

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 819 858**

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/FR2015/053781**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.07.2016 WO16108033**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.12.2015 E 15828828 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2020 EP 3240902**

54 Título: **Quitina, hidrolizado y procedimiento para la producción de uno o más productos de interés a partir de insectos mediante hidrólisis enzimática**

30 Prioridad:

31.12.2014 FR 1463512

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

19.04.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BEREZINA, NATHALIE;
HUBERT, ANTOINE;
BERRO, FABRICE;
LEVON, JEAN-GABRIEL;
LE ROUX, KARINE;
SOCOLSKY, CECILIA;
SANCHEZ, LORENA y
LAURENT, SOPHIE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 819 858 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

Quitina, hidrolizado y procedimiento para la producción de uno o más productos de interés a partir de insectos mediante hidrólisis enzimática

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de al menos un producto de interés a partir de insectos. De manera más particular, la invención se refiere a un procedimiento para la producción de quitina y/o quitosán mediante hidrólisis enzimática de cutículas de insecto. También se refiere a una quitina específica y a un hidrolizado.

10 Según la invención, el término "quitina" se refiere a cualquier tipo de derivado de quitina, es decir, de derivado de polisacárido que comprenda unidades de N-acetil-glucosamina y unidades de D-glucosamina, en particular, copolímeros de quitina-polipéptidos (a veces, denominados "compuestos de quitina-polipéptidos").

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

20 Por "quitosán" se quiere decir, según la presente invención, los productos de la desacetilación de quitina. El límite usual entre el quitosán y la quitina es determinado por el grado de acetilación: un compuesto que tiene un grado de acetilación menor que 50 % se denomina quitosán y un compuesto que tiene un grado de acetilación mayor que 50 % se denomina quitina.

25 La quitina y/o el quitosán se utilizan en numerosas aplicaciones: cosméticas (composición cosmética), médicas y farmacéuticas (composición farmacéutica, tratamiento de quemaduras, biomateriales, apósitos corneales, material de sutura), dietéticas y de procesamiento de alimentos, técnicas (agentes de filtración, texturizado, floculación o adsorbentes, en particular para filtración y purificación de agua), etc. De hecho, la quitina y/o el quitosán son materiales que son biocompatibles, biodegradables y no tóxicos.

30 La extracción tradicional de la quitina se efectúa químicamente de crustáceos, cefalópodos, aunque también, más excepcionalmente, de hongos. La vía química utiliza grandes cantidades de reactivos (tales como ácido clorhídrico, hidróxido de sodio y agentes blanqueadores), los cuales tienen el efecto de desnaturalizar la estructura de la quitina tal como existe en el estado natural, por ejemplo, como está presente en la concha de crustáceos. Más aún, la mayoría de los reactivos químicos son dañinos a los seres humanos y al ambiente y generan grandes volúmenes de efluentes que tienen que ser tratados. Finalmente, la quitina y/o el quitosán que se origina de crustáceos puede generar reacciones alérgicas en personas sensibles.

35 Otra vía para la extracción de quitina es la vía enzimática. Se considera que ésta vía es más suave, lo que permite conservar mejor la quitina y/o el quitosán, la quitina obtenida mediante esta vía es de un color parduzco, requiriendo una etapa de purificación con el fin de obtener un polvo comercializable, es decir, de color blanco. Por lo tanto, los procedimientos existentes generalmente comprenden una o más etapas para eliminar las impurezas de la quitina, tal como una etapa de desmineralización con ácido, realizada antes de la hidrólisis enzimática y/o una etapa para blanquear la quitina con un agente oxidante, realizada después de la hidrólisis enzimática. Por desgracia, estas dos etapas de purificación de quitina tienen el efecto de alterar la estructura química de la quitina.

40 El trabajo realizado por los inventores demostró que era posible obtener una quitina que fuera más pura y con una estructura más parecida a la de la estructura original de la quitina al realizar una etapa de tratamiento mecánico antes de la hidrólisis, es decir, una etapa de prensado de cutículas de insectos.

50 Por lo tanto, la invención se refiere a un procedimiento para la producción de al menos un producto de interés a partir de insectos, que comprende las siguientes etapas:

- 55 (i) trituración de las cutículas de los insectos,
 (ii) prensado de las cutículas de los insectos, y después
 (iii) la hidrólisis enzimática de las cutículas de los insectos con una enzima proteolítica.

Por "producto de interés" se entiende que se refiere más particularmente a la quitina y/o al quitosán y/o a un hidrolizado.

60 Por "hidrolizado" se entiende que se refiere a un producto que comprende proteínas, proteínas hidrolizadas, péptidos, aminoácidos y/u otros compuestos derivados de una proteína, obtenibles mediante hidrólisis enzimática de proteínas.

65 El producto o los productos de interés se obtienen de insectos. Por "insectos" se entiende que se refiere a insectos en cualquier estadio de desarrollo, tal como un estadio de adulto, larva o ninfa. De preferencia, los insectos utilizados en el procedimiento según la invención son comestibles.

De manera más particular, los insectos pueden seleccionarse del grupo constituido por coleópteros, dípteros, lepidópteros, isópteros, ortópteros, himenópteros, blatópteros, hemípteros, heterópteros, efemerópteros y mecópteros, de preferencia, coleópteros, dípteros, ortópteros y lepidópteros.

5 De preferencia, los insectos se seleccionan del grupo compuesto 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* y *Samia ricini*.

10 Más preferiblemente, los insectos se seleccionan del grupo constituido por *Tenebrio molitor*, *Hermetia illucens*, *Galleria mellonella*, *Alphitobius diaperinus*, *Zophobas morio*, *Blattella fusca*, *Musca domestica*, *Chrysomya megacephala*, *Locusta migratoria*, *Schistocerca gregaria*, *Acheta domesticus* y *Samia ricini* y aún más preferiblemente, *Tenebrio molitor*.

15 Una o más especies de insectos pueden utilizarse en el procedimiento según la invención, de preferencia, una sola especie de insectos. Si se utilizan varias especies, se seleccionarán ventajosamente dos especies estrechamente relacionadas, por ejemplo *Hermetia illucens* y *Musca domestica*.

20 Preferentemente, los insectos se crían en lugar de tomarlos de la naturaleza. Por ejemplo, los insectos se cultivan en una granja de insectos. La cría de insectos en una granja especial no solo permite controlar y eliminar los riesgos asociados con enfermedades portadas por insectos, sino también limitar los riesgos asociados con la toxicidad de productos alimenticios derivados de insectos, por ejemplo, debido a la presencia de insecticidas. Asimismo, las prácticas de crianza permiten controlar la calidad del suministro de los insectos y limitar los costes de suministro.

25 Por "cutículas de insecto" se entiende que se refiere no solo a las cutículas una vez que han sido separadas de los insectos, sino también las cutículas que incluyen todos o parte de los demás constituyentes del insecto, incluyendo el insecto completo. De hecho, es posible aplicar el procedimiento según la invención a todo el insecto, tal como a insectos triturados, o solamente a una parte de los insectos que comprende las cutículas, por ejemplo, las exuvias y/o mudas de insectos, separadas de manera natural y recogidas mediante un procedimiento adecuado.

30 La cutícula es la capa exterior (o exoesqueleto) secretada por la epidermis de los insectos. En general, está formada por tres capas:

- 35 - la epicutícula, que es la capa más delgada, más externa de la cutícula (menor que 4 µm); esta capa es impermeable al agua y comprende una capa de cera impermeabilizante, así como una cantidad más pequeña de proteínas y quitina;
- la exocutícula, que es la capa intermedia de la cutícula; compuesta esencialmente por proteínas que se han endurecido por curtido, que son responsables de la rigidez de la cutícula; quitina y opcionalmente melanina; y
- 40 - la endocutícula, que es una capa delgada y flexible, constituida por una mezcla de proteínas y quitina.

El objetivo principal de prensar las cutículas de insectos es eliminar un jugo de prensa rico en grasa y/o enriquecer la torta de prensa para dar un substrato para la hidrólisis.

45 En el procedimiento según la invención, el prensado de las cutículas de los insectos permite obtener una torta de prensa que comprende un contenido de aceite (o lípidos) menor que o igual a 20 %, de preferencia menor que o igual a 15 %, más preferiblemente menor que o igual a 12 %, aún más preferiblemente menor que o igual a 10 %.

50 En la presente solicitud, los intervalos de los valores son entendidos como inclusivos. Más aún, cuando "aproximadamente" o "del orden de" precede un número, es equivalente a más o menos 10 % del valor de este número.

Del mismo modo, con el fin de enriquecer la torta de prensa en un substrato para hidrólisis, el prensado de las cutículas de los insectos permite obtener una torta de prensa que tiene un contenido de materia seca comprendido entre 30 % y 60 %, de preferencia comprendido entre 40 % y 55 % y más preferiblemente comprendido entre 45 % y 50 %.

55 Cualquier sistema de prensa puede utilizarse para realizar el prensado de las cutículas de los insectos, por ejemplo, una prensa de tornillo simple o doble tornillo (prensa de doble tornillo del tipo Angel), un filtro-prensa (filtro-prensa del tipo Choquet), una prensa de placas, etc. Estos sistemas son bien conocidos para una persona experta en la técnica, quien es capaz de determinar las condiciones de prensado con el fin de obtener los contenidos de aceite y/o agua mencionados anteriormente.

60 En el procedimiento de acuerdo con la invención, el prensado de las cutículas de insectos es seguido de una hidrólisis enzimática.

65 De preferencia, la hidrólisis enzimática se realiza con al menos una enzima proteolítica, de preferencia una proteasa. En la presente solicitud, los nombres o sufijos "peptidasa" y "proteasa" se utilizan indistintamente para referirse a una enzima que provoca la lisis de un enlace peptídico de las proteínas. Ventajosamente, esto se realiza durante un tiempo

ES 2 819 858 T3

de 4 a 8 h, de preferencia durante 4 a 5 h, a una temperatura de 40 a 60 °C, de preferencia 45 a 55 °C y a un pH comprendido entre 6 y 8, de preferencia entre 6,5 y 7,5.

5 La hidrólisis enzimática puede realizarse con una sola proteasa o de manera alternativa con una mezcla de enzimas que contenga al menos una proteasa, más preferiblemente una mezcla de enzimas que contenga varias proteasas, tal como una mezcla que contenga una endoproteasa y una exoproteasa, o una proteasa y una polisacarasa.

De preferencia, la proteasa se selecciona del grupo constituido por aminopeptidasas, metalocarboxipeptidasas, serina endopeptidasas, cisteína endopeptidasas, aspártico endopeptidasas, metaloendopeptidasas.

10

Ventajosamente, las enzimas pueden seleccionarse entre las siguientes:

Enzima(s)	Clase	Número de EC	Proveedor	Ciudad	País
Flavourzyme	Aminopeptidasas	EC 3.4.11.1	Novozyme	Bagsvaerd	Dinamarca
Proteasa fúngica 500		EC 3.4.11.1	Bio-Cat	Troy	Estados Unidos
Kojizyme		EC 3.4.11.1	Novozyme	Bagsvaerd	Dinamarca
Protex P	Serina endopeptidasas	EC 3.4.21	Genencor International B.V.	Leiden	Holanda
Quimotripsina		EC 3.4.21.1	Novozyme	Bagsvaerd	Dinamarca
Protamex		EC 3.4.21	Novozyme	Bagsvaerd	Dinamarca
Elastasa		EC 3.4.21.14	Novozyme	Bagsvaerd	Dinamarca
Tripsina		EC 3.4.21.36	Novozyme	Bagsvaerd	Dinamarca
Alcalasa		EC 3.4.21.4	Novozyme	Bagsvaerd	Dinamarca
Papaína	Cisteína endopeptidasas	EC 3.4.22.2	Bio-Cat	Troy	Estados Unidos
Bromelaína (ananasa)		EC 3.4.22.32	Bio-Cat	Troy	Estados Unidos
Polyve NP	Aspártico endopeptidasas	EC 3.4.23	Lyven	Colombelles	Francia
Pepsina		EC 3.4.23.1	Sigma Aldrich	Saint-Quentin-Fallavier	Francia
Proteasa neutra	Metaloendopeptidasa	EC 3.4.24.28	Bio-Cat	Troy	Estados Unidos
Protex 50FP	Endopeptidasa	EC 3.4.21	Bio-Cat	Troy	Estados Unidos
Pancrealyve	Exo y endopeptidasa (cóctel de proteasas + amilasas)	n.a.*	Lyven	Colombelles	Francia
Izyme BA	Aspárticoproteasa	EC 3.4.23	Novozyme	Bagsvaerd	Dinamarca
Sumizyme	Cóctel enzimático	n.a.*	Takabio – Shin Nihon	Aichi	Japón
Neutrasa	Base de Zn de endoproteasa de <i>B. amilolicuefaciens</i>	EC 3.4.24	Novozyme	Bagsvaerd	Dinamarca
Novozyme 37071	Proteasa		Novozyme	Bagsvaerd	Dinamarca

*n.a.: no aplicable

15 Ventajosamente, la enzima utilizada en la hidrólisis es una aspártico endopeptidasa, tal como Polyve NP. Este tipo de enzima permite obtener muy buenos resultados en términos de pureza de la quitina obtenida, en especial cuando este tipo de enzima se aplica en la hidrólisis de una torta de prensa obtenida de coleópteros y más particularmente de la especie *T. molitor*.

20 La enzima o la mezcla de enzimas se introduce en una cantidad que varía de 0,2 a 10 % en peso de materia seca estimada, de preferencia de 0,4 a 8 % en peso y más preferiblemente de 0,5 a 2 %. Por "peso de materia seca estimada" se entiende que quiere decir más particularmente el peso de materia seca de insecto o parte(s) de insecto, tal como puede estimarse cuando se entra en la etapa de hidrólisis enzimática.

25 En términos de actividad enzimática, la cantidad de enzima o mezcla enzimática introducida es equivalente a una actividad comprendida entre 2000 y 5000 SAPU (siglas del inglés "Spectrophotometric Acid Protease Unit que significa Unidad espectrofotométrica de proteasa ácida, descrita en el ejemplo 5 más adelante), de preferencia entre 3000 y 4000 SAPU, por 100 g de peso húmedo, con un contenido de agua desde 30 hasta 70 %, de substrato a transformar, es decir, de materia de insecto o parte(s) de insecto hidratada.

30 Ventajosamente, la etapa de hidrólisis enzimática se realiza en presencia de agua, tal como agua dulce. La cantidad

- de agua utilizada en la hidrólisis enzimática de determina de la siguiente manera: la proporción del volumen de agua en ml sobre el peso en g de insecto está comprendida de preferencia entre 0,3 y 10, más preferiblemente entre 0,5 y 5, aún más preferiblemente entre 0,7 y 3, aún más preferiblemente del orden de 1. Se observará que esta proporción también corresponde a la proporción del peso de agua sobre el peso de insecto, siendo la densidad de agua 1,0 g/ml en condiciones normales de temperatura y presión.
- El procedimiento de acuerdo con la invención permite obtener una quitina que tiene un grado de pureza (o pureza gravimétrica) comprendida entre 40 y 90 %, de preferencia entre 50 y 90 %, más preferiblemente comprendida entre 60 y 85 % y aún más preferiblemente del orden de 80 % (véase el ejemplo 2 y la figura 2).
- Más aún, el procedimiento de acuerdo con la invención permite obtener un hidrolizado que tenga un cierto número de propiedades ventajosas, en particular en términos de digestibilidad, contenido de lípidos y/o proteínas, tamaño de proteína o composición de aminoácidos.
- El procedimiento de acuerdo con la invención comprende una etapa de trituración antes de la etapa de prensado.
- Esta etapa de trituración tiene por objeto reducir las cutículas y/o los insectos a partículas con el fin de facilitar el acceso de las enzimas al substrato durante la hidrólisis enzimática. Esta etapa también permite, cuando es seguida de una etapa de prensado, facilitar la eliminación del jugo de prensa y el aislamiento de la materia sólida.
- Esta etapa de trituración también permite mejorar la distribución de los lípidos que se originan del insecto entre la torta de prensa y el jugo de prensa que se origina del prensado. De hecho, como se muestra en la figura 4, la torta de prensa que se origina de un procedimiento comprendiendo tanto trituración como prensado, tiene un contenido de lípidos reducido comparado con una torta de prensa a partir de un procedimiento que comprende solo prensado.
- De manera más particular, en el procedimiento de acuerdo con la invención, la trituración y el prensado de las cutículas de insectos permite obtener una torta de prensa que comprende un contenido de lípidos (o aceite) menor que o igual a 15 %, de preferencia menor que o igual a 12 %, aún más preferiblemente menor que o igual a 10 %.
- La trituración puede realizarse ventajosamente con un molino mezclador, tal como un molino de cuchillas.
- De preferencia, al final de la trituración, el tamaño de las partículas de insecto es menor que 1 cm (tamaño de partícula más grande observable utilizando un microscopio), de preferencia menor que 0,5 cm, aún más preferiblemente un tamaño comprendido entre 300 μm y 0,5 cm, de preferencia 500 μm y 0,5 cm y aún más preferiblemente entre 500 μm y 1 mm.
- Para facilitar la trituración puede añadirse una cantidad de agua. Esta cantidad de agua se determina de la siguiente manera: la proporción del volumen de agua en ml sobre el peso en g de insecto está comprendida de preferencia entre 0,3 y 10, más preferiblemente entre 0,5 y 5, aún más preferiblemente entre 0,7 y 3, aún más preferiblemente del orden de 1.
- Ventajosamente, el procedimiento de acuerdo con la invención también comprende una etapa de provocar la muerte de los insectos, que se realiza antes de la etapa de prensado y/o trituración.
- Esta etapa de provocar la muerte puede realizarse mediante procedimientos convencionales de cría de animales de sangre fría y/o de tamaño pequeño (crustáceos, peces, caracoles, etc.), tales como frío (congelación), calor (escaldado), privación de oxígeno, etc. Ventajosamente, la etapa de provocar la muerte de los insectos se realiza mediante escaldado. El escaldado no solo provoca la muerte de los insectos, sino que también disminuye la carga microbiana (reduciendo el riesgo de deterioro y riesgo de salud) e inactiva las enzimas internas de los insectos, lo cual puede desencadenar una autólisis y, por tanto, un rápido oscurecimiento de los mismos. Este escaldado se realiza de tal manera que provoca la muerte tan rápidamente como es posible, con el fin de respetar el bienestar animal y de acuerdo con las recomendaciones científicas.
- De manera alternativa, la provocación de la muerte puede realizarse mediante blanqueo. El blanqueo tiene las mismas ventajas que el escaldado mencionadas anteriormente.
- Ventajosamente, la muerte de los insectos se provoca, por ejemplo, mediante escaldado o blanqueo, y después se trituran antes de prensarse.
- De preferencia, la etapa de escaldado se realiza en agua, tal como agua dulce, a una temperatura que varía de 95 a 105 °C, de preferencia del orden de 100 °C y durante un tiempo de 2 a 20 min, de preferencia de 5 a 15 min.
- La cantidad de agua introducida en esta etapa de escaldado se determina de la siguiente manera: la proporción del volumen de agua en ml sobre el peso de insecto en g está comprendida de preferencia entre 0,3 y 10, más preferiblemente entre 0,5 y 5, aún más preferiblemente entre 0,7 y 3, aún más preferiblemente del orden de 1.

De manera alternativa, la etapa de blanqueo se realiza con vapor de agua y/o con agua a una temperatura comprendida entre 80°C y 130°C, de preferencia entre 90°C y 120°C.

5 El procedimiento de acuerdo con la invención puede comprender además, una etapa de tratamiento de las cutículas de insectos con un agente oxidante antes de la hidrólisis enzimática.

De preferencia, en el procedimiento de acuerdo con la invención, el agente oxidante utilizado en el tratamiento de las cutículas se selecciona del grupo constituido por peróxido de hidrógeno, permanganato de potasio, ozono e hipoclorito de sodio, aún más preferiblemente peróxido de hidrógeno.

10 Ventajosamente, cuando el agente oxidante es peróxido de hidrógeno, la cantidad introducida de este agente para tratar las cutículas de insecto es tal que el contenido de peróxido de hidrógeno está comprendido entre 1 y 33 % en peso sobre el peso total de insectos, de preferencia entre 2 y 12 % en peso sobre el peso total de insectos, de preferencia del orden de 6 % en peso.

15 De preferencia, el tratamiento de las cutículas de insecto con el agente oxidante se realiza en presencia de agua, tal como agua dulce. Ventajosamente, la cantidad de agua utilizada durante el tratamiento de las cutículas se determina de la siguiente manera: la proporción de volumen de agua en ml sobre el peso en g de insecto está comprendida de preferencia entre 0,3 y 10, más preferiblemente entre 0,5 y 5, aún más preferiblemente entre 0,7 y 3, aún más preferiblemente del orden de 1.

20 El tratamiento de las cutículas de insecto con el agente oxidante puede realizarse durante una o más de las siguientes etapas:

- 25 - de manera concomitante con el escaldado y/o después de la etapa de escaldado, más preferiblemente de manera concomitante con el escaldado. Como alternativa, de manera concomitante con el blanqueo y/o después de la etapa de blanqueo, más preferiblemente de manera concomitante con el blanqueo. De manera más particular, cuando el tratamiento de las cutículas de insecto se realiza durante el escaldado o el blanqueo, el agente oxidante puede añadirse ventajosamente al agua utilizada para escaldar los insectos.
- 30 - antes, de manera concomitante y/o después de la trituración. De manera más particular, cuando el tratamiento de las cutículas de insecto se realiza durante la trituración, el agente oxidante puede añadirse ventajosamente al agua utilizada para la trituración.
- antes y/o de manera concomitante con el prensado.
- 35 - durante una etapa de tratamiento específico de las cutículas de insecto.

De manera ventajosa, la hidrólisis enzimática puede ir seguida de una etapa de inactivación térmica para inactivar la enzima o la mezcla de enzimas utilizada en la hidrólisis enzimática.

40 Al final de un procedimiento de acuerdo con la invención, la quitina puede recuperarse mediante prensado o centrifugación del medio de reacción de la hidrólisis enzimática. En esta etapa, también se recuperó un coproducto de la quitina, es decir, un hidrolizado.

45 A continuación se describe con más detalle un modo de realización preferido de un procedimiento de acuerdo con la invención.

En particular, este modo de realización preferido describe varias etapas ventajosas para un procedimiento de acuerdo con la invención, tales como etapas de purificación suave de la quitina: un segundo prensado, operaciones de lavado, filtración y secado opcionales.

50 Finalmente, como la quitina se comercializa generalmente en forma de polvo, también puede realizarse una segunda trituración. Esta última también puede realizarse para promover la reacción de desacetilación, que permite preparar quitosán a partir de quitina. Las condiciones de la reacción de desacetilación se describen de manera más completa en la etapa 10 del modo de realización preferido descrito en detalle a continuación.

55 Un procedimiento particularmente ventajoso para la producción de quitina a partir de cutículas de insecto, comprende las siguientes etapas:

- 60 a) muerte de los insectos,
b) trituración de los insectos,
c) prensado de los insectos
d) la hidrólisis enzimática de las cutículas de los insectos con una enzima proteolítica,
e) recuperación de la quitina,

65 pudiendo tratarse opcionalmente las cutículas de los insectos con un agente oxidante antes de la etapa d).

Los modos de realización preferidos de las diversas etapas a) a e), así como el tratamiento con el agente oxidante,

son como se ha indicado anteriormente o en la etapa correspondiente en el modo de realización preferido a continuación.

La invención también se refiere a una quitina, tal como una quitina obtenible mediante un procedimiento de acuerdo con la invención. Debido a las condiciones suaves utilizadas en el procedimiento de acuerdo con la invención, esta quitina tiene una estructura parecida a la de la quitina tal y como se encuentra en el estado natural en la cutícula del insecto mientras que tiene un alto grado de pureza, tal como un grado de pureza comprendido entre 40 y 90 %, de preferencia entre 50 y 90 %, más preferiblemente comprendido entre 60 y 85 % y aún más preferiblemente del orden de 80 %.

La quitina obtenible mediante un procedimiento de acuerdo con la invención, tiene al menos una cualquiera de las siguientes propiedades ventajosas:

- un contenido de ceniza menor que 4 %, de preferencia menor que 3,5 %, más preferiblemente menor que o igual a 2,5 % (en particular cuando la quitina se prepara a partir de insectos vegetarianos), más preferiblemente menor que 2 % y aún más preferiblemente menor que o igual a 1,5 % (en especial cuando la quitina se prepara a partir de *T. molitor*) y aún más preferiblemente menor que 1 % en peso sobre el peso total de materia seca,
- un grado de pureza (o pureza gravimétrica) comprendido entre 40 y 90 %, de preferencia entre 50 y 90 %, más preferiblemente comprendido entre 60 y 85 % y aún más preferiblemente del orden de 80 %,
- una abundancia de superficie funcional que tiene una proporción (C-O)/(C-H) comprendida entre 0,30 y 0,56, de preferencia entre 0,31 y 0,53,
- una tasa de lípidos ≤ 14 % en peso total sobre el peso total de materia seca,
- una tasa de lípidos ≤ 5 % cuando la quitina se prepara a partir de insectos no voladores,
- aminoácidos totales ≤ 45 %,
- aminoácidos totales ≤ 16 % cuando la quitina se prepara a partir de insectos voladores,
- una tasa de abundancia relativa de al menos cualquiera de 3 aminoácidos de ALA, GLY, LEU, PRO, SER, TYR, VAL ≤ 10 %,
- una tasa de abundancia relativa de LEU, PRO, VAL ≤ 10 % cuando la quitina se prepara a partir de *T. molitor*,
- una tasa de abundancia relativa de ALA ≤ 12 % cuando la quitina se prepara a partir de *T. molitor*,
- una pureza colorimétrica ≥ 40 %,
- una pureza colorimétrica ≥ 50 % cuando la quitina se prepara con la enzima Prolyve NP durante la hidrólisis enzimática,
- una pureza por diferencia ≥ 45 %, de preferencia > 49 %,
- una pureza por diferencia ≥ 52 % cuando la quitina se prepara a partir de *T. molitor*,
- una pureza por diferencia ≥ 70 % cuando la quitina se prepara a partir de insectos voladores,
- un grado de acetilación ≥ 70 % y un grado de cristalinidad $\leq 0,61$,
- un grado de acetilación ≥ 70 % y un grado de cristalinidad $\leq 0,42$.

La quitina de acuerdo con la invención comprende un contenido de aminoácidos menor que o igual a 45 % en peso sobre el peso total de materia seca, un contenido de ceniza menor que o igual a 2,5 % en peso sobre el peso total de materia seca, una pureza por diferencia mayor que o igual a 45 %, un grado de acetilación mayor que o igual a 70 % y un grado de cristalinidad mayor que o igual a 0,42.

De preferencia, la quitina tiene todas las propiedades anteriores.

Todas las unidades y procedimientos de medición de las características indicadas anteriormente se describen en los ejemplos, y de manera más particular, en el ejemplo 5.

Un procedimiento particularmente ventajoso para la producción de un hidrolizado a partir de insectos, comprende las siguientes etapas:

- a) muerte de los insectos,
- b) trituración de los insectos,
- c) prensado de los insectos,
- d) la hidrólisis enzimática de las cutículas de los insectos con una enzima proteolítica,
- e) recuperación del hidrolizado,

pudiendo tratarse opcionalmente las cutículas de los insectos con un agente oxidante antes de la etapa d).

Los modos de realización preferidos de las diversas etapas a) a e), así como el tratamiento con el agente oxidante, son como se ha indicado anteriormente, o en la etapa correspondiente en el modo de realización preferido a continuación.

La invención también se refiere a un hidrolizado, tal como un hidrolizado obtenible mediante un procedimiento de acuerdo con la invención.

El hidrolizado obtenible mediante un procedimiento de acuerdo con la invención, tiene al menos una cualquiera de las siguientes propiedades ventajosas:

- 5 - un contenido de ceniza menor que 4 %, de preferencia menor que 3 % en peso (en especial cuando el hidrolizado se prepara a partir de insectos vegetarianos) sobre el peso total de materia seca,
- una excelente digestibilidad, en particular digestibilidad péptica, mayor que 95 %, de preferencia mayor que o igual a 96 % y más preferiblemente mayor que o igual a 98 % y de manera más particular, mayor que o igual a 99 %, habiéndose medido la digestibilidad péptica de acuerdo con un procedimiento conforme a la norma 72/188/EEC;
- 10 - un contenido de proteína/péptidos mayor que o igual a 70 %, de preferencia mayor que o igual a 71 % y más preferiblemente mayor que o igual a 75 % y de manera más preferible, mayor que o igual a 80 % (en particular, cuando el hidrolizado se prepara a partir de insectos no voladores);
- un contenido de proteína soluble en agua de un tamaño mayor que 12.400 g/mol, menor que 20 %, de preferencia menor que 18 % en peso sobre el peso total de proteínas solubles en agua;
- 15 - un contenido de lípidos menor que 14 %, de preferencia menor que 10 %, más preferiblemente menor que o igual a 5 % (en especial cuando el hidrolizado se prepara a partir de insectos no voladores), más preferiblemente menor que o igual a 2 % y aún más preferiblemente menor que o igual a 1 %;
- una composición en la que los aminoácidos más abundantes son prolina, alanina, leucina, ácido aspártico, glutamina y/o valina. Por "más abundante" se entiende que se refiere a una cantidad relativa del aminoácido en la composición mayor que 5 %, de preferencia mayor que 7 % en peso sobre el peso total de aminoácidos. El alto contenido de prolina prueba ser particularmente interesante;
- 20 - una tasa de abundancia relativa de al menos cualquiera de 5 aminoácidos seleccionados de ASP, GLU, ALA, GLY, LEU, PRO, TYR, VAL, LYS ≥ 6 %;
- una tasa de abundancia relativa de al menos cualquiera de 3 aminoácidos seleccionados de ASP, GLU, ALA, LEU, PRO, TYR, VAL ≥ 8 %.
- 25

De manera más particular, por "proteínas solubles en agua" se entiende que se refiere, entre las proteínas (o proteínas en crudo), a aquéllas que son solubles en una solución acuosa cuyo pH está comprendido entre 6 y 8, ventajosamente entre 7,2 y 7,6.

30 De preferencia, la solución acuosa es una solución tampón cuyo pH está comprendido entre 6 y 8, ventajosamente entre 7,2 y 7,6.

35 De preferencia, la solución tampón es una solución de NaCl tamponada con fosfato, cuyo pH es igual a $7,4 \pm 0,2$.

El hidrolizado de acuerdo con la invención comprende al menos 40 % en peso de proteínas sobre el peso total de materia seca, un contenido de ceniza menor que 3 % en peso sobre el peso total de materia seca y un contenido de proteína soluble en agua de un tamaño mayor que 12.400 g/mol, menor que 50 %, de preferencia menor que 43 %.

40 Por "insecto vegetariano" se entiende que se refiere a un insecto que no tiene proteínas animales en su dieta habitual. Como ejemplos de insectos vegetarianos, pueden mencionarse los coleópteros, lepidópteros u ortópteros.

45 Por "insecto volador" se entiende que se refiere a un insecto que puede volar cuando es adulto, a diferencia de un insecto denominado "no volador". Como ejemplos de insectos voladores, pueden mencionarse los lepidópteros o los dípteros. Como ejemplos de insectos no voladores, pueden mencionarse los coleópteros o los ortópteros.

Todas las unidades y procedimientos de medición de las características indicadas anteriormente se describen en los ejemplos, y de manera más particular, en el ejemplo 5.

50 De preferencia, el hidrolizado tiene todas las propiedades anteriores.

55 Se observará en particular que el hidrolizado puede distinguirse de cualquier otro tipo de hidrolizado por su contenido de glucosamina y/o un derivado del mismo (de preferencia N-acetilglucosamina), más particularmente un contenido mayor que o igual a 0,01 %, de preferencia mayor que o igual a 0,08 % en peso sobre el peso total de materia seca del hidrolizado.

En la presente solicitud, cualquier referencia a una regulación o una directiva concierne a dicha regulación o dicha directiva en vigor en la fecha de presentación de la presente solicitud.

60 Ventajosamente, el hidrolizado puede complementarse con aditivos para equilibrar su perfil nutricional con el fin de adaptarlo a diferentes tipos de animales.

65 Ventajosamente, el hidrolizado puede concentrarse y después secarse para obtener un hidrolizado seco. De manera alternativa, el hidrolizado puede estar en forma líquida. Estos hidrolizados pueden utilizarse como alimento o como ingrediente alimenticio, en particular, para animales, o de manera alternativa, pueden tratarse, por ejemplo, para aislar aminoácidos.

Un procedimiento particularmente ventajoso para la producción de quitosán a partir de cutículas de insectos, comprende las siguientes etapas:

- 5 a) muerte de los insectos,
 b) trituración de los insectos,
 c) prensado de los insectos,
 d) la hidrólisis enzimática de las cutículas de insectos con una proteasa,
 e) recuperación de la quitina,
 10 f) desacetilación de la quitina recuperada,
 g) recuperación del quitosán,

pudiendo tratarse opcionalmente las cutículas de los insectos con un agente oxidante antes de la etapa d).

- 15 Los modos de realización preferidos de las diversas etapas a) a g), así como el tratamiento con el agente oxidante, son como se ha indicado anteriormente o en la etapa correspondiente en el modo de realización preferido a continuación.

20 La invención también se refiere a un quitosán obtenible mediante un procedimiento de acuerdo con la invención.

La quitina y/o el quitosán obtenible mediante un procedimiento de acuerdo con la invención puede(n) utilizarse ventajosamente en varias aplicaciones:

- 25 - en composiciones cosméticas, farmacéuticas, nutracéuticas o dietéticas;
 - como biomateriales para tratar quemaduras, como segunda piel, para fabricar apósitos corneales o suturas quirúrgicas;
 - como agentes de filtración, texturizado, floculación y/o adsorbentes, en particular, para la filtración y descontaminación de agua.

30 De acuerdo con un modo de realización preferido de la invención, el procedimiento comprende las siguientes etapas, descritas esquemáticamente en la figura 1. Se observará que, en este modo de realización preferido, algunas etapas se indican como opcionales.

35 • **Etapa 1: Muerte de los insectos**

Esta etapa 1 de muerte, permite provocar la muerte de los insectos y reducir al mismo tiempo la carga microbiana (reduciendo el riesgo de degradación y el riesgo para la salud) e inactivar las enzimas internas de los insectos, lo cual puede desencadenar una autólisis y, por tanto, un rápido oscurecimiento de los mismos.

40 La provocación de la muerte puede realizarse mediante escaldado.

Los insectos, de preferencia larvas, se escaldan con agua durante 2 a 20 min, de preferencia 5 a 15 min. De preferencia, el agua está a una temperatura comprendida entre 95 y 105 °C, de preferencia 100 °C.

45 La cantidad de agua introducida en esta etapa 1 de escaldado se determina de la siguiente manera: la proporción del volumen de agua en ml con respecto al peso en gramos de insecto es de preferencia entre 0,3 y 10, más preferiblemente entre 0,5 y 5, aún más preferiblemente entre 0,7 y 3 y todavía más preferiblemente del orden de 1.

50 De manera alternativa, la muerte puede realizarse mediante blanqueo. De preferencia, los insectos 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 preferiblemente entre 95 y 105 °C, aún más preferiblemente 98 °C o con agua a una temperatura comprendida entre 95 y 100 °C, de preferencia de 100 °C (a través de las boquillas de atomización) 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 preferiblemente entre 95 y 105 °C. El tiempo de residencia en la cámara de blanqueo está comprendido entre 1 y 15 minutos, de preferencia entre 3 y 7 min.

55 En esta etapa, también es posible tratar las cutículas de los insectos utilizando agua de escaldado o blanqueo que comprende el agente oxidante de acuerdo con las modalidades indicadas en la etapa intermedia a continuación.

60 • **Etapa intermedia (opcional): tratamiento de las cutículas con el agente oxidante**

En el procedimiento es posible introducir una etapa específica de tratamiento de las cutículas con el agente oxidante. Ventajosamente, esta etapa intermedia de tratamiento de las cutículas se realiza entre la etapa de muerte 1 y la etapa de trituración 2.

65 Esta etapa intermedia se realiza de preferencia con un agente oxidante seleccionado del grupo que consiste de

peróxido de hidrógeno (H₂O₂), permanganato de potasio (KMnO₄), ozono (O₃) e hipoclorito de sodio (NaClO), más preferiblemente peróxido de hidrógeno.

5 De acuerdo con un primer modo de realización, al final de la etapa 1, cuando el último se realiza mediante escaldado, el agente oxidante se introduce directamente en el tanque de escaldado, después de enfriamiento opcional del agua de escaldado a una temperatura del orden de 40 a 60 °C, de preferencia del orden de 50 °C.

10 El peróxido de hidrógeno, tal como el que se comercializa, normalmente está forma de una solución acuosa, por ejemplo, una solución a 30 % en peso sobre el peso total de agua.

10 La cantidad de peróxido de hidrógeno introducida para el tratamiento es tal que el contenido de peróxido de hidrógeno está comprendido entre 1 y 33 % en peso sobre el peso total de insectos, de preferencia entre 2 y 12 % en peso sobre el peso total de insectos, de preferencia del orden de 6 % en peso.

15 De acuerdo con un segundo modo de realización, los insectos son extraen del tanque de escaldado, se tamizan y se reintroducen en un tanque.

20 El peróxido de hidrógeno se introduce después en el tanque en forma de una solución acuosa diluida, estando comprendido el contenido de peróxido de hidrógeno entre 1 y 33 % en peso sobre el peso de agua, de preferencia entre 2 y 12 % en peso sobre el peso de agua y de preferencia del orden de 6 % en peso.

• Etapa 2: trituración

25 Los insectos se extraen del tanque de escaldado o de tratamiento o de la cámara de blanqueo, después se tamizan y se colocan en una trituradora, tal como un molino de cuchillas, permitiendo la reducción de los insectos a partículas.

30 Para facilitar la trituración, se puede añadir una cantidad de agua. La cantidad de agua es similar a la que se introduce durante la etapa de escaldado 1: la proporción del volumen de agua en ml con respecto al peso en gramos del insecto está comprendida de preferencia entre 0,3 y 10, más preferiblemente entre 0,5 y 5, aún más preferiblemente entre 0,7 y 3, aún más preferiblemente del orden de 1. También es posible mantener el agua de escaldado y/o el agua que resulta de la etapa intermedia para llevar a cabo esta etapa. Es probable que este agua contenga el oxidante. En este caso, el tratamiento de las cutículas puede tener lugar durante la etapa de escaldado 1 y la etapa de trituración 2 o durante la etapa intermedio de tratamiento de las cutículas y durante la etapa de trituración.

35 De preferencia, al final de la trituración, el tamaño de las partículas de los insectos es menor que 1 cm (las partículas más grandes se pueden observar con un microscopio), de preferencia menor que 0,5 cm. De preferencia, el tamaño de las partículas está comprendido entre 500 mm y 0,5 cm e incluso más preferentemente entre 500 mm y 1 mm.

40 No es necesario reducir excesivamente el tamaño de las partículas, por ejemplo, a un tamaño menor que 250 mm.

40 Esta etapa de trituración 2 promueve el acceso de las enzimas a su sustrato.

45 En esta etapa, es posible introducir el agente oxidante en el molino de trituración con el fin de tratar las cutículas de acuerdo con las modalidades indicados en la etapa intermedio precedente.

45 Cuando el tratamiento de las cutículas no se realiza de manera concomitante con la trituración, durante esta etapa es posible añadir aditivos de antioxidantes que se utilizan comúnmente para la conservación y la estabilidad del producto.

50 • Etapa 3: prensado de las cutículas de los insectos

50 La pasta húmeda que se origina en la etapa 2 de trituración, se coloca en una prensa de acuerdo con un procedimiento que permite presionar y separar un jugo que comprende una fracción de grasa y una fracción de proteína.

55 De preferencia, la etapa de prensado permite obtener una torta que comprende un contenido de aceite menor que o igual a 20 %, de preferencia menor que o igual a 15 %, más preferiblemente menor que o igual a 15 %, más preferiblemente menor que o igual a 12 %, aún más preferiblemente menor que o igual a 10 %.

60 De manera similar, la etapa de prensado permite obtener una torta de prensa con un contenido de materia seca comprendido entre 30 % y 60 %, de preferencia comprendido entre 40 % y 55 % y más preferiblemente comprendido entre 45 % y 50 %.

65 La etapa de prensado se puede llevar a cabo con cualquier sistema de prensa, tal como, por ejemplo, una prensa de tornillo simple o de doble tornillo (prensa de doble tornillo de tipo Angel), un filtro-prensa (filtro-prensa del tipo Choquet), una prensa de placas, etc. El experto en la materia estará familiarizado con estos sistemas y podrá determinar las condiciones de prensado a fin de obtener los contenidos de aceite y/o agua ya mencionados.

Si la pasta húmeda de la etapa de trituración 2 se obtuvo con agua que comprendía el oxidante, puede ser ventajoso eliminar al menos una parte de este oxidante antes de realizar la etapa de prensado 3.

5 Esta etapa de prensado 3 puede realizarse opcionalmente antes de la etapa de trituración 2 comenzando a partir de los insectos escaldados. Sin embargo, es ventajoso realizar la etapa de prensado 3 después de la etapa de trituración 2.

Por lo tanto, esta etapa de prensado 3 permite obtener un jugo de prensa y una torta de prensa.

10 • Etapa 4: hidrólisis enzimática

La pasta húmeda que se origina en la etapa de trituración 2 o la torta de prensa que se origina en la etapa de prensa 3, se coloca en un tanque de hidrólisis con agua.

15 Opcionalmente y como se describirá a continuación, la fracción de proteína que se origina en la etapa de separación 12 puede reintroducirse en esta etapa de hidrólisis enzimática 4, al mezclarlo con la torta de prensa.

20 Opcionalmente, y en el caso de que el agua de escaldado no contenga oxidante, el agua de escaldado puede recuperarse y reintroducirse en la etapa de hidrólisis. De hecho, este agua contiene fracciones de insecto que se han solubilizado por la acción de este escaldado y al utilizar la última en la hidrólisis, es posible reducir las pérdidas. Opcionalmente, este agua de escaldado puede desgrasarse, ya que ciertas ceras pueden haberse disuelto en el agua.

25 La cantidad de agua introducida en esta etapa de hidrólisis enzimática 4 es similar a la introducida en la etapa de escaldado 1: la proporción del volumen de agua en ml sobre el peso en g de insecto está comprendida de preferencia entre 0,3 y 10, más preferiblemente entre 0,5 y 5, aún más preferiblemente entre 0,7 y 3, aún más preferiblemente del orden de 1.

30 La hidrólisis enzimática se realiza con una proteasa, tal como una proteasa comercial, durante 4 a 8 h, más particularmente durante 4 a 5h, a un pH de 6 a 8, más particularmente de 6,5 a 7,5, a una temperatura de 40 a 60°C, más particularmente de 45 a 55°C.

La cantidad de enzimas introducida en la etapa de hidrólisis es menor que 10 % en peso sobre el peso total estimado de materia seca que entra en la hidrólisis, de preferencia menor que 6 %, más preferiblemente del orden de 2 %.

35 La hidrólisis proteolítica crea la producción de una fase soluble que contiene los péptidos, las glucosaminas y las oligoquitinas y un residuo sólido formado a partir de quitina, principalmente copolímero de quitina-polipéptido.

• Etapa 5: inactivación térmica

40 Con el fin de detener la actividad de las enzimas de la reacción y estabilizar la fase soluble de la hidrólisis, la inactivación con calor se realiza calentando este jugo a una temperatura comprendida entre 80 y 105 °C durante 10 a 25 min, de preferencia durante 15 a 20 minutos. De acuerdo con un procedimiento, esta etapa de inactivación térmica 5 se realiza de acuerdo con las técnicas de esterilización habituales de la industria agroalimentaria. De acuerdo con otro procedimiento, la inactivación enzimática se realiza calentando con radiación IR o UV o con microondas.

45 • Etapa 6: prensado

50 El residuo sólido, compuesto mayoritariamente por quitina, se recupera y después se prensa en una prensa para drenar al máximo este residuo, con el fin de reinyectar este prensado en la fase soluble. El residuo prensado así formado consta esencialmente de quitina, principalmente en forma de copolímero de quitina-polipéptido.

• Etapas 7 y 8 (opcionales): lavado y secado

55 A continuación, el residuo sólido se lava, se filtra, se vuelve a lavar y se seca mediante tecnologías convencionales conocidas por el experto en la materia.

60 Ventajosamente, el sistema de secado se diseña para proteger la estructura del copolímero de quitina-polipéptido; la hidrometría, ventilación y composición del aire son controladas. Ventajosamente, el secado puede realizarse en una estufa ventilada a una temperatura que varía entre 60 y 80 °C, de preferencia del orden de 70 °C.

Opcionalmente, estas etapas pueden comprender una etapa de deslipidación final: el residuo sólido se trata con HCl para quitar los últimos residuos de lípidos, en particular las ceras cuticulares.

65 Las siguientes etapas 9 a 11 son para transformar la quitina en quitosán y, por tanto, sólo se utilizan cuando el producto deseado es el quitosán.

• Etapa 9 (opcional): trituración

A continuación, el residuo sólido seco que comprende predominantemente quitina, se tritura, por ejemplo, en un molino de cuchillas.

La producción de quitosán a partir de quitina, mediante la reacción de desacetilación, depende principalmente del tamaño de las partículas de quitina. Por tanto, una trituración muy fina del residuo sólido seco antes de la desacetilación permite aumentar significativamente los rendimientos y la velocidad de la reacción de desacetilación, como se muestra en la tabla 1 a continuación:

Tabla 1: Eficiencia de la desacetilación de acuerdo con trituración previa de la quitina

	Trituración 30 seg	Trituración 45 seg	Trituración 60 seg	Trituración 120 seg
50% de las partículas	< 174 µm	< 117 µm	< 95 µm	< 67 µm
90% de las partículas	< 310 µm	< 244 µm	<157 µm	< 159 µm
DA*	99 %	90 %	85 %	80 %
*Medición de grado de acetilación DA				

Las condiciones de la desacetilación realizada en la prueba indicadas en la tabla 1 son las siguientes: tiempo de reacción 4 h, 100°C, NaOH en solución acuosa a 30 % en volumen, en una proporción de solución de quitina:NaOH estimada igual a 1:20.

En consecuencia, el residuo sólido es triturado de preferencia a un tamaño de partícula menor que 200 µm, más preferiblemente menor que 160 µm.

• Etapa 10: desacetilación

El residuo sólido, opcionalmente triturado en la etapa 9, se coloca después en un reactor, al cual se añade solución concentrada de hidróxido de sodio, durante 4 a 24 h y de preferencia 6 a 18 h. El hidróxido de sodio en solución acuosa que tiene un contenido que varía de 30 % a 40 % se añade según a una proporción de peso en g de quitina triturada/volumen en ml de hidróxido de sodio en solución acuosa comprendida entre 1:50 y 1:10, de preferencia del orden de 1:20. Después, el tanque se calienta, estando la temperatura de desacetilación entre 80 y 150 °C, de preferencia entre 90 y 120 °C y más preferiblemente a 100 °C.

De esta manera se obtiene quitosán en forma de polvo.

El quitosán puede experimentar después cualquier operación conocida por el experto en la técnica que permita funcionalizarle, en particular mediante la adición de radicales (carboxilación, hidroxilación, etc.).

• Etapa 11 (opcional): secado

El polvo de quitosán es seco después a una temperatura entre 30 y 80 °C, de preferencia entre 50 y 70 °C y de preferencia a aproximadamente 60 °C, con el fin de obtener un polvo que tiene un contenido de materia seca mayor que 85 %, más particularmente mayor que 90 %.

Las siguientes etapas son para recuperar una fracción de grasa y una fracción de proteína del jugo obtenido en la etapa de prensado 3 y por lo tanto se utilizan solamente cuando se desea tal recuperación.

• Etapa 12: separación

El jugo de prensa se somete a una o más etapas de separación, con el fin de separar la fracción de grasa (aceites de los insectos) de la fracción de proteína (proteínas de la hemolinfa de los insectos). Estas etapas pueden realizarse mediante cualquier tecnología de separación de aceites bien conocida por un experto en la materia, tal como centrifugación, decantación, separación mediante ósmosis inversa, ultrafiltración, CO₂ supercrítico, etc., o una combinación de varias de estas tecnologías.

La separación de la fracción de grasa puede ser compleja, en vista de la presencia de aceites de composiciones muy diferentes en los insectos y los ácidos grasos pueden tener cadenas cortas (C2-C5) así como cadenas muy largas (por ejemplo, para las ceras: >C25). Elevar la temperatura por encima del punto de fusión de estos aceites (aproximadamente 38 °C) durante la centrifugación, permite solubilizar esta crema y facilitar la separación de la fracción de grasa del resto del jugo. El centrifugado experimenta después decantación de acuerdo con un procedimiento (tipo decantador o tricantador), para separar mejor los aceites y las proteínas.

Estas etapas permiten obtener así una fracción de grasa.

Una vez separada de la fracción de grasa, la fracción de proteína puede mezclarse con la torta de prensa que se origina en la etapa de prensado 3 justo antes de la etapa de hidrólisis 4. De hecho, con frecuencia más del 20 % de las proteínas se pierde en el jugo durante la etapa de prensado 3, de ahí el interés de recuperar esta fracción y de someterla a la etapa de hidrólisis.

5

• Etapa 13 (opcional): concentración

De acuerdo con un procedimiento, la concentración se realiza mediante evaporación al vacío de la parte acuosa. El concentrado tiene un extracto seco mayor que 10 %, de preferencia mayor que 20 %. Esta operación facilita el secado y en esta etapa pueden añadirse aditivos comúnmente utilizados para la conservación y la estabilidad del producto.

10

• Etapa 14 (opcional): secado

El concentrado se seca finalmente mediante tecnologías conocidas por el experto en la materia, por ejemplo, pulverización/atomización ("secado por pulverización"), lo que permite obtener un extracto, es decir, un polvo seco de concentrado rico en péptidos y glucosaminas, en particular, las glucosaminas que se originan de la hidrólisis parcial de quitina mediante H₂O₂ (esencialmente).

15

Otras características y ventajas de la invención aparecerán en los siguientes ejemplos, proporcionados de manera ilustrativa, con referencia a las figuras, las cuales representan respectivamente:

20

- La figura 1 es un diagrama de flujo de un modo de realización preferido del procedimiento de acuerdo con la invención,
- La figura 2 es un diagrama que compara el grado de pureza de la quitina obtenida mediante un procedimiento enzimático que comprende una o más etapas preliminares de trituración y prensado,
- La figura 3 es un diagrama que compara el contenido de lípidos medido en diferentes fracciones del producto intermedio del cual se extrajo la quitina,
- La figura 4 muestra la distribución de los lípidos en el jugo de prensa y la torta de prensa obtenidos mediante un procedimiento enzimático que comprende las etapas preliminares de trituración y prensado o una etapa preliminar de prensado,
- La figura 5 es un diagrama que muestra la distribución de las proteínas/péptidos de acuerdo con sus masas molares (en %) en un hidrolizado de acuerdo con la invención y en el jugo de prensa,
- La figura 6 es un diagrama que muestra la distribución relativa de los aminoácidos que constituyen un hidrolizado de acuerdo con la invención,
- La figura 7 es un diagrama que muestra la abundancia relativa de los aminoácidos en la quitina;
- La figura 8 es el efecto del prensado sobre el contenido de ceniza en el hidrolizado - diferentes insectos;
- La figura 9 es el efecto del prensado sobre el contenido de ceniza en el hidrolizado - diferentes enzimas;
- La figura 10 es el contenido de ceniza en el hidrolizado con el procedimiento de trituración + prensado - diferentes insectos;
- La figura 11 es la abundancia relativa de proteínas de gran tamaño en función de diferentes procedimientos y diferentes insectos para una hidrólisis realizada con Prollyve,
- La figura 12 es la abundancia relativa de proteínas de gran tamaño en función de diferentes procedimientos y diferentes enzimas aplicadas a *T. molitor*,
- La figura 13 es el efecto del prensado sobre el contenido de proteína del hidrolizado - diferentes enzimas,
- La figura 14 es el efecto del prensado sobre el contenido de proteína del hidrolizado - diferentes insectos;
- La figura 15 es el efecto del prensado sobre el contenido de lípidos del hidrolizado - diferentes enzimas;
- La figura 16 es el efecto del prensado sobre el contenido de lípidos del hidrolizado - diferentes insectos;
- La figura 17 es la digestibilidad péptica de los hidrolizados obtenidos - provisional;
- Figura 18: TM + Prollyve: abundancia relativa de aminoácidos en el hidrolizado;
- Figura 19: TM + Sumizyme: abundancia relativa de aminoácidos en el hidrolizado;
- Figura 20: TM + Novozyme: abundancia relativa de aminoácidos en el hidrolizado;
- Figura 21: TM + Neutrasa: abundancia relativa de aminoácidos en el hidrolizado;
- Figura 22: HI + Prollyve: abundancia relativa de aminoácidos en el hidrolizado;
- Figura 23: GM + Prollyve: abundancia relativa de aminoácidos en el hidrolizado;
- Figura 24: AD + Prollyve: abundancia relativa de aminoácidos en el hidrolizado;
- Figura 25: Efecto del prensado sobre el contenido de ceniza en la quitina - diferentes enzimas;
- Figura 26: Contenido de ceniza en la quitina de diferentes insectos;
- Figura 27: Contenido de lípidos en la quitina;
- Figura 28: Contenido de aminoácidos en la quitina;
- Figura 29: TM + Prollyve: abundancia relativa de aminoácidos en la quitina;
- Figura 30: TM + Sumizyme: abundancia relativa de aminoácidos en la quitina;
- Figura 31: TM + Novozyme: abundancia relativa de aminoácidos en la quitina;
- Figura 32: TM + Neutrasa: abundancia relativa de aminoácidos en la quitina;
- Figura 33: HI + Prollyve: abundancia relativa de aminoácidos en el hidrolizado;
- Figura 34: GM + Prollyve: abundancia relativa de aminoácidos en el hidrolizado;
- Figura 35: AD + Prollyve: abundancia relativa de aminoácidos en el hidrolizado;

50

55

60

65

- Figura 36: Pureza gravimétrica de la quitina en función de diferentes procedimientos y diferentes enzimas aplicadas a *T. molitor*;
- Figura 37: Pureza gravimétrica de la quitina en función de diferentes procedimientos y diferentes insectos con Prolyve;
- 5 - Figura 38: Pureza colorimétrica de la quitina en función de diferentes procedimientos y diferentes enzimas con *T. molitor*;
- Figura 39: Pureza colorimétrica de la quitina en función de diferentes procedimientos y diferentes insectos con Prolyve;
- Figura 40: Pureza por diferencia de la quitina;
- 10 - Figura 41: Grado de acetilación de la quitina obtenido mediante el procedimiento para *T. molitor*;
- Figura 42: Grado de acetilación de la quitina obtenido mediante el procedimiento con Prolyve;
- Figura 43: Representación de la cutícula mediante microscopía de fluorescencia por dos fotones;
- Figura 44: Grado de cristalinidad de las quitinas obtenidas; y
- Figura 45: Tamaño de las proteínas en el hidrolizado.

Ejemplo 1: Ejemplo de un procedimiento de acuerdo con la invención

Seiscientos (600) g de larvas de *T. molitor* se introdujeron en un vaso de precipitado, se colocaron en un baño de agua a 100 °C que contenía 600 ml de agua, llevado a ebullición de antemano. Después de 5 minutos, el vaso de precipitado se sacó del baño de agua, las larvas se drenaron y después se mezclaron con un volumen de agua de 600 ml. El líquido así obtenido se prensó con una prensa de doble tornillo del tipo Angel en las siguientes condiciones:

- Velocidad= 82 rev/min;
- W (energía) = 3 HP (caballos de fuerza) o $2,68 \times 10^6$ J;
- 25 - Porosidad (aprox.) = 0,5 mm en la primera parte y 0,2 mm en la última parte.

Se obtiene así un jugo de prensa y una torta de prensa de $136,49 \pm 4,48$ g de peso húmedo, de los cuales, $100,22 \pm 0,22$ g, se utilizan en las siguientes etapas. No obstante podría haberse utilizado cualquier otro tipo de prensa siempre que permita la extracción y obtención de una torta de prensa que sea substancialmente similar en términos de contenido de agua y/o contenido de lípidos. Como ejemplo, se realizaron otras pruebas con el filtro-prensa del tipo Choquet que tiene las siguientes características:

- Área de superficie de filtración de la celda = 50 cm²;
- Presión = 2 a 8 bar (200 a 800 kPa);
- 35 - Temperatura = 20 a 80 °C;
- Porosidad = 25 a 80 µm;
- Caudal al final de la filtración = 100 a 250 ml/h.

La torta de prensa se transfiere a un matraz Erlenmeyer que contiene 600 ml de una solución de proteasa (Prolyve NP conc) al 1 % (relativo al peso húmedo de la torta de prensa) y todo ello se coloca bajo agitación magnética durante 4 horas a 45 °C (a un pH de aproximadamente 6,5). El matraz Erlenmeyer se coloca después durante 15 minutos en un baño de agua a 90 °C con el fin de desactivar las enzimas y la solución se filtra en caliente a $0,45\text{-}0,5$ µm. La quitina así obtenida se seca durante 24 horas a 70 °C. Mediante este procedimiento se obtienen $16,99 \pm 1,77$ g de quitina. En estas condiciones, el hidrolizado (filtrado obtenido después de la hidrólisis) representa $609,98 \pm 10,9$ g con un contenido de materia seca de 5,05 %, lo cual, después de la liofilización, permite obtener $30,8 \pm 0,55$ g de hidrolizado seco.

Ejemplo 2: Influencia de las etapas mecánicas previas a la hidrólisis enzimática sobre el grado de pureza de la quitina obtenida

Se probaron diferentes tipos de pretratamiento mecánico, trituración ("trituración 1") sola, trituración seguida de prensado, trituración seguida de prensado y de una segunda trituración ("trituración 2"), así como el prensado solo.

Para el prensado, se usó la prensa del tipo Angel descrita en el ejemplo 1.

1. Materiales y procedimientos

Producción de quitina con una trituración

Doscientos (200) g de larvas de *T. molitor* se introdujeron en un vaso de precipitado y se colocaron en un baño de agua a 100 °C que contenía 200 ml de agua llevada a ebullición de antemano. Después de 5 minutos, el vaso de precipitado se sacó del baño de agua, las larvas se drenaron y después se mezclaron con un volumen de agua de 200 ml. El líquido así obtenido se transfirió a un matraz Erlenmeyer que contenía 2 g de proteasa (Prolyve) y todo ello se colocó bajo agitación magnética durante 4 horas a 45 °C (a un pH de aproximadamente 6,5). El matraz de Erlenmeyer se colocó después durante 15 minutos en un baño de agua a 90 °C con el fin de desactivar las enzimas y la solución se filtró en caliente a $0,45\text{-}0,5$ µm. La quitina así obtenida se secó durante 24 horas a 70 °C. Mediante este

procedimiento se obtienen $8,13 \pm 0,27$ g de quitina.

Producción de quitina con trituración seguido de prensado

5 Doscientos (200) g de larvas de *T. molitor* se introdujeron en un vaso de precipitado y se colocaron en un baño de agua a 100 °C que contenía 200 ml de agua llevada a ebullición de antemano. Después de 5 minutos, el vaso de precipitado se sacó del baño de agua, las larvas se drenaron y después se mezclaron con un volumen de agua de 200 ml. El líquido así obtenido se pasó a una prensa del tipo de doble tornillo. Treinta (30) g de la torta de prensa así obtenida se transfirieron a un matraz Erlenmeyer que contenía 150 ml de agua y 0,3 g de proteasa (Prolyve) y todo
10 ello se colocó bajo agitación magnética durante 4 horas a 45 °C (a un pH de aproximadamente 6,5). El matraz Erlenmeyer se colocó después durante 15 minutos en un baño de agua a 90 °C con el fin de desactivar las enzimas y la solución se filtró en caliente a $0,45-0,5 \mu\text{m}$. La quitina así obtenida se secó durante 24 horas a 70 °C. Mediante este procedimiento se obtienen $4,71 \pm 0,11$ g de quitina.

15 Producción de quitina con una primera trituración ("trituración 1") seguida de prensado y de una segunda trituración ("trituración 2")

Doscientos (200) g de larvas de *T. molitor* se introdujeron en un vaso de precipitado y se colocaron en un baño de agua a 100 °C que contenía 200 ml de agua llevada a ebullición de antemano. Después de 5 minutos, el vaso de precipitado se sacó del baño de agua, las larvas se drenaron y después se mezclaron con un volumen de agua de 200 ml. El líquido así obtenido se pasa a una prensa del tipo de doble tornillo. La torta de prensa así obtenida se secó durante 24 horas en una estufa a 70 °C y después se trituró a $250 \mu\text{m}$. Diez (10) g de polvo así obtenido se transfirieron un matraz Erlenmeyer que contenía 50ml de agua y 0,1 g de proteasa (Prolyve) y todo ello se colocó bajo agitación magnética durante 4 horas a 45 °C (a un pH de aproximadamente 6,5). El matraz Erlenmeyer se colocó después
20 durante 15 minutos en un baño de agua a 90 °C con el fin de desactivar las enzimas y la solución se filtró en caliente a $0,45-0,5 \mu\text{m}$. La quitina así obtenida se secó durante 24 horas a 70 °C. Mediante este procedimiento se obtienen $4,93 \pm 0,12$ g de quitina.

30 Producción de quitina solo con prensado

Doscientos (200) g de larvas de *T. molitor* se introdujeron en un vaso de precipitado y se colocaron en un baño de agua a 100 °C que contenía 200 ml de agua llevada a ebullición de antemano. Después de 5 minutos, el vaso de precipitado se sacó del baño de agua, las larvas se drenaron y después se pasaron a una prensa del tipo de doble tornillo. Noventa (90) g de torta de prensa así obtenidos se transfirieron a un matraz Erlenmeyer que contenía 450 ml de agua y 0,9 g de proteasa (Prolyve) y todo ello se colocó bajo agitación magnética durante 4 horas a 45 °C (a un pH de aproximadamente 6,5). El matraz Erlenmeyer se colocó después durante 15 minutos en un baño de agua a 90 °C con el fin de desactivar las enzimas y la solución se filtró en caliente a $0,45-0,5 \mu\text{m}$. La quitina así obtenida se secó durante 24 horas a 70 °C. Mediante este procedimiento se obtienen $6,48 \pm 0,28$ g de quitina.

40 Producción de quitina por vía química

Cincuenta (50) g de las larvas de *T. molitor* se introdujeron un vaso de precipitado y se colocaron en un baño de agua a 100 °C que contenía 50 ml de agua llevada a ebullición de antemano. Después de 5 minutos, el vaso de precipitado es sacó del baño de agua, las larvas se drenaron y después se mezclaron con un volumen de agua de 60 ml. El líquido así obtenido se transfirió a un recipiente de 1 l y se añadieron 500 ml de una solución de HCl 1M. Todo ello se colocó bajo agitación a 90 °C durante 1 hora. El contenido se filtró y el residuo sólido se transfirió a un frasco de 1 l que contenía 500 ml de una solución de NaOH 1M; todo ello se colocó bajo agitación a 90 °C durante 24 horas. Después, el residuo se filtró y se colocó en una estufa ventilada a 70 °C durante 24 horas. De esta manera, por vía química, se obtienen $0,944 \pm 0,005$ g de quitina purificada.

50 Cálculo del grado de pureza

El grado de pureza de la quitina se determina al comparar el peso de residuo seco obtenido en relación al resultante de una extracción química, aproximadamente 5 % de la materia seca inicial.

55 Medición del contenido de lípidos

Dos (2) g de muestra se colocan en un vaso de precipitado al que le añaden 0,2 g de Na_2SO_4 y 15 ml de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (2/1 v/v). Todo ello se coloca bajo agitación magnética durante 20 minutos, a continuación la solución se filtra y el residuo se coloca nuevamente en el vaso de precipitado con 10 ml de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (2/1 v/v). Todo ello se coloca bajo agitación magnética durante 15 minutos, la solución se filtra, las fases de solvente se combinan y evaporan a peso constante. El contenido de lípidos se determina como un porcentaje en peso después de la extracción-evaporación en relación al peso inicial de la muestra (2 g).

65 2. Resultados

Como puede constatarse a partir de la figura 2, el procedimiento tiene una influencia sobre la pureza de la quitina

obtenida, obteniéndose los mejores resultados con un prensado mínimo. El mejor resultado se obtiene con trituración seguido de prensado, en concreto una quitina que tiene un grado de pureza de 78 % y el menos bueno con trituración sola, en concreto una quitina que tiene un grado de pureza de 48 %.

5 Un análisis más fino del producto intermedio a partir del cual se extrajo la quitina, permite constatar que un bajo contenido de lípidos promueve mayor pureza de la quitina obtenida (figura 3). Por "producto intermedio" se entiende que se refiere al producto que entra en hidrólisis enzimática, es decir, que se origina en la última etapa antes de la hidrólisis, a saber, de acuerdo con los procedimientos de producción antes mencionados, la etapa de trituración 1 o 2 o la etapa de prensado.

10 El análisis del contenido de lípidos en la quitina y el jugo de hidrólisis de hecho muestra que en función del contenido de lípidos inicial presente en el producto intermedio, el contenido de lípidos en la quitina es relativamente estable, de 7 a 15 %, mientras que el contenido de lípidos en el hidrolizado varía de 11 a 47 % (figura 3).

15 De manera más particular, si el producto intermedio tiene un contenido de lípidos del 35 %, entonces:

- la quitina resultante de la hidrólisis tendrá una pureza de tan solo 50 % y comprenderá 10 % de lípidos y
- el contenido de lípidos del hidrolizado estará por sí mismo cerca del 40%.

20 Sin embargo, si el contenido de lípidos del producto intermedio es del 7 %, entonces:

- la quitina obtenida después de la hidrólisis tendrá una pureza del 80 % y tendrá un contenido de lípidos del 8 % y el hidrolizado también tendrá un bajo contenido de lípidos del orden del 10 %.

25 Esto indica que cuando el contenido de lípidos inicial es alto, mayor que 12 %, la enzima responsable de hidrólisis hidrolizará no solo las proteínas, sino también los lípidos mediante promiscuidad catalítica. De este modo se obtiene un contenido de lípidos similar en la quitina, es decir, del 8,6 y 7,9 %, en el caso de que los lípidos iniciales fuesen del 35 y 7 % respectivamente. En cambio, la pureza de la quitina pasa en este caso del 48 al 84 % respectivamente. Por tanto, del 52 % de impurezas por una parte y de 16 % por la otra, el 8 % en promedio se debe a los lípidos y la cantidad de proteínas todavía unidas a la quitina es por tanto 38 puntos mayor en el caso de que hubiera más lípidos en el producto intermedio sometido a hidrólisis.

30 Finalmente, la importancia de la trituración corriente arriba del prensado también puede estudiarse (figura 4). Así, puede verse claramente que la distribución de los lípidos entre la torta y el jugo de prensa es mucho más eficaz, 12,9 frente a 87,1 contra 42,7 frente a 57,3, cuando se realiza una trituración preliminar.

Ejemplo 3: Análisis del hidrolizado

35 Se realizó un análisis detallado del hidrolizado obtenido en el ejemplo 1.

40 1. Contenido de glucosamina

El contenido de glucosaminas y de algunos otros azúcares en el hidrolizado se analizó mediante cromatografía de gases después de la metanólisis y siliación.

45 Procedimiento:

Diez (10) mg de la muestra y 50 µg de estándar interno se colocaron en 500 µl de una mezcla de metanol/ácido clorhídrico 3 N durante 4 horas a 110 °C (o 24 horas a 130 °C). La mezcla se neutralizó después con Ag₂CO₃. Para reacetilar cualquier osamina presente, se añaden 50 µl de anhídrido acético. Después de mantenerlas en la oscuridad durante la noche a temperatura ambiente, las muestras se centrifugaron (15 min, 3000 rpm) y el sobrenadante se evaporó. Los compuestos se disolvieron después en 100 µl de piridina y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente con 100 µl de BSTFA (Supelco). Después, los reactivos se evaporaron y el residuo se tomó en 700 µl de CH₂Cl₂ y se inyectaron en CPG.

55 Programa de temperatura: 1 minuto a 120 °C, gradiente de 1,5 °C/minuto hasta 180 °C, después 2 °C/minuto hasta 200 °C.

Detección: FID

Columna: HP-5MS (30 m, 0,25 mm de diámetro interior)

60 Estándar interno: mio-inositol

Los diversos contenidos se midieron y calcularon de dos maneras diferentes (tabla 2). Puede verse que la glucosamina está contenida en el hidrolizado a un contenido de 0,1-0,15 % en peso y con una proporción de 0,04-0,05 en relación a la glucosa.

65

Tabla 2: Distribución de la glucosamina, manosa y glucosa en el hidrolizado

	Metanólisis a 110 °C		Metanólisis a 130 °C	
	% en peso	Proporción molar	% en peso	Proporción molar
Glucosa	1,6 ± 0,3	1	2 ± 0,4	1
Manosa	0,3 ± 0,05	0,15 ± 0,005	0,4 ± 0,08	0,15 ± 0,007
Glucosamina	0,1 ± 0,02	0,04 ± 0,007	0,15 ± 0,04	0,05 ± 0,003

2. Tamaño de las proteínas

5 El tamaño de las proteínas/péptidos en el hidrolizado se evaluó mediante HPLC, aparato Shimadzu 20A, a temperatura ambiente, en una columna Superdex Peptide 10/300 GL, en un tampón de acetonitrilo (ACN) al 30 %, ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1 %, con una caudal de 0,4 l/min. La detección se realizó a 250 nm y el volumen de muestra inyectado fue de 20 µl.

10 Más aún, el tamaño de las proteínas/péptidos en el jugo de prensa preparado en el ejemplo 1, también se evaluó en las mismas condiciones con fines de comparación.

La comparación del tamaño de las proteínas entre el jugo de prensa y el hidrolizado (figura 5) muestra claramente que la mayor parte, el 76 %, de los péptidos presentes en el hidrolizado tiene una masa molar comprendida entre 130 y 900 Da. En cambio, la parte de las proteínas de baja digestibilidad (de masa molar mayor que 1300 Da) se reduce del 31 % al 2 %. Del mismo modo, la proporción de péptidos que tienen un carácter amargo (de masa molar menor que 130 Da) pasa del 38 % al 15 %. Por tanto, los criterios de digestibilidad y palatabilidad mejoran gracias al tratamiento enzimático propuesto.

20 3. Digestibilidad

El nivel de digestibilidad péptica del hidrolizado se estima al 99,6 % de las proteínas totales. Dicho nivel se midió en un laboratorio externo, el procedimiento utilizado cumple con la directiva 72/199/EEC y se realizó sin desgrasado.

25 4. Contenido de proteínas

El contenido de proteínas del hidrolizado se estimó al 84,8 %. Dicho contenido se midió en un laboratorio externo mediante el procedimiento de Kjeldahl con un coeficiente de corrección de 6,25. El procedimiento utilizado cumple con la regulación EC 152/2009.

30 5. Contenido de lípidos

El contenido de lípidos del hidrolizado se estimó al 0,7 ± 0,5%. Dicho contenido se midió en un laboratorio externo mediante el procedimiento denominado de "hidrólisis" adaptado de la regulación EC 152/2009 (procedimiento B).

35 6. Composición de aminoácidos

El hidrolizado obtenido después del tratamiento con las diferentes enzimas, se analizó en cuanto a su composición de aminoácidos (figura 6). Se observa un predominio de prolina, junto con la presencia de hidroxiprolina (HYP) - metabolito de la prolina y aminoácido ausente en ciertos organismos, por ejemplo, los crustáceos. No obstante, la prolina y su metabolito, la hidroxiprolina, juegan un papel esencial en el metabolismo, en particular al permitir la síntesis de otros aminoácidos tales como arginina y glutamato. Aunque la mayoría de mamíferos pueden sintetizar prolina, la producción de este aminoácido por neonatos, aves y peces es insuficiente, lo cual es la razón de utilizar algunas veces la suplementación con prolina e hidroxiprolina para aumentar el crecimiento de ciertos animales. Asimismo, la prolina es el principal aminoácido contenido en la leche de los mamíferos, donde está presente en un contenido del 12 %, en cambio, su contenido en las proteínas de las plantas es mucho más bajo, solamente del 2,9 % en la soja y del 0,8 % en el maíz. Por lo tanto, se encuentra que este hidrolizado tiene un contenido de prolina tan alto como en la leche y muy por encima del encontrado en las proteínas vegetales.

50 Los otros aminoácidos presentes en grandes cantidades son alanina, leucina y glutamato (con glutamina). Sus cantidades relativas son mayores al 9 %. En cambio, los aminoácidos que contienen azufre, tales como cisteína y metionina, están presentes en bajas cantidades, del orden del 0,5 %.

55 El procedimiento utilizado para determinar estos resultados (hidrólisis ácida) no permite detectar aminoácidos, tales como triptófano y arginina. Asimismo, la asparagina se transformó completamente en ácido aspártico y la glutamina en ácido glutámico y lo que se observó bajo los picos de ASP y GLU es de hecho la suma del ácido aspártico y de la asparagina por un lado y del ácido glutámico y la glutamina por otro lado, respectivamente, inicialmente presentes en el hidrolizado.

60 Ejemplo 4: Análisis de la quitina

Se realizó un análisis de aminoácidos detallado en la quitina obtenida en el ejemplo 1.

5 El contenido total de aminoácidos es de 32,3 g por 100 g de copolímero (determinado como la suma de los aminoácidos). Los aminoácidos presentes son predominantemente valina, glicina, alanina y tirosina (figura 7).

Los análisis se subcontrataron y los resultados se obtuvieron mediante el procedimiento NF EN ISO 13904 para el triptófano y NF EN ISO 13903 para los demás aminoácidos.

10 Ejemplo 5: Caracterización del hidrolizado y de la quitina de acuerdo con el procedimiento de producción utilizado

I. Material y procedimientos

15 a) Material

Insectos

Se estudiaron diferentes insectos:

- 20 - un coleóptero: *Tenebrio molitor* (*T. molitor* o TM),
 - un lepidóptero: *Galleria mellonella* (*G. mellonella* o GM),
 - un díptero: *Hermetia illucens* (*H. illucens* o HI), y
 - un ortóptero: *Acheta domesticus* (*A. domesticus* o AD).

25 Enzimas

Se utilizaron diferentes enzimas en la etapa de hidrólisis.

30 Esta medición de la actividad enzimática se basa en el principio de medición de liberación de la tirosina a 275 nm durante la hidrólisis de la caseína mediante una enzima proteolítica (procedimiento de ensayo SAPU de Valley Research, por Karen PRATT).

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

- 35 SAPU/g = una unidad espectrofotométrica de proteasa
 AA = absorbancia correlacionada
 i = ordenada en origen
 11 = volumen de reacción final
 M = inclinación de la curva de calibración
 40 30 = tiempo de reacción (en minutos)
 C = concentración de la enzima (g/ml) en la solución enzimática añadida
 1 = 1 ml de volumen de la solución de la enzima añadida

45 La curva de calibración se obtiene midiendo la absorbancia de las soluciones de tirosina de diferentes concentraciones en un tampón fosfato (0,2 M, pH 7).

50 Cinco (5) ml de una solución de caseína (0,7% p/v, tampón fosfato 0,2 M, pH 7, calentado durante 30 minutos a 90 °C y con 3,75 g/l_{solución} añadidos) se incubaron con 1 ml de la solución enzimática (0,15 g en 100 ml de tampón de glicina, 0,05 M) a probar a 37 °C durante 30 minutos. Después se añadieron 5 ml de una solución de TCA (18 g de TCA, 11,35 g de acetato de sodio anhidro, 21 ml de ácido acético helado, completado con agua desmineralizada a 1 litro de solución), se mezcló en un vórtice, se filtró y se midió la absorbancia a 275 nm.

55 El control se preparó de la misma manera pero sin añadir enzima, en su lugar se añadió 1 ml de agua desmineralizada con el fin de tener el mismo volumen de reacción.

Las actividades así medidas para las diferentes enzimas utilizadas (Prolyve NP, Novozyme 37071, Neutrasa y Sumizyme) se indican en la tabla 3.

Enzima	Prolyve	Novozyme	Neutrassa	Sumizyme
Actividad enzimática deseada	3789,52	3789,52	3789,52	3789,52
Actividad enzimática / g	3789,52	1662,35	2213,24	2327,19
m (g)	1,00	2,28	1,71	1,17

Tabla 3. Correspondencia de las actividades y masas enzimáticas de las enzimas utilizadas

b) Procedimientos de producción

5

Procedimiento de producción con trituración sola (denominado "trituración" en las figuras)

Seiscientos (600) g de insectos recientes (ya sean larvas en el caso de *T. molitor*, *G. melonella* o *H. illucens* o grillos en el caso de *A. domesticus*), se introdujeron en una cámara donde se provocó su muerte con vapor (115 °C, 5 minutos). Los insectos se introdujeron después en un mezclador y se añadieron 75 ml de agua por 100 g de insectos y después todo ello se mezcló. Cien (100) g (peso húmedo) de producto así obtenido, se introdujeron en un matraz de tres cuellos equipado con un condensador y un agitador mecánico y después se añadió una enzima proteolítica con una actividad equivalente a 3789 SAPU. La reacción se calentó a 45 °C durante 4 horas. La temperatura se elevó después a 90 °C durante 15 minutos y la mezcla de reacción se filtró finalmente (0,40-0,45 µm). El residuo se secó durante 24 horas a 70 °C: obteniéndose así la quitina por vía de purificación enzimática; el filtrado se congeló y se liofilizó obteniéndose así el hidrolizado.

El procedimiento es idéntico para cualquier insecto o enzima estudiado.

20 Procedimiento de producción con trituración seguido de prensado (denominado "trituración + prensado" en las figuras)

Seiscientos (600) g de insectos recientes (ya sea larvas en el caso de *T. molitor*, *G. melonella* o *H. illucens* o grillos en el caso de *A. domesticus*) se introdujeron en una cámara donde se provocó su muerte con vapor (115 °C, 5 minutos). Los insectos se introdujeron después en un mezclador y se añadieron 75 ml de agua por 100 g de insectos y después todo ello se mezcló. Cien (100) g (peso húmedo) de producto así obtenido, se introdujeron en un matraz de tres cuellos equipado con un condensador y un agitador mecánico y después se añadieron 500 ml de agua, así como una enzima proteolítica con una actividad equivalente a 3789 SAPU. La reacción se calentó a 45 °C durante 4 horas. La temperatura se elevó después a 90 °C durante 15 minutos y la mezcla de reacción se filtró finalmente (0,40-0,45 µm). El residuo se secó durante 24 horas a 70 °C: obteniéndose así la quitina por vía de purificación enzimática; el filtrado se congeló y se liofilizó obteniéndose así el hidrolizado.

El procedimiento es idéntico para cualquier insecto o enzima estudiado.

35 c) AnálisisMedición del contenido de ceniza

El contenido de ceniza se determinó sobre el procedimiento relevante de regulación EC 152/2009 con fecha del 27 de enero de 2009.

40

Medición del tamaño de las proteínas

Cien (100) mg de muestra se introdujeron en 10 ml de tampón de fosfato/NaCl (pH 7,4, 0,137 mM). La muestra se agitó durante un minuto (vórtice), se centrifugó a 900 g durante 1 min y después se filtró a través de una membrana de 0,45 µm. El análisis se realizó en un sistema de cromatografía de exclusión estérica, con la columna Nucleogel GFC-300, el eluyente utilizado es el tampón de fosfato/NaCl (pH 7,4, 0,137 m); el caudal es 1,0 ml/min, la detección se realizó con un detector de UV a 280 nm.

45

Medición del contenido de proteínas

El contenido de proteínas se obtuvo mediante el procedimiento de Dumas, con un coeficiente de conversión de 6,25, adaptado de la norma NF EN ISO 16634-1.

50

Medición del contenido de lípidos

El contenido de lípidos se obtuvo mediante un procedimiento adaptado del reglamento EC 152/2009 - procedimiento B - SN.

55

Digestibilidad péptica

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

Abundancia relativa de aminoácidos

La abundancia de aminoácidos se determinó mediante un procedimiento obtenido del reglamento EC 152/2009 con fecha del 27 de enero de 2009 - SN. El contenido de triptófano se determinó por separado mediante un procedimiento adaptado del reglamento EC 152/2009 con fecha del 27 de enero de 2009 - SN. La abundancia relativa se calculó al relacionar el contenido de cada aminoácido con el contenido de aminoácidos.

Contenido de aminoácidos

El contenido de aminoácidos se determinó añadiendo los valores individuales obtenidos para cada aminoácido, incluyendo triptófano.

Pureza gravimétrica

La pureza gravimétrica se determinó al comparar el peso de residuo seco obtenido en relación al resultante de una extracción química, evaluándose esta última a aproximadamente el 5 % de la materia seca inicial.

Pureza colorimétrica

El color de la muestra se estimó analizando fotografías de muestras utilizando el programa informático ImageJ de acuerdo con los tres colores rojo, verde y azul (RVA o RGB en inglés), representando su promedio una valoración del color real. Una muestra de quitina de gamba comercializada por Chitine Francia, se tomó como estándar (100 % de pureza) y la pureza colorimétrica de las muestras producidas se calculó como un porcentaje de este color (proporción del color de la muestra/color del estándar).

Pureza por diferencia

Para esta medición, las cantidades de impurezas conocidas (aminoácidos, lípidos y ceniza) se restaron del valor de pureza absoluta (100 %) para obtener el valor de la pureza estimada por diferencia; es decir, a una muestra que contiene 30 % de proteínas, 10 % de lípidos y 1 % de ceniza se la asigna una pureza de $100-30-10-1=59$ %.

Grado de cristalinidad

Las mediciones se realizaron de acuerdo con la técnica de WAXS (dispersión de rayos X de ángulo ancho) en un aparato Bruker D8 Advance (diseño A25 DaVinci) equipado con un detector Lynxeye XE. Los resultados se interpretaron siguiendo el procedimiento descrito en Loelovich, M. Res. Rev.; J. Chem. 2014, 3, 7-14.

Grado de acetilación

Las mediciones se realizaron utilizando un aparato de RMN ¹³C CP/MAS (Bruker), equipado con un imán de 800 MHz.

El análisis de los resultados se efectuó conforme a lo descrito en Simionatto Guinesi, L.; Gomes Cavalheiro, E.T. Thermochemica Acta 2006, 444, 128-133 y Heux, L.; Brugnerotto, J.; Desbrières, J.; Versali, M.-F.; Rinaudo, M. Biomacromolecules 2000, 1, 746-751.

Medición de abundancia de superficie funcional y atómica

Las mediciones se realizaron utilizando un aparato XPS Escalab 25 (VG Scientific), equipado con una fuente de RX Ka A1 (1486.6 eV), un monocromador y una lente magnética.

Las muestras, previamente reducidas a polvo, se colocaron al vacío durante 48 a 72 horas y después se analizaron.

Representación de la cutícula mediante microscopía de fluorescencia de dos fotones

Microscopía multifotónica en aparato DISCO (Synchrotron Soleil).

Lambda exc=810 nm, potencia 18 %, filtro azul turquesa y ocre 406/15 (SHG), filtro azul 460/60, filtro verde 550/88.

II. Hidrolizado

a) Ceniza

5 El prensado tiene un efecto muy significativo sobre el contenido de ceniza en el hidrolizado obtenido, independientemente del insecto estudiado (figura 8). De hecho, la disminución en el contenido de ceniza puede alcanzar un 52 % y la disminución proporcional es relativamente similar ya sea que los insectos sean naturalmente ricos en minerales o no. Así, en el caso de *H. illucens*, el contenido de ceniza cambia de 7,5 g/100 g de materia seca cuando se utiliza el procedimiento con trituración, a 3,8 g/100 g de materia seca cuando se añade una etapa de prensado, es decir, una disminución del 49 %; en el caso de *T. molitor*, cambia de 5 g/100 g a 2,4 g/100 g, es decir, una disminución del 52 %.

10 El prensado también tiene un efecto significativo sobre el contenido de ceniza en el hidrolizado obtenido, independientemente de la enzima utilizada (figura 9). En particular se observa que para *T. molitor*, independientemente de la enzima utilizada, el contenido de ceniza en el hidrolizado es menor que 3 % cuando se utiliza el procedimiento con prensado.

15 El contenido de ceniza en el hidrolizado (obtenido mediante el procedimiento de trituración + prensado) es menor que 4 g/100 de materia seca, independientemente del insecto estudiado (figura 10).

b) Tamaño de las proteínas en el hidrolizado

20 El uso de la etapa de prensado permite claramente mejorar el desempeño de las enzimas proteolíticas, independientemente del insecto (figura 11) o la enzima utilizados (figura 12). La abundancia relativa de proteínas de gran tamaño cae así significativamente en relación al procedimiento que comprende solo la etapa de trituración, sin comprender el hidrolizado final más de 10,3 % máximo en el caso de la hidrólisis realizada con Prolyve, independientemente del insecto; y no más de 17,5 % en el caso de la hidrólisis de *T. molitor*, independientemente de la utilizada.

c) Contenido de proteínas

30 El contenido de proteínas del hidrolizado es sumamente dependiente del procedimiento utilizado. Así, cuando se aplica trituración sola, las proteínas solo representan un $53,59 \pm 1,5$ % de la materia seca del hidrolizado de *T. molitor* así obtenida, independientemente de la enzima utilizada (figura 13). En cambio, cuando la trituración es seguida de prensado, el contenido de proteínas en el hidrolizado cambia a $84,58 \pm 1,4$ %, experimentando así un aumento de 53-62 %, dependiendo de la enzima utilizada.

35 Este aumento es mayor si el insecto era inicialmente pobre en proteínas, así en el caso de *G. melonella*, el contenido de proteínas cambia de 41,25 % a 71 %, experimentando un aumento de casi un 86 % y en el caso de *H. illucens*, el aumento es incluso del 118 %, debido a que cambia de 34,25 % a 74,5 % (figura 14).

d) Contenido de lípidos

40 El prensado tiene una mayor influencia sobre el contenido de lípidos del hidrolizado, independientemente de la enzima (figura 15) o del insecto estudiado (figura 16). De hecho, el contenido de lípidos disminuye drásticamente de 51,4-97,7 %, cambiando así de 28,6 a 13,9 % en el caso de *H. illucens* (51,4 % de disminución) y de 33,85 a 0,9 % en el caso de *T. molitor* con Novozyme (97,3 % de disminución).

e) Digestibilidad péptica

45 La digestibilidad péptica de los hidrolizados así obtenida es muy alta, mayor que 96 %, independientemente de la enzima o del insecto estudiado (figura 17).

f) Abundancia de aminoácidos

50 El uso de la etapa de prensado permite obtener una mejor extracción de los otros aminoácidos presentes en la cutícula, tales como alanina y tirosina y, a un menor grado, valina, serina y glicina, independientemente de la enzima o del insecto estudiado (figuras 18-24). Estos resultados también deberían compararse con los que se refieren a los aminoácidos presentes en la quitina purificada enzimáticamente (figuras 29-35).

60 Observación: aunque la abundancia relativa de algunos aminoácidos, incluyendo ácido aspártico y glutamato, en particular, disminuye, sus cantidades permanecen idénticas o incluso aumentan ligeramente en ciertos casos, ya que la cantidad total de aminoácidos extraída mediante el procedimiento con una etapa de prensado aumenta (véase contenido de proteínas en el hidrolizado).

III. Quitina

65 a) Ceniza

El contenido de cenizas en la quitina también está afectado por la etapa de prensado, aunque a un menor grado que para el hidrolizado. Se observa por tanto una disminución que varía del 25 % al 28,6 % en función de la enzima utilizada (figura 25).

- 5 El contenido de cenizas en la quitina (obtenida mediante el procedimiento de trituración + prensado) es extremadamente bajo, independientemente del insecto (figura 26) estudiado. Así, en el caso de *T. molitor*, el contenido máximo de ceniza es de 1,05 g/100 g de materia seca e incluso para insectos naturalmente ricos en minerales, permanece menor que 3,5 g/100 g de materia seca.

10 b) Contenido de lípidos en la quitina

Aunque a un grado ligeramente menor que para el hidrolizado, el contenido de lípidos en la quitina también disminuye cuando se añade al procedimiento la etapa de prensado (figura 27). La eficiencia depende esencialmente de la enzima, desde un 15 % para Sumizyme y hasta un 60 % para Novozyme. Independientemente del insecto, cuando la reacción se realiza con Prolyve, esta disminución se sitúa entre un 50 % en el caso de *H. illucens* y un 58 % en el caso de *T. molitor*.

Para todos los insectos, el contenido de lípidos es menor que 12 % y para los insectos no voladores es incluso ≤ 6 %.

20 c) Contenido y abundancia relativa de aminoácidos en la quitina

La etapa de prensado permite eliminar una mayor parte de las proteínas unidas a la quitina. Como la medición directa del contenido de proteínas se dificulta debido a la función amida presente en la estructura real de la quitina, este contenido de proteínas se aproximó por la suma de los aminoácidos (figura 28). Así, puede constatarse que la suma de los aminoácidos disminuye, de 5 a 54 %, cuando se añade al procedimiento la etapa de prensado, independientemente de la enzima o del insecto estudiado.

La abundancia relativa de los aminoácidos se ve poco afectada por la etapa de prensado, aunque algunos aminoácidos, incluyendo la alanina, parecen extraerse mejor cuando se realiza la etapa de prensado (figuras 29 a 35). No obstante, puede constatarse que para todos los insectos, la alanina, la tirosina y la prolina, así como en menor medida, la valina, la glicina, la leucina y la serina, son aminoácidos que se unen principalmente a la quitina, estando su contenido comprendido en promedio entre el 23 y el 40 % de todos los aminoácidos y también está entre estos aminoácidos que observamos las disminuciones más importantes en la quitina y los aumentos más significativos (alcanzando un máximo de 7- 30%) en el hidrolizado (figuras 18-24) cuando se añade al procedimiento una etapa de prensado.

35 d) Pureza gravimétrica

Independientemente de la enzima (figura 36) o del insecto (figura 37) estudiado, la pureza gravimétrica mejora al utilizar la etapa de prensado. Así, cambia de 48,7 % a 77,1 % en el caso de *T. molitor* con Prolyve y de 33,7 % a 87,9 % en el caso de *H. illucens* con Prolyve.

40 e) Pureza colorimétrica

45 También se observa una mejora en la pureza colorimétrica, sin duda menos marcada, que para la pureza gravimétrica, cuando la etapa de prensado forma parte del procedimiento, independientemente de la enzima o del insecto estudiado (figuras 38 y 39).

50 f) Pureza por diferencia

Debido a la disminución en el contenido de lípidos, ceniza y aminoácidos en la quitina obtenida después del procedimiento con prensado, la pureza por diferencia de esta quitina aumenta significativamente, un 13 % en el caso de *H. illucens* y hasta un 74 % en el caso de *T. molitor* con Prolyve, independientemente del insecto o de la enzima estudiado (figura 40).

55 g) Grado de acetilación de la quitina

El grado de acetilación se ve significativamente afectado al añadir al procedimiento la etapa de prensado (figuras 41 y 42). De hecho, la eliminación de lípidos y de aminoácidos de la hemolinfa, permite una mayor accesibilidad de las enzimas a la superficie de la cutícula, lo que contribuye a una mejora de la escisión de los enlaces peptídicos de las proteínas unidas a la quitina, aunque también, mediante promiscuidad catalítica, se escinden los enlaces amida de la quitina. De este modo, el grado de acetilación de la quitina de *T. molitor* que resulta del procedimiento, está comprendido entre 76 y 79 %, mientras que sin etapa de prensado, es de 91 % e incluso la hidrólisis química, realizada en condiciones drásticas de temperatura y reactivos, conduce a un grado de acetilación de 85 %.

65 Para los otros insectos considerados, en particular *G. melonella* y *A. domesticus*, el grado de acetilación también se

ve afectado por el procedimiento, cambiando así de 83 a 74 % en un caso y de 100 a 95 % en el otro caso, respectivamente.

5 Conforme la solubilidad y la capacidad de procesamiento de la quitina están particularmente relacionados con su grado de acetilación, esta hidrólisis concomitante del enlace de amida de las unidades de N-acetilglucosamina de la quitina es un efecto positivo inesperado de la hidrólisis enzimática realizada en estas condiciones.

h) Abundancias de superficie funcional y atómica

10 Conforme la purificación avanza, la distribución de los átomos en la superficie de la quitina muestra un aumento en el contenido de oxígeno relativo y una disminución en el contenido de carbono relativo (tabla 4).

15 Del mismo modo, los enlaces de los átomos de carbono en la superficie tienden a pasar de enlaces predominantemente de tipo hidrocarburo (C-H, C-C), a enlaces de tipo alcohol (C-O) o carbonilo (C=O). También existe una disminución en los enlaces de tipo amida (N-C=O).

20 Sin embargo, parece que la más representativa es la proporción de enlace alcohol/enlace hidrocarburo (C-O/C-H) y en el contexto de la quitina purificada enzimáticamente esta proporción está comprendida entre 0,31 y 0,56, aunque más específicamente entre 0,39 y 0,41.

En la tabla 4:

- la expresión "cutícula en bruto" se refiere a la quitina de la cutícula en el estado natural, analizada directamente después de haber sido extraída del insecto mediante disección;
- 25 - la expresión "quitina purificada enzimáticamente (Novozyme)" se refiere a una quitina que resulta de un procedimiento que comprende trituración + prensado e hidrólisis enzimática en presencia de la enzima Novozyme 37071;
- la expresión "quitina purificada enzimáticamente (Prolyve)" se refiere a una quitina que resulta de un procedimiento que comprende trituración + prensado e hidrólisis enzimática en presencia de la enzima Prolyve NP;
- 30 - la expresión "quitina purificada enzimáticamente" se refiere a una quitina que resulta de un procedimiento que comprende trituración + prensado e hidrólisis enzimática en presencia de la enzima Prolyve;
- la expresión "quitina pura" se refiere a una quitina obtenida mediante purificación química, idéntica a la utilizada para determinar la cantidad de quitina en el insecto.

		Átomos		Tipos de enlace				Proporción (C-O)/(C-H)
		C	O	C-H	C-O	C=O	N-C=O	
TM	Cutícula en bruto	78,85	16,23	68,88	20,16	6,87	3,53	0,29
	Quitina purificada enzimáticamente (Novozyme)	75,71	18,50	62,88	24,21	9,93	2,98	0,39
	Quitina purificada enzimáticamente (Prolyve)	75,64	19,40	57,54	29,57	10,67	2,22	0,51
	Quitina pura	64,24	30,31	39,5	42,36	16,21	1,92	1,07
AD	Quitina purificada enzimáticamente	78,49	16,37	68,16	20,84	8,48	2,32	0,31
	Quitina pura	67,27	27,30	42,32	40,46	13,59	3,63	0,96
GM	Quitina purificada enzimáticamente	76,24	19,29	63,15	25,15	8,9	2,81	0,40
	Quitina pura	64,93	28,87	34,1	45,39	18,07	2,44	1,33
HI	Cutícula en bruto	86,09	12,69	83,35	8,41	2,88	5,68	0,10
	Quitina purificada enzimáticamente	74,46	21,10	61,49	25,07	7,95	5,49	0,41
	Quitina pura	73,10	22,49	53	30,3	11,16	4,11	0,57

Tabla 4. Distribución de ciertos átomos y enlaces en la superficie de la quitina

35

i) Representación de la cutícula mediante microscopía de fluorescencia de dos fotones

La purificación parcial de la quitina por vía enzimática según el procedimiento de acuerdo con la invención, permite mantener la flexibilidad del conjunto al conservar el "llenado" proteico de las estructuras de quitina, comparada con una purificación química, quitando al mismo tiempo la sobrecarga proteica en el exterior de la estructura (véase la figura 43).

La terminología utilizada en la figura 43 es la misma que la definida en el apartado III h) anterior.

j) Grado de cristalinidad

Independientemente del insecto o de la enzima estudiado, el grado de cristalinidad, es decir, la proporción de las áreas cristalinas y amorfas, de la quitina obtenida, está comprendido entre 0,42 y 0,61.

En general, en la bibliografía, se habla de índice de cristalinidad, es decir, la proporción de las alturas de los picos (y no de las áreas). Esta medición conlleva un riesgo substancial de error. No obstante, para fines de comparación, el índice de cristalinidad de las muestras también se midió y se situó entre el 88 y el 95 % para todos los insectos y es incluso mayor que 90 % para los coleópteros y los lepidópteros.

Ejemplo 6: Procedimiento de acuerdo con la invención con recuperación de la fracción proteica que se obtiene del jugo de prensa

I. Material y procedimientos

a) Material

Insecto

Se estudió el siguiente insecto:

- un coleóptero: *Tenebrio molitor* (*T. molitor* o TM).

Enzima

Se usó Prollyve en la hidrólisis.

Enzima	Prollyve
Actividad enzimática deseada	3789,52
Actividad enzimática / g	3789,52
m (g)	1,00

b) Procedimientos de producción

Procedimiento de producción con trituración seguida de prensado (denominado "trituración + prensado" en las figuras)

Se transformaron varios lotes de la siguiente manera: 600 g de larvas recientes de *T. molitor* se introdujeron en una cámara, donde se provocó la muerte con vapor (115°C, 5 minutos). Los insectos se introdujeron después en un mezclador y se añadieron 75 ml de agua por 100 g de insectos y después todo ello se mezcló y se prensó (prensa de doble tornillo o filtro-prensa u otro sistema de prensado).

Después, la torta de prensado se secó a 70 °C durante la noche. En cambio, el jugo de prensa, se centrifugó durante 30 minutos con una fuerza de 3.000 g y la parte sólida se recuperó - proteínas insolubles de la hemolinfa.

Después, 125 g de torta de prensa y 125 g (peso húmedo, aproximadamente 30 % en peso seco) de proteínas de hemolinfa insolubles se introdujeron en un matraz de tres cuellos equipado con un condensador y un agitador magnético, se añadieron 1.250 ml de agua así como una enzima proteolítica con una actividad equivalente a 9.500 SAPU. La reacción se calentó después a 45 °C durante 4 horas. La temperatura subió a 90 °C durante 15 minutos y finalmente la mezcla de reacción se filtró (0,40 - 0,45 µm). El residuo se secó durante 24 horas a 70 °C: se trata por tanto de la quitina obtenida por la vía de purificación enzimática; el filtrado se congeló y se liofilizó; se trata por tanto del hidrolizado.

c) Análisis

La medición del contenido de ceniza, la medición del contenido de lípidos, la abundancia relativa de aminoácidos y la medición del tamaño de las proteínas, se realizaron como en el ejemplo 5.

5

II. Caracterización de los productos obtenidos

Los productos obtenidos, la quitina y el hidrolizado, se analizaron y se caracterizaron (tabla 5, figura 45).

10

Tabla 5: Caracterización

	Hidrolizado	Quitina
Cenizas	4,1	0,5
Lípidos	12,85	3,7
Digestibilidad	95	n. a.
Aminoácidos (abundancia relativa %)		
ASP	9,7	5,4
GLU	12,8	6,7
ALA	9,0	13,7
ARG	2,5	3,6
CYS	1,1	0,5
GLY	5,9	9,4
HIS	3,3	3,9
ILE	5,4	4,8
LEU	8,5	8,0
LYS	6,5	2,9
MET	1,5	0,4
PHE	4,0	2,6
PRO	6,9	8,3
SER	4,4	5,8
THR	4,9	3,5
TYR	4,7	11,3
VAL	7,7	9,0
TRP	1,3	0,6
n. a.: no aplicable		

REIVINDICACIONES

- 5 1. Hidrolizado preparado a partir de insectos, que comprende al menos 40 % en peso de proteínas sobre el peso total de materia seca, un contenido de cenizas menor que 3 % en peso sobre el peso total de materia seca y un contenido de proteínas solubles en agua de un tamaño mayor que 12.400 g/mol, menor que 50 %.
- 10 2. Procedimiento para la producción de al menos un producto de interés a partir de insectos, que comprende las siguientes etapas:
 (i) trituración de las cutículas de los insectos,
 (ii) prensado de las cutículas de los insectos y después,
 (iii) la hidrólisis enzimática de las cutículas de los insectos con una enzima proteolítica.
- 15 3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, que antes de la etapa de trituración, comprende una etapa de provocar la muerte de los insectos.
- 20 4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, que antes de la hidrólisis enzimática comprende además una etapa de tratamiento de las cutículas de los insectos con un agente oxidante.
- 25 5. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que el insecto o los insectos se selecciona(n) del grupo constituido por coleópteros, lepidópteros, ortópteros y dípteros.
6. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que la proteasa se selecciona del grupo constituido por aminopeptidasas, metalocarboxipeptidasas, serina endopeptidasas, cisteína endopeptidasas, aspártico endopeptidasas, metaloendopeptidasas.
- 30 7. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que el producto de interés es quitina y/o quitosán.
8. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que el producto de interés es un hidrolizado.
- 35 9. Procedimiento para la producción de quitina a partir de cutículas de insectos, que comprende las siguientes etapas:
 a) provocar la muerte de los insectos,
 b) triturar los insectos,
 c) prensar los insectos,
 d) la hidrólisis enzimática de las cutículas de los insectos con una enzima proteolítica,
 e) recuperar la quitina,
 40 opcionalmente, pudiendo tratarse las cutículas de los insectos con un agente oxidante antes de la etapa d).
- 45 10. Quitina obtenible mediante un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, 9.
11. Procedimiento para la producción de un hidrolizado a partir de insectos, que comprende los siguientes etapas:
 a) provocar la muerte de los insectos,
 b) triturar los insectos,
 c) prensar los insectos,
 d) la hidrólisis enzimática de las cutículas de los insectos con una enzima proteolítica,
 e) recuperar el hidrolizado,
 50 opcionalmente, pudiendo tratarse las cutículas de los insectos con un agente oxidante antes de la etapa d).
- 55 12. Hidrolizado obtenible mediante un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, 8, 11.
- 60 13. Procedimiento para la producción de quitosán a partir de cutículas de insectos, que comprende los siguientes etapas:
 a) provocar la muerte de los insectos,
 b) triturar los insectos,
 c) prensar los insectos,
 d) la hidrólisis enzimática de las cutículas de los insectos con una proteasa,
 e) recuperar la quitina,
 f) desacetilar la quitina recuperada,
 g) recuperar el quitosán,
 65 opcionalmente, pudiendo tratarse las cutículas de los insectos con un agente oxidante antes de la etapa d).

14. Quitina que comprende un contenido de aminoácidos menor que o igual a 45 % en peso sobre el peso total de materia seca, un contenido de cenizas menor que o igual a 2,5 % en peso sobre el peso total de materia seca, una pureza por diferencia mayor que o igual a 45 %, un grado de acetilación mayor que o igual a 70 % y un grado de cristalinidad mayor que o igual a 0,42.
- 5

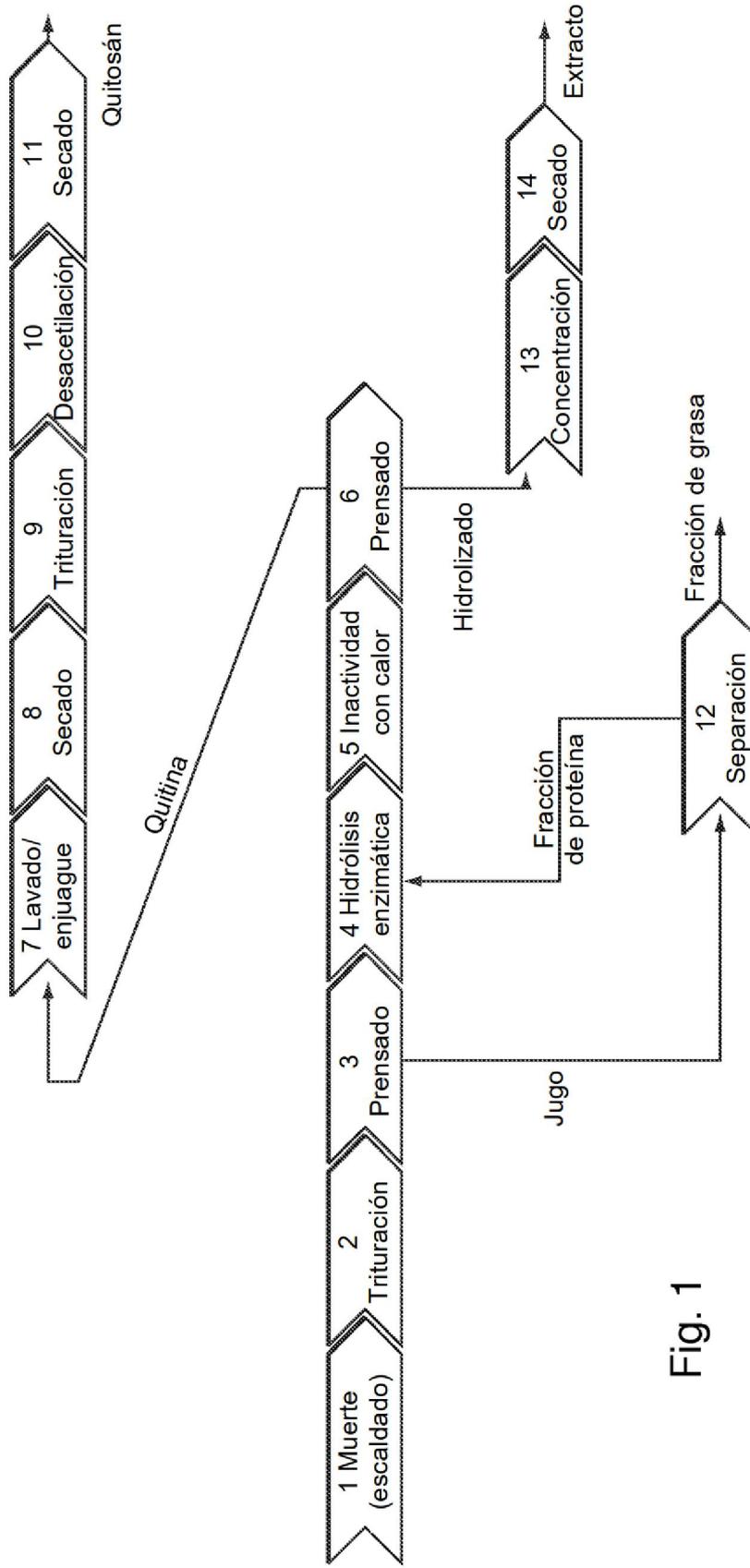


Fig. 1

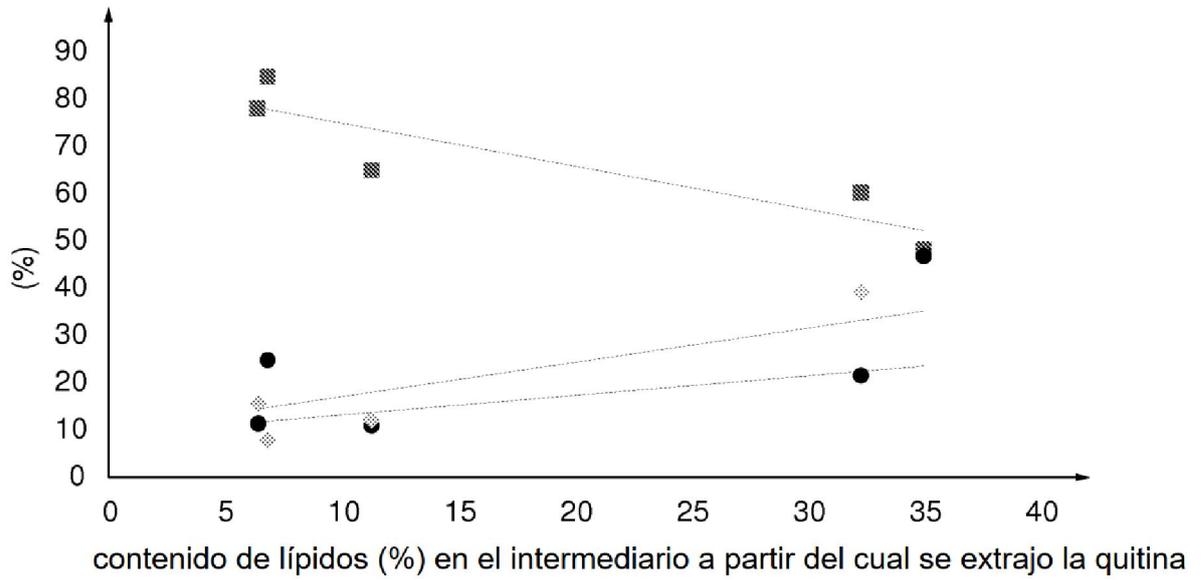
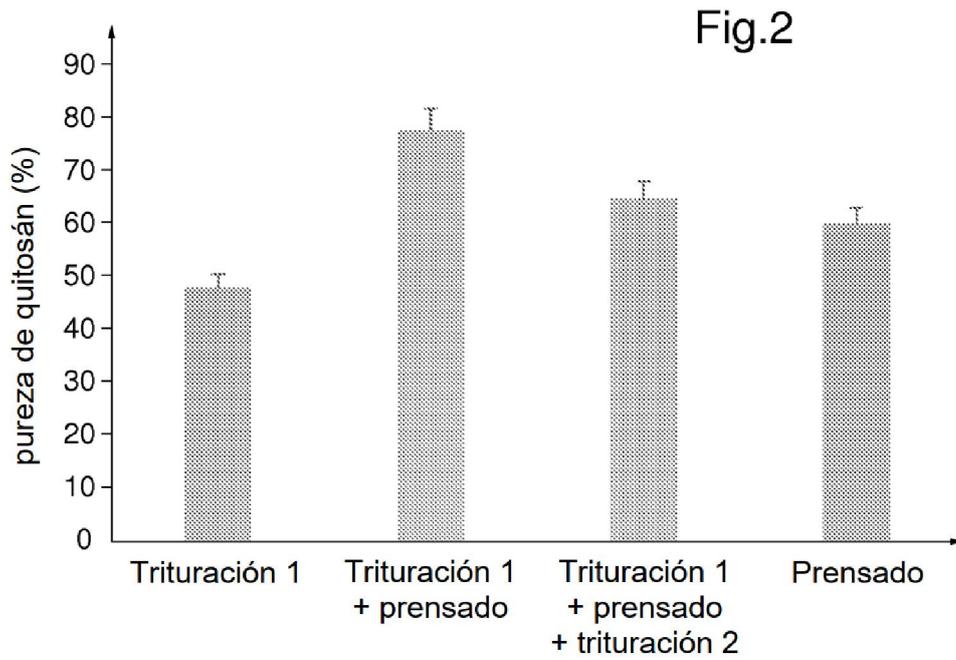


Fig. 3

- pureza de la quitina
- contenido de lípidos en el hidrolizado
- ◊ contenido de lípidos en la quitina

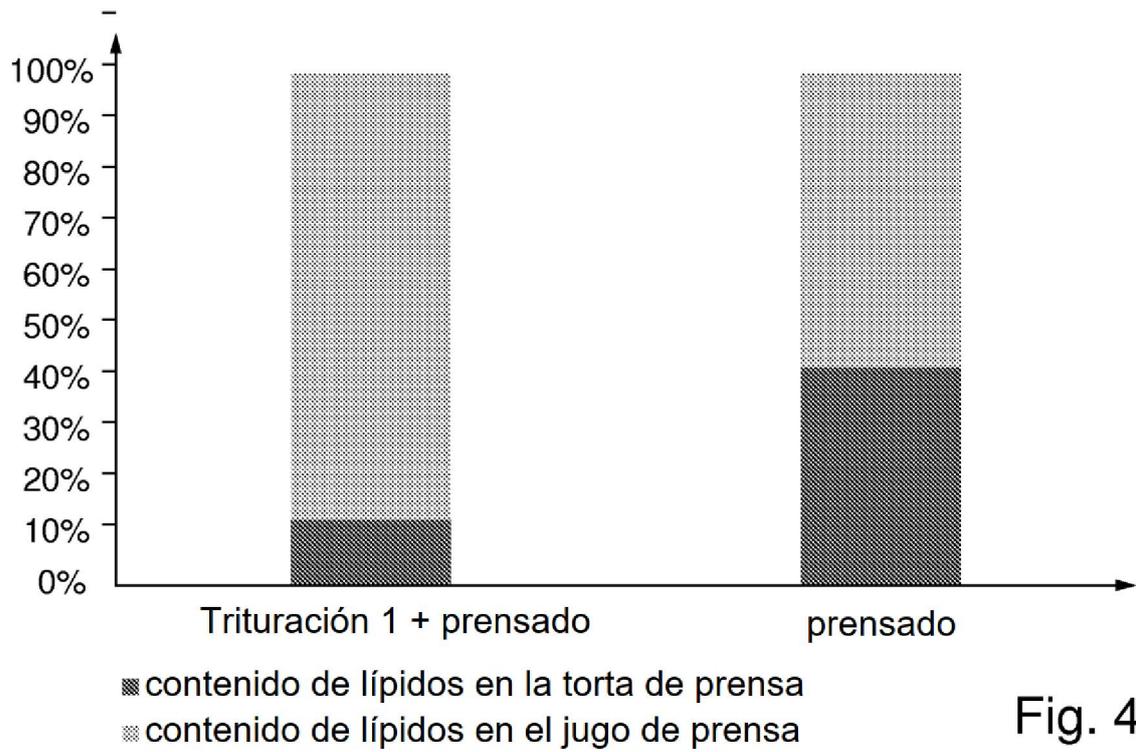


Fig. 4

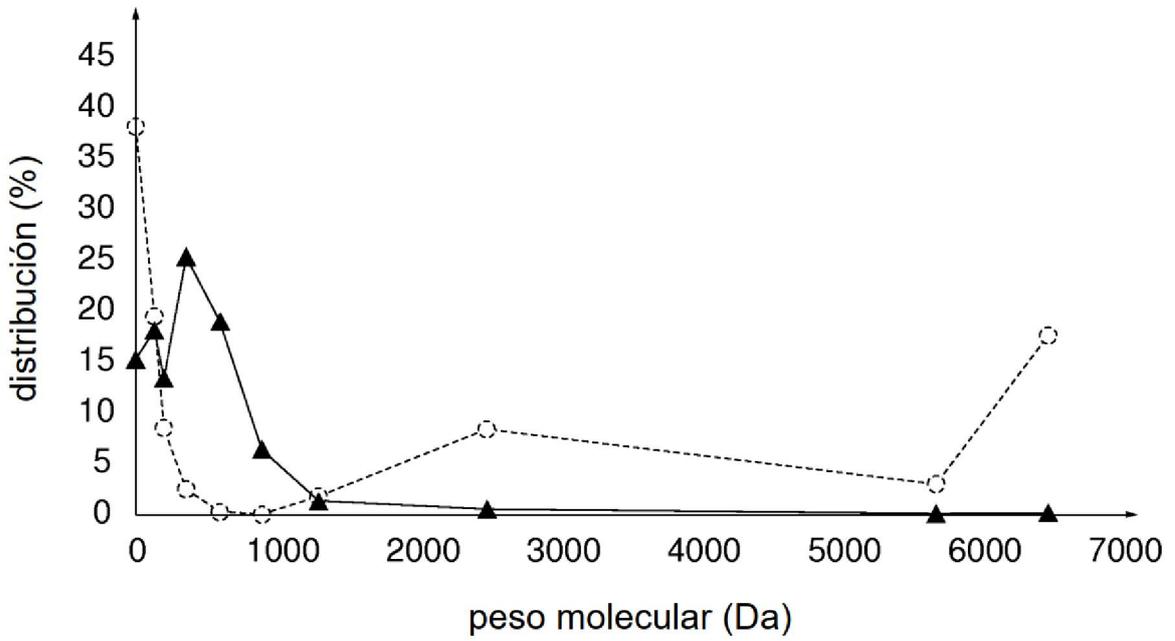
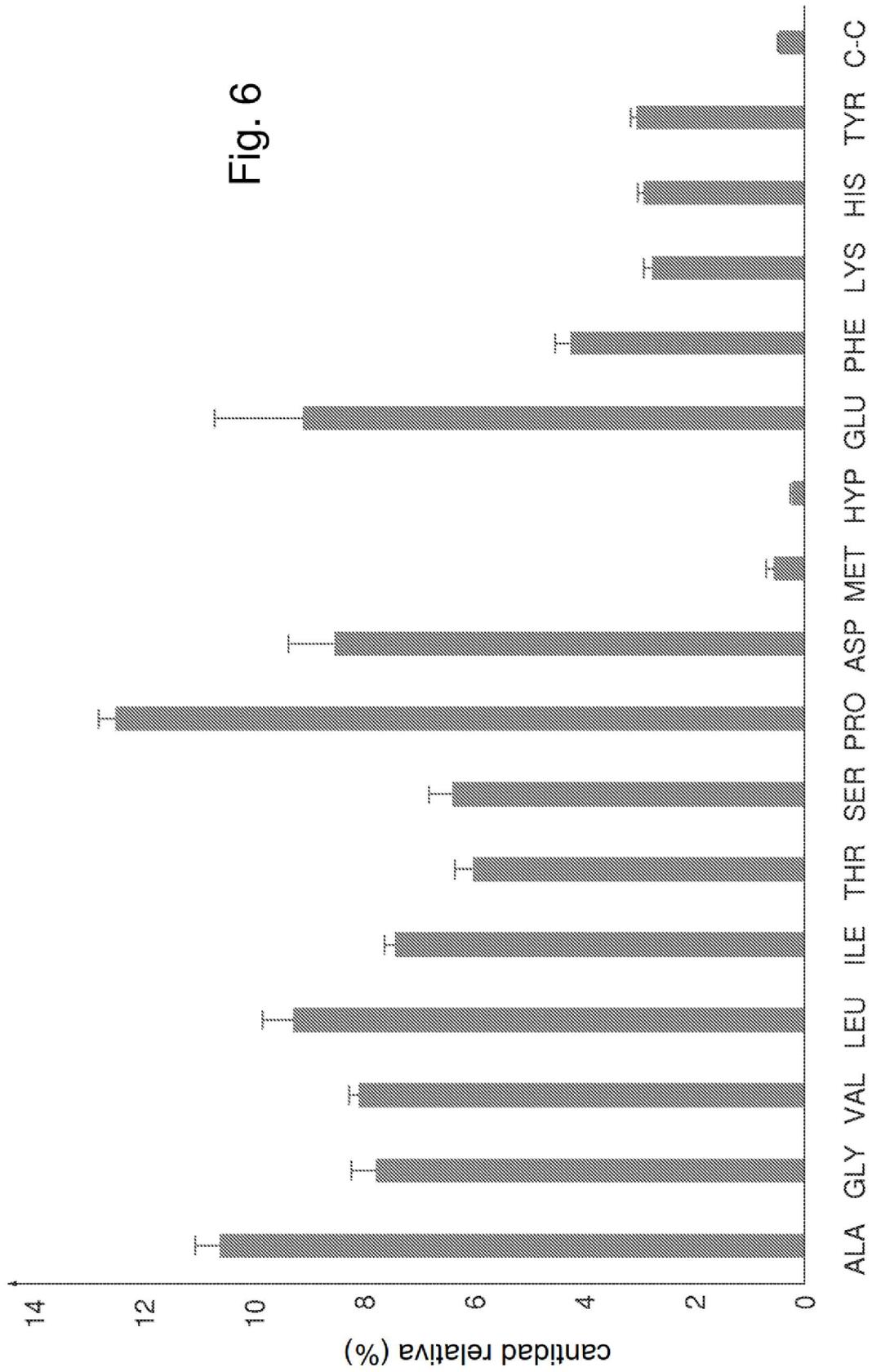
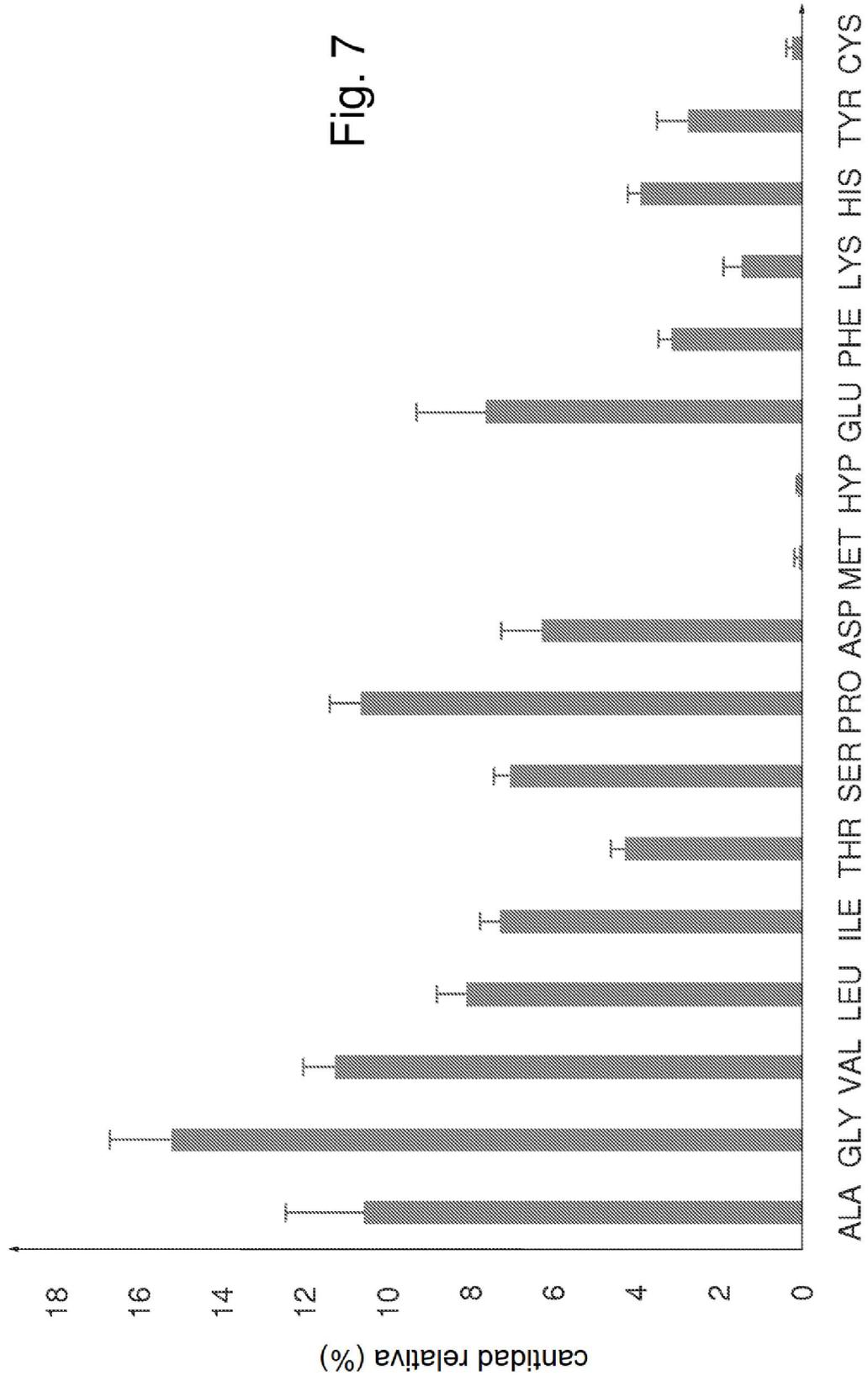


Fig. 5

---○--- jugo de prensa —▲— hidrolizado





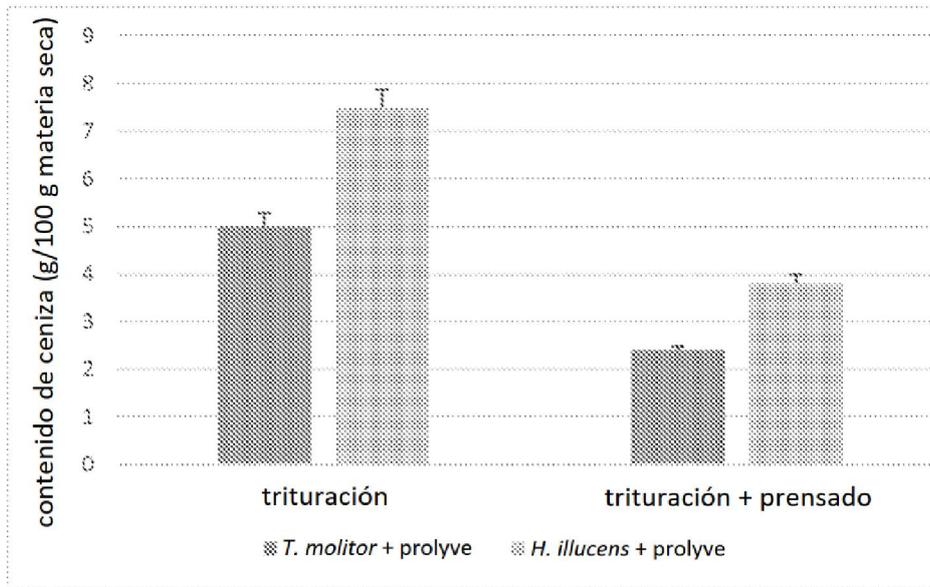


Fig. 8

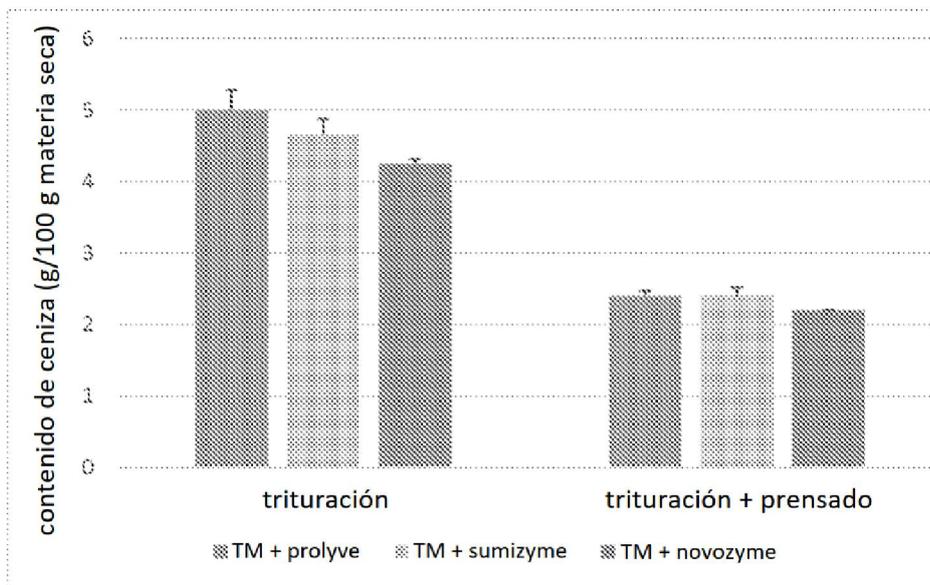


Fig. 9

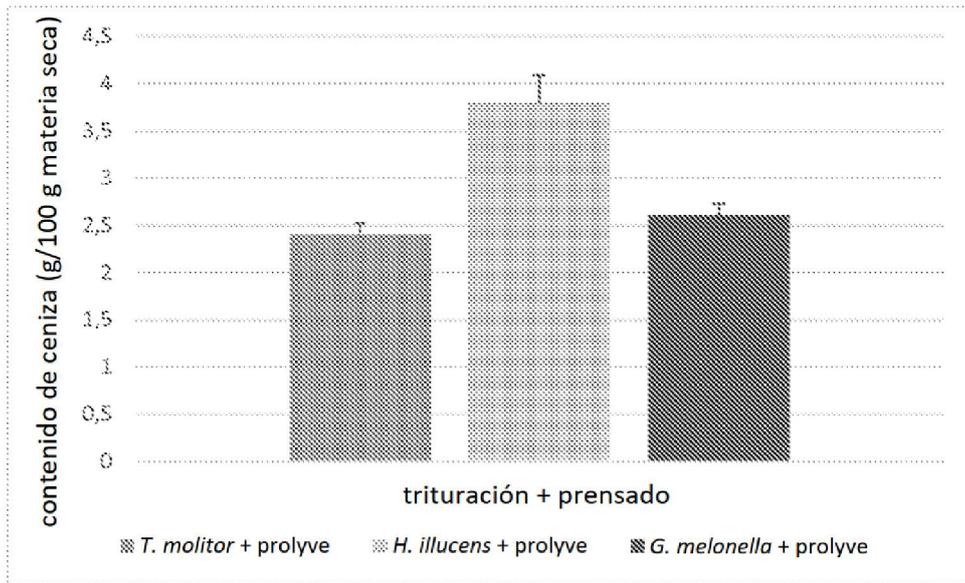


Fig. 10

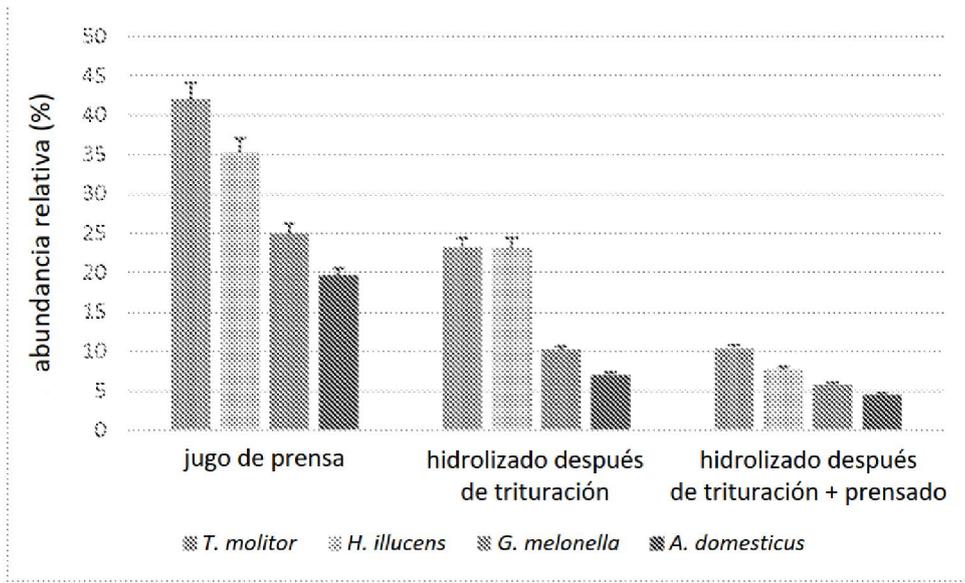


Fig. 11

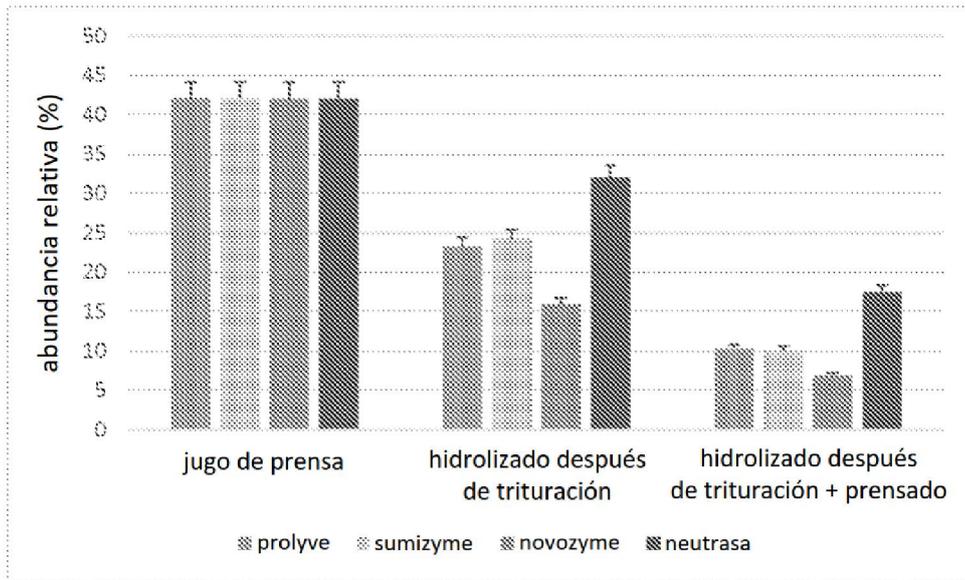


Fig. 12

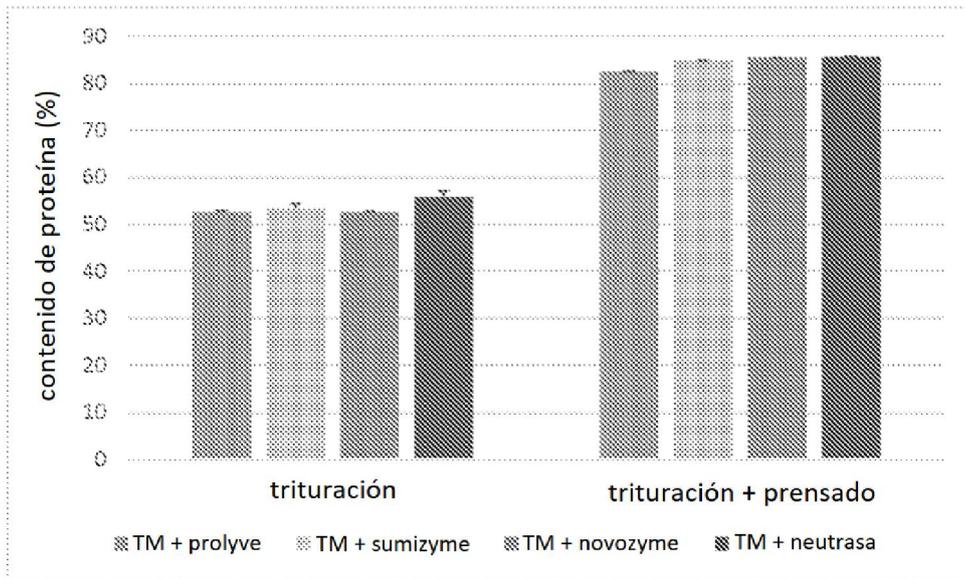


Fig. 13

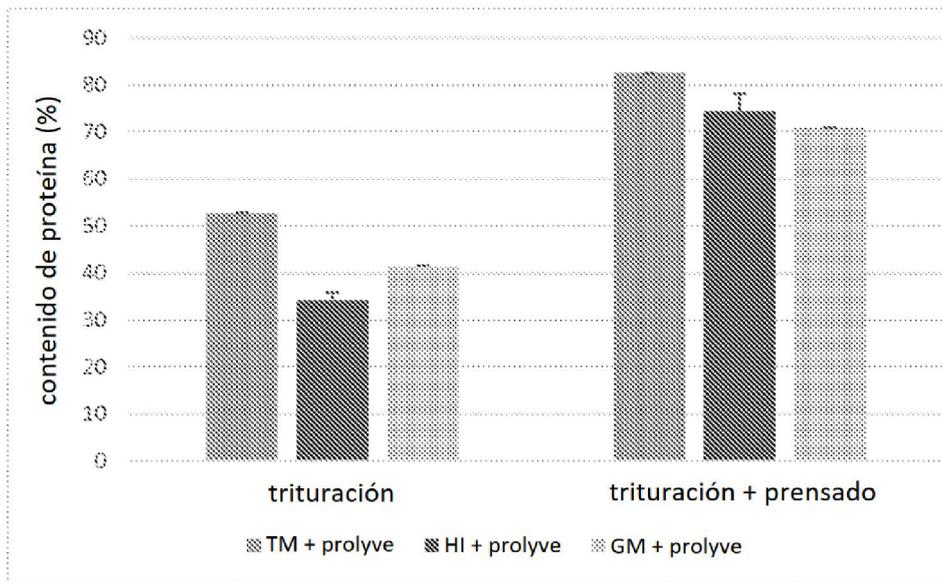


Fig. 14

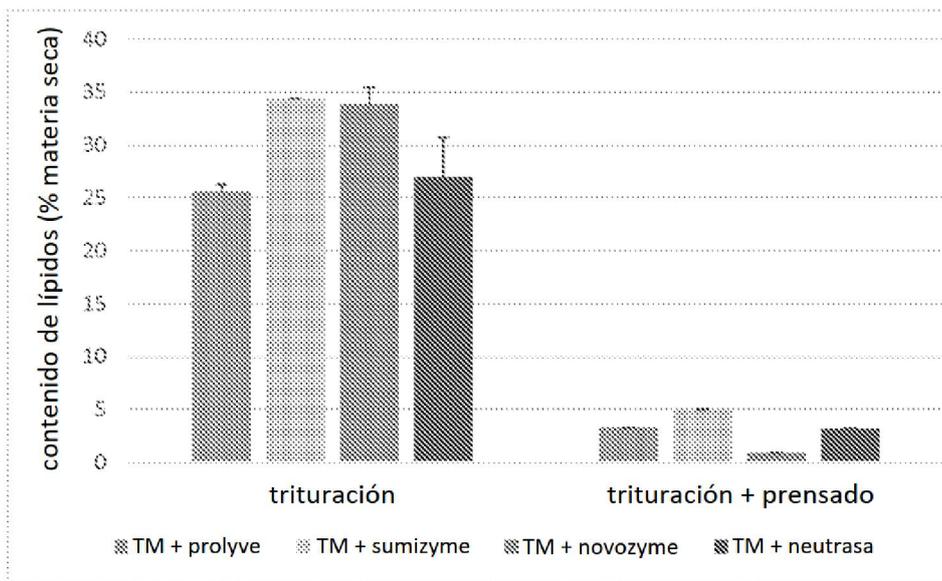


Fig. 15

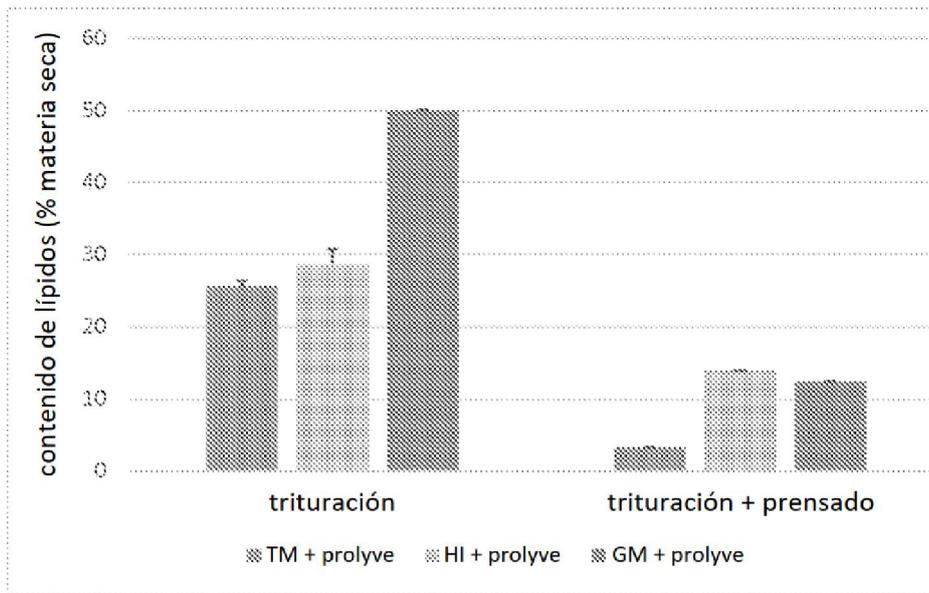


Fig. 16

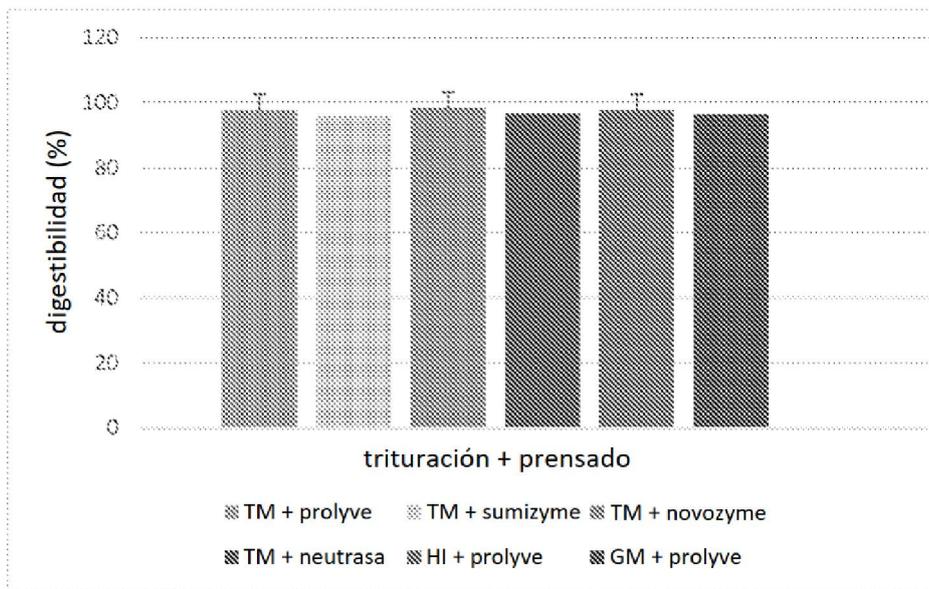


Fig. 17

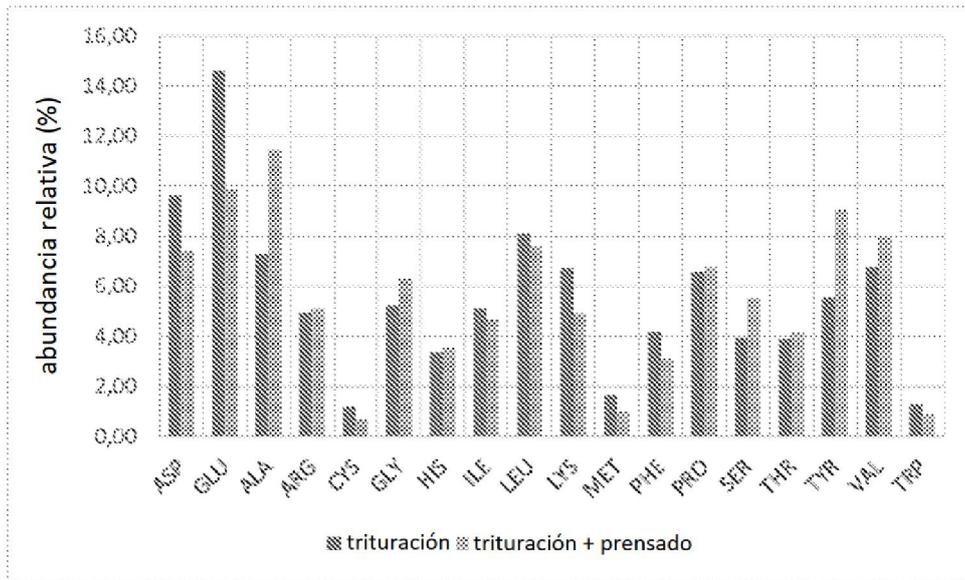


Fig. 18

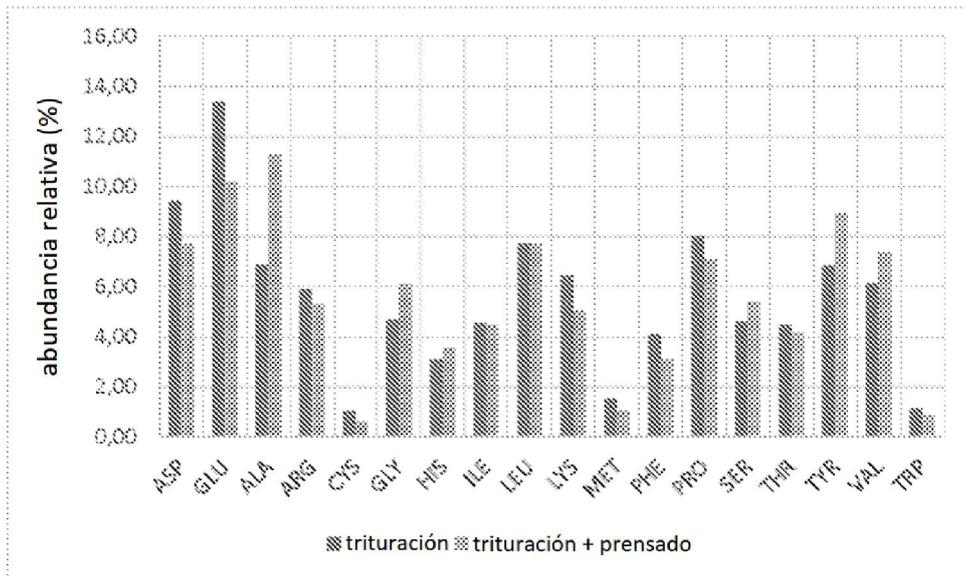


Fig. 19

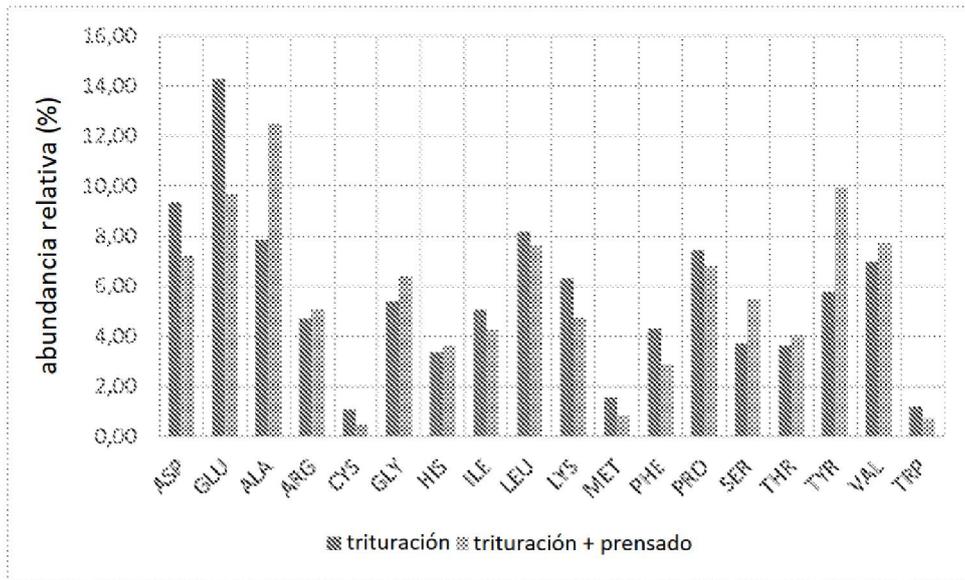


Fig. 20

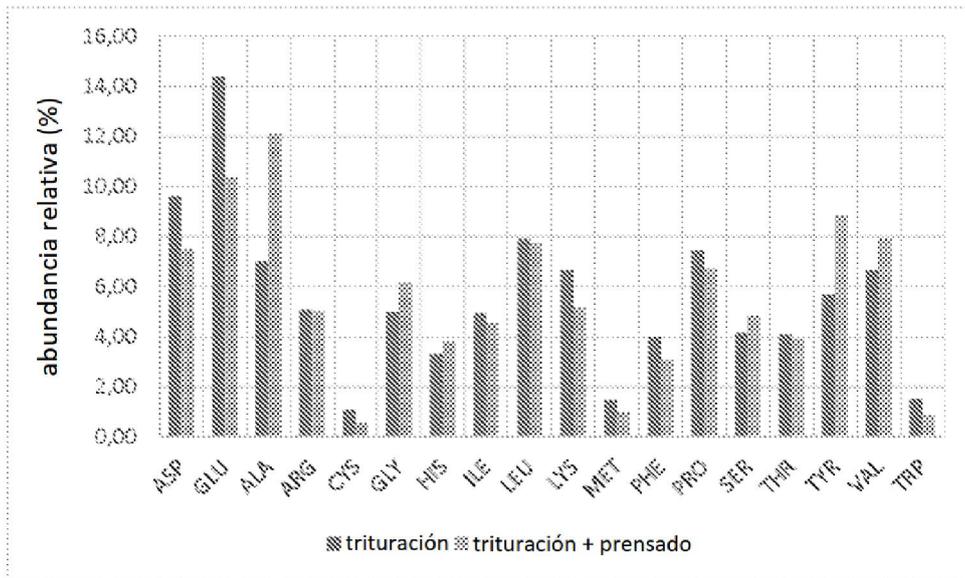


Fig. 21

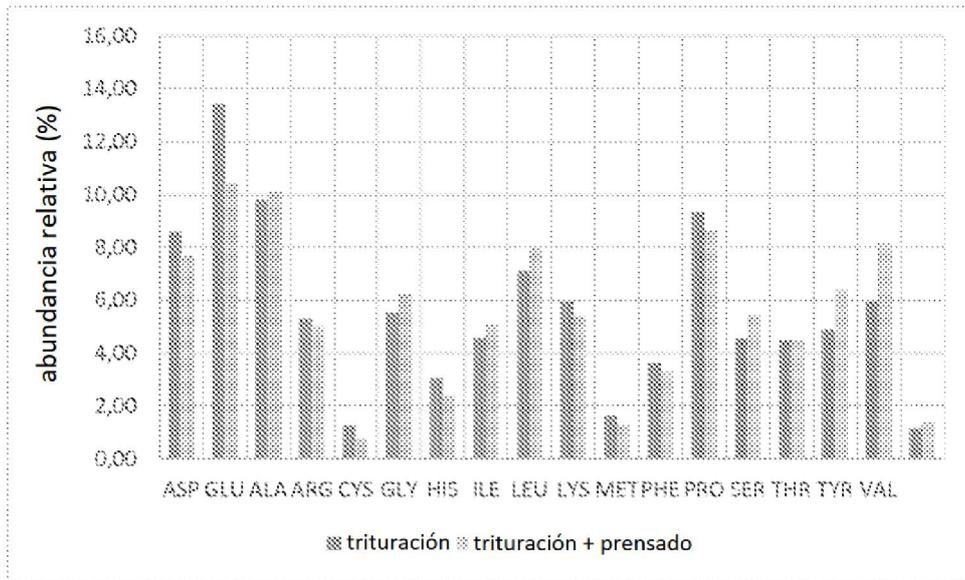


Fig. 22

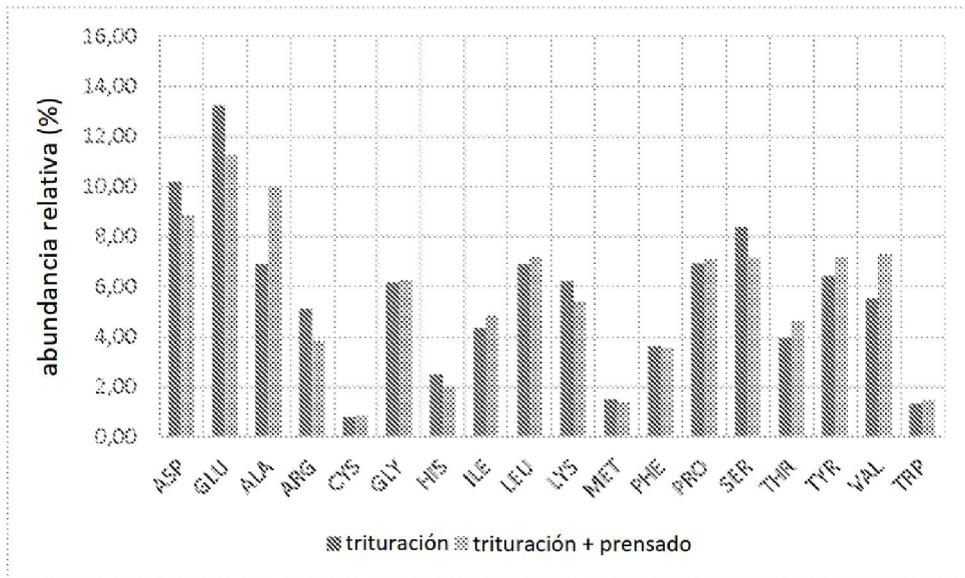


Fig. 23

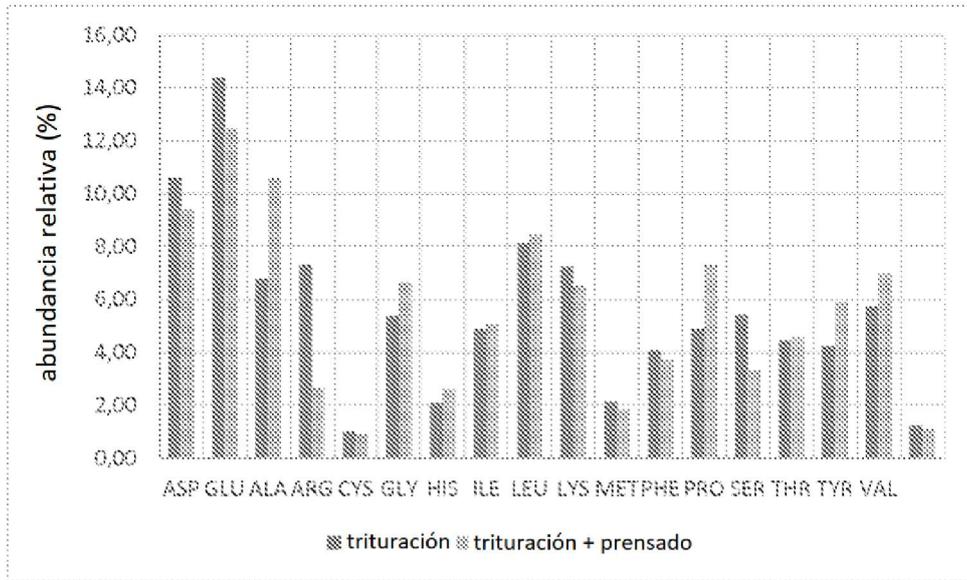


Fig. 24

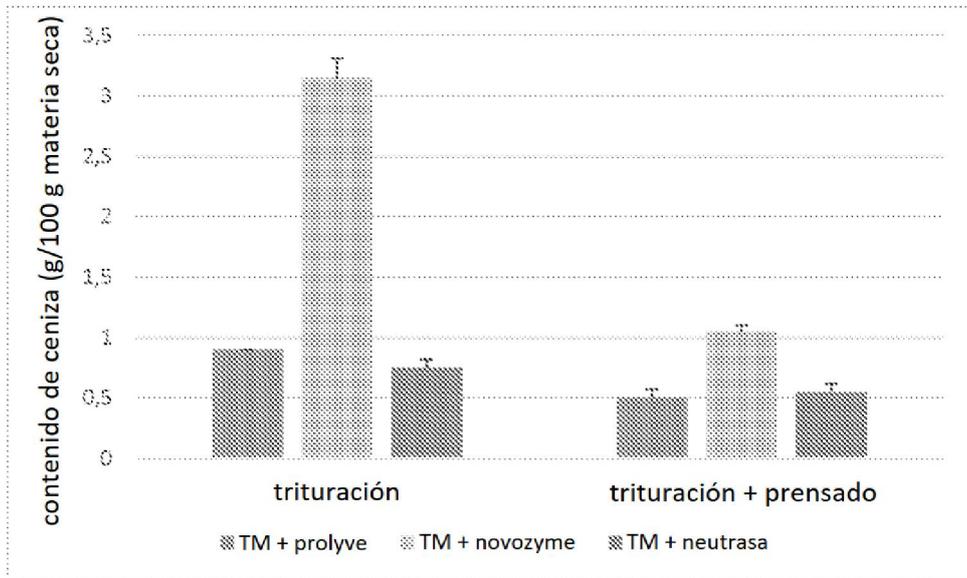


Fig. 25

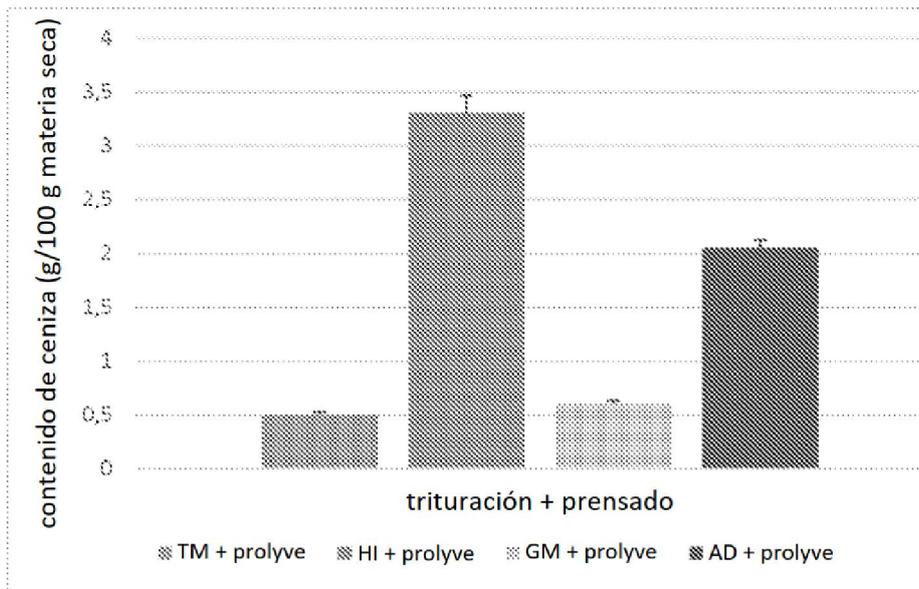


Fig. 26

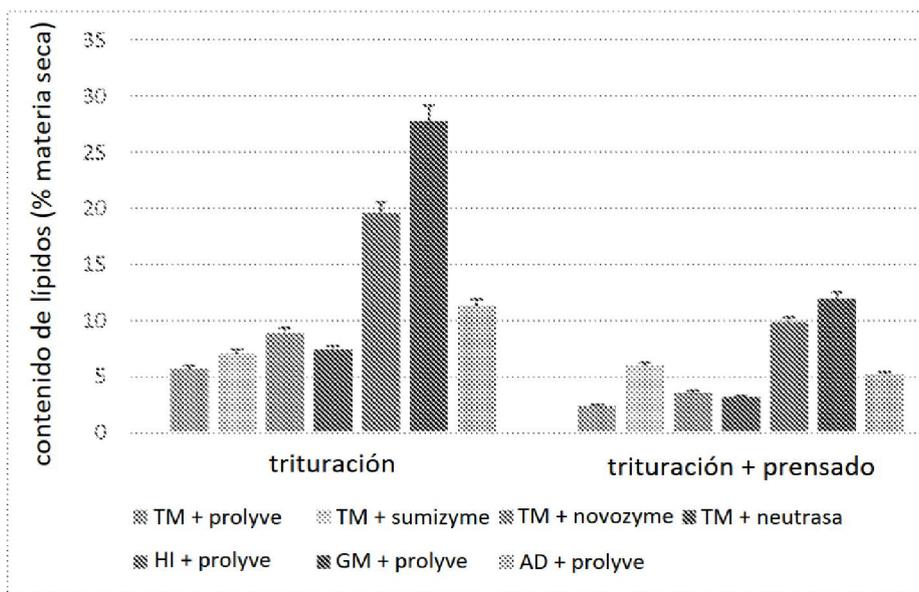


Fig. 27

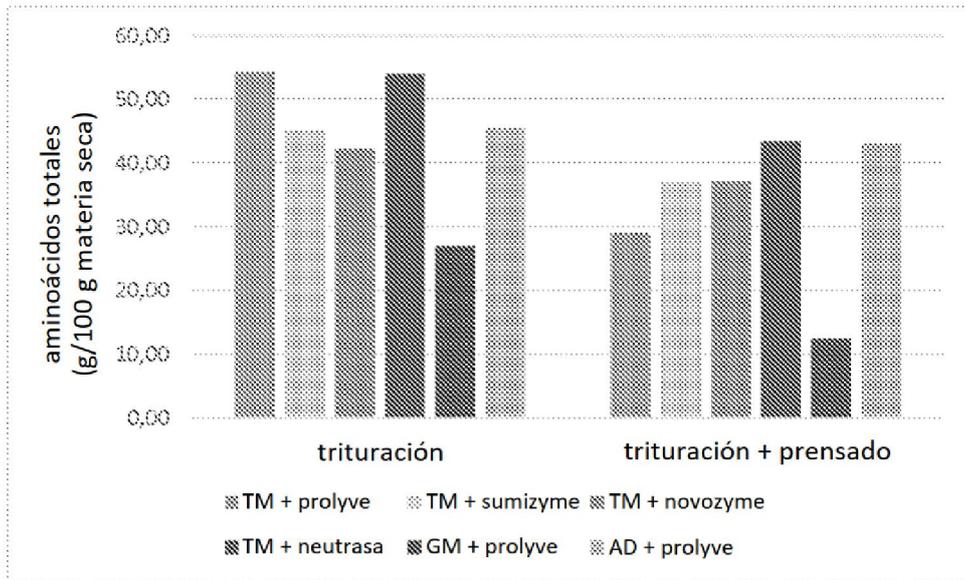


Fig. 28

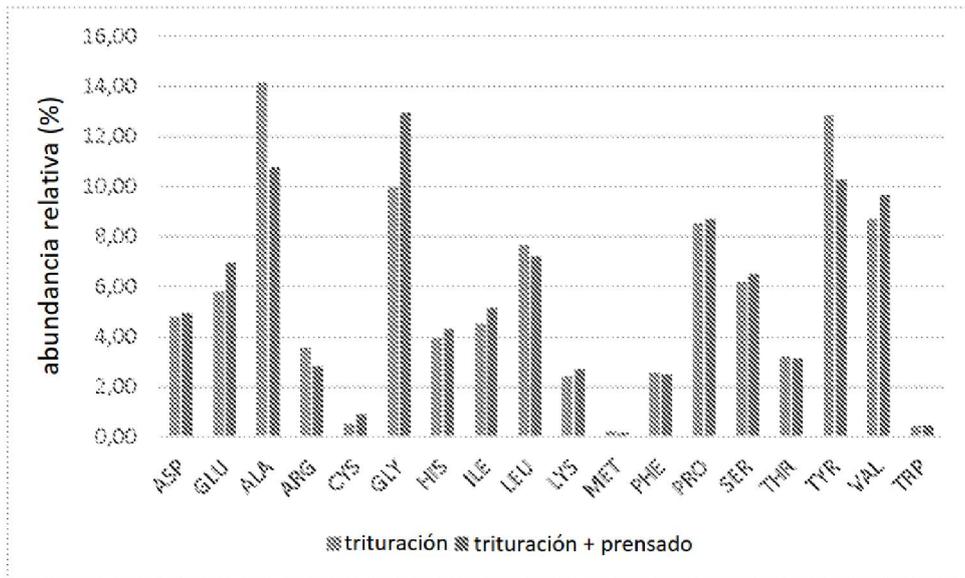


Fig. 29

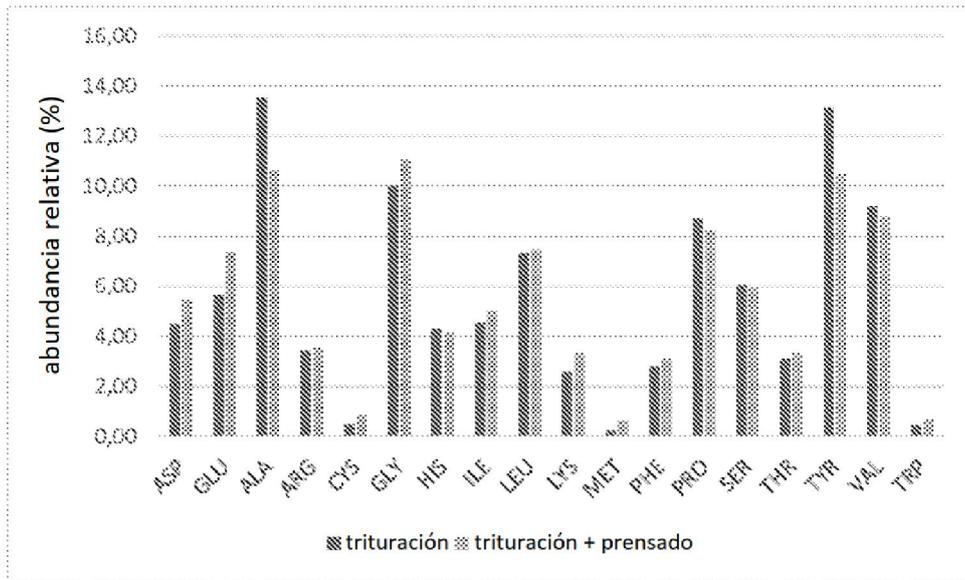


Fig. 30

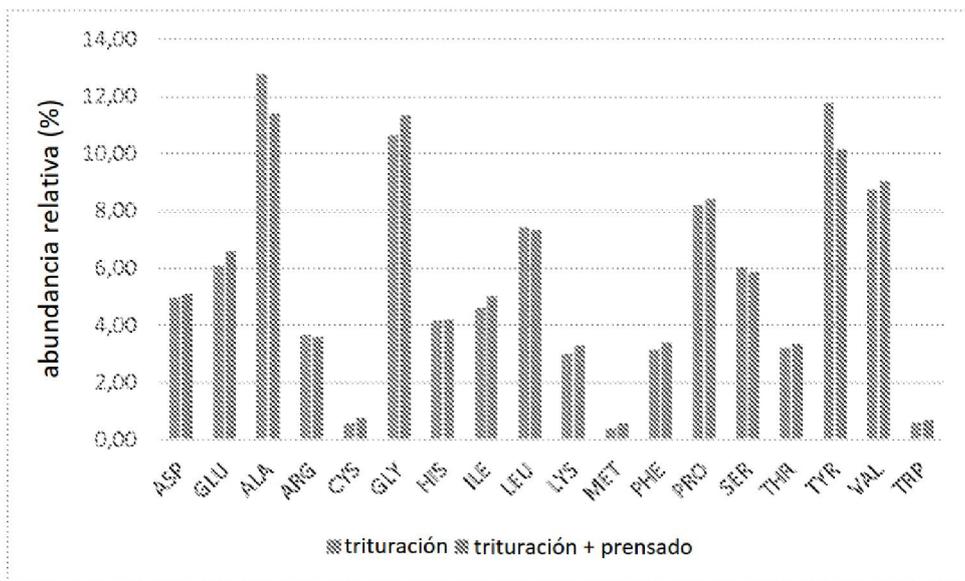


Fig. 31

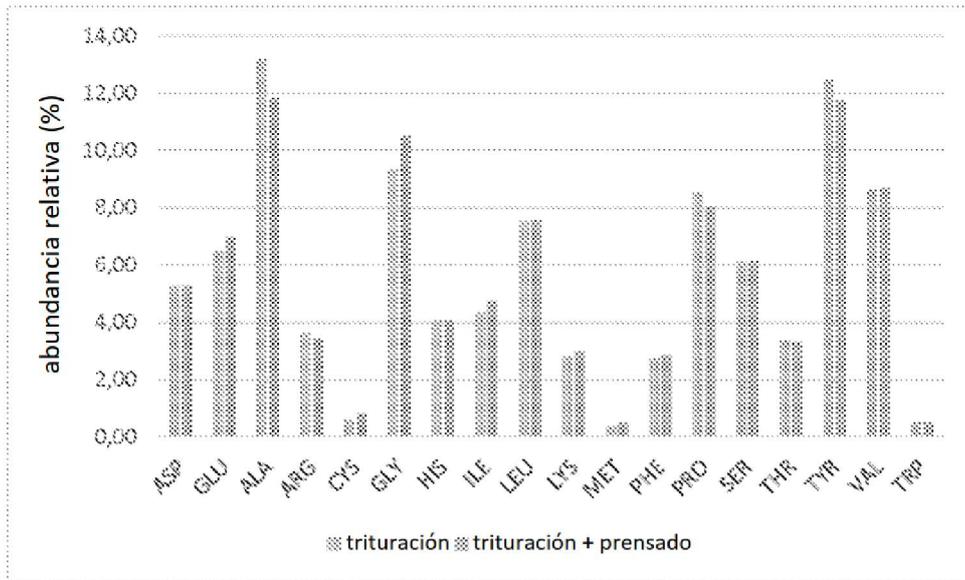


Fig. 32

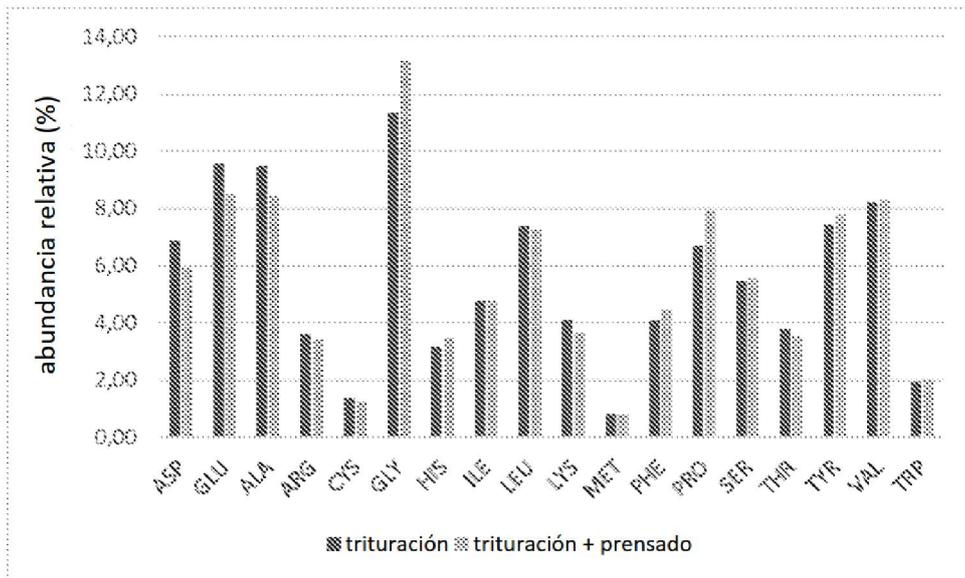


Fig. 33

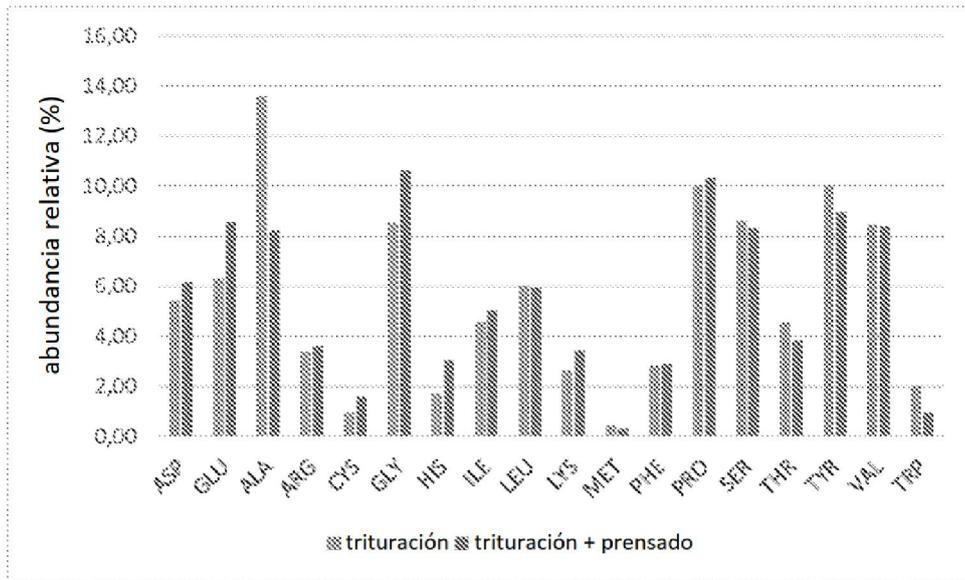


Fig. 34

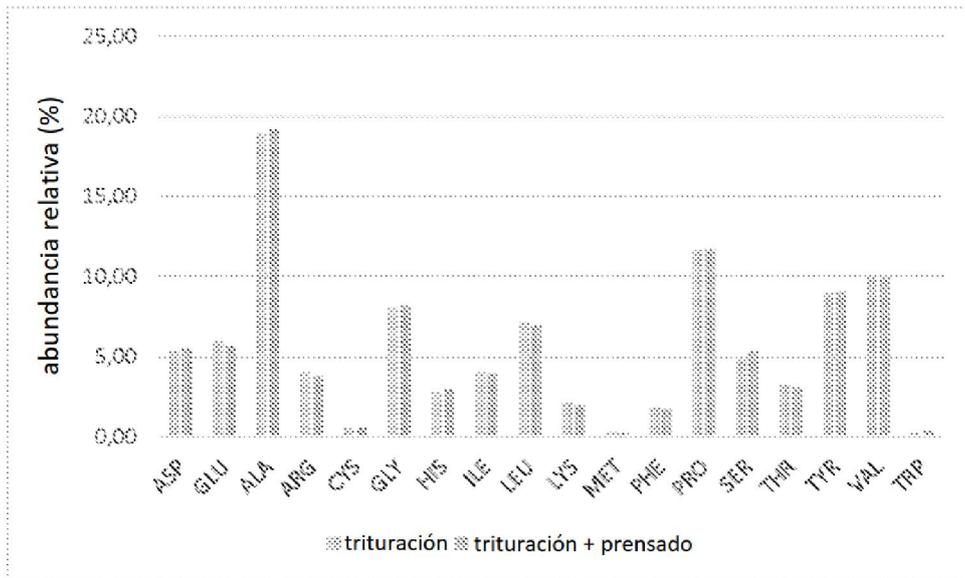


Fig. 35

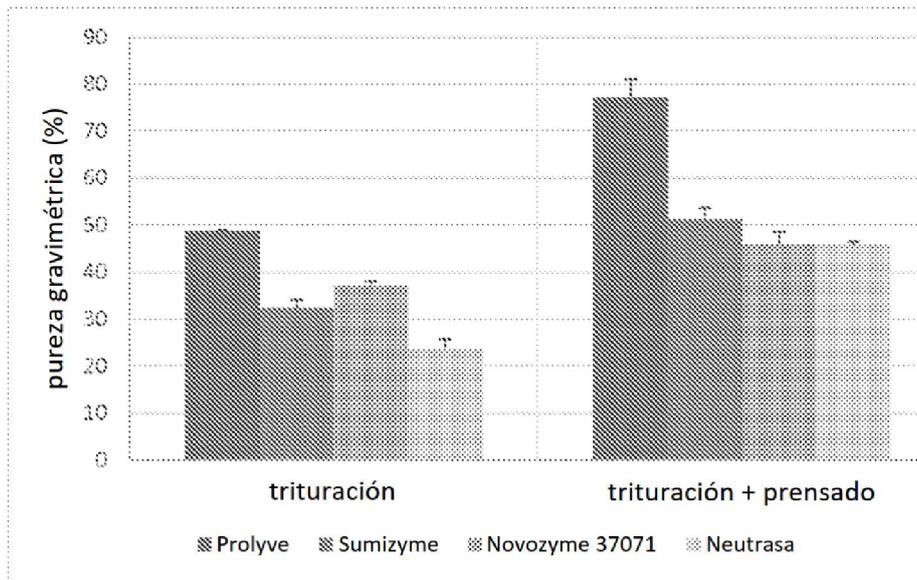


Fig. 36

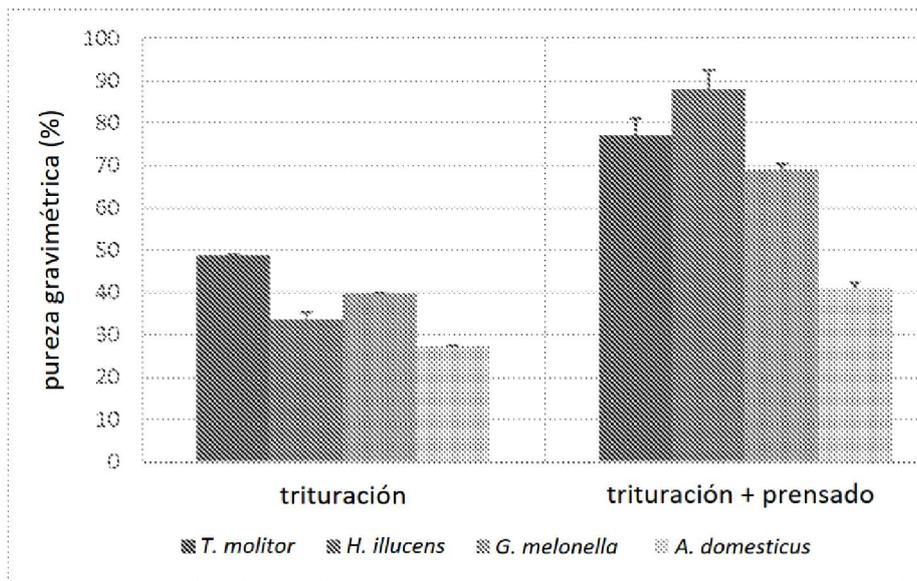


Fig. 37

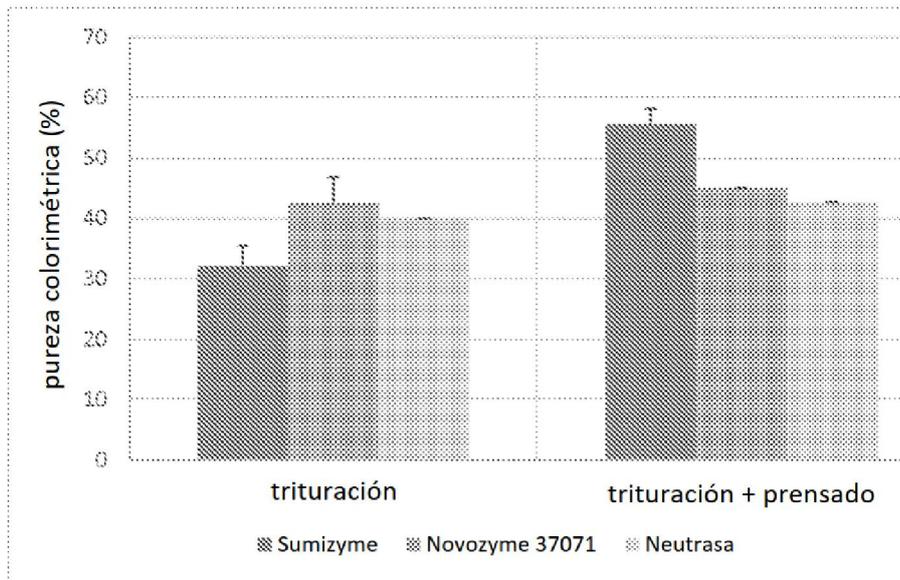


Fig. 38

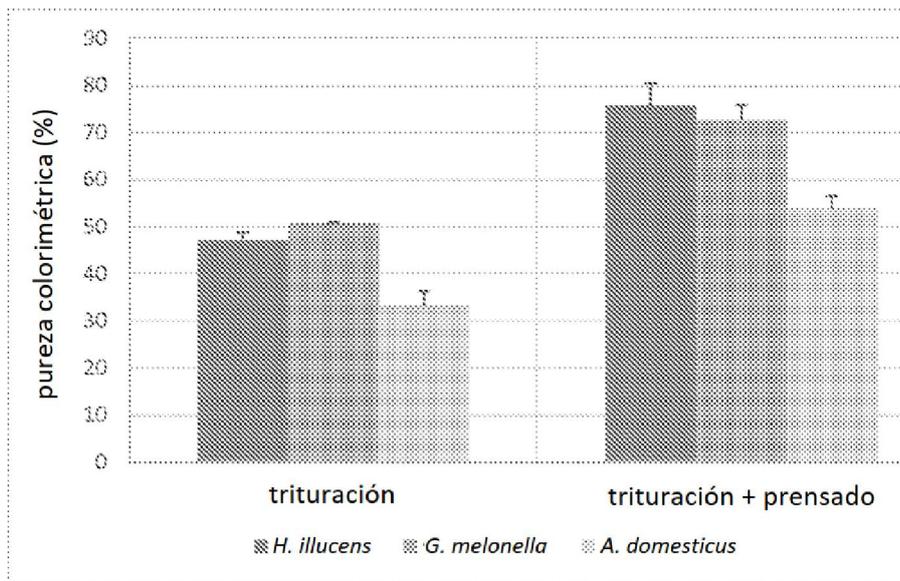


Fig. 39

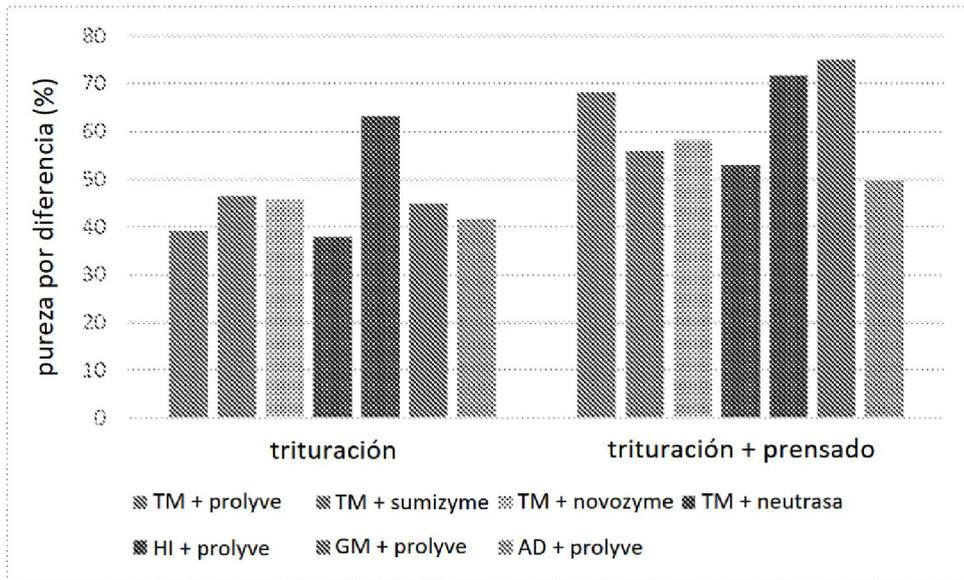


Fig. 40

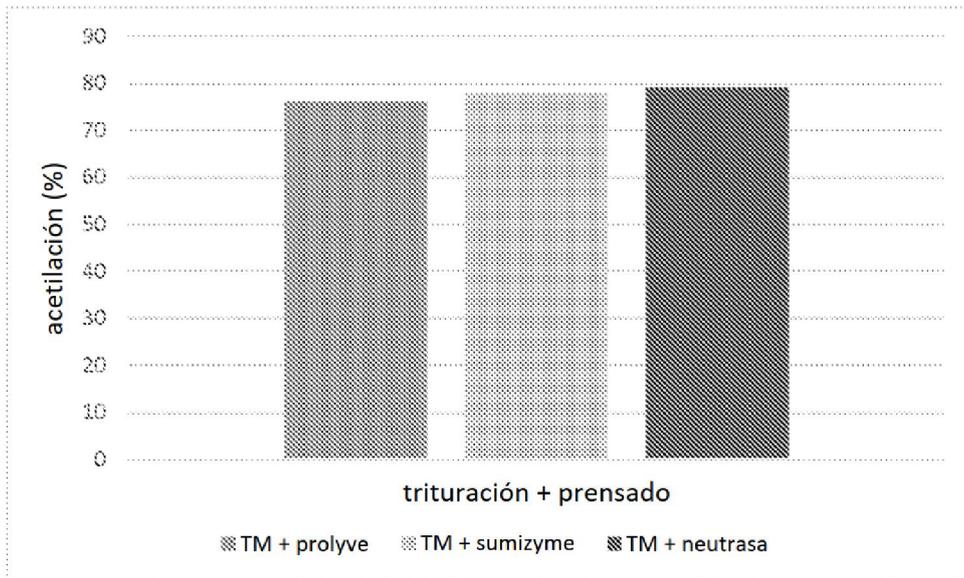


Fig. 41

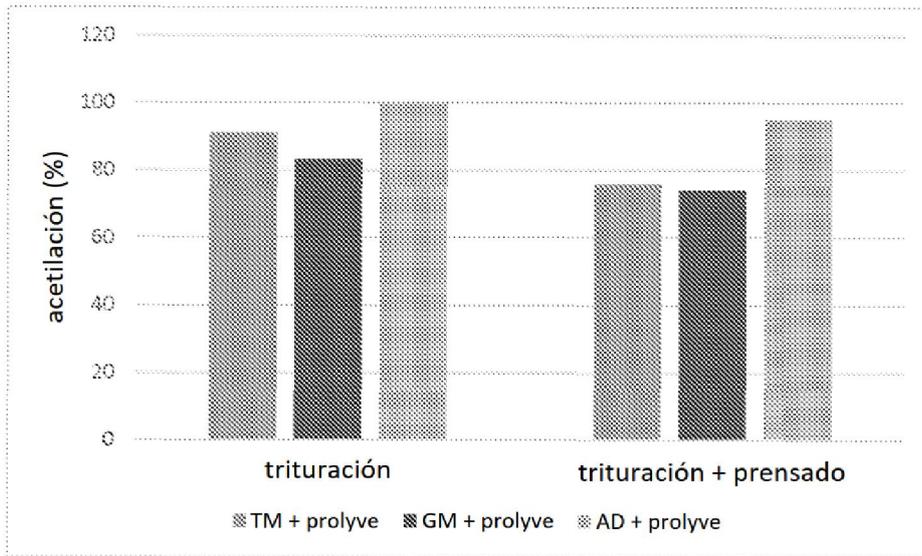


Fig. 42

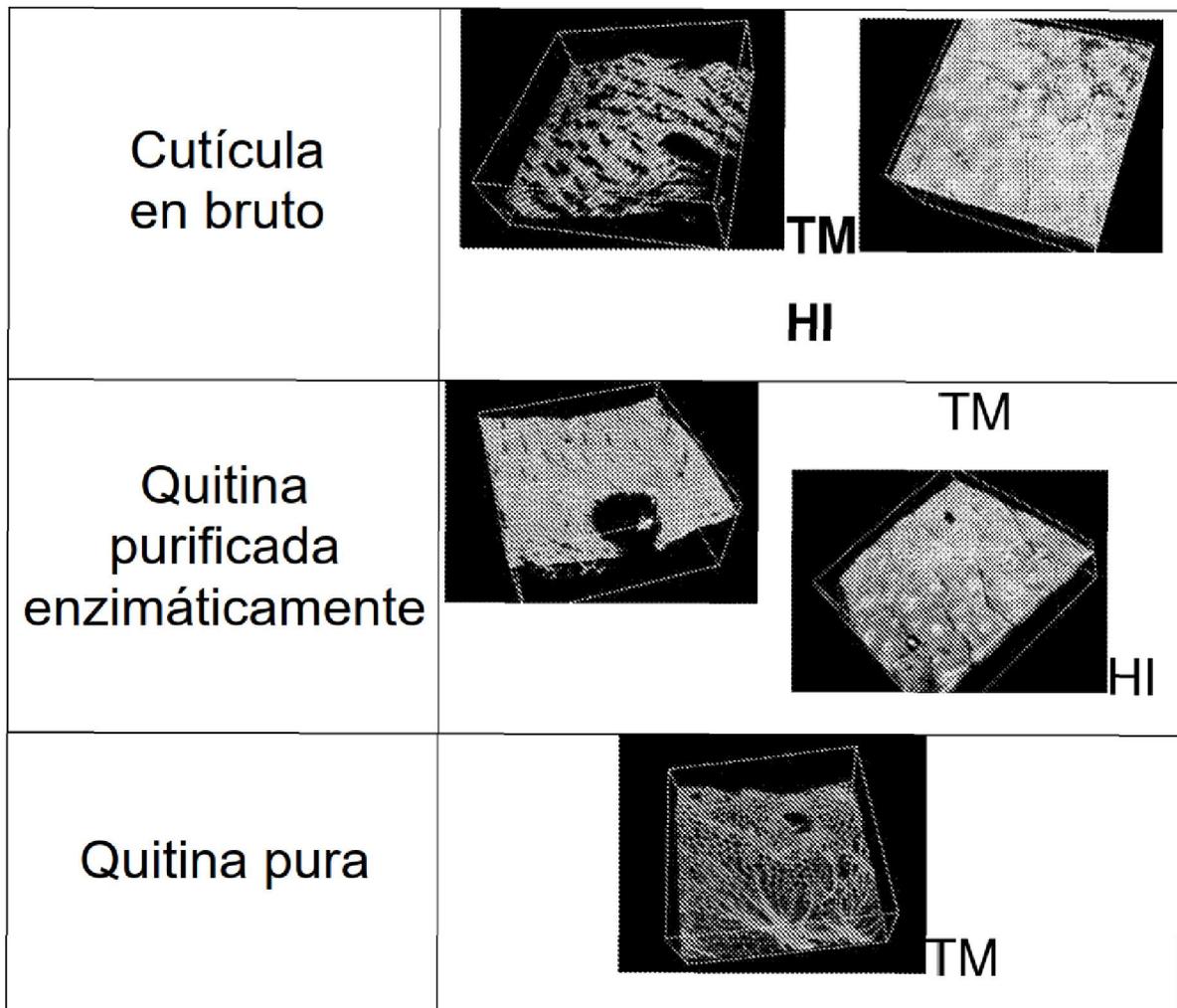


Figura 43

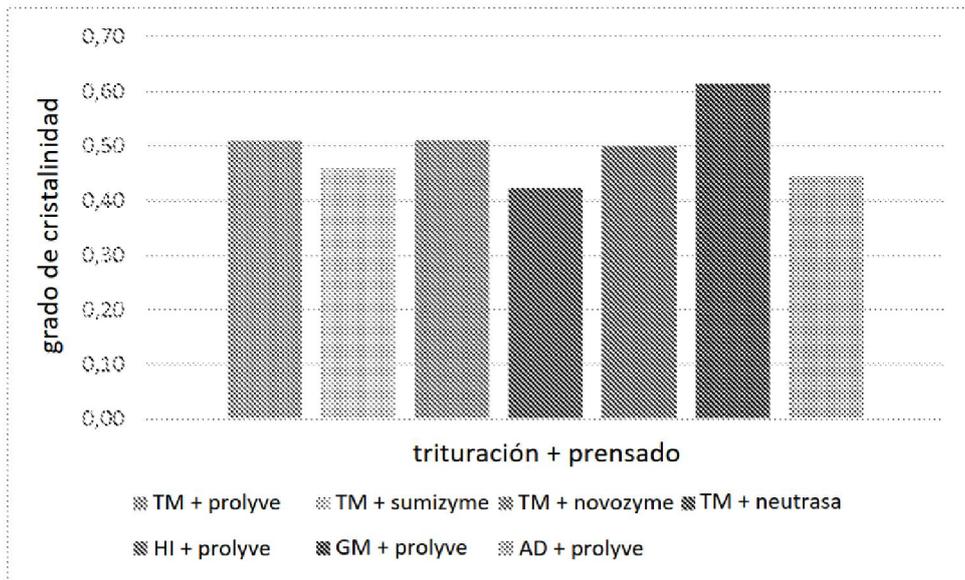


Fig. 44

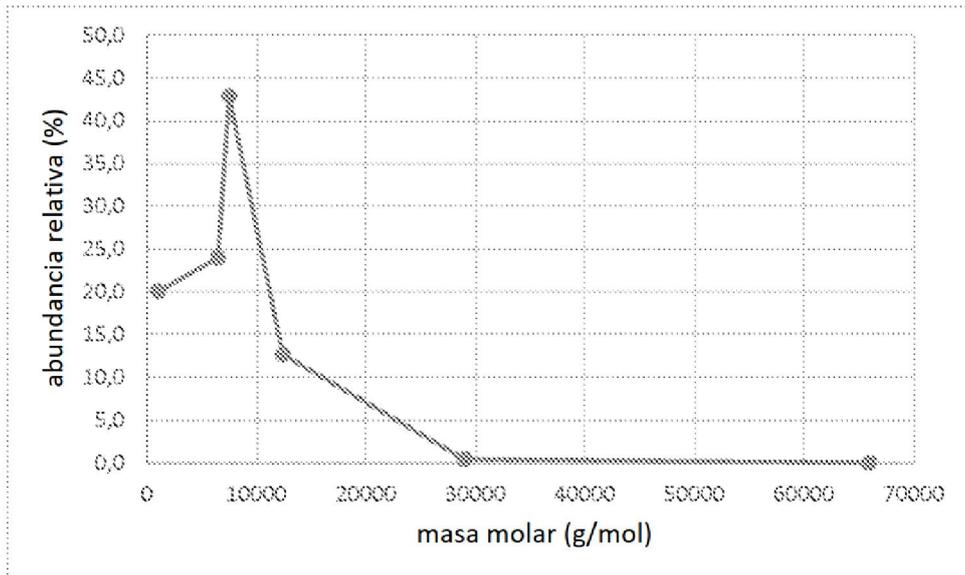


Fig. 45