

DESCRIPTION

Titre : TRAITEMENT ULTRAVIOLET SUR LARVES DE COLEOPTERES TRANSFORMEES POUR L'ENRICHISSEMENT EN VITAMINE D3

5

Domaine technique

La présente invention concerne le domaine de l'industrie alimentaire.

L'objet de la présente invention concerne plus particulièrement la préparation d'une poudre alimentaire à base de coléoptères.

10 Un des objets de la présente invention est d'améliorer l'enrichissement en vitamine D3 d'une poudre issue de larves de coléoptères.

La présente invention trouvera ainsi de nombreuses applications notamment dans l'industrie alimentaire, et notamment pour l'alimentation humaine, l'alimentation de reptiles, l'alimentation animale (PetFood / PetCare / Complément alimentaire) ou encore la pisciculture.

15

Art antérieur

La vitamine D3 a des propriétés importantes pour l'organisme.

Par vitamine D3, on entend ici le cholécalciférol.

20 Chez l'espèce humaine, cette vitamine D3 participe notamment au maintien des niveaux sanguins normaux de calcium et de phosphore absorbés par l'intestin. Elle renforce le système immunitaire et améliore la fonction cognitive.

La vitamine D3 joue aussi un rôle essentiel dans le maintien des muscles squelettiques et des os chez les humains et les animaux de compagnie comme le chien.

25 Elle est par exemple utilisée en complément du calcium pour prévenir l'ostéoporose chez les personnes âgées.

Chez les reptiles, la vitamine D3 permet une assimilation optimale du calcium et la minéralisation des os.

30 On sait aujourd'hui que 50% des adultes en bonne santé souffrent d'un déficit en vitamine D3. Les besoins journaliers en vitamine D3 sont de 15 µg pour les adultes et peut grimper à 20 µg chez les personnes âgées de plus de 70 ans.

Classiquement, les sources alimentaires contenant de la vitamine D3 proviennent essentiellement des poissons à travers notamment les huiles, le filet ou les foies de poisson. Les poissons sont cependant une ressource en déclin, qui devient donc de plus en plus chère.

On peut aussi trouver sous forme de compléments de la vitamine D3 extraite du lichen boréal ou synthétisée à partir de la lanoline.

Les aliments riches en vitamine D3 sont donc présents en quantité réduite ; la demande en vitamine D3 est quant à elle en croissance forte.

- 5 Les acteurs de l'industrie alimentaire concentrent donc beaucoup d'énergie pour trouver des solutions permettant de fabriquer cette vitamine D3 de façon durable et raisonnée.

On connaît dans l'état de la technique le document WO2019229332 A1 appartenant au Demandeur.

- 10 Ce document propose une fabrication de poudre alimentaire riche en vitamine D3 à base de coléoptères.

Dans ce document, il est plus particulièrement proposé un traitement ultraviolet, dit traitement UV, pendant la phase de croissance des larves de type *Tenebrio Molitor* ou *Alphitobius Diaperinus*.

- 15 Un tel traitement UV pendant la phase de croissance des larves permet une synthèse importante de vitamine D3.

- En effet, les résultats obtenus avec la technologie d'enrichissement proposée dans le document WO2019229332 A1 mettent en évidence que, sans traitement UV, les larves contiennent peu ou pas de vitamine D3 (entre 0 et 2 µg / 100 g sur poids sec) tandis qu'avec un traitement UV pendant la phase de croissance des larves on obtient un taux maximal moyen de vitamine D3 dans la larve d'environ 50 µg / 100 g sur poids sec en moyenne. Ces larves vivantes riches en vitamine D3 permettent ensuite après la phase de transformation d'obtenir des poudres de coléoptères ou des larves de coléoptères riches en vitamine D3.

Le Demandeur soumet cependant que, sur le plan industriel, la mise en œuvre de la solution proposée dans le document WO2019229332 A1 reste complexe.

- 25 En effet, d'après l'enseignement technique de ce document, le traitement UV est réalisé directement sur des larves vivantes pendant leur phase de croissance larvaire.

Ceci engendre plusieurs problématiques qui peuvent fortement nuire à la productivité d'un élevage et rendre difficile son industrialisation.

- 30 Le Demandeur soumet en premier lieu qu'un traitement UV sur les larves vivantes peut engendrer un taux de mortalité des larves dix fois supérieure à celui observé sur des larves en absence de traitement UV notamment quand la source lumineuse est placée à une distance inférieure à 25 centimètres des larves vivantes.

Des tests montrent en effet que le taux de mortalité des larves âgées de 12 semaines ayant subi un traitement UV (Lampe 25 W, indice UVB 200) pendant 10 jours à une distance de 25

centimètres de la source lumineuse est de 0.1% alors qu'elle est de 0.01% sans ce traitement lumineux.

Le Demandeur soumet en second lieu que la surface nécessaire pour réaliser ce type de traitement UV est importante.

- 5 Pour obtenir une synthèse de vitamine D3 de 50 µg / 100 g sur poids sec de larves, il faut placer une lampe UVB de 25W (Indice UVB 200) à une distance de 25 centimètres du bac contenant les larves pendant 10 jours. Ces bacs ont une dimension de 56 centimètres x 38 centimètres x 17 centimètres. Cette configuration permet de minimiser le taux de mortalité en maximisant le taux de synthèse de vitamine D3.

- 10 Elle est donc très couteuse en temps mais également en surface puisque, dans les conditions décrites ci-dessus, une structure de 125 centimètres x 200 centimètres x 30 centimètres permet de produire seulement 10.5 kilogrammes de larves vivantes (soit 3.75 kilogrammes de poudres) tous les 10 jours.

- Le Demandeur soumet donc que les solutions de l'état de la technique ne sont jusqu'à présent pas pleinement satisfaisantes pour une industrialisation dans la fabrication d'une poudre de coléoptères alimentaire riche en vitamine D3.
- 15

Résumé et objet de la présente invention

La présente invention vise à améliorer la situation décrite ci-dessus.

- 20 La présente invention vise plus particulièrement à remédier aux différents inconvénients mentionnés ci-dessus en proposant une solution efficace et facile à mettre en œuvre sur le plan industriel pour augmenter significativement le taux de vitamine D3 dans une poudre de coléoptères.

- L'objet de la présente invention concerne selon un premier aspect un procédé de préparation d'une poudre de coléoptères enrichie en vitamine D3 comprenant une étape de traitement lumineux au cours de laquelle au moins une source lumineuse émet des rayons ultraviolets en direction de larves de coléoptères transformées.
- 25

Le fait de réaliser le traitement lumineux, dit traitement UV, après transformation améliore de façon surprenante le taux de vitamine D3 et facilite grandement l'industrialisation du process.

- 30 L'application du traitement UV après transformation des coléoptères permet d'augmenter jusqu'à dix fois le taux de vitamine D3 dans une poudre de coléoptères en diminuant par deux et demi la surface nécessaire.

Ici, par larves transformées, on entend les larves de coléoptères qui ont subi au minimum un procédé d'abattage.

Avantageusement, le procédé selon la présente invention comprend, préalablement à l'étape de traitement lumineux, une étape de transformation des larves de coléoptères comprenant un abattage desdites larves.

De préférence, l'étape de transformation est réalisée sur des coléoptères en phase larvaire.

- 5 Selon une première variante, cet abattage est réalisé par un traitement thermique froid.

Par traitement thermique froid, on entend par exemple une exposition des larves de coléoptères à des températures inférieures à 4°C pendant une durée supérieure à 10 minutes.

Selon une deuxième variante, cette étape de transformation est réalisée par un traitement thermique chaud.

- 10 Par traitement thermique chaud, on entend par exemple une exposition des larves de coléoptères à des températures supérieures à 40 °C pendant une durée supérieure à 15 secondes dans de l'eau (ébullition) ou supérieure à 30 minutes à l'air chauffé.

Dans un mode de réalisation particulier, on peut prévoir que, lors de l'étape d'abattage, les larves sont positionnées dans une eau présentant une température comprise entre 50 et 120°C,

- 15 préférentiellement entre 85°C et 110°C, encore préférentiellement entre 90°C et 100°C.

On parle aussi d'un ébullition.

Une telle technique d'abattage par ébullition s'avère efficace et permet de conserver les propriétés nutritionnelles des coléoptères et de réduire la charge bactérienne des larves.

De préférence, cet ébullition est réalisé pendant une durée d'ébullition comprise entre

- 20 30 secondes et 10 minutes, préférentiellement entre 1 et 5 minutes.

Selon une troisième variante, l'étape d'abattage peut également se faire par une exposition des larves de coléoptères à des micro-ondes par exemple pendant au moins 10 secondes.

Avantageusement, la phase de transformation comprend après abattage une étape de déshydratation (ou de cuisson) visant à obtenir un taux d'activité de l'eau (AW, Activity of

- 25 Water) de la poudre < 0.7.

Pour cette déshydratation, on peut prévoir un traitement micro-onde.

Par traitement micro-onde, on entend l'exposition des larves de coléoptères à des micro-ondes par exemple pendant au moins 10 secondes.

Pour cette déshydratation, on peut aussi prévoir de façon alternative ou complémentaire un

- 30 traitement thermique des larves abattues.

Lors de ce traitement thermique des larves pour la déshydratation, les larves abattues sont donc placées dans un environnement compris entre 40 et 250 °C, préférentiellement entre 50 et 150°C, et ce de préférence pour une durée de traitement comprise entre 1 heure et 24 heures, de manière à ce que les larves abattues présentent :

- entre 2 et 15% d'eau, plus préférentiellement entre 3 et 8% d'eau, et/ou
- une activité de l'eau inférieure (AW) à 0.7.

De préférence, pendant le traitement thermique, les larves transformées sont disposées sur une épaisseur comprise entre 1 et 100 millimètres, préférentiellement entre 5 et 15 millimètres.

- 5 Optionnellement, les larves transformées peuvent subir un broyage et/ou un pressage.

De préférence, l'étape de transformation comprend, après abattage, un broyage des larves pour obtenir une poudre de coléoptères.

- On notera ici que le broyage des larves après déshydratation permet d'améliorer les performances de synthèse en vitamine D3 après traitement UV. Cette étape après
- 10 déshydratation reste toutefois optionnelle.

On obtient après déshydratation et broyage une poudre de coléoptères.

Par poudre de coléoptères, on entend une poudre sèche ($AW < 0.7$) constituée par exemple :

- soit de larves entières de *Tenebrio Molitor* ayant subi un procédé thermique de séchage et un broyage ;
- 15 - soit de larves entières d'*Alphitobius Diaperinus* ayant subi un procédé thermique de séchage et un broyage ;
- soit d'un mélange de larves de ces deux espèces ayant subi un procédé thermique de séchage et un broyage ;
- soit d'une fraction de larves entières de *Tenebrio Molitor* ayant subi au préalable un
- 20 procédé de pressage puis un procédé thermique de séchage et un broyage ;
- soit d'une fraction de larves entières d'*Alphitobius Diaperinus* ayant subi au préalable un procédé de pressage puis un procédé thermique de séchage et un broyage ;
- soit d'un mélange de fraction de larves de ces deux espèces ayant subi au préalable un procédé de pressage puis un procédé thermique de séchage et un broyage.

- 25 Dans un mode de réalisation particulier, l'étape de transformation comprend un premier tamisage des larves pour éliminer les résidus comme les excréments ou les restes éventuelles de nourriture.

Un tel tamisage reste toutefois optionnel. Il a pour simple objectif de nettoyer les larves avant abattage.

- 30 De préférence, l'étape de transformation comprend un jeun pendant 24 à 48 heures. Un tel jeun évite l'apparition de nouveaux excréments. Un tel jeun reste donc optionnel à mettre en œuvre dans le cadre de la présente invention.

Optionnellement, l'étape de jeun est suivie d'un deuxième tamisage.

Avantageusement, l'étape de transformation comprend préalablement à l'abattage un étourdissement au froid entre -18°C et + 4°C.

De préférence, l'étape d'étourdissement au froid est mise en œuvre pendant une durée d'étourdissement comprise entre 1 et 5 minutes.

5 Avantageusement, les rayons ultraviolets émis par l'au moins une source lumineuse en direction des larves transformées de coléoptère lors de l'étape de traitement lumineux sont :

- du type UVB et consistent en des rayonnements électromagnétiques dont la longueur d'onde est comprise entre 280 nm et 320 nm, et/ou ;
- du type UVA et consistent en des rayonnements électromagnétiques dont la longueur

10 d'onde est comprise entre 320 nm et 400 nm.

De préférence, il est envisagé, lors de l'étape de traitement lumineux, que l'au moins une source lumineuse est positionnée à une distance déterminée des larves de coléoptères comprise entre de l'ordre de 1 à 100 centimètres de préférence comprise entre de l'ordre de 5 à 20 centimètres. L'intensité des sources lumineuses UV décroît au fur et à mesure que l'on s'écarte de celle-ci.

15 La quantité de vitamine D3 synthétisée est dépendante de la quantité d'UVB reçu par unité de temps.

Avantageusement, l'au moins une source lumineuse présente une puissance de rayonnement comprise entre 13 et 125 Watts, de préférence entre 20 et 50 Watts.

20 Avantageusement, il est envisagé que, pendant l'étape de traitement lumineux, l'au moins une source lumineuse émet les rayons ultraviolets en direction des larves de coléoptère transformées selon des plages de traitement comprises entre 10 minutes et 24 heures en continue ou en cumulée sur une période de 24 heures.

Avantageusement, il est envisagé que, pendant toute ou partie de l'étape de traitement lumineux, les larves de coléoptères transformées sont maintenues dans un environnement

25 présentant une température sensiblement constante comprise entre 20 et 30°C, de préférence entre 26 et 28°C.

La synthèse de vitamine D3 est optimisée en présence de température supérieure à 20 °C.

L'objet de la présente invention concerne selon un deuxième aspect une poudre de coléoptères

30 obtenue par la mise en œuvre du procédé de préparation tel que décrit ci-dessus.

Une telle poudre de coléoptères obtenue par le procédé ci-dessus présente une concentration en vitamine D3 qui est quatre à dix fois supérieure à la concentration en vitamine D3 obtenue avec la méthode décrite dans le document WO2019229332 A1

L'objet de la présente invention concerne selon un troisième aspect une utilisation d'une poudre de coléoptères telle que décrite ci-dessus pour l'alimentation humaine ou animale.
De préférence, la poudre est utilisée en tant qu'ingrédient ou complément alimentaire.
D'autres utilisations avantageuses pourront être envisagées comme par exemple l'alimentation
5 des reptiles ou celle des poissons.

Figures

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention ressortiront de la description ci-dessous, en référence aux figures 1 et 2 annexées qui en illustrent un exemple de réalisation
10 dépourvu de tout caractère limitatif et sur lesquelles :

[Fig.1]

La figure 1 est un graphe représentant la concentration en vitamine D3 de plusieurs échantillons de larves de coléoptères ayant subi un traitement lumineux UV d'une durée d'exposition de huit heures ; et

15 [Fig.2]

La figure 2 est un graphe représentant l'évolution de la concentration en vitamine D3 de plusieurs échantillons de larves de coléoptères ayant subi un traitement lumineux UV en fonction du temps.

20 Description détaillée

Un exemple de réalisation d'une préparation d'une poudre de coléoptères riche en vitamine D3 va maintenant être décrit dans ce qui va suivre en référence conjointement aux figures 1 et 2.

Pour mémoire, la préparation de poudre qui va être décrite ici vise à mettre au point une technique pour augmenter significativement le taux de vitamine D3 dans les poudres à base de
25 coléoptères de type *Tenebrio Molitor* et/ou *Alphitobius Diaperinus*.

Contrairement aux techniques prévoyant un traitement UV sur des coléoptères vivants, le concept sous-jacent à la présente invention est de réaliser un tel traitement UV après transformation.

Ici, on entend par larves transformées les larves de coléoptères ayant subi au minimum un
30 abattage.

Le Demandeur soumet que rien dans l'art antérieur ni même dans les connaissances générales de l'homme du métier ne permettait d'envisager qu'il était possible d'améliorer la synthèse de vitamine D3 en appliquant un traitement UV sur des coléoptères transformés.

Dans l'exemple décrit ici et utilisé ici dans les différentes expérimentations, on utilise des larves sélectionnées parmi les espèces suivantes : *Tenebrio Molitor* et/ou *Alphitobius Diaperinus*.

L'utilisation d'autres espèces peut également être envisagée.

- On notera ici que la phase de croissance des larves n'est pas décrite dans ce présent document
- 5 car l'invention porte principalement sur la transformation et le traitement UV, les phases préalables à l'élevage ne font pas partie de la présente invention.

Phase de transformation :

- 10 Dans une mise en œuvre particulière de la présente invention, la phase de transformation est réalisée de la manière suivante.

Entre la 6^{ème} et la 14^{ème} semaine de croissance, plus préférentiellement entre la 10^{ème} et la 13^{ème} semaine de croissance, les larves sont tamisées pour éliminer les excréments.

Les larves tamisées sont ensuite placées dans un bac plastique pour un jeun de 24 à 48 heures.

- 15 Après le jeun, les larves sont de nouveau tamisées pour enlever les excréments.

Les larves sont placées dans de l'eau entre 85°C et 100°C pour l'abattage pendant 1 à 4 minutes.

On parle d'abattage thermique chaud.

Lors de cette transformation, on prévoit en outre, juste avant l'abattage, une étape d'étourdissement au froid entre -18°C et + 4°C pendant plusieurs minutes.

- 20 Après l'abattage, les larves subissent un traitement thermique à une température comprise entre 50 et 150°C pour une durée comprise entre 1 heure et 24 heures en fonction de la température utilisée.

Les larves obtenues contiennent entre 2 et 15% d'eau, plus préférentiellement entre 3 et 8% d'eau et une activité de l'eau inférieure à 0.9, plus préférentiellement inférieur à 0.7.

- 25 Une phase de broyage peut être réalisée. Le terme poudre regroupe ici toute réduction en élément inférieur à 3 millimètres des insectes entiers ayant subi un traitement thermique au préalable dans leur stade larvaire ou nymphal ou seulement d'une partie morphologique de ces insectes.

On comprend ici qu'il s'agit d'une description d'un mode de réalisation particulier de cette

- 30 phase de transformation.

Une telle mise en œuvre permet d'obtenir des résultats performants. On comprendra toutefois ici que l'homme du métier peut envisager d'autres mises en œuvre pour transformer les larves de coléoptères.

On notera également ici que les fabricants de poudre ne mettront pas nécessairement en œuvre cette phase d'abattage et qu'ils pourront se fournir chez un fournisseur, éleveur de coléoptères, qui leur livrera des larves de coléoptères déjà transformées (ou abattues). Dans ce cas, le fabricant de poudre procédera directement à la phase d'enrichissement (ou traitement UV) pour enrichir la poudre en vitamine D3.

Phase de traitement UV :

Les larves déshydratées et broyées en poudre ou les larves entières déshydratées non broyées subissent après la fin du traitement thermique le traitement UV en tant que tel.

Dans cet exemple, cette phase de traitement UV se fait dans une salle spécifique.

Dans l'exemple de réalisation de la présente invention, on préfère maintenir cette salle dans des conditions ambiantes permettent de maintenir les coléoptères transformés dans un environnement présentant :

- une température sensiblement constante comprise entre 20 et 30°C, de préférence entre 26 et 28°C ; et
- une hygrométrie sensiblement constante comprise entre 30 et 70 % d'humidité relative, de préférence entre 30 et 40 %.

Cette gestion contrôlée des paramètres ambiants (température et hygrométrie) permet d'obtenir un meilleur rendement dans la synthèse de la vitamine D3.

L'homme du métier pourrait toutefois envisager d'autres conditions ambiantes similaires.

Dans cet exemple, la phase de traitement UV dure entre 1 et 10 jours et a une durée de 10 minutes et 24 heures par jour en continue ou en cumulée sur une période de 24 heures.

Dans l'exemple décrit ici, on cherche donc à enrichir en vitamine D3 des larves de coléoptères transformées par un traitement UV. Un tel traitement UV met en œuvre au moins une source lumineuse de type source d'ultraviolets (ou source UV) qui émet des rayons ultraviolets en direction de larves transformées de coléoptères.

De préférence, la source UV est maintenue en position au-dessus de la poudre de coléoptères ou des coléoptères entiers.

Dans cet exemple, les rayons ultraviolets émis par la source UV en direction des larves de coléoptères sont :

- du type UVB et consistent en des rayonnements électromagnétiques dont la longueur d'onde est comprise entre 280 nm et 320 nm, et/ou

- du type UVA et consistent en des rayonnements électromagnétiques dont la longueur d'onde est comprise entre 320 nm et 400 nm.

On notera ici que l'émission de lumière dans le visible n'a aucune incidence sur la synthèse de la vitamine D3.

- 5 Dans l'exemple décrit ici, la source UV est positionnée, pendant la phase de traitement lumineux, à une distance déterminée des larves de coléoptères comprise de l'ordre 2 à 100 cm, de préférence entre 10 et 15 cm.

Dans cet exemple, la source UV présente une puissance de rayonnement comprise entre 13 et 125 Watts, de préférence entre 20 et 50 Watts.

- 10 Optionnellement, après cette phase UV, un second traitement thermique compris entre 40 et 200°C, préférentiellement entre 60 et 100 °C durant 1 heure à 24 heures peut être réalisé.

Augmenter l'enrichissement des larves transformées jusqu'à dix fois

- 15 Des premiers résultats obtenus dans le cadre des différentes études et tests réalisés sont particulièrement intéressants :

Résultats : Document WO2019229332 A1	Résultats : Invention	
Concentration en vitamine D3 après traitement UV sur des larves vivantes pendant 5 jours. ¹	Concentration en vitamine D3 après traitement UV sur des larves transformées non réduites en poudre pendant 5 jours. ¹	Concentration en vitamine D3 après traitement UV sur des larves transformées réduites en poudre pendant 5 jours. ¹
24 µg / 100 g sur poids sec	97 µg / 100 g sur poids sec	204 µg / 100 g sur poids sec

- ¹ Les larves vivantes et les larves transformées sont situées à 25 cm de la source lumineuse et placées dans des bacs de dimensions 57 centimètres x 38 centimètres x 17 centimètres. L'épaisseur des larves vivantes et transformées sont de 1 cm maximum.

- Ces résultats sont confirmés et amplifiés par d'autres séries de tests qui seront détaillés dans la suite de la description. Ces tests et analyses supplémentaires (Figure 1 & 2) sur la concentration en vitamine D3 montrent que la présente invention permet d'augmenter jusqu'à dix fois la synthèse de vitamine D3 par rapport à la méthode décrite dans le document WO2019229332 A1.

Augmenter la production par 2.5 par unité de surface

La présente invention permet également d'augmenter la production de larves transformées par unité de surface.

- 5 Pour mémoire : dans le document WO2019229332 A1, les sources lumineuses pour le traitement UV sur les larves vivantes sont de préférence positionnées au-dessus des bacs contenant les larves à une distance optimale comprise entre 25 et 35 centimètres pour éviter un taux trop important de mortalité lié notamment à la chaleur trop importante.

Grace à la présente invention, la source lumineuse peut être placée entre 10 et 15 centimètres
10 sans aucun impact sur la mortalité.

- Dans le document WO2019229332 A1, une structure de dimensions 125 centimètres x 200 centimètres x 30 centimètres accueillant les sources lumineuses et les bacs contenant les larves vivantes sur une période de 5 jours permettent de produire 10,5 kg de larves vivantes, soit 3.75 kilogrammes de poudres de larves, contenant 24 μg / 100 g de vitamine D3 sur poids sec. Avec
15 la présente invention, la même structure sur une période équivalente permet de produire 9.5 kg de poudres de larves contenant, en fonction de la durée d'exposition, entre 50 et 500 μg / 100 g de vitamine D3 sur poids sec, soit 2.5 fois plus. Ceci est possible par la réduction de la distance entre les sources lumineuses et les larves transformées mais également par le fait qu'il est possible de travailler directement sur des larves transformées ayant subi un traitement
20 thermique au préalable. Ces dites larves ne perdront plus de poids contrairement aux larves vivantes qui doivent subir une cuisson ou déshydratation et qui vont perdre 65% de leur masse totale par l'évaporation de l'eau.

Diminuer par 100 le temps du traitement lumineux

- 25 Selon la technique proposée dans le document WO2019229332 A1, il fallait 10 jours de traitement lumineux pour atteindre 50 μg / 100 g de vitamine sur poids sec dans la larve.

Avec la présente invention, dans les conditions optimales, une concentration de 50 μg / 100 g sur poids sec est obtenue en 1 à 2 heures de traitement UV.

- 30 Ces résultats sont mis en évidence dans la deuxième série de tests détaillée ci-après.
Les analyses de quantification de la vitamine D3 ont été réalisées par un laboratoire indépendant certifié Cofrac. La quantification est réalisée par HPLC semi-préparative suivie d'une HPLC en phase inverse avec détecteur UV/DAD (265 nm).

D'autres tests ont également été menés pour mettre en évidence les effets avantageux du traitement UV post-transformation des larves.

- *Première série de tests :*

5

Lors de cette première série de tests, on dispose de plusieurs échantillons S1, S2, S3 et S4 de larves de type *Tenebrio Molitor*. Chaque échantillon présente des différences (larves fraîches, vivantes, etc.).

Ces analyses ont été réalisées par un laboratoire indépendant certifié Cofrac selon la norme EN
10 12821 : 2009-08.

Lors de ces tests, on applique un traitement UV sur chacun de ces échantillons S1, S2, S3 et S4 et on mesure leur concentration en vitamine D3.

Les résultats et analyses de ces tests sur les échantillons S1 à S4 sont illustrés en figure 1 ; cette figure 1 représente plus particulièrement la concentration en vitamine D3 pour chacun des
15 échantillons S1, S2, S3 et S4 après 8 heures d'exposition.

Le premier test (échantillon S1) porte sur un traitement UV sur des larves de *Tenebrio Molitor* vivantes.

On prévoit dans ce premier test un traitement UV sur ces larves vivantes comme proposé dans
20 le document WO2019229332 A1. L'unique différence est qu'ici, on quantifie la concentration de vitamine D3 directement sur des larves fraîches congelés au préalable.

Dans ce premier exemple, la distance de la lampe UV au-dessus des larves vivantes est de 20 cm avec les caractéristiques suivantes de l'ampoule : 25W ; 10% UVB, Exo Terra ; irradiance moyenne : 74.1 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$; Température moyenne : 31.8°C.

25 D'après la figure 1, cette concentration est de 3600 UI/kg sur poids frais, soit environ 10260 UI/kg sur poids sec ; cette conversion en concentration sur larves sèches ayant été obtenue en multipliant la concentration sur larves fraîches par 2.85 (les larves de *Tenebrio Molitor* contiennent en moyenne 65 % d'eau).

Ici, UI est une unité internationale : 1 UI = 0,025 μg de vitamine D3.

30

Le deuxième test (échantillon S2) porte également sur un traitement UV sur des larves vivantes. Dans ce deuxième test, on prévoit donc un traitement UV sur ces larves.

Ici, la distance de la lampe au-dessus de l'échantillon de larves S2 est de 20 cm avec les caractéristiques suivantes de l'ampoule : 25W, 10% UVB, Exo Terra ; irradiance moyenne : 75 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$; température moyenne : 29,44 °C.

On transforme ensuite ces larves fraîches selon la technique proposé dans le document
5 WO2019229332 A1 pour obtenir une poudre de larves sèches enrichies en vitamine D3 par un traitement UV pendant la phase larvaire.

On mesure ici la concentration de vitamine D3 sur les larves sèches déshydratées.

D'après la figure 1, la concentration de vitamine D3 pour cet échantillon S2 est de 7200 UI/kg sur poids sec.

10

Un autre test (échantillon S3) porte sur un traitement UV sur des larves transformées (mortes), et plus particulièrement des larves sèches non broyées.

On comprend dans ce test que les larves ont été préalablement abattues et qu'on applique ensuite un traitement UV tel que proposé selon la présente invention.

15 Ce test correspond donc à un exemple de mise en œuvre particulier de la présente invention.

On notera que, dans cet exemple, l'abattage est réalisé par un trempage dans un bain d'eau à 100°C pendant 2 minutes. D'autres techniques pourraient cependant être envisagées par l'homme du métier.

Dans cet exemple, les larves transformées ont été déshydratées à 65°C pendant 14 heures.

20 Les larves transformées (mais non broyées) sont ensuite positionnées sous une lampe positionnée à une distance au-dessus des larves sèches non broyées de 20 cm ; la lampe utilisée présente les caractéristiques suivantes de l'ampoule : 25W, 10% UVB, Exo Terra ; irradiance moyenne : 75 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$; température moyenne : 30 °C.

D'après la figure 1, la concentration de vitamine D3 pour cet échantillon S3 atteint cette fois
25 36 000 UI/kg sur poids sec, soit ici cinq fois plus que la concentration de vitamine D3 pour des larves vivantes (échantillons S2 et S1).

Le quatrième test (échantillon S4) porte quant à lui sur un traitement UV sur des larves transformées, et plus particulièrement un échantillon de larves sèches broyées.

30 Dans cet exemple, on comprend que des larves de *Tenebrio Molitor* ont subies le même procédé d'abattage que les larves de l'échantillon S3.

Après abattage, celles-ci ont en plus été broyées.

Dans cet exemple, on applique donc sur cet échantillon S4 un traitement UV comme le propose l'invention, après abattage.

On utilise ici le même dispositif que celui ci-dessus, à savoir une lampe UV positionnée à une distance au-dessus des larves sèches broyées de 20 cm avec les caractéristiques suivantes de l'ampoule : 25W, 10% UVB, Exo Terra. Irradiance moyenne : 75 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$. Température moyenne : 30 °C.

5 D'après la figure 1, la concentration de vitamine D3 pour cet échantillon S4 atteint cette fois 72 000 UI/kg sur poids frais, soit ici dix fois plus que la concentration de vitamine D3 pour les larves vivantes (échantillons S1 et S2) et deux fois plus que la concentration de vitamine D3 pour l'échantillon S3.

10 Cette première série de tests met en évidence l'intérêt de la présente invention en appliquant un traitement UV sur des larves transformées (après abattage) (échantillon S3 et S4), et non des larves vivantes comme proposé dans le document WO2019229332 A1 (échantillon S1 et S2). Le Demandeur soumet ici que, face à une exposition UVB, on aurait pu penser avant la présente invention et les tests ci-dessus que les larves transformées de coléoptères auraient au mieux
15 garder une capacité de synthèse de vitamine D3 identique à celle des larves vivantes.

On aurait même pu s'attendre à ce que cette capacité à synthétiser la vitamine D3 soit altérée du fait de la transformation subie par les larves.

Or, de façon très surprenante et inattendue, les résultats obtenus montrent le contraire et mettent en évidence qu'une exposition aux UVB sur des larves transformées entraîne une synthèse de
20 vitamine D3 plus puissante avec des concentrations en vitamine D3 qui sont cinq à six fois supérieure aux concentrations obtenues suite à une exposition UVB sur des larves vivantes dans des durées et conditions d'exposition similaires.

Ces résultats qui n'étaient pas attendus ont un fort impact sur les rendements possibles par unité de surface et donc sur la pertinence d'industrialiser ce procédé sur les larves transformées.

25 Cette série de tests mets également en évidence l'intérêt de broyer les larves transformées avant le traitement UV, ce qui multiplie encore par deux la concentration en vitamine D3.

- 2^{ème} série de tests :

30 Une deuxième série de tests a été menée pour mettre en évidence l'évolution de la concentration de la vitamine D3 en fonction du temps d'exposition en UV-B.

Lors de ces tests, on dispose de plusieurs échantillons de larves de type *Tenebrio Molitor*, notés ici S1', S2', S3', S4', S5' et S6'. Ces échantillons vont être soumis à différents tests.

Les résultats et analyses de ces différents tests sur les échantillons sont illustrés en figure 2. Les analyses ont été réalisées par un laboratoire indépendant certifié Cofrac selon la norme EN 12821 : 2009-08.

Dans cette deuxième série de tests, on dispose d'un échantillon S1' correspondant à de la poudre
5 dégraissée de coléoptères.

Ici, on dispose de poudre dégraissée de *Tenebrio Molitor* sur lesquelles on applique un traitement UV par l'intermédiaire d'une lampe UV positionnée à une distance au-dessus des larves S1' de 20 cm. La lampe UV présente les caractéristiques d'ampoule suivantes : 25W, 10% UVB, Exo Terra ; irradiance moyenne : 75 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$; température moyenne : 30°C.

10 Dans cet exemple, on réalise ensuite une extraction de la fraction huileuse des larves par un pressage des larves sèches ayant subi au préalable un blanchiment de 2 minutes à 100 °C puis une déshydratation de 12 heures à 65°C.

D'après la figure 2, après une exposition aux rayons UV de 10 heures, la concentration en vitamine D3 de l'échantillon S1' est comprise entre 5000 et 10 000 UI/kg de vitamine D3.

15 Lors de cette deuxième série de tests, l'échantillon S2' comprend ici des larves vivantes. On applique ensuite sur les larves vivantes pendant leur croissance un traitement UV par une lampe dont l'ampoule présente les caractéristiques suivantes : 25W, 10% UVB, Exo Terra ; irradiance moyenne : 74, 1 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$; température moyenne : 31.8°C. Comme pour l'échantillon S1 de la figure 1, l'analyse de concentration en Vitamine D3 est réalisée sur des larves congelées.

20 D'après la figure 2, la concentration en vitamine D3 de l'échantillon S2' est comprise entre 150 00 et 20 000 UI/kg de vitamine D3 après une exposition de 60 heures.

L'échantillon S3' correspondant à des groupes de larves vivantes sur lesquelles on applique un traitement UV pendant la phase de croissance. Les conditions d'exposition sont identiques à celles de S1' et S2'. A durée d'exposition égale, on obtient d'après la figure 2 des résultats
25 sensiblement identiques à ceux obtenus pour l'échantillon S2'. Comme pour l'échantillon S2 de la figure 1, l'analyse de concentration en Vitamine D3 est réalisée sur des larves déshydratées et réduites en poudre.

Les tests réalisés sur les échantillons S1', S2' et S3' correspondent à des exemples de mise en œuvre du document WO2019229332A1, c'est-à-dire un traitement UV sur des larves vivantes.

30 L'échantillon S4' correspond à des larves sèches entières (abattues). Avant traitement UV, ces larves ont été transformées par abattage (ébouillantage pendant 2 minutes à 100°C) puis déshydratées.

Ces larves restent cependant non broyées.

On applique ensuite lors de ce test un traitement UV sur cet échantillon S4' par une lampe dont l'ampoule présente les caractéristiques suivantes : 25W, 10% UVB, Exo Terra ; irradiance moyenne : 75 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$; température moyenne : 29,44 °C.

Malgré le fait de ne pas broyer les larves abattues, on remarquera d'après la figure 2 que la concentration en vitamine D3 est élevée et dépasse les 60 000 UI/kg de vitamine D3 après une exposition en UV-B de 24 heures.

Enfin, dans cette deuxième série de tests, on dispose d'échantillons S5' et S6' comprenant des larves sèches broyées.

L'échantillon S5' correspond à des larves qui ont été abattues par le froid à -18°C avant d'être blanchies pendant 2 min à 100°C, puis déshydratées à 65° C pendant 14 heures et enfin broyées. L'échantillon S6' correspond à des larves qui ont été abattues par ébullition à 100 °C pendant 2 minutes, puis déshydratées à 65° C pendant 14 heures et enfin broyées. Chaque point des échantillons S6' comprend 2 analyses distinctes (N=2 ; Moyenne $\pm$ déviation standard).

Pour ces échantillons S5' et S6', on dispose une lampe UV à une distance au-dessus des larves vivantes de 20 cm. Comme pour S4', cette lampe UV présente les caractéristiques d'ampoule suivantes : 25W, 10% UVB, Exo Terra ; irradiance moyenne : 75 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$; température moyenne : 29,44 °C.

D'après la figure 2, la concentration de l'échantillon S5' est comprise entre 90 000 et 100 000 UI/kg de vitamine D3 après une exposition de 24 heures.

Toujours, d'après la figure 2, la concentration des échantillons S6' est comprise entre 80 000 et 90 000 UI/kg de vitamine D3 après une exposition de 24 heures. Cette concentration dépasse ensuite les 90 000 UI/kg de vitamine D3 après une exposition de 72 heures.

Cette deuxième série de tests sur la concentration en vitamine D3 montrent que la présente invention permet d'augmenter, sur un temps d'exposition donné, de quatre à dix fois la synthèse de vitamine D3 par rapport à la méthode décrite dans le document WO2019229332 A1.

Cette deuxième série de tests montre également que le broyage permet de maximiser la synthèse de vitamine D3, mais qu'en revanche sans broyage les résultats obtenus restent très appréciés.

Il devra être observé que cette description détaillée porte sur un exemple de réalisation particulière de la présente invention, mais qu'en aucun cas cette description ne revêt un quelconque caractère limitatif à l'objet de l'invention ; bien au contraire, elle a pour objectif d'ôter toute éventuelle imprécision ou toute mauvaise interprétation des revendications qui suivent.

Il devra également être observé que les signes de références mis entre parenthèses dans les revendications qui suivent ne présentent en aucun cas un caractère limitatif ; ces signes ont pour seul but d'améliorer l'intelligibilité et la compréhension des revendications qui suivent ainsi que la portée de la protection recherchée.