

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 806 145**

51 Int. Cl.:

A23L 33/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.12.2015 PCT/FR2015/053784**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.07.2016 WO16108036**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.12.2015 E 15830827 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020 EP 3240436**

54 Título: **Composición que comprende quitina y proteínas digeribles**

30 Prioridad:

31.12.2014 FR 1463512
20.10.2015 FR 1560013

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.02.2021

73 Titular/es:

YNSECT (100.0%)
1 Rue Pierre Fontaine
91058 Évry-Courcouronnes Cedex, FR

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 806 145 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

Composición que comprende quitina y proteínas digestibles

5 La presente invención se refiere a una composición que comprende proteínas y quitina. También se refiere a un procedimiento de preparación de esta composición y a su uso en alimentación humana o animal, y más especialmente en la alimentación de peces.

10 En la actualidad, la acuicultura es uno de los sectores más dinámicos de la industria alimentaria. La alta demanda de pescado ha ocasionado un aumento considerable del precio del alimento destinado a la piscicultura.

15 Uno de los productos más utilizados en la alimentación de los peces es la harina de pescado. De hecho, la harina de pescado es una de las principales fuentes de proteínas de la alimentación en la acuicultura. Esta harina es rica en proteínas animales (rica en aminoácidos de tipo lisina y metionina) fáciles de digerir. Una demanda cada vez mayor, junto con una oferta limitada, ha ocasionado un aumento considerable de su precio, lo que crea un riesgo para el crecimiento sostenible de la acuicultura. De este modo, hay una gran demanda de fuentes de proteínas alternativas de alta calidad y, en la medida de lo posible, renovables para la alimentación en la acuicultura.

20 Las harinas de insectos ofrecen fuentes proteicas naturales de reemplazo y la posibilidad de su producción masiva con una mínima huella ecológica. Específicamente, determinados insectos, tal como la especie *Tenebrio molitor*, tienen la ventaja de permitir su producción masiva a gran escala.

25 El artículo de Internet "Insects for food and feed" de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (<http://www.fao.org/edible-insects/84625/en/>) revela información general sobre el valor nutricional de los insectos.

30 El artículo de Internet "Des insectes dans la farine" de Hervé Guénot (<http://www.lejdd.fr/JDD-Paris/Des-insectes-dans-la-farine-581928>), revela la existencia de harinas provenientes de diferentes biomásas tales como las harinas de insectos.

35 El artículo de Sandra G.F. Bukkens (1997), "The nutritional value of edible insects", Ecology of Food and Nutrition, 36:2-4,287-319 revela los valores nutricionales de diferentes insectos, particularmente su contenido de proteína bruta, materia grasa, ceniza y fibra bruta.

La solicitud US2008/0075818 describe un procedimiento de preparación de una harina de insectos.

40 En el documento "Edible insects. Future prospects for food and feed security", FAO Forestry paper 171, de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, publicado en 2013, se describen diferentes aspectos de los insectos comestibles.

Sin embargo, parece que los resultados de ensayos de sustitución de harinas de pescado por diversas harinas de insectos se han mitigado. En los casos en los que parece posible la sustitución, generalmente esta no supera el 50 %; observándose efectos nefastos por encima de esta cantidad sobre el crecimiento de los peces.

45 El trabajo de los inventores ha permitido poner de manifiesto que, de manera ventajosa, en la acuicultura puede utilizarse una composición específica reemplazando una harina de pescado en la alimentación.

50 Por lo tanto, la presente invención se refiere a una composición que comprende al menos 67 % en peso de proteínas crudas, al menos 5 % en peso de quitina, los porcentajes en peso se expresan con respecto al peso total de la composición, y 85 % en peso de proteínas digestibles con respecto al peso total de las proteínas crudas.

Se observará que, en el contexto de la presente solicitud, y a menos que se estipule otra cosa, se entiende que los intervalos de los valores indicados son inclusivos.

55 El experto en la materia está familiarizado con la cuantificación de "proteínas crudas". Por ejemplo, se puede mencionar el método de Dumas o el método de Kjeldahl. De preferencia, se utiliza el método de Dumas, correspondiente a la norma NF EN ISO 16634-1 (2008).

60 En la solicitud, si no se especifica la fecha de una norma, estándar o directiva, se refiere a la norma, estándar o directiva vigente a la fecha de presentación.

Preferentemente, la composición comprende 68 % en peso de proteínas crudas, más preferentemente 70 % por peso de proteínas crudas; los porcentajes por peso se expresan con respecto al peso total de la composición.

65 Por "proteínas digestibles" se entiende que se refiere a las proteínas digestibles determinadas por la digestibilidad péptica. De preferencia, la cuantificación de las proteínas digestibles se efectuará mediante el método descrito en la

directiva 72/199/EC.

Preferentemente, la composición comprende 86 %, más preferentemente 88 % en peso de proteínas digeribles con respecto al peso total de las proteínas crudas.

Según la invención, por "quitina" se entiende cualquier tipo de derivado de quitina, es decir, derivado de polisacáridos que comprende unidades de N-acetil-glucosamina y unidades de D-glucosamina, específicamente los copolímeros de quitina-polipéptidos (a veces, denominados "compuestos de quitina-polipéptidos"). Estos copolímeros también se pueden asociar a pigmentos, a menudo de tipo melanina.

Después de la celulosa, la quitina es el segundo polímero más sintetizado en el mundo actual. De hecho, numerosas especies del mundo actual sintetizan quitina, ya que constituye parte del exoesqueleto de los crustáceos e insectos, y la pared lateral que rodea y protege a los hongos. Específicamente, en los insectos, la quitina constituye del 3 a 60 % de su exoesqueleto.

El contenido de quitina se determina mediante su extracción a través de un método que puede corresponder al método AOAC 991.43, descrito en el ejemplo 2, el cual es un método preferido para realizar esta determinación.

Preferentemente, la composición comprende entre el 5 y el 16 % en peso de quitina, más preferentemente entre el 8 y el 14 % de quitina; los porcentajes en peso se expresan con respecto al peso total de la composición.

Las composiciones de la técnica anterior, capaces de contener tanto proteínas como quitina, generalmente corresponden a composiciones que se obtienen a partir de insectos y/o crustáceos. Sin embargo, los contenidos elevados de proteínas crudas y de proteínas digeribles presentes en la composición según la invención, se pueden obtener solo mediante un procedimiento de tratamiento de insectos y/o crustáceos, que comprende una etapa de hidrólisis. No obstante, una etapa de hidrólisis tiene el efecto de reducir el contenido de quitina a un nivel del orden de 5 % en peso, tal como inferior al 5 % en peso, con respecto al peso total de la composición.

Sin embargo, a menudo se considera que la quitina es un tipo de factor antinutricional ya que es difícil de digerir. Esto explica por qué, en aplicaciones del sector agroalimentario, las composiciones a base de insectos se desquitinizan, es decir, se efectúa una etapa de eliminación de quitina. El trabajo de los inventores también permitió demostrar que, al contrario de las ideas recibidas, la quitina no tiene impacto alguno sobre el crecimiento de los peces alimentados con una composición según la invención, que comprende un contenido considerable de quitina (véase más adelante el ejemplo 4). Por el contrario, la composición según la invención puede reemplazar ventajosamente no solo parte de la harina de pescado de la alimentación en la acuicultura sino su totalidad. De hecho, la composición según la invención permite mejorar el crecimiento de animales alimentados con ella.

Además, durante el proceso de fabricación del alimento, la introducción de la composición según la invención también tiene determinadas ventajas: permite reducir la pérdida de vitaminas hidrosolubles durante tratamientos térmicos opcionales y reducir la energía requerida durante una etapa de extrusión opcional.

De preferencia, la composición según la invención tienen una tasa de humedad residual comprendida entre 2 y 15 %, de preferencia entre 5 y 10 %, de mayor preferencia entre 6 y 8 %. Esta tasa de humedad puede determinarse, por ejemplo, según el método originado en la norma EC 152/2009 del 27-01-2009 (103° C/4 horas).

Ventajosamente, la composición según la invención tiene un contenido de cenizas inferior o igual al 4 % en peso con respecto al peso total de la composición, e incluso más ventajosamente, inferior o igual al 3,5 %.

Las cenizas constituyen el residuo producido de la combustión de la composición según la invención.

El experto en la materia está familiarizado con el método de determinación del contenido de cenizas. De preferencia, el contenido de cenizas se determinó según el método descrito en la norma de EC 152/2009 del 27-01-2009.

De preferencia, el contenido de materia grasa de la composición según la invención comprende entre 5 y 20 % en peso con respecto al peso total de la composición, más preferentemente entre 9 y 17 %.

El experto en la materia está familiarizado con los métodos de determinación del contenido de materia grasa. Por ejemplo, y de manera preferida, este contenido se determina según el método de la norma de EC 152/2009.

Como se indicó anteriormente, la composición según la invención puede obtenerse a partir de insectos.

Por "obtenerse" a partir de insectos, se entiende más específicamente, una composición obtenida únicamente a partir de insectos y opcionalmente de agua. La composición es el resultado de un tratamiento mecánico y térmico, con exclusión de cualquier tratamiento químico (diferente al que utiliza agua) de los insectos.

Más específicamente, la composición es una harina de insectos. Por "harina de insectos" se entiende que se refiere a

un polvo que tiene un tamaño de partículas aceptable para la alimentación humana o animal. Por “tamaño de partículas aceptable para la alimentación humana o animal”, se entiende que se refiere a un tamaño de partículas comprendido entre 100 μ m y 1,5 mm, preferentemente comprendido entre 300 μ m y 1 mm, más preferentemente entre 500 y 800 μ m.

5 Los insectos preferidos para la preparación de dicha harina son, por ejemplo, los coleópteros, dípteros, lepidópteros, isópteros, ortópteros, himenópteros, blatópteros, hemípteros, heterópteros, efemerópteros y mecópteros, de preferencia los coleópteros, dípteros, ortópteros, lepidópteros o sus mezclas.

10 Preferentemente, los insectos se seleccionan del grupo constituido por *Tenebrio molitor*, *Hermetia illucens*, *Galleria mellonella*, *Alphitobius diaperinus*, *Zophobas morio*, *Blattella fusca*, *Tribolium castaneum*, *Rhynchophorus ferrugineus*, *Musca domestica*, *Chrysomya megacephala*, *Locusta migratoria*, *Schistocerca gregaria*, *Acheta domesticus*, *Samia ricini* o sus mezclas, e incluso más preferentemente, *Tenebrio molitor*.

15 Ventajosamente, la composición según la invención comprende entre el 35 y 65 % en peso de proteínas solubles con respecto al peso total de proteínas crudas, y al menos el 50 % de las proteínas solubles tiene un tamaño inferior o igual a 12 400 g/mol.

20 Por “proteínas solubles” se entiende, entre las proteínas crudas, las que son solubles en una solución acuosa cuyo pH varía entre 6 y 8, ventajosamente entre 7,2 y 7,6.

De preferencia, la solución acuosa es una solución tampón cuyo pH varía entre 6 y 8, ventajosamente entre 7,2 y 7,6. Preferentemente, la solución tampón es una solución tampón fosfato de NaCl cuyo pH es igual a 7,4 +/- 0,2.

25 La digestibilidad de las proteínas en los seres humanos y animales está muy condicionada por el tamaño de las proteínas. En nutrición animal, es frecuente reducir el tamaño de las proteínas para facilitar la digestión de los animales. Generalmente, esta reducción del tamaño de las proteínas se realiza mediante procedimientos de hidrólisis (por ejemplo, enzimática) cuya implementación es particularmente costosa.

30 La composición según la invención, obtenida mediante un procedimiento que no implique la hidrólisis, comprende una gran cantidad de proteínas solubles cuyo tamaño disminuye lo suficiente como para facilitar la digestión de los animales. La composición según la invención también tiene la ventaja de permitir su preparación a menor coste.

35 Ventajosamente, la composición según la invención comprende entre 30 y 60 % en peso, de preferencia entre 35 y 55 % en peso de proteínas solubles con respecto al peso total de proteínas crudas.

De preferencia, al menos el 60 %, de preferencia al menos el 70 % de las proteínas solubles, tiene un tamaño inferior o igual a 12 400 g/mol.

40 Más específicamente, las proteínas solubles tienen un tamaño comprendido entre 6 500 y 12 400 g/mol.

Ventajosamente, menos del 10 %, de preferencia menos del 8%, más preferentemente menos del 5 %, e incluso con mayor preferencia el 0 % de las proteínas solubles tiene un tamaño superior o igual a 66 000 g/mol

45 Dicha distribución de las proteínas solubles se pone de manifiesto en el ejemplo 6.

La invención también divulga un procedimiento de preparación de una composición según la invención.

50 El procedimiento de preparación de una composición según la invención, comprende un etapa de prensado de los insectos.

El objetivo del prensado es extraer el aceite de los insectos para así obtener una torta de prensa con un contenido de aceite (o materia grasa) inferior o igual al 20 % en peso con respecto al peso seco de la torta de prensa, preferentemente inferior o igual al 17 %.

55 La etapa de prensado se describe con mayor detalle en la etapa 2 del procedimiento de preparación descrito más adelante.

60 Específicamente, es posible efectuar un prensado con calor o frío. De preferencia, se utiliza una prensa de un solo tornillo.

Más específicamente, el procedimiento según la invención comprende las siguientes etapas:

- 65
- i) provocar la muerte de insectos,
 - ii) prensado de los insectos para obtener una torta de prensa,
 - iii) secado de la torta de prensa, y

iv) trituración de la torta de prensa.

Se puede provocar la muerte a los insectos escaldándolos o blanqueándolos, como se describe con mayor detalle más adelante en la etapa 1 del procedimiento detallado.

Asimismo, la trituración se describe con mayor detalle en la etapa 4 del procedimiento detallado.

Finalmente, el procedimiento de preparación según la invención comprende además un etapa de secado de la torta de prensa.

La etapa de secado se realiza después de la etapa de prensado y antes de la etapa de trituración.

El secado se describe con mayor detalle en la etapa 3 del procedimiento detallado.

Procedimiento detallado de preparación de una composición según la invención

• Etapa 1: Provocar la muerte de los insectos

Esta etapa 1, en la que se provoca la muerte de los insectos, puede efectuarse ventajosamente mediante escaldado o blanqueado. Esta etapa 1 permite provocar la muerte de los insectos a la vez que se reduce la carga microbiana (reducción del riesgo de alteración y sanitario) y se inactivan las enzimas internas de los insectos que pueden provocar una autólisis, produciendo así un rápido oscurecimiento de los mismos.

Para el escaldado, los insectos, preferentemente larvas, se sumergen en agua durante 2 a 20 min, preferentemente durante 5 a 15 min. De preferencia, el agua está a una temperatura comprendida 95 y 105° C, preferentemente 100° C.

La cantidad de agua que se introduce durante el escaldado se determina de la siguiente manera: la proporción del volumen de agua en ml con respecto al peso en gramos del insecto está preferentemente comprendida entre 0,3 y 10, más preferentemente entre 0,5 y 5, incluso más preferentemente entre 0,7 y 3, incluso más preferentemente del orden de 1.

Para el blanqueado, los insectos, preferentemente larvas, se blanquean con vapor (boquillas o lecho de vapor) a una temperatura comprendida entre 80 y 130°C, de preferencia entre 90 y 120°C, más preferentemente entre 95 y 105° C, preferentemente 98°C o con agua a una temperatura comprendida entre 95 y 105°C, preferentemente 100°C (a través de boquillas de aspersión) o con una mezcla de ambos (agua + vapor) a una temperatura comprendida entre 80 y 130°C, de preferencia entre 90 y 120°C, más preferentemente entre 95 y 105°C, preferentemente 98°C. El tiempo de residencia en la cámara de blanqueado varía entre 1 a 15 minutos, preferentemente entre 3 y 7 min.

• Etapa (opcional): trituración

Los insectos se extraen del tanque de escaldado o de la cámara de blanqueado y a continuación se hacen pasar por un tamiz (o se drenan) y se colocan en una trituradora, tal como una trituradora mezcladora con cuchillas, permitiendo reducir los insectos a partículas.

Para facilitar la trituración, se puede añadir una cantidad de agua. Esta cantidad de agua es similar a la que se introduce durante la etapa 1 de escaldado: la proporción del volumen de agua en ml con respecto al peso en gramos del insecto está preferentemente comprendida entre 0,3 y 10, más preferentemente entre 0,5 y 5, incluso más preferentemente entre 0,7 y 3, incluso más preferentemente del orden de 1. Para efectuar esta etapa, también es posible guardar el agua de escaldado y/o el agua resultante del blanqueado.

De preferencia, al final de la trituración, el tamaño de las partículas de los insectos es inferior a 1 cm (las partículas más grandes pueden observarse con un microscopio), de preferencia inferior a 0,5 cm. Preferentemente, el tamaño de las partículas varía entre 300 mm y 3 mm, más preferentemente entre 500 mm y 1 mm. No es necesario reducir excesivamente el tamaño de las partículas, por ejemplo, a un tamaño inferior a 250 mm.

• Etapa 2: prensado

A continuación, los insectos muertos de la etapa 1 o la pasta húmeda de la etapa de trituración opcional, se colocan en una prensa según un modo operativo que permite prensar y separar un jugo que comprende al mismo tiempo una fracción oleaginosa y una fracción proteica.

De preferencia, la etapa de prensado permite 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, preferentemente inferior o igual al 17%, más preferentemente inferior o igual al 15 %.

Asimismo, la etapa de prensado permite obtener una torta de prensa con un contenido en materia seca comprendido

entre 30 % y 60 %, preferentemente entre 40 % y 55 %, y más preferentemente entre 45 % y 55 %.

La etapa de prensado puede realizarse con cualquier sistema de prensa, tal como, por ejemplo, una prensa de un solo tornillo o de doble tornillo (prensa de doble tornillo de tipo Ángel), un filtro de prensa (filtro de prensa de tipo Choquet), una prensa de platina, etc. El experto en la materia está familiarizado con estos sistemas y podrá determinar las condiciones de prensado para obtener los contenidos de aceite y/o agua mencionados anteriormente.

Específicamente, es posible efectuar un prensado con calor o frío. Ventajosamente, el prensado se efectuará con calor, lo que permite aumentar la cantidad de aceite extraído de la torta de prensa. Específicamente, el prensado con calor permite 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, de preferencia, inferior o igual al 15 %.

• Etapa 3: secado

A continuación, la torta de prensa se seca mediante tecnologías estándar conocidas por el experto en la materia. El secado puede ser directo o indirecto (secador de película delgada, "secador de paletas", "secador tubular", "secador de disco", etc.) a una temperatura comprendida entre 60°C y 200°C, durante 15 minutos a 24 horas. Por ejemplo, la torta de prensa se puede poner y secar al aire ventilado/agitado a una temperatura comprendida entre 80 y 100°C, preferentemente a 90°C durante 3 a 7 horas, preferentemente durante 5 horas.

El objetivo de esta etapa de secado es obtener una torta de prensa con una tasa de humedad comprendida entre 2 y 15 %, de preferencia entre 5 y 10 %, aún más preferentemente entre 4 y 8 %.

• Etapa 4: trituration final

A continuación, la torta de prensa seca se coloca en una trituradora, tal como una trituradora de martillo, lo que permite reducir la torta de prensa a partículas.

Ventajosamente, al acabar esta trituration final, el tamaño de las partículas de los insectos es inferior a 0,5 mm (las partículas de mayor tamaño pueden observarse con un microscopio), de preferencia del orden de 1 mm. Más específicamente, el tamaño de las partículas está comprendido entre 300 mm y 1 mm, incluso más preferentemente entre 500 y 800 mm.

La sucesión de estas cuatro etapas permite obtener una composición según la invención, que comprende un tasa alta de proteínas crudas y de proteínas digeribles al mismo tiempo que se mantiene una tasa de quitina del orden de al menos 5 % en peso con respecto al peso total de la composición.

Como se indica anteriormente, la etapa de prensado puede realizarse con frío o con calor.

Como ejemplo de un procedimiento de obtención de una composición según la invención que implica un prensado con frío:

En un matraz con 200 ml de agua previamente hervida, se introducen larvas (por ejemplo, de *T. molitor*), y se las provoca la muerte mediante escaldado al baño María a 100°C. Después de 5 minutos, el matraz se retira del baño María, las larvas se drenan y después se mezclan con un volumen de agua de 200 ml. El líquido así obtenido se transfiere a una prensa de dos tornillos. La torta de prensa así obtenida se seca durante 24 horas en un horno a 70°C y después se tritura a 250 mm.

Como ejemplo de un procedimiento de obtención de una composición según la invención que implica un prensado con calor:

En una cámara de blanqueado, se introducen larvas (por ejemplo, de *T. molitor*) y se blanquean con vapor durante 5 min a 100°C. Después, las larvas blanqueadas de esta manera se introducen en una prensa de tipo "desección", adecuada para productos cargados de agua. La torta de prensa así obtenida se seca durante 5 horas en un horno a 90°C y después se tritura en un triturador de martillo a 1 mm.

Según un primer modo de realización del procedimiento de acuerdo con la invención, la etapa de prensado está precedida por una etapa trituration de insectos.

Por tanto, la invención se refiere a un procedimiento de preparación de una composición según la invención que comprende las siguientes etapas:

- i) provocar la muerte de insectos,
- ii) prensado de los insectos para obtener una torta de prensa,
- iii) secado de la torta de prensa, y
- iv) trituration de la torta de prensa

en donde la etapa de prensado está precedida por una etapa de trituration de insectos.

En el ejemplo 5 se describe más detalladamente una ventaja de la etapa de trituración de insectos previa al prensado.

5 De acuerdo con un segundo modo de realización del procedimiento según la invención, la etapa de prensado de los insectos se realiza con calor.

Por tanto, la invención se refiere a un procedimiento de preparación de una composición según la invención que comprende las siguientes etapas:

- 10
- i) provocar la muerte de insectos,
 - ii) prensado de los insectos para obtener una torta de prensa,
 - iii) secado de la torta de prensa, y
 - iv) trituración de la torta de prensa.

15 en donde la etapa de prensado se realiza con calor.

Como se indica anteriormente, el prensado con calor permite 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, de preferencia inferior o igual al 15 %.

20 De acuerdo con un tercer modo de realización del procedimiento según la invención, la etapa de trituración de la torta de prensa se realiza hasta obtener un tamaño de partículas comprendido entre 300 mm y 1 mm, de preferencia entre 500 y 800 mm.

25 Por tanto, la invención se refiere a un procedimiento de preparación de una composición según la invención que comprende las siguientes etapas:

- 30
- i) provocar la muerte de insectos,
 - ii) prensado de los insectos para obtener una torta de prensa,
 - iii) secado de la torta de prensa, y
 - iv) trituración de la torta de prensa.

en donde la etapa de trituración de la torta de prensa se realiza hasta obtener un tamaño de partículas comprendido entre 300 mm y 1 mm.

35 Más específicamente, en este tercer modo de realización del procedimiento según la invención, la etapa de prensado de los insectos puede realizarse con calor. De manera alternativa, la etapa de prensado podrá estar precedida por una etapa de trituración de insectos.

40 Finalmente, la invención se refiere al uso de una composición según la invención en la alimentación humana o animal.

Ventajosamente, la composición según la invención puede utilizarse en la alimentación de animales de compañía, tales como perros, gatos, pájaros, peces, reptiles y roedores.

45 Más específicamente, la composición según la invención puede utilizarse en acuicultura (peces, crustáceos, moluscos, marisco), en alimentación de aves de corral (pollos, pavos, animales de cacería, tales como, codornices, faisanes, sisones), cerdos, rumiantes (animales bovinos, ovinos, caprinos, equinos) y visones.

50 Finalmente, la composición según la invención puede utilizarse de manera ventajosa para reemplazar una harina proteica.

Por harina proteica se entiende más específicamente una harina de pescado, leche en polvo o lactosuero (suero de leche), un concentrado de harina de soja ("CHS"), harina de carne, tal como, por ejemplo, de tipo harina de aves de corral ("Poultry Meal")

55 El reemplazo puede ser parcial o total.

Preferentemente, la composición según la invención se utiliza en el reemplazo parcial o total de una harina de pescado, tal como un reemplazo al 50 o 100 %.

60 Otras características y ventajas de la invención, aparecerán más adelante en los ejemplos proporcionados a modo ilustrativo, con referencia a:

- 65
- La figura 1, que es a un diagrama ilustrativo de las variaciones de temperatura del agua y de los niveles de oxígeno disuelto en los tanques donde se cultivaron las truchas alimentadas con diferentes dosis de la composición según la invención.

- La figura 2, que comprende dos diagramas que ilustran el impacto sobre el peso corporal final (fig. 2A) y el índice de consumo (fig. 2B) de las truchas alimentadas con diferentes dosis de la composición según la invención.
- La figura 3, que ilustra la distribución de los lípidos procedentes del insecto que se encuentran en el jugo y la torta de prensa que se obtiene mediante un procedimiento que comprende una etapa de prensado o una etapa de trituración posterior al prensado.
- La figura 4, que es un diagrama que representa el análisis mediante cromatografía estérica de exclusión por tamaño de las proteínas de la composición según la invención.

Ejemplo 1: Procedimiento de preparación de una composición según la invención

La composición según la invención se prepara a partir de larvas de *Tenebrio molitor*. Después de recibir las larvas, estas pueden conservarse a una temperatura de 4° C durante 0 a 15 días en sus cubetas de cría sin mayor degradación antes de provocar su muerte. El peso (edad) de las larvas utilizadas es variable y por consiguiente su composición puede variar, tal como se ilustra en la siguiente Tabla 1:

Tabla 1: Composición bioquímica de las 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
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 porcentajes (%) se expresan en peso seco con respecto al peso húmedo de las larvas.

● Etapa 1: Blanqueado de los insectos

Las larvas vivas (+4°C a +25°C) se transportan en capas de un grosor comprendido entre 2 y 10 cm en una cinta transportadora perforada (1 mm), hasta una cámara de blanqueado. Los insectos se blanquean con vapor (boquillas o lecho de vapor) a 98°C o con agua a 100°C (boquillas de aspersion) o con una mezcla de ambos (agua + vapor). El tiempo de residencia en la cámara de blanqueado está comprendido entre 1 a 15 minutos, idealmente 5 min.

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

● Etapa 2: Prensado

Una vez blanqueadas, las larvas se transportan a una tolva de alimentación continua de una prensa de un solo tornillo. Mientras pasan hacia la prensa, las larvas se mantienen a una temperatura mayor de 70°C para aumentar los resultados del desgrasado (desaceitado). El principio de desgrasado consiste en presurizar el material en el interior de una jaula cilíndrica mediante una disposición de tornillos y arandelas dispuestos sobre el eje central. La jaula está tapizada en el interior con barrotos distribuidos en sección y mantenidos separados por espacios de diferentes grosores dependiendo de la zona de trabajo. Los intersticios así habilitados permiten el flujo de una fracción de aceite y limitan el paso del material denominado "seco", la fracción proteica, que se denominará "torta de prensa", participando de esta forma en la presurización.

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

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

La torta de prensa obtenida contiene de 35 a 40 % de materia seca, de 67 a 75 % de proteínas y de 13 a 17 % de materia grasa; los porcentajes en peso se expresan con respecto al peso seco de la torta de prensa.

● Etapa 3: Secado

A continuación, la torta de prensa se coloca sobre una bandeja en una película delgada (aproximadamente de 2 cm) y se seca al 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 protegerla de cualquier contaminación que haya tenido lugar después la muerte de los insectos.

La actividad del agua (Ac) después del secado es de 0,35. Los resultados microbiológicos muestran una ausencia de *Salmonella spp* (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: Trituración

5 La torta de prensa seca, que comprende principalmente proteínas, finalmente se tritura con un triturador de martillo continuo (6 piezas reversible en movimiento; grosor de 8 mm). El triturador se alimenta mediante una tolva con una aleta de control del caudal (180 kg/h). La rejilla perforada utilizada para controlar el resultado de la granulometría es de 0,8 mm. La velocidad de rotación del motor es de 3 000 rpm (motorización eléctrica; energía absorbida de 4 kW (5,5 CV)).

10 Ejemplo 2: Caracterización de la composición según la invención

La composición preparada en el ejemplo 1 fue caracterizada.

15 1. Análisis

1.1 Determinación de la tasa de humedad

La tasa de humedad se determina según el método que proviene de la norma EC 152/2009 del 27-01-2009 (103°C/4 horas).

20 1.2 Determinación de la cantidad de proteínas crudas

Las proteínas crudas se determinan de acuerdo con el método denominado de “Dumas”, y corresponde a la norma NF EN ISO 16634-1 (2008).

25 1.3 Determinación de la cantidad de quitina

Las fibras alimenticias de la harina de insectos se componen esencialmente de quitina, midiéndose esta última por tanto de acuerdo con el método ADAC 991.43. Los valores así obtenidos están, por consiguiente, ligeramente sobrestimados.

1.4 Determinación de la cantidad de materia grasa

La materia grasa se determinó de acuerdo con el método de la norma EC 152/2009.

35 1.5 Determinación de la cantidad de cenizas

Las cenizas crudas se determinaron de acuerdo con el método de la norma EC 152/2009 del 27-01-2009.

40 1.6 Determinación de la cantidad de fósforo

El fósforo se midió mediante plasma acoplado inductivamente (PAI) con calibración interna.

45 1.7 Determinación de la energía

El valor energético se obtiene con los coeficientes de la norma EU 1169/201.

1.8 Determinación de las cantidades de aminoácidos y ácidos grasos

50 Esta determinación se efectuó mediante cromatografía de gases después de hidrólisis y derivatización de los aminoácidos y ácidos grasos, respectivamente.

1.9 Determinación de la digestibilidad péptica

55 La digestibilidad péptica se midió mediante el método descrito en la directiva 72/199/EC.

2 Resultados

60 La composición según la invención se detalla en la siguiente Tabla 2.

ES 2 806 145 T3

Tabla 2: Composición

Macronutriente	Unidad	Composición
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	Composición
Arginina	%*	2,56
Histidina	%*	1,39
Isoleucina	%*	2,11
Leucina	%*	3,99
Lisina	%*	3,32
Treonina	%*	1,87
Valina	%*	2,91
Metionina	%*	1,43
Ácidos grasos	Unidad	Composición
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
Cisteína	%*	0,63

(continuación)

Ácidos grasos	Unidad	Composición
Fenilalanina	%*	1,98
Tirosina	%*	2,68
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
C22:0	%*	0,01

* Los porcentajes en peso se expresan sobre el peso total de la composición

Además, se obtiene una digestibilidad péptica de 90+/- 2%.

5 Ejemplo 3: Procedimiento alternativo de preparación de una composición según la invención

En un matraz colocado en un baño María a 100° C y que contiene con 200 ml de agua previamente hervida, se introducen 200 g de larvas de *T. molitor*. Después de 5 minutos, el matraz se retira del baño María, las larvas se drenan y después se mezclan con un volumen de agua de 200 ml. El líquido así obtenido se transfiere a una prensa de dos tornillos. La torta de prensa así obtenida se seca durante 24 horas en un horno a 70°C y después se tritura a 250 mm. De este modo se obtiene una composición según la invención.

Ejemplo 4: Introducción de la composición según la invención en la alimentación de peces

En el presente ejemplo, se estudió el efecto de la inclusión de una composición alimenticia según la invención sobre el crecimiento, la ingesta de alimento, la conversión alimenticia, la composición corporal y la digestibilidad aparente de los nutrientes en la trucha arcoíris.

1. Materiales y métodos

1.1 Composición según la invención

La composición que se utilizó en este ejemplo es la que se obtuvo según el ejemplo 1 y que se describió con más detalle en el ejemplo 2.

1.2 Dietas experimentales

Se formuló una dieta basada en harina de pescado (CTRL) con ingredientes convenientes a fin de satisfacer las necesidades nutricionales conocidas de los alevines de trucha arcoíris. Esta dieta CTRL se compone de 25 % de harina de pescado, 8 % de otras fuentes proteicas de origen marino (harina de calamar y harina de krill), mientras que las fuentes proteicas restantes eran un concentrado de proteína de soja, gluten de maíz y gluten de trigo. Basándose en de esta formulación, se formularon cuatro dietas de prueba (Y5, Y7,5, Y15 e Y25), en donde la harina de pescado se reemplazó por la composición según la invención a las tasas respectivas de 20, 30, 60 y 100 % (véase la Tabla 3 a continuación).

Tabla 3: Formulación y composición de las 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
Composición según la invención		5,00	750	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

(continuación)

Ingredientes en %*:	CTRL	Y5	Y7,5	Y15	Y25
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
Premezcla 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 monocálcico	1,30	1,70	2,00	2,60	3,50
DL-metionina	0,30	0,30	0,30	0,40	0,50
Oxido 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 cruda, % MS**	48,5 ± 0,0	48,5 ± 0,1	48,5 ± 0,0	48,5 ± 0,0	48,5 ± 0,1
Grasas crudas, % MS**	22,7 ± 0,2	22,7 ± 0,1	22,6 ± 0,2	22,7 ± 0,2	22,7 ± 0,2
Ceniza, % MS**	9,4 ± 0,0	8,8 ± 0,0	8,7 ± 0,1	8,1 ± 0,0	7,4 ± 0,0
Quitina, % MS**	0,06	0,46	0,66	1,26	2,06
Energía total, MJ/kg de MS	23,2 ± 0,2	23,2 ± 0,0	23,2 ± 0,0	23,2 ± 0,1	23,2 ± 0,1

* % de materia seca con respecto al peso total de la composición
** %) en peso seco con respecto al peso total de la materia seca
¹Harina de pescado peruana LT70: 71 % de proteínas crudas (PC), 11 % de materia grasa cruda (MGC), EXALMAR, Perú; ²Harina de krill: 61 % de PC, 19 % de MGC, Aker BioMarine Antarctic AS, Noruega; ³Super Prime sin vísceras: 82 % de PC, 3,5 % de MGC, Sopropêche, Francia; ⁴Soycomil P: 62 % de PC, 0,7 % de MGC, ADM, Países bajos; ⁵VITEN: 84,7 % de PC, 1,3 % de MGC, ROQUETTE, Francia; ⁶Harina de gluten de maíz: 61 % de PC, 6 % de MGC, COPAM, Portugal; ⁷PREMIX Lda, Portugal. Vitaminas (dieta IU o mg/kg): DL-alfa acetato de tocoferol, 100 mg; Bisulfato de sodio y de menadiona, 25 mg; Acetato de retinilo, 20 000 IU; DL-colecalciferol, 2 000 IU; tiamina, 30 mg; riboflavina, 30 mg; piridoxina, 20 mg; cianocobalamina, 0,1 mg; ácido nicotínico, 200 mg; ácido fólico, 15 mg; ácido ascórbico, 1 000 mg; inositol, 500 mg; biotina, 3 mg; pantotenato de calcio, 100 mg; cloruro de colina, 1 000 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; trigo excipiente; ⁸El óxido de itrio se incorporó solo en una fracción de los alimentos utilizados para las mediciones de digestibilidad.

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

10 Las dietas se fabricaron mediante extrusión (tamaños de los gránulos: 1,2 y 2,0 mm) con una extrusora de doble tornillo CLEXTRAL BC45 a una escala piloto con un diámetro de tornillo de 55,5 mm y un intervalo de temperatura entre 119 y 123°C. Durante la extrusión, todos los lotes de alimentos extruidos se secaron en una secadora vibradora de lecho fluido (modelo DR100, TGC Extrusion, Francia). Después de enfriar los gránulos, se añaden los aceites recubriendo al vacío (modelo PG-10VCLAB, Dinnisen, Países Bajos). Durante la prueba, los alimentos experimentales se conservaron a temperatura ambiente, pero en un lugar frío y bien ventilado. Se tomaron muestras representativas de cada dieta para el análisis (Tablas 4 - 5).

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

(continuación)

Aminoácidos	CTRL	Y5	Y7,5	Y15	Y25
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

El contenido se indica en porcentaje (%) en peso con respecto al peso total de 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

El contenido se indica en porcentaje (%) en peso con respecto al peso total de gránulos antes del secado.

5 1.3 Prueba sobre el rendimiento del crecimiento

Durante 90 días, tres grupos ejemplares de 35 truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), con un peso corporal inicial (PCI) de $5,01 \pm 0,1$ g, recibieron una de las cinco dietas experimentales. Los peces crecieron en tanques de fibra de vidrio circulares (volumen: 250 l) con un suministro de agua dulce a flujo continuo, a temperaturas comprendidas entre $14,1 \pm 0,3^\circ\text{C}$ y con niveles de oxígeno disuelto por encima de 7,4 mg/l (véase la Figura 1). Los peces se sometieron a condiciones de verano con cambios naturales de fotoperíodo (mayo a julio). Durante una semana, los peces se alimentaron manualmente hasta estar aparentemente saciados, tres veces al día (a las 9, 14 y 18 horas) y dos veces al día los fines de semana (a las 10 y 16 horas), con el mayor de los cuidados para evitar malgastar el alimento. El alimento que se distribuyó se cuantificó durante todo el estudio. Los peces anestesiados se pesaron individualmente al comienzo y al final del estudio, y el grupo se pesó el día 28 y el día 60. Al comienzo, 15 peces del mismo suministro inicial se sometieron a ensayo y se mantuvieron a -20°C para un análisis posterior sobre la composición integral corporal. Después de 90 días de alimentación experimental, 6 peces de cada tanque se sometieron a ensayo con el mismo propósito.

20 1.4. Medición de digestibilidad aparente

Al final de la prueba de crecimiento y después de todas las tomas de muestras asociadas, se utilizaron 12 peces (peso corporal: 45 g) de cada tanque de réplica para determinar la digestibilidad aparente de la materia seca, de las proteínas, lípidos, energía y fósforo, mediante el método indirecto con las mismas dietas que contenían óxido de itrio (200 mg/kg) como marcador inerte. Los peces se conservaron en tanques cilíndricos (volumen: 60 l; caudal de agua: 3,7 l/min; niveles de oxígeno disuelto mayores que 6,4 mg/l), a una temperatura del agua constante de 14°C . Los peces se adaptaron a las condiciones de cultivo y a las dietas experimentales durante 10 días. A continuación, los peces se alimentaron manualmente una vez al día (a las 10 h) excediéndose un poco. Después de limpiar profundamente los tanques de cría para eliminar todos los restos de alimento, la materia fecal se extraía diariamente durante los 8 días siguientes utilizando el sistema de filtración de salida de agua continua (sistema Choubert-INRA). Después de una recogida diaria, la materia fecal se congeló a -20°C . La materia fecal mezclada proveniente de cada grupo de peces se liofilizó antes de analizarla. Cada dieta se sometió a prueba por triplicado.

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

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

1.5. Métodos analíticos

5 Los ingredientes de prueba, las dietas y la materia fecal liofilizada se trituraron antes del análisis. Las muestras integrales se cortaron y 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, de las dietas alimenticias, de la materia fecal y del pez completo, se realizó utilizando los siguientes procedimientos: materia seca después del secado a 105° C durante 24 h; cenizas para combustión a 550°C durante 12 h; proteína cruda (N x 6,25) mediante una técnica de combustión con luz seguida de separación por cromatografía de gases y detección de la conductividad térmica (LECO FP428); la materia grasa por extracción con diclorometano (Soxhlet); el fósforo total según el método ISO/DIS 6491 que utiliza el reactivo vanado-molibdico; la energía cruda en una bomba calorimétrica adiabática. Se determinó presencia de óxido de itrio en los alimentos y las heces mediante el método CP-AES.

15 Se hidrolizó el total de aminoácidos, los ingredientes de prueba y las dietas de prueba (6 M de HCL a 116°C durante 22 horas en matraces de vidrio aclarados con nitrógeno), y después se derivatizaron con un reactivo de flúor AccQ (6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidilo) de acuerdo con el método de Tag AccQ- (Waters, EE. UU.). Los análisis se efectuaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) en un sistema de análisis de aminoácidos en fase inversa, utilizando norvalina como patrón interno. El triptófano no se determinó ya que se destruye parcialmente mediante hidrólisis ácida. Los picos resultantes se analizaron con el programa EMPOWER (Waters, EE. UU.). Para analizar 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 análisis de ésteres por cromatografía de gases, de acuerdo con el modo operativo de Lepage y Roy (1986).

25 1.6. Criterio para evaluar el crecimiento y la utilización de los nutrientes

PCI (g) Peso corporal inicial

PCF (g) Peso corporal final

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

30 Índice de consumo IC: ración alimenticia en bruto/aumento de peso.

Ingesta alimenticia voluntaria, IAV (% PC/día): $(\text{ración alimenticia en bruto}/(PCI+PCF))/2/\text{días} \times 100$.

Coficiente de eficacia proteica CEP: aumento de peso húmedo/ingesta de proteína cruda.

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

35

1.7 Análisis estadístico

Los datos se presentan a través del promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar. Los datos se sometieron a un análisis de univarianza. Antes del ANOVA (análisis de la varianza), los valores expresados en % se sometían a una transformación de la raíz cuadrada del arcoseno. El significado estadístico se probó a un nivel de probabilidad de 0,05. Todas las pruebas estadísticas se efectuaron utilizando el programa de IBM SPSS V21.

40

2. Resultados

45 2.1. Rendimiento del crecimiento

Los datos sobre el rendimiento del crecimiento, la conversión alimenticia y la eficacia proteica de la trucha arcoíris alimentada con las dietas experimentales durante 28, 60 y 90 días, se indican en las Tablas 6 - 8 y en la Figura 2. Durante la prueba no se produjeron muertes.

50

Tabla 6: Rendimiento del 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
IAV, % PC/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 valores medios ± desviación estándar (n=3).
 Los valores de una fila con diferentes exponentes tienen diferencias significativas (P <0,05).

Después de 28 días de alimentación experimental (tabla 5), los peces han más que triplicado su peso corporal inicial. La ingesta de alimento fue alta (3,22 a 3,31 % de PC/día) y no se vio afectada ($P>0,05$) por las dosis de composición según la invención incorporadas que van en aumento. Esta observación sugiere que la composición según la invención no tuvo efectos negativos sobre la palatabilidad, e incluso que podría compensar la eliminación total de la harina de pescado sin comprometer la ingesta de alimento. La tasa de crecimiento varía de 4,19 a 4,50 %/día. En comparación con el tratamiento CTRL, mientras que las dietas Y5 e Y7,5 no afectaron el PCF y la TCE, las dietas Y15 e Y25 condujeron 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 la dieta CTRL, la inclusión de la composición según la invención a 5 y 7,5 % (dietas Y5 e Y7,5 %) no afectó al IC. Sin embargo, los altos niveles de inclusión de la composición según la invención (dietas Y15 e Y25) condujeron a una reducción significativa en el IC ($P<0,05$). El coeficiente de eficacia proteica (CEP) varió entre 2,55 y 2,72. Los peces alimentados con una dieta Y25 mostraron un aumento significativo del CEP, en comparación con los peces alimentados con las dietas CTRL, Y5 e Y7,5.

Tabla 7: Rendimiento del 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 valores medios ± desviación estándar (n=3).
Los valores de una fila con diferentes exponentes tienen diferencias significativas ($P < 0,05$).

Después de 60 días de alimentación experimental (Tabla 6), los peces que se sometieron al tratamiento más eficaz, mostraron un aumento de 8 veces el peso corporal inicial. La tasa de crecimiento varió de 3,00 a 3,57 %/día. En comparación con el tratamiento CTRL, todas las dietas con la composición según la invención mostraron un aumento significativo ($P<0,05$) del TCE. Los valores del IC variaron entre 0,85 y 1,10, y en comparación con el tratamiento CTRL, la inclusión de la composición según la invención en todas las dosis probadas condujo a una reducción significativa del IC ($P<0,05$). El coeficiente de eficacia proteico (CEP) varió entre 2,01 y 2,56. El valor más bajo del CEP se encontró en los peces alimentados con una dieta CTRL, mientras que un aumento del CEP se asoció estrechamente a las dosis en aumento de la composición según la invención.

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 valores medios ± desviación estándar (n=3).
Los valores de una fila con diferentes exponentes tienen diferencias significativas ($P < 0,05$).

Después de 90 días de alimentación experimental (tabla 8), los peces que se sometieron al tratamiento más eficaz, mostraron un aumento de 11 veces el peso corporal inicial. En comparación con los peces alimentados con CTRL, los alimentados con dietas ricas en insectos mostraron un aumento significativo del peso corporal final ($P<0,05$). Este aumento estaba relacionado con la dosis, con un aumento moderado para la dieta Y5, intermedio para las dietas Y7,5 e Y15, y más alto para la dieta Y25. La tasa de crecimiento específico (TCE) varió entre 2,39 y 2,67 %/día, encontrando un valor mínimo en los peces alimentados con una dieta CTRL, mientras que los alimentados con pienso que contenía la composición según la invención, mostraron valores de TCE significativamente más altos ($p<0,05$). Independientemente del nivel de incorporación, la composición según la invención condujo a una reducción significativa del IC ($P<0,05$). En comparación con el tratamiento CTRL, todas las dietas de harina de insecto condujeron a un aumento significativo de los valores del CEP ($P<0,05$).

2.2. Composición integral

En la Tabla 9 se muestran los datos sobre la composición integral de la trucha al final de la prueba. Los tratamientos alimentarios no tuvieron ningún efecto ($P>0,05$) sobre el contenido de humedad, proteínas, lípidos, cenizas, fósforo y energía de todo el pez.

Tabla 9: Composición integral 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 pez.
 Los valores son valores medios ± desviación estándar (n=3).
 Valores iniciales del pez: humedad 75,0 ; proteína 14,1 %; materia grasa 8,7 %; cenizas 2,2 %; fósforo 0,4 %, energía 6,7 kJ/g.

2.3 Retención de los nutrientes

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

10

Tabla 10: Retención de nutrientes y energía en la trucha alimentada con las diferentes dietas.

Retención, % de ingesta	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
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 valores medios ± desviación estándar (n=3).
 Los valores de una fila con diferentes exponentes tienen diferencias significativas (P <0,05).

2.4 Digestibilidad aparente

15 En la Tabla 11 se muestra la composición de la materia fecal recogida de la trucha alimentada con los diversos tratamientos alimentarios.

Tabla 11: Composición de la materia fecal de la trucha alimentada con diferentes dietas.

Composición de materia fecal	CTRL	Y5	Y7,5	Y15	Y25
Óxido de itrio, (mg/kg)	1.384 ± 39	1.395 ± 94	1.415 ± 61	1.369 ± 62	1.411 ± 43
Proteína, % DM*	19,63 ± 0,06	19,67 ± 0,24	19,76 ± 0,34	19,70 ± 0,38	19,20 ± 0,41
Grasas, % DM*	4,37 ± 0,06	4,33 ± 0,19	4,28 ± 0,24	4,30 ± 0,06	4,20 ± 0,33
Fósforo, % DM*	2,64 ± 0,06	2,77 ± 0,08	2,65 ± 0,10	2,54 ± 0,15	2,62 ± 0,09
Energía, kJ/g DM	23,24 ± 0,16	23,14 ± 0,40	23,47 ± 0,47	22,88 ± 0,16	23,09 ± 0,16

* Porcentaje en peso seco con respecto al peso total de la materia fecal seca.
 Los valores son valores medios ± desviación estándar (n=3).

20 En la tabla 12 se muestran los coeficientes de digestibilidad aparente (CDA %) de los diferentes nutrientes y de la energía. El aumento de las dosis de incorporación de la composición según la invención, no tuvo ningún efecto significativo (P>0,05) sobre la digestibilidad aparente de la materia seca, las proteínas, la grasa, el fósforo y la energía.

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

ADC, %	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
Grasa	97,0 ± 0,1	97,0 ± 0,1	97,0 ± 0,2	97,0 ± 0,2	97,1 ± 0,3
Fósforo, % de ingesta	69,9 ± 1,4	68,3 ± 1,5	70,5 ± 2,4	71,4 ± 2,9	70,3 ± 1,8

25

(continuación)

ADC, %	CTRL	Y5	Y7,5	Y15	Y25
Energía, % de ingesta	84,1 ± 0,4	84,3 ± 0,8	84,1 ± 1,0	84,2 ± 0,6	84,4 ± 0,6
Los valores son valores medios ± desviación estándar (n=3).					

3. Conclusión

5 Después de 90 días de alimentación experimental, el rendimiento global del crecimiento se puede considerar como muy satisfactorio y dentro de un intervalo más alto para los alevines de trucha arcoíris, con valores de TCE durante toda la prueba que varían entre 2,4 y 2,7 %/día. En los tratamientos con mayor rendimiento, los peces mostraron un aumento de 11 veces su peso corporal inicial. La tasa de conversión alimenticia entre los tratamientos varió entre 0,79 y 0,93, lo que sugiere una buena idoneidad nutricional de los alimentos y buenas prácticas alimentarias.

10 Los datos experimentales generados en este ejemplo permiten afirmar que:

- 15 ▪ La incorporación de dosis en aumento de la composición según la invención (5, 7,5, 15 y 25 %) con una reducción simultánea de la harina de pescado, se ha relacionado con un aumento progresivamente significativo del peso corporal del pez.
- 15 ▪ Todas las dietas que contienen composición según la invención han mostrado una mejora significativa en la TCE, el IC y el CEP.
- 15 ▪ Las dosis de incorporación en aumento de la composición según la invención no tuvieron ningún efecto sobre la composición integral de la trucha.
- 20 ▪ Las dosis de incorporación en aumento de la composición según la invención no tuvieron efecto sobre la digestibilidad aparente de la materia seca, las proteínas, la grasa, el fósforo y la energía en las diferentes dietas experimentales.
- 20 ▪ Las proteínas, el fósforo y la retención de energía se reforzaron en las truchas alimentadas con los alimentos que comprenden la composición según la invención.

25 En general, la composición según la invención, utilizada en este ejemplo, podría reemplazar eficazmente el 100 % de la harina de pescado en la dieta alimenticia de los alevines de trucha arcoíris con efectos positivos sobre el IC y el rendimiento global del crecimiento.

30 Ejemplo 5: Procedimientos con o sin trituración previa al prensado

Procedimiento solo con prensado

35 En un matraz puesto al baño María a 100° C y que contiene 200 ml de agua previamente llevada a ebullición, se introducen 200 g de larvas de *T. molitor*. Después de 5 minutos, el matraz se retira del baño María; las larvas se drenan y se transfieren a una prensa de tipo doble tornillo. De este modo, se obtiene una torta de prensa.

Procedimiento con trituración seguida de prensado

40 En un matraz puesto al baño María a 100° C y que contiene 200 ml de agua previamente llevada a ebullición, se introducen 200 g de larvas de *T. molitor*. Después de 5 minutos, el matraz se retira del baño María; las larvas se drenan y después se mezclan con un volumen de agua de 200 ml. El líquido que se obtiene se transfiere a una prensa de tipo doble tornillo. De este modo, se obtiene una torta de prensa.

Medición de la tasa de lípidos

45 En un matraz se colocan 2 g de muestra, se añaden 0,2 g de Na₂SO₄ y 15 ml de CHCl₃/MeOH (2/1 v/v). La mezcla se somete a agitación magnética durante 20 minutos; a continuación la solución se filtra, y el residuo se coloca nuevamente en el matraz con 10 ml de CHCl₃/MeOH (2/1 v/v). La mezcla se somete a agitación magnética durante 15 minutos; a continuación la solución se filtra, y las fases disolventes se combinan y evaporan a un peso constante. El contenido de lípidos se determina como porcentaje de masa después de la extracción-evaporación con respecto a la masa inicial de la muestra (2 g).

Conclusión:

55 Se estudió la importancia de la trituración antes del prensado (figura 3). Claramente parece que, cuando se realiza una trituración previa, la distribución de los lípidos entre la torta y el jugo de prensa es mucho más eficaz, 12,9 frente a 87,1 en comparación con 42,7 frente a 57,3.

60 Ejemplo 6: Análisis del tamaño de las proteínas solubles de la composición según la invención

Se colocó una muestra de 100 mg de la composición preparada en el ejemplo 1 en 10 ml de tampón de fosfato NaCl

5 (pH 7,4, 0,137 mM). La muestra se agitó (vórtice) durante 1 minuto y después se centrifugó a 900 g durante 1 min. Después de centrifugar, la muestra se filtró a través de una membrana de 0,45 mm. El análisis del tamaño de las proteínas solubles se realizó utilizando un sistema de cromatografía estérica de exclusión por tamaño con una columna Nucleogel GFC-300. Como eluyente se utilizó un tampón de fosfato NaCl (pH 7,4, 0,137 mM). El caudal era de 1,0 ml/min. La detección se realizó con un detector UV a 280 nm.

Los resultados del análisis se muestran en la figura 4 y se resumen en la tabla 13 a continuación.

10 Tabla 13: Distribución de los tamaños de las proteínas solubles contenidas en la composición preparada en el 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

Los resultados demuestran que aproximadamente el 74,4 % de las proteínas solubles presentes en la composición según la invención, tienen una masa molar inferior a 12 400 g/mol (o Da, daltons).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición que comprende al menos 67 % en peso de proteínas crudas, al menos 5 % en peso de quitina, los porcentajes en peso se expresan con respecto al peso total de la composición, y 85 % en peso de proteínas digeribles con respecto al peso total de las proteínas crudas.
2. Composición según la reivindicación 1, que comprende un contenido de ceniza menor o igual al 4 % en peso con respecto al peso total de la composición.
- 10 3. Composición según la reivindicación 1 o 2, que comprende un contenido de grasa entre 5 y 20 % en peso con respecto al peso total de la composición.
4. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, obtenida de insectos.
- 15 5. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, cuyo contenido de humedad residual está comprendido entre 2 y 15 %.
6. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende entre 30 y 60 % en peso de proteínas solubles con respecto al peso total de proteínas crudas, en donde al menos el 50 % de las proteínas solubles tienen un tamaño menor o igual a 12 400 g/mol.
- 20 7. Procedimiento de preparación de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, que comprende las siguientes etapas:
- 25 i) provocar la muerte de insectos,
ii) prensado de los insectos para obtener una torta de prensa,
iii) secado de la torta de prensa, y
iv) trituración de la torta de prensa.
- 30 8. Procedimiento según la reivindicación 7, que comprende las siguientes etapas,
- i) provocar la muerte de insectos,
ii) prensado de los insectos para obtener una torta de prensa,
iii) secado de la torta de prensa, y
35 iv) trituración de la torta de prensa.
- en donde la etapa de prensado está precedida por una etapa de trituración de los insectos.
- 40 9. Procedimiento según la reivindicación 7, que comprende las siguientes etapas:
- i) provocar la muerte de insectos,
ii) prensado de los insectos para obtener una torta de prensa,
iii) secado de la torta de prensa, y
45 iv) trituración de la torta de prensa.
- en donde la etapa de prensado se realiza con calor.
10. Procedimiento según la reivindicación 7, que comprende las siguientes etapas:
- 50 i) provocar la muerte de insectos,
ii) prensado de los insectos para obtener una torta de prensa,
iii) secado de la torta de prensa, y
iv) trituración de la torta de prensa.
- 55 en donde la etapa de trituración de la torta de prensa se realiza hasta obtener un tamaño de partícula comprendido entre 300 μ m y 1 μ m.
11. Uso de la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en alimentación humana o animal.
- 60 12. Uso según la reivindicación 11, en donde la composición se utiliza para reemplazar una harina proteica.

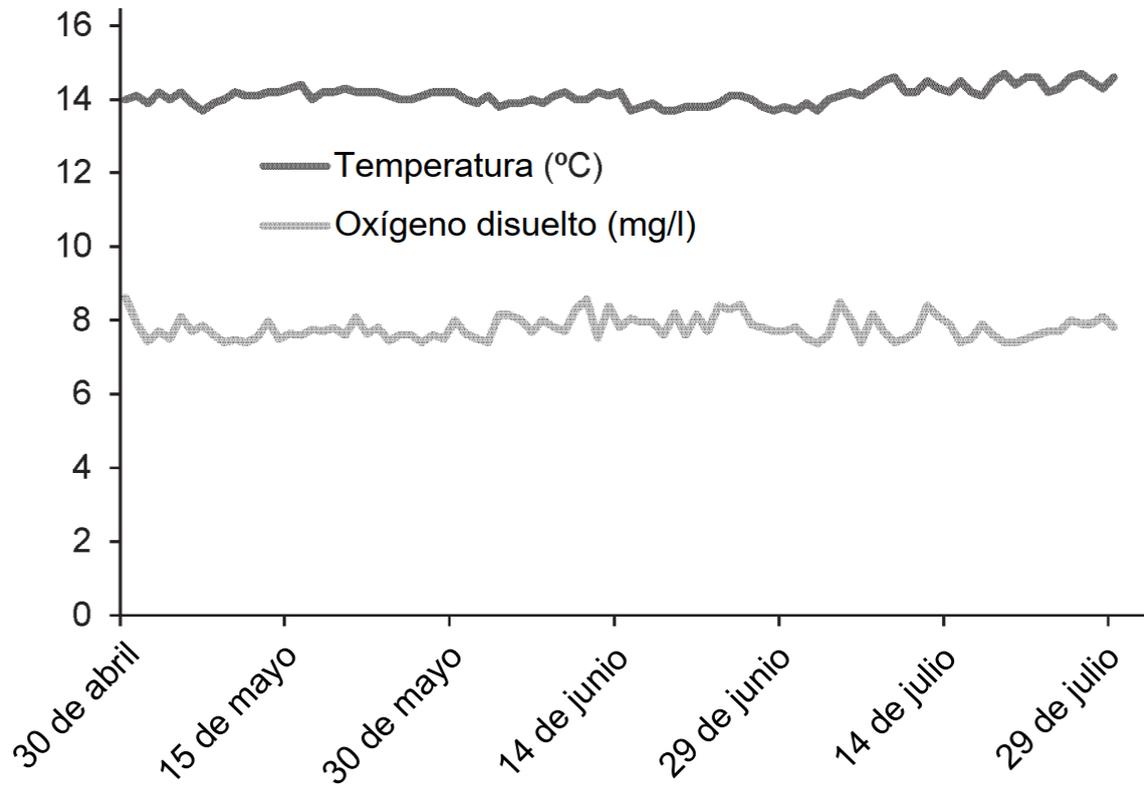


Fig. 1

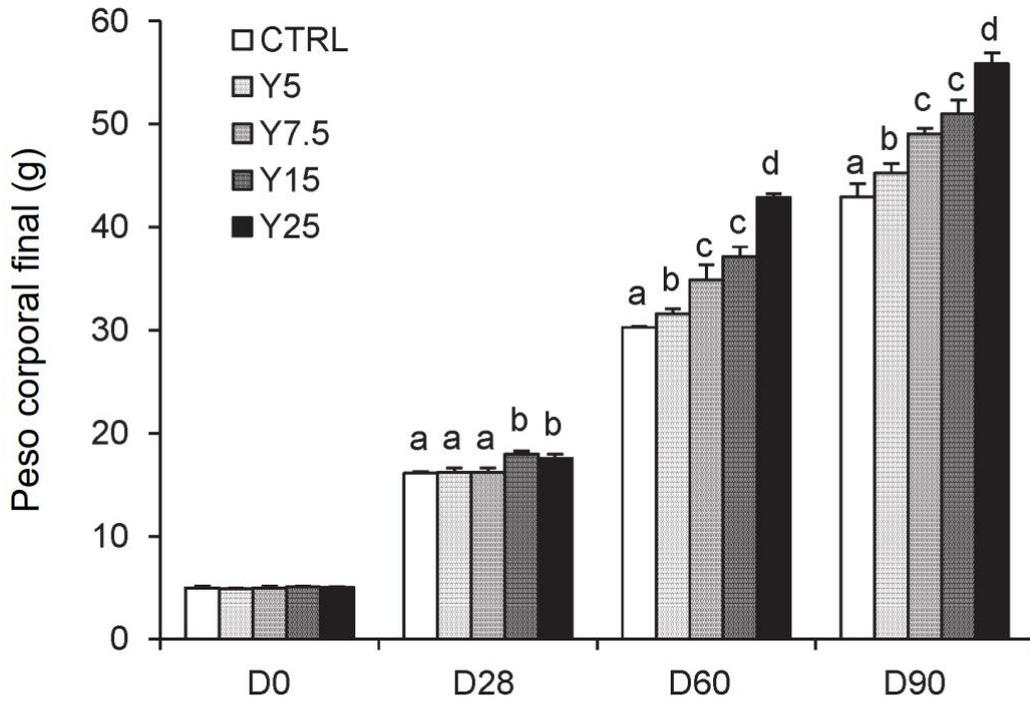


Fig. 2A

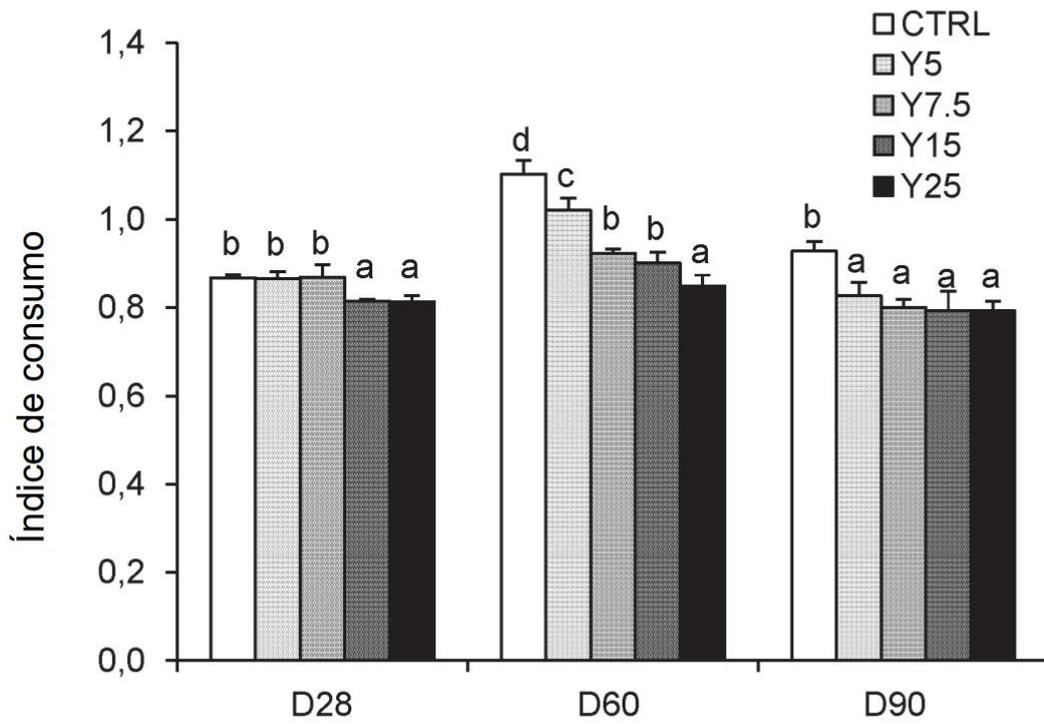


Fig. 2B

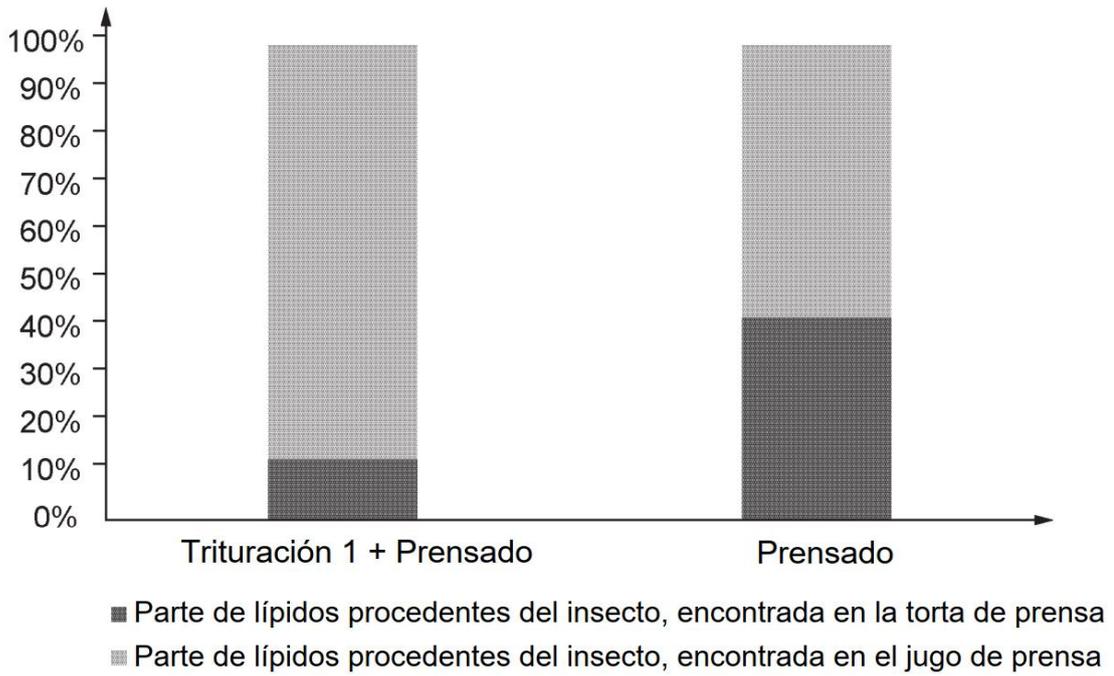


Fig. 3

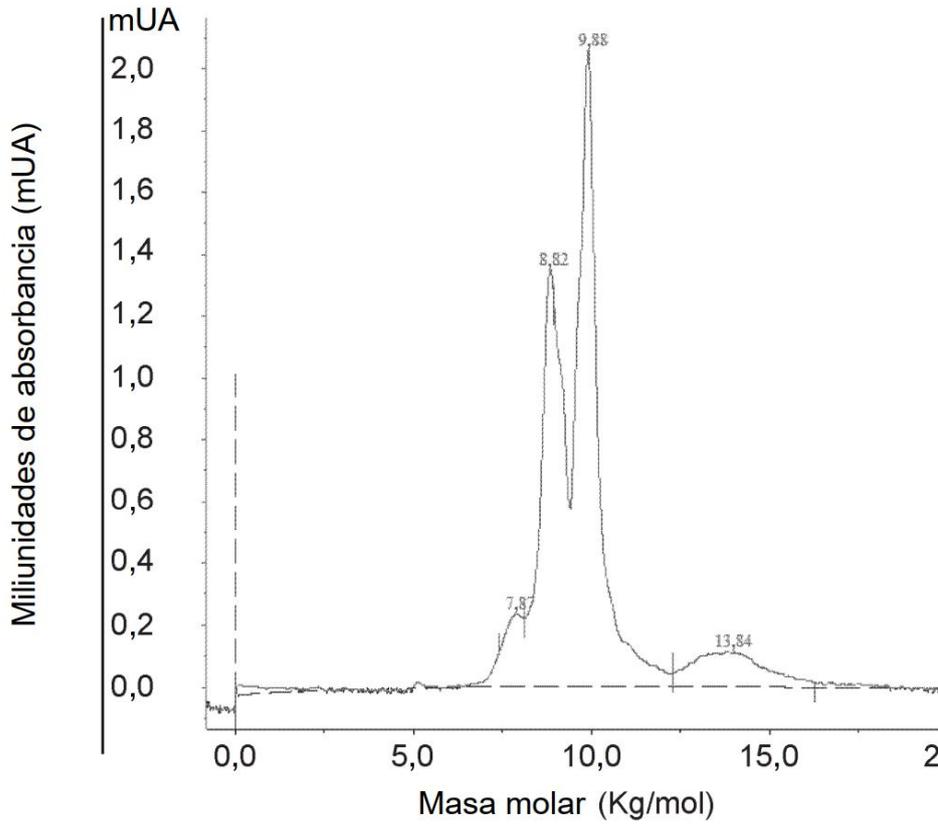


Fig. 4