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.11.2019

73 Titular/es:

YNSECT (100.0%)
1 Rue Pierre Fontaine
91058 Evry Cedex, FR

72 Inventor/es:

ARMENJON, BENJAMIN;
BEREZINA, NATHALIE;
LAURENT, SOPHIE;
SOCOLSKY, CÉCILIA;
SANCHEZ, LORENA y
HUBERT, ANTOINE

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 733 534 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Polvo de coleóptero

5 La presente invención se refiere a un insecto en polvo. También se refiere a un método para la preparación de este polvo y su uso en el consumo humano o animal, y más en particular en piensos para peces.

La acuicultura es ahora uno de los sectores más dinámicos en la industria alimentaria. La alta demanda de peces ha dado como resultado un aumento significativo en el precio de los piensos destinados a la cría de peces.

10 Uno de los productos más utilizados en la alimentación de peces es la harina de pescado. La harina de pescado es una de las principales fuentes de proteínas en los alimentos para acuicultura. Es una harina muy rica en proteínas animales (ricas en aminoácidos de tipo lisina y metionina) que son fáciles de digerir. Una demanda creciente acompañada por una oferta limitada ha resultado en un aumento significativo en su precio, creando un riesgo para el crecimiento sostenible de la acuicultura. Por lo tanto, existe una gran demanda de fuentes alternativas de proteínas de alta calidad y, en la medida de lo posible, renovables para la acuicultura.

15 Las harinas para insectos ofrecen fuentes de proteínas de reemplazo natural y la posibilidad de ser producidas en masa con una huella ecológica mínima. En particular, ciertos coleópteros, como el Tenebrio molitor, tienen la ventaja de ser adecuados para la producción en masa intensiva.

20 Sin embargo, los resultados de las pruebas de sustitución de harina de pescado por varias harinas de insectos han sido dispares. En caso de que la sustitución sea posible, generalmente no excede el 50 %; más allá de este contenido se observan efectos perjudiciales para el crecimiento de los peces.

25 El documento XP002757230; "Des insectes dans la farine", JDD París, 19-12-2012, página 1, se refiere al posible uso de harina de insectos como las harinas de Tenebrio molitor, que es un coleóptero, en la industria alimentaria.

30 El trabajo de los inventores ha hecho posible demostrar que un polvo de insecto específico podría usarse ventajosamente para reemplazar una harina de pescado en la alimentación acuícola.

35 Por lo tanto, la presente invención se refiere a un polvo de coleópteros que comprende al menos un 67 % en peso de proteínas y al menos un 5 % en peso de quitina, dándose los porcentajes en peso con respecto al peso total de polvo de coleóptero.

Se observará que en el contexto de la presente solicitud, y a menos que se estipule lo contrario, se entiende que los rangos de valores indicados son inclusivos.

40 Por "polvo de coleóptero" se entiende una composición, en forma de partículas, preparada únicamente a partir de coleópteros y, opcionalmente, agua.

45 El contenido de humedad residual del polvo de coleóptero está comprendido entre el 2 y el 15 %, preferiblemente entre el 5 y el 10 %, más preferiblemente entre el 4 y el 8 %. Este contenido de humedad puede determinarse, por ejemplo, de acuerdo con el método del Reglamento 152/2009 de la CE de 27 de enero de 2009 (103 °C/4 h).

A lo largo de la solicitud, cuando no se especifica una fecha para un reglamento, una norma o una directiva, se refiere a la regulación, norma o directiva vigente en la fecha de presentación.

50 Cuando el polvo de coleóptero se muele a un tamaño de partícula aceptable para el consumo humano o animal, este último se puede denominar "harina de coleópteros". Por "tamaño de partícula aceptable para el consumo humano 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.

55 Preferiblemente, los coleópteros preferidos de acuerdo con la invención pertenecen a las familias de Tenebrionidae, Melolonthidae, Dermestidae, Coccinellidae, Cerambycidae, Carabidae, Buprestidae, Cetoniidae, Dryophthoridae, o sus mezclas.

60 Más preferiblemente, son los siguientes coleópteros: Tenebrio molitor, Aiphitobius diaperinus, Zophobas morio, Tenebrio obscurus, Tribolium castaneum y Rhynchophorus ferrugineus, o sus mezclas.

Por "proteínas", se entiende la cantidad de proteínas brutas. La cuantificación de proteínas brutas es bien conocida por los expertos en la materia. A modo de ejemplo, se puede mencionar el método Dumas o el método Kjeldahl. Preferiblemente, se utiliza el método Dumas, correspondiente a la norma NF EN ISO 16634-1 (2008).

65 Preferiblemente, el polvo de coleóptero comprende un 68 % en peso de proteínas brutas, más preferiblemente un 70 % en peso de proteínas brutas, dándose los porcentajes en peso con respecto al peso total de polvo de

coleóptero.

De acuerdo con la invención, por "quitina" se entiende cualquier tipo de derivado de quitina, es decir, cualquier tipo de derivado de polisacárido que comprende unidades de N-acetil-glucosamina y unidades de D-glucosamina, en particular los copolímeros de quitina-polipéptido (a veces denominados "compuesto de quitina-polipéptido"). Estos copolímeros también pueden combinarse con pigmentos, a menudo del tipo melanina.

La quitina sería el segundo polímero más sintetizado en el mundo vivo después de la celulosa. De hecho, la quitina es sintetizada por numerosas especies del mundo vivo: constituye parte del exoesqueleto de los crustáceos e insectos y de la pared lateral que rodea y protege a los hongos. Más en particular, en insectos, la quitina constituye así del 3 al 60 % de su exoesqueleto.

El contenido de quitina se determina por extracción de la misma. Dicho método puede ser el método AOAC 991.43 descrito en el Ejemplo 2, y es un método preferido para esta determinación.

Preferiblemente, el polvo comprende entre el 5 y el 16 % en peso de quitina, más preferiblemente entre el 8 y el 14 % de quitina, dándose los porcentajes en peso con respecto al peso total de polvo de coleóptero.

El polvo de coleóptero de acuerdo con la invención comprende un alto contenido de proteínas brutas. Dicho contenido generalmente se obtiene solo por un método de tratamiento de coleópteros que comprende una etapa de hidrólisis. Sin embargo, una etapa de hidrólisis tiene el efecto de reducir el contenido de quitina a un nivel del orden del 5 % en peso, tal como menos del 5 % en peso, con respecto al peso total de la composición.

Sin embargo, la quitina a menudo se considera como un tipo de factor antinutricional porque es difícil de digerir. Esto explica por qué para las aplicaciones en el sector agroalimentario, las composiciones a base de insectos se desquitinizan, es decir, se lleva a cabo una etapa para eliminar la quitina. El trabajo de los inventores también permitió demostrar que, contrariamente a la creencia popular, la quitina no tuvo impacto en el crecimiento de peces alimentados con un polvo de coleóptero de acuerdo con la invención que comprende un contenido significativo de quitina (ver el Ejemplo 4 a continuación). Por el contrario, el polvo de coleóptero de acuerdo con la invención puede reemplazar ventajosamente no solo una parte, sino toda la harina de pescado en un pienso para acuicultura. De hecho, el polvo de coleóptero de acuerdo con la invención hace posible mejorar el crecimiento de animales alimentados con este polvo.

Además, durante el proceso de fabricación de alimentos, la introducción del polvo de coleóptero de acuerdo con la invención también tiene ciertas ventajas: reducir las pérdidas de vitaminas solubles en agua durante los tratamientos térmicos opcionales y reducir la energía requerida durante una etapa de extrusión opcional.

Ventajosamente, el polvo de coleóptero de acuerdo con la invención tiene un contenido de ceniza inferior o igual al 4 % en peso con respecto al peso total del polvo de coleóptero, e incluso más ventajosamente inferior o igual al 3,5 %.

La ceniza constituye el residuo resultante de la combustión de la composición de acuerdo con la invención.

El método para determinar el contenido de cenizas es bien conocido por los expertos en la materia. Preferiblemente, el contenido de cenizas se determinó de acuerdo con el método establecido por el reglamento 152/2009 de la CE de 27 de enero de 2009.

El contenido de grasa del polvo de coleóptero de acuerdo con la invención está comprendido preferiblemente entre el 5 y el 20 % en peso con respecto al peso total de polvo de coleóptero, más preferiblemente entre el 9 y el 17 %.

Los métodos para determinar el contenido de grasa son bien conocidos por los expertos en la materia. A modo de ejemplo y de manera preferida, este contenido se determinará de acuerdo con el método del reglamento 152/2009 de la CE.

Ventajosamente, las proteínas del polvo de coleóptero de acuerdo con la invención tienen una digestibilidad mayor o igual al 85 % en peso con respecto al peso total de proteínas brutas.

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

Preferiblemente, la digestibilidad es mayor o igual al 86 %, más preferiblemente mayor o igual al 88 %.

Ventajosamente, el polvo de coleóptero de acuerdo con la invención comprende entre el 35 y el 65 % en peso de proteínas solubles con respecto al peso total de proteínas, y al menos el 50 % de las proteínas solubles tienen un tamaño inferior o igual a 12.400 g/mol.

Por "peso total de proteínas" se entiende el peso de proteínas brutas presentes en el polvo de coleóptero de

acuerdo con la invención.

Por "proteínas solubles" se entiende, entre las proteínas brutas, aquellas que son solubles en una solución acuosa cuyo pH está comprendido entre 6 y 8, ventajosamente entre 7,2 y 7,6.

5 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 de NaCl, cuyo pH es igual a $7,4 \pm 0,2$.

10 La digestibilidad de las proteínas en seres humanos y animales está muy determinada por el tamaño de las proteínas. En el consumo animal, es común reducir el tamaño de las proteínas para facilitar la digestión de los animales. Esta reducción en el tamaño de las proteínas generalmente se lleva a cabo mediante procesos de hidrólisis (por ejemplo, enzimáticos), cuya implementación es particularmente costosa.

15 El polvo de coleóptero de acuerdo con la invención, obtenido mediante un método que no implica hidrólisis, comprende una gran cantidad de proteínas solubles cuyo tamaño se reduce suficientemente para facilitar la digestión de los animales. El polvo de coleóptero de acuerdo con la invención también tiene la ventaja de poder prepararse a un menor coste.

20 Ventajosamente, el polvo de coleóptero de acuerdo con la invención comprende entre el 38 y el 60 % en peso, preferiblemente entre el 43 y el 55 % en peso de proteínas solubles con respecto al peso total de proteínas.

Preferiblemente, al menos el 60 %, preferiblemente al menos el 70 % de las proteínas solubles tienen un tamaño inferior o igual a 12.400 g/mol.

25 Más en particular, las proteínas solubles tienen un tamaño comprendido entre 6500 y 12.400 g/mol.

Ventajosamente, menos del 10 %, preferiblemente menos del 8 %, más preferiblemente menos del 6 % de proteínas solubles tienen un tamaño mayor o igual a 29.000 g/mol.

30 A modo de ejemplo, el análisis por cromatografía de exclusión por tamaños de las proteínas solubles de un polvo de coleóptero de acuerdo con la invención se presenta en el Ejemplo 6.

35 La invención también describe un método para la preparación de un polvo de coleóptero de acuerdo con la invención.

El método para la preparación del polvo de coleóptero de acuerdo con la invención comprende una etapa de prensado de los coleópteros.

40 El objetivo del prensado es desaceitar los coleópteros y así obtener una torta de prensa con un contenido de aceite (o grasa) inferior o igual al 20 % en peso con respecto al peso seco de la torta de prensa, preferiblemente inferior o igual al 17 %.

45 La etapa de prensado se describe más detalladamente en la etapa 2 del método de preparación detallado a continuación.

En particular, es posible realizar prensado en caliente o en frío. Preferiblemente, se utiliza una prensa de un solo tornillo.

50 Más en particular, el método de preparación de acuerdo con la invención comprende las siguientes etapas:

- i) matar los coleópteros,
- ii) prensar los coleópteros para obtener una torta de prensa, y
- iii) moler la torta de prensa.

55 Los coleópteros pueden matarse mediante ebullición o escaldado, como se describe más detalladamente a continuación en la etapa 1 del método detallado.

De manera similar, la molienda se describe más detalladamente en la etapa 4 del método detallado.

60 Finalmente, el método de preparación de acuerdo con la invención también puede comprender una etapa de secado de la torta de prensa.

65 La etapa de secado se lleva a cabo ventajosamente después de la etapa de prensado y antes de la etapa de molienda.

El secado se describe más detalladamente en la etapa 3 del método detallado.

Método detallado para la preparación del polvo de coleóptero de acuerdo con la invención

5 Etapa 1: Matar los insectos

Esta etapa 1 de sacrificio puede llevarse a cabo ventajosamente mediante ebullición o escaldado. Esta etapa 1 hace posible matar los insectos mientras reduce la carga microbiana (reduciendo el riesgo de deterioro y riesgo para la salud) y desactivando las enzimas internas de los insectos que pueden provocar la autólisis, y por lo tanto un rápido oscurecimiento de los mismos.

Para la ebullición, los insectos, preferiblemente las larvas, se bullen con agua durante 2 a 20 min, preferiblemente de 5 a 15 min. Preferiblemente, el agua está a una temperatura comprendida entre 95 y 100 °C, preferiblemente a 100 °C.

La cantidad de agua introducida durante la ebullición se determina de la siguiente manera: la relación del volumen de agua en ml al peso en g de insecto está comprendida preferiblemente entre 0,3 y 10, más preferiblemente entre 0,5 y 5, incluso más preferiblemente entre 0,7 y 3, incluso más preferentemente es del orden de 1.

Para el escaldado, los insectos, preferiblemente las larvas, se escaldan con vapor (boquillas o lecho de vapor) a una temperatura comprendida entre 80 y 130°C, preferiblemente entre 90 y 120 °C, más preferiblemente entre 95 y 105 °C, incluso más preferiblemente a 98 °C o con agua a una temperatura comprendida entre 95 y 100 °C, preferiblemente a 100 °C (mediante boquillas de aspersión) o en modo mixto (agua + vapor) a una temperatura comprendida entre 80 y 130 °C, preferiblemente entre 90 y 120 °C, más preferiblemente entre 95 y 105 °C, incluso más preferiblemente a 98 °C. El tiempo de residencia en la cámara de escaldado está comprendido entre 1 y 15 minutos, preferiblemente entre 3 y 7 min.

• Etapa (opcional): Molienda

Los insectos se retiran del tanque de ebullición o de la cámara de escaldado, a continuación se tamizan (o escurren) y se ponen en un molinillo, como un molino de cuchillos, lo que hace posible reducir los insectos a partículas.

Para facilitar la molienda, se puede añadir una cantidad de agua. Esta cantidad de agua es similar a la introducida durante la etapa de ebullición 1: la relación del volumen de agua en ml al peso en g de insecto está comprendida preferiblemente entre 0,3 y 10, más preferiblemente entre 0,5 y 5, incluso más preferiblemente entre 0,7 y 3, incluso más preferiblemente es del orden de 1. También es posible mantener el agua hirviendo y/o el agua resultante del escaldado para llevar a cabo esta etapa.

Preferiblemente, al finalizar la molienda, el tamaño de las partículas de insecto es inferior a 1 cm (el mayor tamaño de partícula observable usando un microscopio), preferiblemente inferior a 0,5 cm. Preferiblemente, el tamaño de las partículas está comprendido entre 300 µm y 3 mm, más preferiblemente entre 500 µm y 1 mm. No es necesario reducir excesivamente el tamaño de las partículas, por ejemplo a un tamaño inferior a 250 µm.

• Etapa 2: Prensado

Los insectos que se obtienen en la etapa 1 de sacrificio, o la torta húmeda que se obtiene en la etapa de molienda opcional, se ponen en una prensa de acuerdo con un procedimiento que permite prensar y separar un jugo que comprende tanto una fracción grasa como una fracción proteica.

Preferiblemente, la etapa de prensado hace posible obtener una torta de prensa que comprende un contenido de aceite inferior o igual al 20 % en peso con respecto al peso seco de la torta de prensa, preferiblemente, inferior o igual al 17 %, más preferiblemente inferior a o igual al 15 %.

De manera similar, la etapa de prensado hace posible obtener una torta de prensa que tiene un contenido de materia seca comprendido entre el 30 % y el 60 %, preferiblemente comprendido entre el 40 % y el 55 %, y más preferiblemente comprendido entre el 45 % y el 55 %.

Se puede utilizar cualquier sistema de prensado para llevar a cabo la etapa de prensado, como, por ejemplo, una prensa de un solo tornillo o de dos tornillos (prensa de dos tornillos de tipo Angel), una prensa de filtro (filtro de prensa de tipo Choquet), una prensa de platina, etc. Estos sistemas son bien conocidos por un experto en la materia que puede determinar las condiciones de presión para obtener los contenidos de aceite y/o agua mencionados anteriormente.

En particular, es posible realizar el prensado en caliente o en frío. Ventajosamente, el prensado se realizará en caliente, lo que hace posible aumentar la eliminación de aceite de la torta de prensado. En particular, el prensado en caliente hace posible obtener una torta de prensa que comprende un contenido de aceite inferior o igual al 17 % en

peso con respecto al peso seco de la torta de prensa, preferiblemente inferior o igual al 15 %.

- Etapa 3: Secado

5 La torta de prensa se seca a continuación mediante las tecnologías convencionales conocidas por un experto en la materia. El secado puede ser directo o indirecto (secador de capa fina, "secador de paletas", "secador de tubos", "secador de discos", etc.) a una temperatura comprendida entre 60 °C y 260 °C, durante un período de 15 min a 24 h. A modo de ejemplo, la torta de prensa puede disponerse y secarse en aire ventilado/agitado a una temperatura comprendida entre 80 y 100 °C, preferiblemente a 90 °C durante un tiempo comprendido entre 3 y 7 horas, preferiblemente 5 horas.

El objetivo de esta etapa de secado es obtener una torta de prensa con un contenido de humedad comprendido entre el 2 y el 15 %, preferiblemente entre el 5 y el 10 %, incluso más preferiblemente entre el 4 y el 8 %.

- Etapa 4: Molienda final

La torta de prensa seca se pone a continuación en un molino, como un molino de martillos, lo que hace posible reducir la torta de prensa a partículas.

20 Ventajosamente, al completar esta molienda final, el tamaño de las partículas de insecto es inferior a 0,5 cm (el mayor tamaño de partícula observable usando un microscopio), preferiblemente del orden de 1 mm. Más en particular, el tamaño de partícula está comprendido entre 300 µm y 1 mm, incluso más preferiblemente entre 500 y 800 µm.

25 La sucesión de estas cuatro etapas hace posible obtener un polvo de coleóptero de acuerdo con la invención, que comprende un alto contenido de proteínas brutas mientras se mantiene un contenido de quitina del orden de al menos 5 % en peso con respecto al peso total de la composición.

Como se ha indicado anteriormente, la etapa de prensado se puede realizar en frío o en caliente.

30 A modo de ejemplo de un método para obtener el polvo de coleóptero de acuerdo con la invención, que implica un prensado en frío:

Las larvas, por ejemplo de *T. molitor*, se introducen en un vaso de precipitados que contiene 200 ml de agua que se lleva a ebullición de antemano, y se matan escaldándolas en un baño de agua a 100 °C. Las larvas se escurren y a continuación se mezclan con un volumen de agua de 200 ml. El líquido así obtenido se pasa a una prensa de doble tornillo. La torta de prensa así obtenida se seca durante 24 horas en un horno a 70 °C, a continuación se muele a 250 µm.

40 A modo de ejemplo de un método para obtener el polvo de coleóptero de acuerdo con la invención, que implica el prensado en caliente:

Las larvas, por ejemplo de *T. molitor*, se introducen en una cámara de escaldado y se escaldan en vapor durante 5 minutos a 100 °C. Las larvas así escaldadas se introducen a continuación en una prensa de tipo "secado" adecuada para productos cargados de agua. La torta de prensa así obtenida se seca durante 5 horas en un horno a 90 °C, y a continuación se muele en un molino de martillos a 1 mm.

45 Preferiblemente, el método para la preparación de un polvo de coleóptero de acuerdo con la invención comprende las siguientes etapas:

- 50 i) matar los coleópteros,
- ii) prensar los coleópteros para obtener una torta de prensa,
- iii) secar la torta de prensa, y
- iv) moler la torta de prensa.

55 De acuerdo con una primera realización del método de acuerdo con la invención, la etapa de prensado está precedida por una etapa de molienda de los coleópteros.

La invención se refiere así a un método para la preparación de un polvo de coleóptero de acuerdo con la invención que comprende las siguientes etapas:

- 60 i) matar los coleópteros,
- ii) prensar los coleópteros para obtener una torta de prensa,
- iii) secar la torta de prensa, y
- iv) moler la torta de prensa,

65 en la que la etapa de prensado está precedida por una etapa de molienda de los coleópteros.

Una ventaja de la etapa de molienda de los coleópteros antes del prensado se describe más detalladamente en el Ejemplo 5.

5 De acuerdo con una segunda realización del método de acuerdo con la invención, la etapa de prensado de los coleópteros se lleva a cabo en caliente.

La invención se refiere así a un método para la preparación de un polvo de coleóptero de acuerdo con la invención que comprende las siguientes etapas:

- 10
- i) matar los coleópteros,
 - ii) prensar los coleópteros para obtener una torta de prensa,
 - iii) secar la torta de prensa, y
 - iv) moler la torta de prensa,

15 en la que la etapa de prensado se realiza en caliente.

Como se ha indicado anteriormente, el prensado en caliente hace posible obtener una torta de prensa que comprende un contenido de aceite inferior o igual al 17 % en peso con respecto al peso seco de la torta de prensa, preferiblemente inferior o igual al 15 %.

20 De acuerdo con una tercera realización del método de acuerdo con la invención, la etapa de molienda de la torta de prensa se lleva a cabo hasta un tamaño de partícula comprendido entre 300 μm y 1 mm, preferiblemente entre 500 y 800 μm .

25 La invención se refiere así a un método para la preparación de un polvo de coleóptero de acuerdo con la invención que comprende las siguientes etapas:

- 30
- i) matar los coleópteros,
 - ii) prensar los coleópteros para obtener una torta de prensa,
 - iii) secar la torta de prensa, y
 - iv) moler la torta de prensa,

35 en la que la etapa de molienda de la torta de prensa se lleva a cabo hasta un tamaño de partícula comprendido entre 300 μm y 1 mm.

Más en particular, en esta tercera realización del método de acuerdo con la invención, la etapa de prensado de los coleópteros puede llevarse a cabo en caliente. Alternativamente, la etapa de prensado puede ir precedida por una etapa de molienda de los coleópteros.

40 La invención finalmente se refiere al uso del polvo de coleóptero de acuerdo con la invención en nutrición humana o animal.

Ventajosamente, el polvo de coleóptero de acuerdo con la invención se puede usar en alimentos para mascotas tales como perros, gatos, aves, peces, reptiles y roedores.

45 Más en particular, el polvo de coleóptero de acuerdo con la invención se puede usar en acuicultura (peces, crustáceos), piensos para aves de corral (pollos), cerdos, rumiantes (vacas, ovejas, cabras, caballos) y visones.

50 Finalmente, el polvo de coleóptero de acuerdo con la invención se puede usar ventajosamente para reemplazar la harina de proteína.

Por harina de proteína se entiende, más en particular, una harina de pescado, leche en polvo o lactoserum en polvo, harina de soja concentrada ("CSP"), harina de carne, como por ejemplo harina de pollo.

55 El reemplazo puede ser parcial o total.

Preferiblemente, el polvo de coleóptero de acuerdo con la invención se usa para el reemplazo parcial o total de una harina de pescado, tal como un reemplazo del 50 o el 100 %.

60 Otras características y ventajas de la invención se harán evidentes a partir de los siguientes ejemplos, dados a modo de ilustración, con referencia a:

- 65
- la Fig. 1, que es un diagrama que ilustra las variaciones en las temperaturas del agua y los niveles de oxígeno disuelto en los tanques donde se criaron truchas alimentadas con diferentes dosis de polvo de coleóptero de acuerdo con la invención,
 - la Fig. 2, que comprende dos diagramas que ilustran el impacto en el peso corporal final (Fig. 2A) y el índice de

consumo (Fig. 2B) de truchas alimentadas con diferentes dosis de polvo de coleóptero de acuerdo con la invención,

- la Fig. 3, que ilustra la distribución de los lípidos que se obtienen del insecto que se encuentra en el jugo y la torta de prensa obtenida por un método que comprende una etapa de prensado o una etapa de molienda y a continuación prensado,
- la Fig. 4, que es un diagrama que representa el análisis por cromatografía de exclusión por tamaños de las proteínas del polvo de coleóptero de acuerdo con la invención.

Ejemplo 1: Método para la preparación de un polvo de coleóptero de acuerdo con la invención

Los coleópteros utilizados para preparar el polvo de coleóptero son larvas de Tenebrio molitor. Al recibir las larvas, pueden almacenarse a 4 °C durante 0 a 15 días en sus tanques de cría sin mayor degradación antes de ser sacrificadas. El peso (edad) de las larvas utilizadas es variable y, como resultado, su composición puede variar, como se ilustra en la Tabla 1 a continuación:

Tabla 1: Composición bioquímica de larvas de Tenebrio molitor según su peso

Biomasa (insectos)	mg	23	35	58	80	108	154
Materia seca	%*	34	34	34,2	37,9	39,6	39,5
Ceniza	%*	1,59	1,52	1,6	1,75	1,67	1,43
Proteínas brutas	%*	22,6	22,2	22	23,2	23,1	23,2
Lípidos	%*	6,62	6,88	7,98	10,3	10,9	11,7

* El % se expresa como peso seco en relación con el peso húmedo de las larvas.

- Etapa 1: Escaldado de los insectos

Las larvas vivas (+4 °C a +25 °C) se transportan en capas con un espesor comprendido entre 2 y 10 cm, en una cinta transportadora perforada (1 mm) a una cámara de escaldado. De este modo, los insectos se escaldan en vapor (boquillas o lecho de vapor) a 98 °C o en agua a 100 °C (boquillas de pulverización) o en modo mixto (agua + vapor). El tiempo de residencia en la cámara de escaldado está comprendido entre 1 y 15 minutos, idealmente 5 min.

La temperatura de las larvas después del escaldado está comprendida entre 75 °C y 98 °C.

- Etapa 2: Prensado

Las larvas, una vez escaldadas, se transportan a la tolva de alimentación de una prensa continua de un solo tornillo. Mientras pasan a la prensa, las larvas se mantienen a una temperatura superior a 70 °C para aumentar los rendimientos de eliminación de aceite. El principio de la eliminación de aceite es presurizar el material dentro de una jaula cilíndrica mediante una disposición de tornillos y anillos dispuestos en el eje central. La jaula está forrada en el interior con barras distribuidas en secciones y separadas por espacios de diferentes espesores según el área de trabajo. Los intersticios así dispuestos permiten el flujo de una fracción de aceite/grasa al tiempo que limitan el paso de la denominada materia "seca", la fracción de proteína, que se denomina "torta de prensa", participa así en el prensado.

Los rendimientos de prensado obtenidos están comprendidos entre 48 y 55 %.

$$R_{torta} = (masa_{torta} / masa_{jugo} + masa_{torta})$$

La torta de prensa obtenida contiene del 35 al 40 % de materia seca, del 67 al 75 % de proteínas y del 13 al 17 % de grasas, los porcentajes en peso se dan en relación con el peso seco de la torta de prensa.

- Etapa 3: Secado

La torta de prensa se pone a continuación en una bandeja en una capa delgada (aproximadamente 2 cm) y se seca en aire ventilado/agitado a 90 °C durante 5 horas para obtener una torta de prensa con un contenido de materia seca superior al 92 %.

Esta etapa permite prevenir cualquier contaminación que haya ocurrido desde el sacrificio.

La Aw (actividad de agua) después del secado es de 0,35. Los resultados microbiológicos muestran una ausencia de especies de Salmonella (método: IRIS Salmonella BKR 23/07-10/11) y valores de Enterobacterias inferiores a 10 UFC/g (método: NF ISO 2128-2, diciembre de 2004, 30 °C y 37 °C).

- Etapa 4: Molienda

La torta de prensado seca, que comprende principalmente proteínas, se muele finalmente con un molino de martillo continuo (6 partes móviles reversibles, espesor 8 mm). El molino es alimentado por una tolva con una tapa de control de caudal (180 kg/h). La parrilla perforada utilizada para controlar la granulometría de salida es de 0,8 mm. La velocidad de rotación del motor es de 3000 rpm (motorización eléctrica, potencia absorbida 4 kW (5,5 CV)).

5

Ejemplo 2: Caracterización del polvo de coleóptero de acuerdo con la invención

Se caracterizó el polvo de coleóptero preparado en el Ejemplo 1.

10

1. Análisis

1.1 Determinación del contenido de humedad

15

El contenido de humedad se determina de acuerdo con el método que se obtiene en el Reglamento CE 152/2009 de 27 de enero de 2009 (103 °C/4 h).

1.2 Determinación de la cantidad de proteínas brutas

20

Las proteínas brutas se determinan de acuerdo con el método denominado de Dumas y corresponden a la norma NF EN ISO 16634-1 (2008).

1.3 Determinación de la cantidad de quitina

25

Las fibras alimentarias en la harina de insectos están compuestas esencialmente de quitina, esta última se analizó por lo tanto de acuerdo con el método AOAC 991.43. Los valores así obtenidos se sobreestiman ligeramente como consecuencia.

1.4 Determinación de la cantidad de grasa

30

La grasa se determinó de acuerdo con el método del Reglamento CE 152/2009.

1.5 Determinación de la cantidad de ceniza

35

La ceniza bruta se determinó de acuerdo con el método según el Reglamento CE 152/2009 de 27 de enero de 2009.

1.6 Determinación de la cantidad de fósforo

40

El fósforo se analiza mediante ICP ("plasma acoplado inductivamente") con calibración interna.

1.7 Determinación de la energía

El valor energético se obtiene con los coeficientes del Reglamento 1169/2011 de la UE.

45

1.8 Determinación de las cantidades de aminoácidos y ácidos grasos

Esta determinación se llevó a cabo mediante cromatografía de gases después de hidrólisis y derivatización de los aminoácidos y ácidos grasos, respectivamente.

1.9 Determinación de la digestibilidad de la pepsina

50

La digestibilidad de la pepsina se mide mediante el método descrito en la Directiva 72/199/CE.

2. Resultados

55

La composición de este polvo de coleóptero se presenta en la Tabla 2 a continuación.

Macronutriente	Unidad	Polvo
Humedad	%*	5,32
Proteína	%*	67,09
Quitina	%*	8,0
Materia grasa	%*	13,6
Ceniza	%*	3,21
Fósforo total	%*	0,75
Energía	MJ/kg	23,74

Aminoácidos	Unidad	Polvo
Arginina	%*	2,56
Histidina	%*	1,39
Isoleucina	%*	2,11
Leucina	%*	3,99
Lisina	%*	3,32
Treonina	%*	1,87
Valina	%*	2,91
Metionina	%*	1,43
Cisteína	%*	0,63
Fenilalanina	%*	1,98
Tirosina	%*	2,68
La taurina	%*	0,42
Ácido aspártico + asparagina	%*	4,51
Ácido glutámico + glutamina	%*	6,36
Alanina	%*	3,83
Glicina	%*	2,54
Prolina	%*	3,18
Serina	%*	2,94

Ácidos grasos	Unidad	Polvo
C12:0	%*	0,03
C14:0	%*	0,22
C15:0	%*	0,01
C16:0	%*	1,33
C16:1	%*	0,05
C16:1n-7	%*	0,16
C17:0	%*	0,02
C17:1	%*	0,01
C18:0	%*	0,35
C18:1n-9	%*	3,03
C18:1n-7	%*	0,04
C18:2n-6	%*	2,96
C18:2tn-6	%*	0,02
C18:3n-3	%*	0,14
C20:0	%*	0,02
C20:1n-9	%*	0,01
C20:2n-6	%*	0,01
C22:0	%*	0,01

* Los porcentajes en peso se expresan en relación con el peso total del polvo.

Tabla 2: Composición del polvo de coleóptero

Además, se obtiene una digestibilidad de pepsina del 90 ± 2 %.

5

Ejemplo 3: Método alternativo para la preparación de un polvo de coleóptero de acuerdo con la invención

10

Se introducen 200 g de larvas de *T. molitor* en un vaso de precipitados, se ponen en un baño de agua a 100 °C y que contiene 200 ml de agua que se lleva previamente a ebullición. Después de 5 minutos, el vaso de precipitados se retira del baño de agua, las larvas se escurren y a continuación se mezclan con un volumen de agua de 200 ml. El líquido así obtenido se pasa a una prensa de tipo de doble tornillo. La torta de prensa así obtenida se seca durante 24 horas en un horno a 70 °C, y a continuación se muele a 250 µm. Se obtiene así un polvo de coleóptero.

15

Ejemplo 4: Introducción del polvo de coleóptero de acuerdo con la invención en la alimentación de peces

En el presente ejemplo, se estudió el efecto de incluir un polvo de coleóptero en la alimentación sobre el crecimiento, el aporte de alimento, la conversión alimentaria, la composición corporal y la digestibilidad aparente de los nutrientes en la trucha arco iris.

20

1. Material y métodos

1.1. Polvo de coleóptero

25

El polvo de coleóptero utilizado en este ejemplo es el que se obtiene de acuerdo con el Ejemplo 1 y se describe más detalladamente en el Ejemplo 2.

1.2. Dietas experimentales

30

Se formuló una dieta a base de harina de pescado (CTRL) con ingredientes convenientes para satisfacer las necesidades nutricionales conocidas de la trucha arco iris juvenil. Esta dieta CTRL está compuesta por un 25 % de harina de pescado, 8 % de otras fuentes de proteínas de origen marino (harina de calamar y harina de krill), mientras que las fuentes de proteínas restantes fueron un concentrado de proteína de soja, gluten de trigo y gluten de maíz. Sobre la base de esta formulación, se formularon cuatro dietas de prueba (Y5, Y7,5, Y15 e Y25), en las cuales la

harina de pescado se reemplazó con polvo de coleóptero en contenidos respectivos de 20, 30, 60 y 100 % (ver Tabla 3 a continuación).

Tabla 3: Formulación y composición de dietas experimentales.

Ingredientes en % *:	CTRL	Y5	Y7,5	Y15	Y25
Harina de pescado LT70 ¹	25,00	20,00	17,50	10,00	0,00
Harina de krill ²	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Harina de calamar ³	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Polvo de coleóptero		5,00	7,50	15,00	25,00
Concentrado de proteínas de soja ⁴	14,00	14,00	14,00	14,00	14,00
Gluten de trigo ⁵	9,05	9,25	9,40	9,65	10,10
Gluten de maíz ⁶	8,20	8,20	8,20	8,20	8,20
Harina de soja 48	7,50	7,50	7,50	7,50	7,50
Guisantes enteros	6,15	5,75	5,40	4,75	3,70
Aceite de pescado	11,50	11,50	11,50	11,50	11,50
Aceite de colza	6,00	5,80	5,70	5,40	5,00
Pre-mezcla de vitaminas y minerales ⁷	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
Lecitina de soja	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Goma de guar	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Antioxidante	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Propionato de sodio	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Fosfato monocalcico	1,30	1,70	2,00	2,60	3,50
DL-metionina	0,30	0,30	0,30	0,40	0,50
Óxido de itrio ⁸	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Materia seca (MS), % *	93,4 ± 0,0	93,1 ± 0,0	93, ± 0,1	95,0 ± 0,0	93,2 ± 0,0
Proteína bruta, % de MS **	48,5 ± 0,0	48,5 ± 0,1	48,5 ± 0,0	48,5 ± 0,0	48,5 ± 0,1
Materias grasas brutas, % de MS **	22,7 ± 0,2	22,7 ± 0,1	22,6 ± 0,2	22,7 ± 0,2	22,7 ± 0,2
Ceniza, % de MS **	9,4 ± 0,0	8,8 ± 0,0	8,7 ± 0,1	8,1 ± 0,0	7,4 ± 0,0
Quitina, % de MS **	0,06	0,46	0,66	1,26	2,06
Energía bruta, MJ/kg de	23,2 ± 0,2	23,2 ± 0,0	23,2 ± 0,0	23,2 ± 0,1	23,2 ± 0,1

*% de materia seca en relación con el peso total de la composición
 **% en peso seco en relación con el peso total de la materia seca
¹ Harina de pescado peruana LT70: 71 % de proteína bruta (PB), 11 % de grasa bruta (MGB), EXALMAR, Perú
² Harina de krill: 61 % de PB, 19 % de MGB, Aker BioMarine Antarctic AS, Noruega
³ Super Prime sin vísceras: 82 % de PB, 3,5 % de MGB, Sopropêche, Francia;
⁴ Soycomil P: 62 % de PB, 0,7 % de MGB, ADM, Países Bajos;
⁵ VITEN: 84,7 % de PB, 1,3 % de MGB, ROQUETTE, Francia;
⁶ Harina de gluten de maíz: 61 % de PB, 6 % de MGB, COPAM, Portugal;
⁷ PREMIX Lda, Portugal. Vitaminas (UI o mg/kg de dieta): acetato de DL-alfa tocoferol, 100 mg; Bisulfato de sodio y menadiona, 25 mg; Acetato de retinilo, 20.000 UI; DL-colecalciferol, 2000 UI; tiamina, 30 mg; riboflavina, 30 mg; piridoxina, 20 mg; cianocobalamina, 0,1 mg; ácido nicotínico, 200 mg; ácido fólico, 15 mg; ácido ascórbico, 1000 mg; inositol, 500 mg; biotina, 3 mg; pantotenato de calcio, 100 mg; cloruro de colina, 1000 mg, betaína, 500 mg. Minerales (g o mg/kg): carbonato de cobalto, 0,65 mg; sulfato de cobre, 9 mg; sulfato férrico, 6 mg; yoduro de potasio, 0,5 mg; óxido de manganeso, 9,6 mg; selenito de sodio, 0,01 mg; sulfato de zinc, 7,5 mg; cloruro de sodio, 400 mg; carbonato de calcio, 1,86 g; excipiente de trigo;
⁸ El óxido de itrio se ha incorporado en solo una fracción de los alimentos utilizados para las mediciones de digestibilidad.

5 Los niveles de harina de calamar y de krill se mantuvieron constantes en todas las dietas para garantizar una alta palatabilidad. Se hicieron ajustes menores a la formulación de las dietas probadas para mantener las condiciones isonitrogenadas (proteína bruta, 48,5 % de MS), condiciones isolipídicas (22,7 % de MS) y condiciones isoenergéticas (energía bruta, 23,2 MJ/kg MS). Los niveles de suplementación con metionina y fosfato monocalcico en las dietas probadas se ajustaron para corresponder a los encontrados en la alimentación de CTRL.

15 Las dietas se produjeron por extrusión (tamaños de gránulos: 1,2 y 2,0 mm) utilizando una extrusora de doble tornillo CLEXTRAL BC45 en una escala piloto con un diámetro de tornillo de 55,5 mm y un rango de temperatura de 119 a 123 °C. Los lotes de alimentos extruidos se secaron en un secador de lecho fluidizado vibrante (modelo DR100, TGC Extrusion, Francia). Después de enfriar los gránulos, los aceites se añadieron mediante recubrimiento al vacío (modelo PG-10VCLAB, Dinnisen, Países Bajos). A lo largo de la duración de la prueba, los alimentos experimentales se almacenaron a temperatura ambiente, pero en un lugar fresco y bien ventilado. Se tomaron muestras representativas de cada dieta para su análisis (Tablas 4-5).

20

Tabla 4: Perfil de aminoácidos de las dietas experimentales.

Aminoácidos	CTRL	Y5	Y7,5	Y15	Y25
Arginina	4,62 ± 0,23	4,53 ± 0,02	4,49 ± 0,23	4,27 ± 0,09	3,89 ± 0,09
Histidina	1,47 ± 0,11	1,56 ± 0,02	1,54 ± 0,09	1,46 ± 0,07	1,50 ± 0,08
Isoleucina	2,31 ± 0,01	2,52 ± 0,01	2,53 ± 0,01	2,46 ± 0,02	2,49 ± 0,00
Leucina	4,51 ± 0,08	4,44 ± 0,01	4,68 ± 0,05	4,46 ± 0,02	4,56 ± 0,01
Lisina	3,09 ± 0,19	3,09 ± 0,01	3,02 ± 0,17	2,94 ± 0,01	2,97 ± 0,03
Treonina	2,32 ± 0,03	2,37 ± 0,00	2,31 ± 0,03	2,14 ± 0,05	2,15 ± 0,02
Valina	2,75 ± 0,00	2,87 ± 0,02	3,00 ± 0,03	3,08 ± 0,01	3,18 ± 0,01
Metionina	1,71 ± 0,15	1,71 ± 0,01	1,75 ± 0,06	1,74 ± 0,02	1,63 ± 0,02
Cisteína	0,35 ± 0,02	0,34 ± 0,00	0,31 ± 0,02	0,33 ± 0,00	0,34 ± 0,00
Fenilalanina	3,30 ± 0,00	3,06 ± 0,01	2,92 ± 0,15	2,85 ± 0,01	2,56 ± 0,00
Tirosina	2,44 ± 0,11	2,48 ± 0,00	2,67 ± 0,14	2,92 ± 0,04	3,14 ± 0,12
Taurina	0,20 ± 0,01	0,20 ± 0,00	0,21 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,04 ± 0,00

Los contenidos se indican en % en peso con respecto al peso total de los gránulos antes del secado.

Tabla 5: Síntesis del perfil de ácidos grasos de las dietas experimentales

Ácidos grasos	CTRL	Y5	Y7,5	Y15	Y25
C14:0	0,40 ± 0,00	0,40 ± 0,00	0,38 ± 0,00	0,43 ± 0,00	0,38 ± 0,00
C16:0	1,86 ± 0,01	1,89 ± 0,01	1,82 ± 0,02	2,11 ± 0,01	1,94 ± 0,02
C16:1n-7	0,48 ± 0,00	0,48 ± 0,00	0,44 ± 0,00	0,50 ± 0,00	0,42 ± 0,01
C18:0	0,49 ± 0,00	0,50 ± 0,01	0,47 ± 0,01	0,54 ± 0,00	0,50 ± 0,01
C18:1n-9	1,62 ± 0,01	1,74 ± 0,01	1,69 ± 0,01	2,08 ± 0,01	2,06 ± 0,02
C18:1n-7	0,26 ± 0,00	0,25 ± 0,00	0,23 ± 0,00	0,25 ± 0,00	0,21 ± 0,00
C18:2n-6	0,79 ± 0,00	0,94 ± 0,01	1,05 ± 0,01	1,36 ± 0,01	1,53 ± 0,02
C18:3n-3	0,13 ± 0,00	0,13 ± 0,00	0,13 ± 0,00	0,14 ± 0,00	0,12 ± 0,00
C18:4n-3	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,08 ± 0,00
C20:1n-9	0,20 ± 0,00	0,19 ± 0,00	0,17 ± 0,00	0,18 ± 0,00	0,14 ± 0,00
C20:4n-6	0,14 ± 0,00	0,13 ± 0,00	0,12 ± 0,00	0,14 ± 0,00	0,12 ± 0,00
C20:5n-3	0,72 ± 0,00	0,71 ± 0,01	0,65 ± 0,00	0,70 ± 0,00	0,57 ± 0,01
C22:1n-11	0,14 ± 0,00	0,13 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,12 ± 0,00	0,08 ± 0,00
C22:5n-3	0,14 ± 0,00	0,13 ± 0,00	0,12 ± 0,00	0,13 ± 0,00	0,10 ± 0,00
C22:6n-3	1,45 ± 0,01	1,44 ± 0,01	1,33 ± 0,01	1,46 ± 0,01	1,21 ± 0,02

Los contenidos se indican en % en peso con respecto al peso total de los gránulos antes del secado.

5 1.3. Prueba de rendimiento de crecimiento

Se alimentaron grupos triplicados de 35 truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), con un peso corporal inicial (PCI) de 5,01 ± 0,1 g con una de las cinco dietas experimentales durante 90 días. Los peces crecieron en tanques circulares de fibra de vidrio (volumen: 250 l) suministrados con un flujo continuo de agua dulce a temperaturas comprendidas entre 14,1 ± 0,3 °C y niveles de oxígeno disuelto por encima de 7,4 mg/l (véase Fig. 1). Los peces fueron sometidos a condiciones veraniegas con cambios de fotoperíodo naturales (mayo-julio). Los peces fueron alimentados a mano hasta la saciedad aparente, tres veces al día (9h00, 14h00 y 18h00) durante la semana y dos veces al día los fines de semana (10h00 y 16h00), teniendo el mayor cuidado para evitar el desperdicio de la alimentación. La alimentación distribuida se cuantificó a lo largo del estudio. Los peces anestesiados se pesaron individualmente al inicio y al final del estudio y el grupo se pesó el día 28 y el día 60. Al comienzo, se tomaron muestras de 15 peces del mismo stock inicial y se almacenaron a -20 °C para el análisis posterior de toda la composición corporal. Después de 90 días de alimentación experimental, se tomaron muestras de 6 peces de cada tanque con el mismo propósito.

20 1.4. Medida de digestibilidad aparente

Al final de la prueba de crecimiento y siguiendo todas las muestras asociadas, se utilizaron 12 peces (peso corporal: 45 g) de cada tanque de réplica para determinar la digestibilidad aparente de la materia seca, proteínas, lípidos, energía y fósforo, por el método indirecto con dietas idénticas que contienen óxido de itrio (200 mg/kg) como

marcador inerte. Los peces se almacenaron en tanques cilíndricos (volumen: 60 l; caudal de agua: 3,7 l/min; niveles de oxígeno disuelto superiores a 6,4 mg/l), a una temperatura constante del agua de 14 °C. Los peces se adaptaron a las condiciones de cultivo y a las dietas experimentales durante 10 días. A continuación, los peces fueron alimentados a mano una vez al día (10h00) en ligero exceso. Después de la limpieza profunda de los tanques de cría para eliminar todos los residuos de alimentación, la materia fecal se recolectó diariamente durante los siguientes 8 días utilizando el sistema de filtración de agua de salida continua (sistema Choubert-INRA). Después de la recolección diaria, la materia fecal se congeló a -20 °C. La materia fecal mezclada que se obtiene en cada grupo de peces se liofilizó antes del análisis. Cada dieta fue probada por triplicado.

Los coeficientes de digestibilidad aparente (CDA) de los nutrientes y de la energía de alimentación en las dietas experimentales se calcularon de acuerdo con la fórmula:

$$CDA (\%) = 100 \left[\frac{\% \text{ de concentración de } Y_2O_3 \text{ en el alimento}}{\% \text{ de concentración de } Y_2O_3 \text{ en las heces}} \times \frac{(\% \text{ de energía o nutrientes en las heces})}{(\% \text{ de energía o nutrientes en el alimento})} \right]$$

1.5. Métodos analíticos

Los ingredientes del ensayo, las dietas y la materia fecal liofilizada se molieron antes del análisis. Las muestras de todo el cuerpo se cortaron, se mezclaron y una muestra representativa se liofilizó y homogeneizó con un molino de laboratorio antes del análisis. El análisis de la composición química del ingrediente, las dietas, la materia fecal y el pez entero se realizó mediante los siguientes procedimientos: materia seca después de secar a 105 °C durante 24 h; ceniza por combustión a 550 °C durante 12 h; proteína bruta ($N \times 6,25$) mediante una técnica de combustión instantánea seguida de separación por cromatografía de gases y detección de conductividad térmica (LECO FP428); la grasa por extracción con diclorometano (Soxhlet); el fósforo total según el método ISO/DIS 6491 que usa reactivo vanadomolibdico; La energía bruta en una bomba calorimétrica adiabática. El óxido de itrio en alimentos y heces se determinó mediante el método ICP-AES.

Para los análisis de los aminoácidos totales, los ingredientes de prueba y las dietas de prueba se hidrolizaron (HCl 6 M a 116 °C durante 22 h en matraces de vidrio enjuagados con nitrógeno), y a continuación se derivaron con un reactivo de flúor AccQ (6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidilo) según el método Tag AccQ (Waters, EE. UU.). Los análisis se llevaron a cabo mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) en un sistema de análisis de aminoácidos de fase inversa, utilizando norvalina como patrón interno. El triptófano no se determinó, ya que resulta parcialmente destruido por hidrólisis ácida. Los picos resultantes se analizaron con el software EMPOWER (Waters, EE. UU.). Para el análisis de los ácidos grasos, los lípidos se extrajeron de acuerdo con el método de Folch et al. (1957) y posteriormente, se determinó la composición de ácidos grasos de los filetes mediante el análisis de los ésteres metílicos mediante cromatografía de gases, según el procedimiento de Lepage y Roy (1986).

1.6. Criterio para evaluar el crecimiento y uso de los nutrientes

PCI (g): Peso corporal inicial.

PCF (g): Peso corporal final.

Tasa de crecimiento específica, TCE (%/día): $(\ln PCF - \ln PCI) \times 100/\text{días}$.

Índice de consumo, IC: relación alimentaria bruta/aumento de peso.

Aporte voluntario de alimento, IVA (% PC/día): $(\text{relación alimentaria bruta}/(PCI + PCF))/2/\text{días} \times 100$.

Coefficiente de eficiencia proteica CEP: ganancia de peso húmedo/aporte de proteína bruta.

Retención (% de aporte): $100 \times (PCF \times \text{contenido final de nutrientes en el cadáver} - PCI \times \text{contenido inicial de nutrientes en el cadáver})/\text{aporte de nutrientes}$.

1.7. Análisis estadístico

Los datos se presentan por el promedio de tres repeticiones \pm la desviación típica. Los datos fueron sometidos a análisis de varianza de un factor. Antes de ANOVA, los valores expresados en % se sometieron a una transformación de raíz cuadrada de arcoseno. La significación estadística fue probada a un nivel de probabilidad de 0,05. Todas las pruebas estadísticas se realizaron con el software IBM SPSS V21.

2. Resultados

2.1. Rendimiento de crecimiento

Los datos sobre los rendimientos de crecimiento, conversión de alimento y eficiencia proteica de la trucha arco iris alimentada con dietas experimentales durante 28, 60 y 90 días se presentan en las Tablas 6-8 y la Fig. 2. No se produjeron muertes durante la prueba.

Tabla 6: Rendimiento de crecimiento el día 28.

Dieta	CTRL	Y5	Y7,5	Y15	Y25
PCI (g)	5,0 ± 0,1	4,9 ± 0,1	5,0 ± 0,1	5,1 ± 0,1	5,1 ± 0,1
PCF (g)	16,1 ± 0,1 ^a	16,2 ± 0,5 ^a	16,2 ± 0,5 ^a	17,9 ± 0,3 ^b	17,6 ± 0,4 ^b
TCE, %/d	4,19 ± 0,12 ^a	4,26 ± 0,13 ^a	4,20 ± 0,07 ^a	4,50 ± 0,07 ^b	4,45 ± 0,06 ^b
IC	0,87 ± 0,01 ^b	0,87 ± 0,02 ^b	0,87 ± 0,03 ^b	0,81 ± 0,00 ^a	0,81 ± 0,01 ^a
Aporte de alimento, % PCM/d	3,27 ± 0,07	3,31 ± 0,09	3,28 ± 0,09	3,25 ± 0,03	3,22 ± 0,07
CEP	2,55 ± 0,02 ^a	2,56 ± 0,05 ^a	2,55 ± 0,08 ^a	2,66 ± 0,01 ^{ab}	2,72 ± 0,05 ^b
Los valores son los promedios ± la desviación típica (n = 3).					
Los valores dentro de una fila con diferentes exponentes difieren significativamente (P <0,05).					

Después de 28 días de alimentación experimental (Tabla 6), los peces han más que triplicado su peso corporal inicial. El aporte de alimento fue alto (3,22-3,31 % PCM/día) y no se vio afectado (P > 0,05) por las dosis crecientes de polvo de coleóptero incorporado. Esta observación sugiere que el polvo de coleóptero no tuvo un efecto negativo en la palatabilidad, e incluso que podría compensar la eliminación total de la harina de pescado sin comprometer el aporte de alimento. La tasa de crecimiento varió del 4,19 al 4,50 %/día. En comparación con el tratamiento con CTRL, mientras que las dietas Y5 e Y7,5 no afectaron al PCF y la TCE, las dietas Y15 e Y25 llevaron a un aumento significativo (P <0,05) en el PCF y la TCE. Los valores del índice de consumo varían entre 0,81 y 0,87. En comparación con el CTRL, la inclusión de polvo de coleóptero al 5 y al 7,5 % (dietas Y5 e Y7,5 %) no afectó al IC. Sin embargo, los altos niveles de inclusión de polvo de coleóptero (dietas Y15 e Y25) llevaron a una reducción significativa en el IC (P <0,05). El coeficiente de eficiencia proteica (CEP) varió entre 2,55 y 2,72. Los peces alimentados con una dieta Y25 mostraron un aumento significativo en el CEP, en comparación con aquellos alimentados con las dietas CTRL, Y5 e Y7,5.

Tabla 7: Rendimiento de crecimiento el día 60.

Dieta	CTRL	Y5	Y7,5	Y15	Y25
PCI (g)	5,0 ± 0,1	4,9 ± 0,1	5,0 ± 0,1	5,1 ± 0,1	5,1 ± 0,1
PCF (g)	30,3 ± 0,1 ^a	31,6 ± 0,5 ^a	34,9 ± 1,5 ^b	37,2 ± 0,9 ^c	42,9 ± 0,4 ^d
TCE, %/d	3,00 ± 0,04 ^a	3,10 ± 0,04 ^b	3,24 ± 0,04 ^c	3,31 ± 0,05 ^c	3,57 ± 0,04 ^d
IC	1,10 ± 0,03 ^d	1,02 ± 0,03 ^c	0,92 ± 0,01 ^b	0,90 ± 0,02 ^b	0,85 ± 0,02 ^a
CEP	2,01 ± 0,06 ^a	2,17 ± 0,06 ^b	2,40 ± 0,02 ^c	2,46 ± 0,06 ^{cd}	2,56 ± 0,07 ^d
Los valores son los promedios ± la desviación típica (n = 3).					
Los valores dentro de una fila con diferentes exponentes difieren significativamente (P <0,05).					

Después de 60 días de alimentación experimental (Tabla 7), los peces que se sometieron al tratamiento más efectivo mostraron un aumento de 8 veces el peso corporal inicial. El nivel de crecimiento varió del 3,00 al 3,57 %/día. En comparación con el tratamiento con CTRL, todas las dietas con el polvo de coleóptero mostraron un aumento significativo (P <0,05) en la TCE. Los valores del IC variaron entre 0,85 y 1,10 y, en comparación con el CTRL, la inclusión del polvo de coleóptero en todas las dosis probadas llevó a una reducción significativa del IC (P <0,05). El coeficiente de eficiencia proteica (CEP) varió entre 2,01 y 2,56. El valor de CEP más bajo se encontró en los peces alimentados con una dieta CTRL, mientras que una mejora en el CEP se asoció estrechamente con el aumento de las dosis del polvo de coleóptero.

Tabla 8: Rendimiento de crecimiento el día 90.

Dieta	CTRL	Y5	Y7,5	Y15	Y25
PCI (g)	5,0 ± 0,1	4,9 ± 0,1	5,0 ± 0,1	5,1 ± 0,1	5,1 ± 0,1
PCF (g)	42,9 ± 1,3 ^a	45,2 ± 1,0 ^b	49,0 ± 0,6 ^c	51,0 ± 1,4 ^c	55,9 ± 1,0 ^d
TCE, %/d	2,39 ± 0,06 ^a	2,47 ± 0,02 ^b	2,54 ± 0,03 ^b	2,56 ± 0,05 ^b	2,67 ± 0,04 ^c
IC	0,93 ± 0,02 ^b	0,83 ± 0,03 ^a	0,80 ± 0,02 ^a	0,79 ± 0,04 ^a	0,79 ± 0,02 ^a
CEP	2,38 ± 0,06 ^a	2,68 ± 0,10 ^b	2,76 ± 0,06 ^b	2,80 ± 0,15 ^b	2,74 ± 0,08 ^b
Los valores son los promedios ± la desviación típica (n = 3).					
Los valores dentro de una fila con diferentes exponentes difieren significativamente (P <0,05).					

Al final de la prueba, 90 días de alimentación experimental (Tabla 8), los peces que se sometieron al tratamiento más efectivo mostraron un aumento de 11 veces el peso corporal inicial. En comparación con los peces CTRL, aquellos alimentados con dietas ricas en insectos mostraron un aumento significativo en el peso corporal final (P <0,05). Este aumento estuvo relacionado con la dosis, con un aumento moderado para la dieta Y5, intermedio para

Y7,5 e Y15, y más alto para Y25. La tasa de crecimiento específica (TCE) varió entre 2,39 y 2,67 %/día, con un valor mínimo encontrado en los peces alimentados con una dieta CTRL, mientras que aquellos alimentados con alimentos que contienen polvo de coleóptero mostraron valores de TCE significativamente más altos ($p < 0,05$). Independientemente del nivel de incorporación, el polvo de coleóptero condujo a una reducción significativa en el IC ($P < 0,05$). En comparación con el tratamiento CTRL, todas las dietas de comida de insectos llevaron a un aumento significativo en los valores de CEP ($P < 0,05$).

2.2. Composición de todo el cuerpo.

Los datos sobre la composición de todo el cuerpo de la trucha al final de la prueba se presentan en la Tabla 9. Los tratamientos de alimentación no tuvieron efecto ($P > 0,05$) sobre los niveles de humedad, proteínas, lípidos, cenizas, fósforo y energía del pez entero.

Tabla 9: Composición de todo el cuerpo de la trucha alimentada con los diversos tratamientos alimentarios.

Composición corporal	CTRL	Y5	Y7,5	Y15	Y25
Humedad, %	70,1 ± 0,6	70,7 ± 0,4	71,1 ± 0,4	70,5 ± 0,5	70,7 ± 1,2
Proteína, %	14,8 ± 0,6	14,8 ± 0,3	15,0 ± 0,5	15,2 ± 0,3	15,2 ± 0,7
Materia grasa, %	12,2 ± 0,2	11,5 ± 0,4	11,0 ± 0,3	11,6 ± 0,1	11,8 ± 0,9
Ceniza, %	1,9 ± 0,0	2,2 ± 0,2	2,1 ± 0,3	2,1 ± 0,0	2,2 ± 0,1
Fósforo, %	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0
Energía, kJ/g	8,2 ± 0,1	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,2	8,2 ± 0,4

* Los porcentajes son porcentajes en peso con respecto al peso total del pescado.
 Los valores son los promedios ± la desviación típica (n = 3).
 Pescado inicial: humedad 75,0 %; proteína 14,1 %; grasas 8,7 %; ceniza 2,2 %; fósforo 0,4 %, energía 6,7 kJ/g.

2.3. Retención de nutrientes

Los valores de nutrientes y de retención de energía (expresados en porcentaje de aporte) se presentan en la Tabla 10. En comparación con el tratamiento con CTRL, los peces alimentados con dietas ricas en polvo de coleópteros mostraron un aumento significativo en proteínas y la retención de energía ($P < 0,05$). De manera similar, las dietas Y7,5, Y15 e Y25 mostraron una retención de P significativamente mayor que la CTRL ($P < 0,05$). La retención de grasa no se vio afectada por las dietas ($P > 0,05$).

Tabla 10: Nutrientes y retención de energía en la trucha alimentada con los diversos tratamientos alimentarios.

Retención, % de aporte	CTRL	Y5	Y7,5	Y15	Y25
Proteína	35,5 ± 2,5 ^a	39,8 ± 0,7 ^b	41,6 ± 0,4 ^b	42,8 ± 2,2 ^b	41,9 ± 2,2 ^b
Materia grasa	64,4 ± 2,1	68,0 ± 4,9	66,8 ± 3,3	71,5 ± 3,4	70,9 ± 6,7
Fósforo	30,5 ± 0,7 ^a	32,7 ± 1,8 ^{ab}	34,0 ± 0,7 ^b	33,9 ± 1,7 ^b	33,8 ± 1,1 ^b
Energía	42,0 ± 0,8 ^a	45,4 ± 1,6 ^b	47,1 ± 1,4 ^b	47,8 ± 1,8 ^b	48,0 ± 2,9 ^b

Los valores son los promedios ± la desviación típica (n = 3).
 Los valores dentro de una fila con diferentes exponentes difieren significativamente ($P < 0,05$).

2.4. Digestibilidad aparente

La composición de la materia fecal recolectada de la trucha alimentada con los diversos tratamientos de alimentación se presenta en la Tabla 11.

Tabla 11: Composición de la materia fecal de la trucha alimentada con los diversos tratamientos alimentarios.

Composición de materia fecal	CTRL	Y5	Y7,5	Y15	Y25
Óxido de itrio, (mg/kg)	1384 ± 39	1395 ± 94	1415 ± 61	1369 ± 62	1411 ± 43
Proteína, % de MS *	19,63 ± 0,06	19,67 ± 0,24	19,76 ± 0,34	19,70 ± 0,38	19,20 ± 0,41
Materia grasa, % de MS *	4,37 ± 0,06	4,33 ± 0,19	4,28 ± 0,24	4,30 ± 0,06	4,20 ± 0,33
Fósforo, % MS *	2,64 ± 0,06	2,77 ± 0,08	2,65 ± 0,10	2,54 ± 0,15	2,62 ± 0,09
Energía, kJ/g MS	23,24 ± 0,16	23,14 ± 0,40	23,47 ± 0,47	22,88 ± 0,16	23,09 ± 0,16

*% en peso con respecto al peso total de materia seca en materia fecal.
 Los valores son los promedios ± la desviación típica (n = 3).

Los coeficientes de digestibilidad aparente (% CDA) para los diferentes nutrientes y energía se presentan en la

Tabla 12. El aumento en las dosis de polvo de coleóptero incorporado no tuvo un efecto significativo ($P > 0,05$) sobre la digestibilidad aparente de la materia seca, proteínas, grasa, fósforo y energía.

Tabla 12: Digestibilidad aparente de los nutrientes y energía en la trucha.

CDA, %	CTRL	Y5	Y7,5	Y15	Y25
Materia seca	84,2 ± 0,4	84,2 ± 1,0	84,3 ± 0,7	84,0 ± 0,7	84,3 ± 0,5
Proteína	93,6 ± 0,2	93,6 ± 0,4	93,6 ± 0,2	93,5 ± 0,4	93,8 ± 0,1
Materia grasa	97,0 ± 0,1	97,0 ± 0,1	97,0 ± 0,2	97,0 ± 0,2	97,1 ± 0,3
Fósforo, % de aporte	69,9 ± 1,4	68,3 ± 1,5	70,5 ± 2,4	71,4 ± 2,9	70,3 ± 1,8
Energía, % de aporte	84,1 ± 0,4	84,3 ± 0,8	84,1 ± 1,0	84,2 ± 0,6	84,4 ± 0,6
Los valores son los promedios ± la desviación típica (n = 3).					

5

3. Conclusión

Al final de los 90 días de alimentación experimental, el rendimiento general del crecimiento puede considerarse muy satisfactorio y en un rango más alto para la trucha arco iris juvenil, con valores de TCE para la duración total de la prueba que varía entre 2,4 y 2,7 %/día. En los tratamientos más efectivos, los peces mostraron un aumento de 11 veces su peso corporal inicial. La tasa de conversión de alimento entre los tratamientos varió entre 0,79 y 0,93, lo que sugiere una buena adecuación nutricional de los alimentos y buenas prácticas de alimentación.

10

Los datos experimentales generados en este ejemplo permiten afirmar que:

15

- La incorporación de dosis crecientes de polvo de coleóptero (5, 7,5, 15 y 25 %) con una reducción concomitante en la harina de pescado se relacionó progresivamente con un aumento significativo en el peso corporal de los peces.
- Todas las dietas que contenían el polvo de coleóptero mostraron una mejora significativa en la TCE, IC y CEP.
- El aumento de las dosis de coleóptero en polvo incorporado no tuvo ningún efecto sobre la composición de todo el cuerpo de la trucha.
- El aumento de las dosis de coleóptero en polvo incorporado no tuvo ningún efecto sobre la digestibilidad aparente de la materia seca, proteínas, lípidos, fósforo y energía en las diferentes dietas experimentales.
- Las proteínas, el fósforo y la retención de energía aumentaron en truchas alimentadas con alimentos que comprenden polvo de coleóptero.

20

25

En general, el polvo de coleóptero utilizado en este ejemplo podría reemplazar efectivamente el 100 % de la harina de pescado en la dieta de la trucha arco iris juvenil con efectos positivos en el IC y en el rendimiento general del crecimiento.

30

Ejemplo 5: Métodos con o sin molienda antes de prensar

Método de solo prensado

35

Se introducen 200 g de larvas de *T. molitor* en un vaso de precipitados, se ponen en un baño de agua a 100 °C y que contiene 200 ml de agua que se lleva previamente a ebullición. Después de 5 minutos, el vaso de precipitados se retira del baño de agua, las larvas se escurren y a continuación se pasan a una prensa de tipo doble tornillo. Se obtiene así una torta de prensa.

40

Método con molienda seguido de prensado

Se introducen 200 g de larvas de *T. molitor* en un vaso de precipitados, se ponen en un baño de agua a 100 °C y que contiene 200 ml de agua que se lleva previamente a ebullición. Después de 5 minutos, el vaso de precipitados se retira del baño de agua, las larvas se escurren y a continuación se mezclan con un volumen de agua de 200 ml. El líquido así obtenido se pasa a una prensa de doble tornillo. Se obtiene así una torta de prensa.

45

Medición del contenido de lípidos

Se pusieron 2 g de muestra en un vaso de precipitados al que se añadieron 0,2 g de Na_2SO_4 y 15 ml de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (2/1 v/v). La mezcla se pone bajo agitación magnética durante 20 minutos, a continuación la solución se filtra, el residuo se pone nuevamente en el vaso con 10 ml de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (2/1 v/v). La mezcla se pone bajo agitación magnética durante 15 minutos, a continuación la solución se filtra, las fases del disolvente se combinan y se evaporan a peso constante. El contenido de lípidos se determina como un porcentaje en peso después de la extracción-evaporación en relación con el peso inicial de la muestra (2 g).

55

Conclusión

5 Se estudió la importancia de la molienda corriente arriba del prensado (Fig. 3). Por lo tanto, es claramente evidente que la distribución de los lípidos entre la torta de prensa y el jugo de prensa es mucho más efectiva, 12,9 frente a 87,1 en lugar de 42,7 frente a 57,3, cuando la molienda se realizó de antemano.

Ejemplo 6: Análisis del tamaño de las proteínas solubles del polvo de coleóptero de acuerdo con la invención

10 Se puso una muestra de 100 mg del polvo de coleóptero preparado en el Ejemplo 1 en 10 ml de tampón fosfato de NaCl (pH 7,4, 0,137 mM). La muestra se agitó durante 1 minuto (vórtice), y a continuación se centrifugó a 900 g durante 1 minuto. Después de la centrifugación, la muestra se filtró a través de una membrana de 0,45 µm. El análisis del tamaño de las proteínas solubles se llevó a cabo utilizando un sistema de cromatografía de exclusión por tamaños con una columna Nucleogel GFC-300. Como eluyente se usó un tampón fosfato de NaCl (pH 7,4, 0,137 mM). El caudal fue de 1,0 ml/min. La detección se llevó a cabo con un detector de UV a 280 nm.

15

Los resultados del análisis se presentan en la Fig. 4 y resumido en la Tabla 13 a continuación.

Tabla 13: Distribución de los tamaños de las proteínas solubles contenidas en el polvo de coleóptero preparado en el

20

Ejemplo 1	
Tamaño de las proteínas (kg/mol)	Abundancia relativa (%)
6,5 a 12,4	74,4
12,4 a 29	20,5
29 a 66	5,1

25

Los resultados muestran que aproximadamente el 74,4 % de las proteínas solubles presentes en el polvo de coleóptero de acuerdo con la invención tienen una masa molar de menos de 12.400 g/mol (o Da, Daltons).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Polvo de coleóptero que comprende al menos el 67 % en peso de proteínas y al menos el 5 % en peso de quitina, los porcentajes en peso se dan en relación con el peso total de polvo de coleóptero.
2. Polvo de coleóptero de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende cenizas en un contenido inferior o igual al 4 % en peso con respecto al peso total de polvo de coleóptero.
- 10 3. Polvo de coleóptero de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende materia grasa en un contenido comprendido entre el 5 y el 20 % en peso con respecto al peso total de polvo de coleóptero.
4. Polvo de coleóptero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, cuyas proteínas exhiben una digestibilidad mayor o igual al 85 %.
- 15 5. Polvo de coleóptero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, cuyo contenido de humedad residual está comprendido entre el 2 y el 15 %.
- 20 6. Polvo de coleóptero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende entre el 40 y el 60 % en peso de proteínas solubles con respecto al peso total de proteínas, en el que al menos el 50 % de las proteínas solubles tienen un tamaño inferior o igual a 12.400 g/mol.
7. Método para la preparación de un polvo de coleóptero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende las siguientes etapas:
- 25 i) matar los coleópteros,
ii) prensar los coleópteros para obtener una torta de prensa, y
iii) moler la torta de prensa.
- 30 8. Método de acuerdo con la reivindicación 7, comprendiendo también una etapa de secado de la torta de prensa.
9. Método de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende las siguientes etapas:
- 35 i) matar los coleópteros,
ii) prensar los coleópteros para obtener una torta de prensa,
iii) secar la torta de prensa, y
iv) moler la torta de prensa,
- en el que la etapa de prensado está precedida por una etapa de molienda de los coleópteros.
- 40 10. Método de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende las siguientes etapas:
- 45 i) matar los coleópteros,
ii) prensar los coleópteros para obtener una torta de prensa,
iii) secar la torta de prensa, y
iv) moler la torta de prensa,
- en el que la etapa de prensado se realiza en caliente.
- 50 11. Método de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende las siguientes etapas:
- 55 i) matar los coleópteros,
ii) prensar los coleópteros para obtener una torta de prensa,
iii) secar la torta de prensa, y
iv) moler la torta de prensa,
- en el que la etapa de molienda de la torta de prensa se lleva a cabo a un tamaño de partícula comprendido entre 300 µm y 1 mm.
- 60 12. Uso del polvo de coleóptero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en nutrición humana o animal.
13. Uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que se utiliza el polvo de coleóptero para reemplazar una harina proteica.

Fig. 1

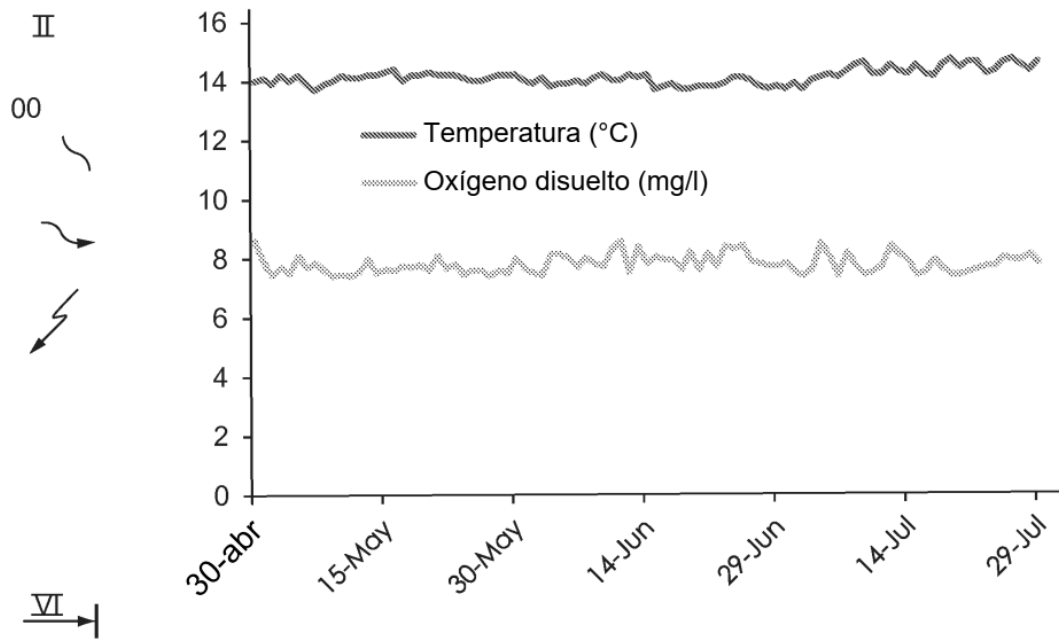


Fig. 1

Fig. 1

II
00
↘
↘
⚡

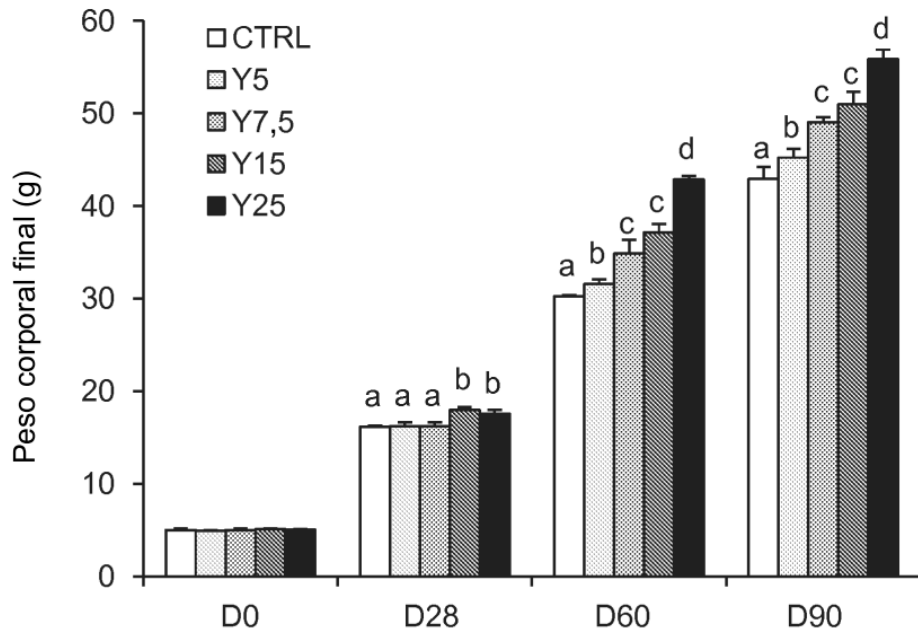


Fig. 2A

VI →

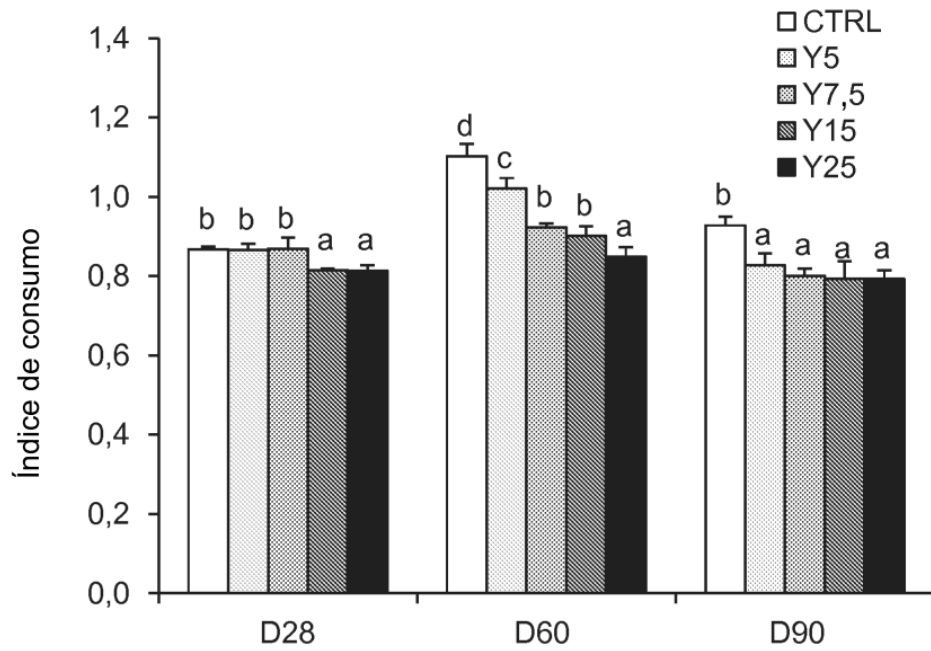


Fig. 2B

Fig. 1

II
00
~
~
~

VI

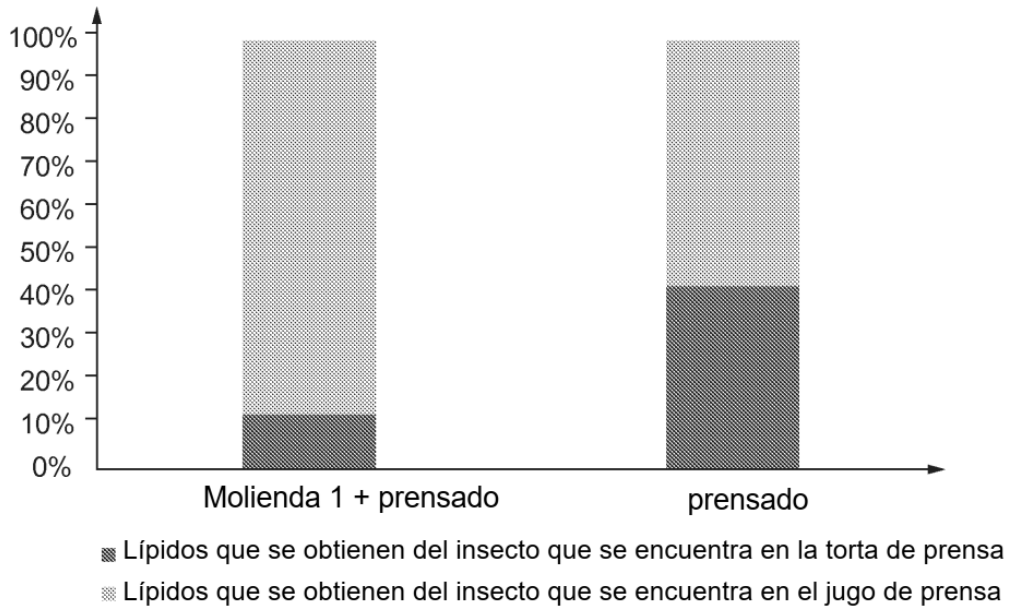


Fig. 3

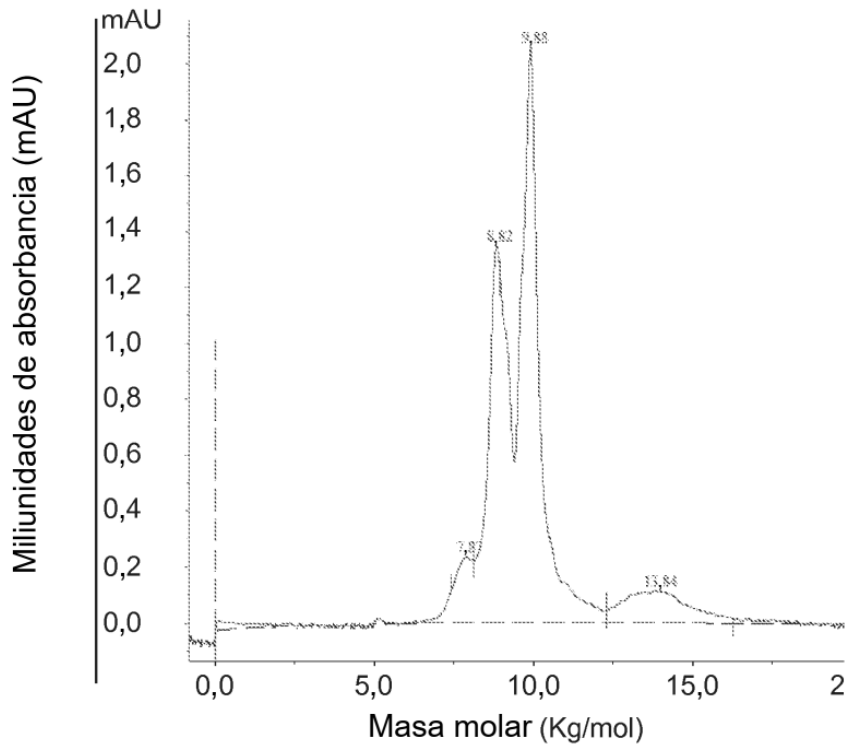


Fig. 4