



UNIVERSIDAD
DE ALMERÍA



FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

Digestión *in vitro* de los insectos *Hermetia illucens*, *Musca domestica* y *Tenebrio molitor*, y sus fracciones hemocele y exoesqueleto. Determinación de grupos amino libres y balance de nitrógeno.

In vitro digestion of the insect *Hermetia illucens*, *Musca domestica* and *Tenebrio molitor*, and their hemocele and exoskeleton fractions. Determination of free amino groups and nitrogen balance.

Presentado por:

Ana Domínguez Pérez

Director:

Fernando Rogelio, García Barroso

Codirector:

Dmitri Fabrikov

Curso 2021/2022

Convocatoria de Enero

ÍNDICE

.....	1
1. Introducción	1
1.1. Fuentes proteicas en alimentación humana y producción animal	1
1.2. Insectos como alternativa proteica.	4
1.3. Insectos estudiados.	5
1.4. Digestibilidad proteica.....	7
1.5. Métodos para evaluar el porcentaje de digestibilidad <i>in vitro</i>	9
3. Material y métodos	11
3.1. Toma y procesamiento de muestras.....	11
3.2. Digestión <i>in vitro</i>	11
3.3. Análisis realizados	13
3.3.1. Determinación de grupos amino libres.	13
3.3.2. Balance del contenido en nitrógeno.	13
4. Análisis estadístico.....	14
5. Resultados	14
5.1. Hidrólisis proteica de los diferentes insectos y sus fracciones.....	14
5.1.1. Dinámica de liberación de grupos amino libres de las diferentes fracciones de los insectos.....	14
5.1.1.1. <i>Hermetia illucens</i>	14
5.1.1.2. <i>Musca domestica</i>	15
5.1.1.3. <i>Tenebrio molitor</i>	17
5.1.2. Comparación entre los insectos en el grado de hidrólisis proteica	18
5.1.2.1. Insecto entero.....	18
5.1.2.2. Hemocele.....	19
5.1.2.3. Exoesqueleto	20
5.1.3. Comparación del grado de hidrólisis entre el insecto entero y sus fracciones...	21
5.1.3.1. <i>Hermetia illucens</i>	22
5.1.3.2. <i>Musca domestica</i>	23
5.1.3.3. <i>Tenebrio molitor</i>	24
5.2. Balance del contenido en nitrógeno de los insectos analizados.	25
6. Discusión.....	26
7. Conclusiones	29
8. Referencias.....	29

Resumen

La demanda de alimentos está creciendo en paralelo con el aumento de la población mundial, con ello se produce el incremento de los efectos negativos de la industria alimentaria sobre el medio natural. Así, nace la necesidad de buscar nuevas fuentes de proteína animal cuya producción sea más sostenible y además proporcione todos los nutrientes necesarios para el correcto mantenimiento de los organismos. Los insectos son una propuesta de alimento más sostenible con el medio natural y además ricos en nutrientes esenciales, propuestos estos tanto para alimentación humana como para animal. Para comprobar su efectividad, en este trabajo se realizaron digestiones *in vitro* de los insectos *Hermetia illucens*, *Musca domestica* y *Tenebrio molitor*, a través del cálculo de las concentraciones de grupos amino libres y del balance del nitrógeno. Además, se separaron las fracciones de hemocele y exoesqueleto para comprobar los posibles cambios en la digestibilidad. Las comparaciones se realizaron tanto entre fracciones del mismo insecto como entre insectos, incluyendo en estas los datos de harina de pescado y harina de soja como alimentos de referencia. Se ha obtenido que, teniendo en cuenta su alta digestibilidad proteica, los insectos pueden ser una alternativa adecuada a las fuentes tradicionales de proteína animal actuales, harina de pescado y de soja. Y que el posible beneficio de fraccionar los insectos requiere un estudio más profundo, ya que los resultados no llegan a ser concluyentes.

Palabras clave: digestión *in vitro*, hemocele, *Hermetia illucens*, insectos, *Musca domestica* nitrógeno, *Tenebrio molitor*

Abstract

The demand for food is growing in parallel with the increase in the world's population, thus increasing the negative effects of the food industry on the natural environment. Thus, there is a need to look for new sources of animal protein whose production is more sustainable and also provides all the nutrients necessary for the proper maintenance of organisms. Insects are a proposal of more sustainable food with the natural environment and also rich in essential nutrients, proposed both for human and animal food. To prove their effectiveness, in this work *in vitro* digestions of the insects *Hermetia illucens*, *Musca domestica* and *Tenebrio molitor* were carried out by calculating the concentrations of free amino groups and the nitrogen balance. In addition, hemocele and exoskeleton fractions were separated to check for possible changes in digestibility. Comparisons were made both between fractions of the same insect and between insects, including fish meal and soybean meal as reference feeds. It has been obtained that, taking into account their high protein digestibility, insects can be a suitable alternative to the current traditional sources of animal protein, fishmeal and soybean meal. And that the possible benefit of fractionating insects requires further study, as the results are inconclusive.

Keywords: digestion *in vitro*, haemocele, *Hermetia illucens*, insects, *Musca domestica*, nitrogen, *Tenebrio molitor*

1. Introducción

1.1. Fuentes proteicas en alimentación humana y producción animal

A lo largo de las últimas décadas, hemos podido comprobar como la población humana ha incrementado su número desde 2.5 millones de habitantes en 1950, hasta los 7,8 millones en la actualidad. Dicha tendencia continuará según las previsiones aumentando hasta los aproximadamente 9,5 millones de habitantes en el 2050 según proyecciones de las Naciones Unidas (WHO, 2021). Por tanto, se puede esperar un incremento creciente de la demanda de alimentos, lo que hace necesario también la ampliación de la oferta de estos.

Este crecimiento de la humanidad sin duda originará una mayor presión sobre los ya limitados recursos del planeta. En la *Figura 1* podemos ver el aumento a nivel global de la producción cárnica en los diferentes continentes. Parece claro que cubrir las crecientes necesidades humanas es inviable en un futuro cercano, y se hace imprescindible retomar a alimentos y/o sistemas de producción más sostenibles.

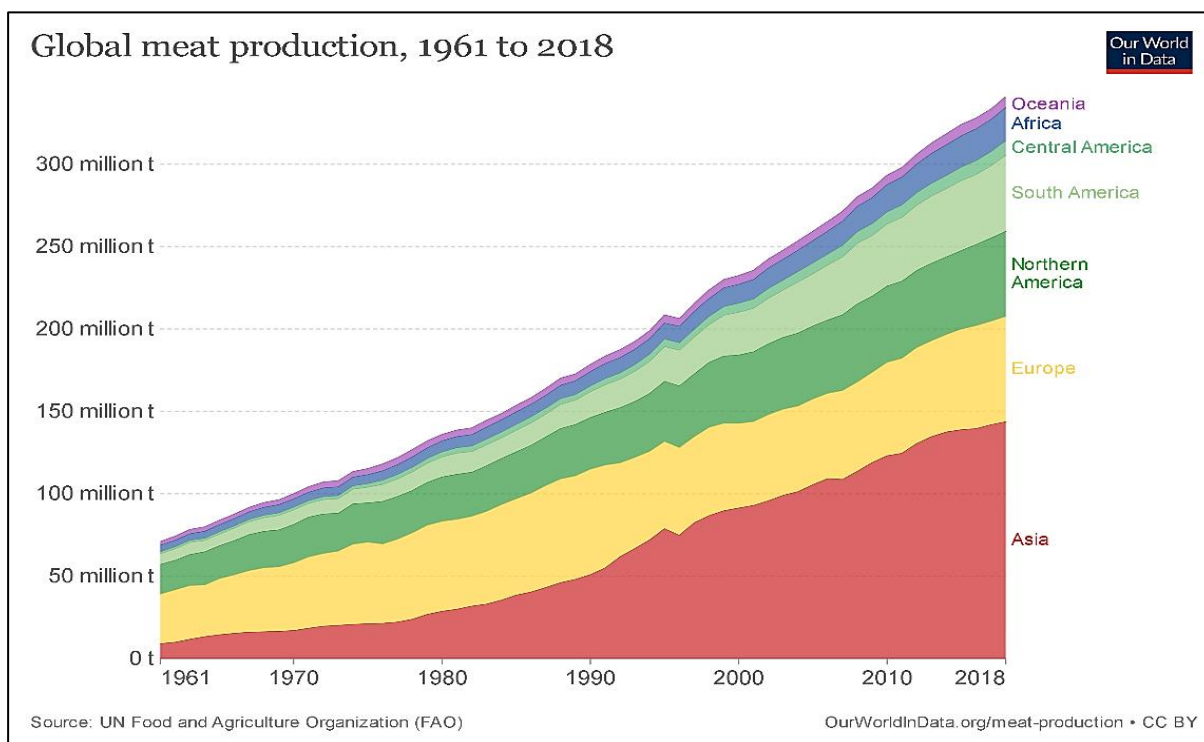


Figura 1. Producción global de carne entre 1961 y 2018 (Ritchie y Roser, 2019).

De este modo, se prevé un auge de los efectos negativos que causa la producción alimenticia a nivel medioambiental, promoviendo el cambio global. Entre dichos efectos encontramos los siguientes (FAO, 2006):

- ❖ Degradación del suelo por cambios en su uso. Las áreas destinadas al pastoreo y cultivos para la producción de piensos y forrajes.
- ❖ Contaminación y demanda de agua. Se requieren elevadas cantidades de agua para la elaboración tanto de carne como de leche, además se produce contaminación de los cursos del

agua por la liberación de nutrientes, patógenos y otros componentes de los desechos de las explotaciones animales.

- ❖ Promoción del cambio climático debido a la liberación de gases de efecto invernadero derivados de la fermentación ruminal y de los desechos de animales de forma directa. Además, indirectamente se emiten por el uso de combustibles fósiles (transporte, producción de piensos...) y por la liberación de CO₂ por la deforestación de bosques para ampliar las áreas de pastoreo y cultivo.
- ❖ Pérdida de biodiversidad debido a la deforestación, la contaminación de los ecosistemas tanto terrestres como acuáticos, desabastecimiento de caladeros por sobrepesca.

Los principales sectores productores de proteína animal son la ganadería y la industria pesquera. Estos sectores causan implicaciones directas sobre el medio natural, dando lugar al aumento de flujos de energía, nutrientes y otras implicaciones como el desabastecimiento de caladeros en el caso de la sobrepesca o el aumento de emisiones de gases de efecto invernadero en la ganadería, tales como el dióxido de carbono, metano y óxido nitroso (Herrero y Gil, 2008). En la *Figura 2* podemos observar la emisión de gases de efecto invernadero en la producción de diferentes alimentos, viéndose como los procedentes de la ganadería son los más contribuyentes al Cambio Climático en cuanto a emisión de CO₂ equivalente.

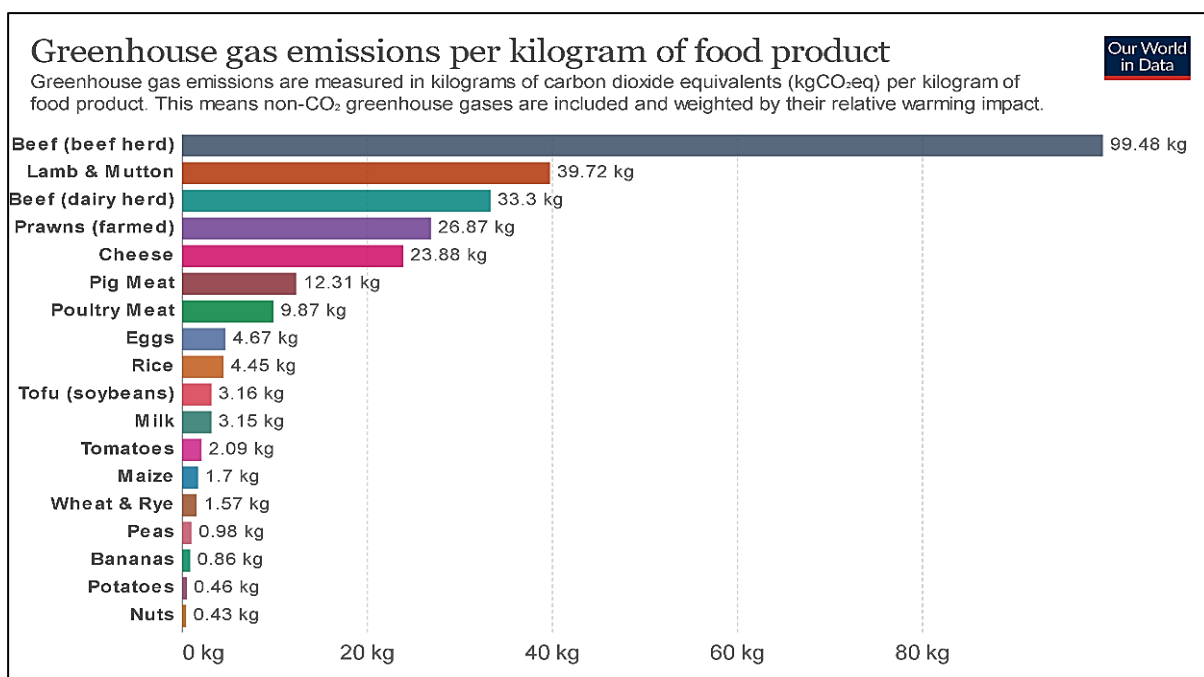


Figura 2. Emisión de gases de efecto invernadero medido en Kilogramos de CO₂ equivalente por la producción de alimentos (Ritchie y Roser, 2021).

Dentro de la dieta humana, la proteína de origen animal representa un tercio del total de proteína ingerida, adquiere importancia debido a los beneficios que aporta para el correcto crecimiento y mantenimiento de nuestro organismo. Cada alimento presenta unas proteínas diferentes, y para aprovecharlas, nuestro organismo debe digerirla, para descomponerlas en aminoácidos. De los 20 aminoácidos que existen, 9 son esenciales, es decir, son aquellos que no podemos sintetizar y debemos ingerirlos a través de nuestro alimento. El déficit de alguno de estos aminoácidos esenciales implica la imposibilidad de sintetizar algunas proteínas. Se

considera que las proteínas de alto valor biológico son aquellas que contienen todos los aminoácidos esenciales.

Existen grandes diferencias entre las proteínas animales y vegetales. Las proteínas animales se considera que tienen mayor valor biológico, al aportar todos los aminoácidos esenciales. Sin embargo, las proteínas vegetales suelen adolecer de alguno de ellos, en muchas ocasiones no cuentan con todos los aminoácidos esenciales necesarios. Por tanto, las proteínas de origen animal tienen una mayor calidad biológica que las vegetales debido a que su composición es más parecida a la que las proteínas de nuestro organismo.

Sin embargo, no todo es la composición, sino también la forma en que se asimilan y digieren. Puesto que hay mayor número de enlaces entre aminoácidos por romper, la proteína animal es más difícil de digerir y, por tanto, de asimilar. En este sentido, hay proteínas vegetales, como las de la soja que, a pesar de tener menor valor biológico, presentan un aporte proteico neto mayor porque se asimilan mucho mejor que las de origen animal.

Por ello, debemos tener en cuenta las implicaciones indirectas procedentes de la producción de piensos. En el conjunto de materias primas tradicionales que forman los piensos cabe destacar las siguientes:

❖ Harina y aceite de pescado: presenta un correcto perfil nutricional y una buena palatabilidad (Sánchez-Muros et al., 2014), sin embargo, al producirse en muchas ocasiones con desechos de pescado, pueden ser deficientes y contener nutrientes de menor calidad. Otro problema que generan es que el aumento de su producción provoca, junto con la pesca, el desabastecimiento de los caladeros y con ello la decadencia de los ecosistemas marinos. Además, el proceso de producción de estos ingredientes supone un gasto económico que tiene que asumir la industria, aumentando el precio de estos productos por la alta demanda (FAO, 2018).

❖ Harinas vegetales: las plantas presentan características en su composición que generan problemas en los piensos tales como la presencia de factores antinutricionales, ausencia de un buen perfil de ácidos grasos y aminoácidos y poca capacidad de captación por parte de los enterocitos intestinales en el caso de peces (Arru et al., 2019). Destacamos la especie vegetal *Glycine máxima* (soja), su producción genera problemas medioambientales como la deforestación, el gran consumo de agua, utilización de herbicidas y fertilizantes y el cultivo de individuos transgénicos que podrían originar un deterioro del medio natural (Sánchez-Muros et al., 2014).

Por ello, nace la necesidad de buscar nuevas fuentes de proteína cuya producción escatime las implicaciones medioambientales de la producción animal convencional, dichas fuentes deben ser seguras, baratas, tener buena disponibilidad, buena calidad y un porcentaje proteico adecuado para poder incluirse en la dieta humana y animal (FAO, 2021).

Una de las fuentes alternativas de proteína son los insectos, tanto en alimento para animales como para el ser humano. Centrándonos en la alimentación humana, la presencia de insectos en la dieta humana no es nada nuevo, debido a que la entomofagia, ingesta de insectos por parte del ser humano, según los escritos se remonta a la época de Aristóteles (384 a.c.-322 a.c) (Ramos-Elorduy y Viejo Montesinos, 2007). Hoy en día los insectos forman parte de la

dieta de aproximadamente 2.000 millones de personas (van Huis et al., 2013). Es en la sociedad occidental donde, sobre todo, reside la ausencia del consumo de insectos debido principalmente a la percepción de la entomofagia como una costumbre propia de países subdesarrollados, vistos, así como un alimento de “baja categoría”, o a la relación de los invertebrados con enfermedades y causantes de daños a la agricultura en forma de plagas (Shockley y Dossey, 2014).

1.2. Insectos como alternativa proteica

Ante la búsqueda de nuevas alternativas proteicas para la alimentación humana a consecuencia del conocimiento de los problemas medioambientales producidos por la producción animal convencional, se hizo necesario que dichas alternativas se enmarcaran en una legislación que controle tanto su seguridad alimenticia, riesgos derivados de su producción y su impacto medioambiental (Pino Cebrián, 2018). Dicha evaluación fue realizada por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), así los insectos fueron considerados como nuevo alimento en la Unión Europea a partir del Reglamento (UE) 2015/2283, , y en el Reglamento (UE) 2017/893, relativo a las disposiciones sobre proteína animal transformada (UE, 2017), permite la producción de las siguientes especies de insectos destinados a alimentación animal: *Acheta domesticus*, *Tenebrio molitor*, *Lacusta migratoria*, *Gryllobes sigillatus*, *Schistocerca gregaria*, *Alphitobius diaperius*, *Apis mellífera*, *Hermetia illucens* y *Musca domestica* (EFSA, 2015). Estos insectos deben de cumplir la norma de haber sido alimentos tradicionales en terceros países, es decir, llevar consumiéndose en estos durante más de 25 años (EFSA, 2015).

En cuanto a la composición, los insectos poseen niveles adecuados de proteínas, lípidos, minerales y vitaminas, proporcionándoles un valor nutricional ya que estos nutrientes son primordiales a la hora de crear una dieta equilibrada. Hay que destacar que poseen niveles de aminoácidos esenciales de los que carecen las proteínas vegetales, siendo así una alternativa a las harinas vegetales (Al-Qazzaz y Ismail, 2016).

Por otro lado, la energía que proporcionan como alimento se ha comprobado como los insectos pueden proporcionar 217-777 kcal/ 100 g, similares al aporte energético proveniente del ganado (165-705 kcal/100 g) y superior a fuentes vegetales (308-352 kcal/100). Así, podemos ver como los insectos en términos energéticos son una buena alternativa a las fuentes tradicionales de proteínas (Shockley y Dossey, 2014).

Otro tema que tratar son las ventajas del proceso de producción de insectos frente a la producción de otros productos como la carne de ganado. La producción de insectos es más sostenible y tiene una menor huella ecológica debido a que estos son más eficientes en la conversión biológica de materiales orgánicos en biomasa comestible (conversión alimenticia) (Al-Qazzaz y Ismail, 2016). Por ejemplo, una vaca consume 8 gramos de masa de alimento por gramo de peso ganado, en cambio, los insectos de manera general requieren menos de 2 gramos (Shockley y Dossey, 2014), lo que se debe a que estos últimos son animales poiquiloterms, es decir, no gastan energía en la producción de calor ya que su temperatura depende del medio en el que viven. También poseen una alta fecundidad, tasas de crecimiento rápido y ciclo de vida cortos, dando lugar a una gran biomasa final, siendo el proceso de producción más eficiente

que la producción ganadera o piscícola y a la larga más rentable económicamente (Al-Qazzaz y Ismail, 2016).

Esta rentabilidad tanto en el proceso de producción como en calidad nutritiva del alimento se suma la menor emisión de efectos de gases de efecto invernadero (GEI) y amoníaco y un menor consumo de agua en su producción ya que los insectos obtienen esta de los alimentos que toman. (Shockley y Dossey, 2014). Vistas todas las ventajas que presentan podemos plantear los insectos como una alternativa alimenticia más sostenible con el medio natural.

En 2012 se contabilizó el número de especies que habían sido descritas para consumo humano, llegando a sumar 2163 (Shockley y Dossey, 2014). A nivel mundial los órdenes de insectos que más se consumen son Coleoptera con 661 especies, Lepidoptera con 396 especies y Hemiptera con 222 especies.

1.3. Insectos estudiados

Concretamente en este trabajo se han estudiado las especies, *Hermetia illucens* (mosca soldado-negra), *Musca domestica* (mosca común) y *Tenebrio molitor* (gusano de la harina). En la Figura 3 podemos observar los diferentes estadios por los que pasan estos insectos a lo largo de su ciclo biológico.

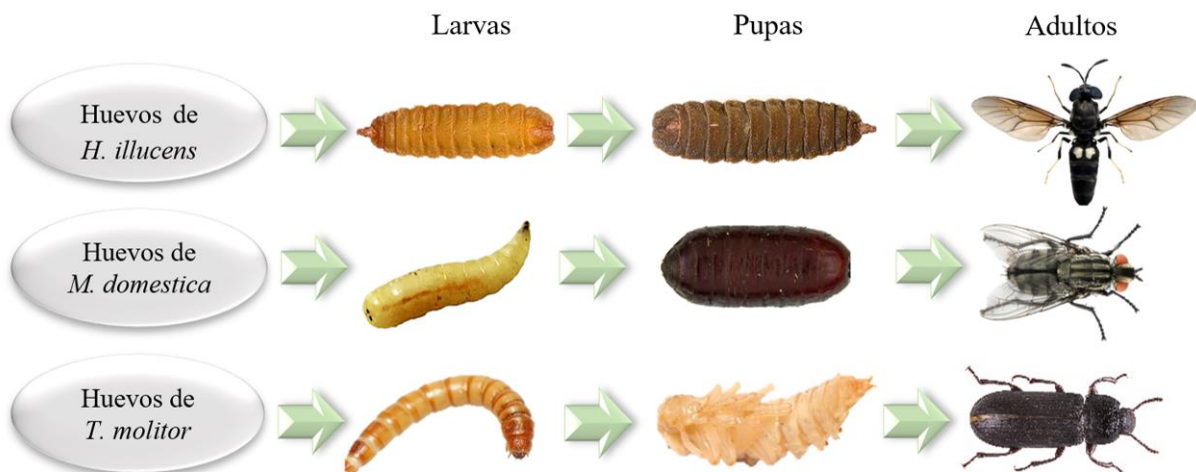


Figura 3. Esquema de los diferentes estadios del ciclo biológico de las especies *Hermetia illucens*, *Musca domestica* y *Tenebrio molitor*.

El díptero *Hermetia illucens*, es una especie de la familia Stratiomyidae, las larvas de esta especie contienen adecuados niveles de proteína (36% - 48%) y de grasa (25% -35%), con una relación adecuada de aminoácidos esenciales. Es una especie muy resistente ante condiciones ambientales exigentes, no causan plagas ni transmiten enfermedades, siendo un añadido a la seguridad en el ámbito de su producción (Al-Qazzaz y Ismail, 2016). Se ha comprobado cómo puede ser incluida en los piensos utilizados en acuicultura, por ejemplo, para trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Borgoño et al., 2017) y lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Magalhães et al., 2017), donde la inclusión parcial no ha producido efectos negativos para los peces.

El otro díptero estudiado es *Musca domestica*, incluido en la familia Muscidae. Destacamos que posee buenos niveles de aminoácidos esenciales como la Metionina y leucina (Al-Qazzaz y Ismail, 2016). En cuanto al contenido de proteína poseen en torno a un 40,1% en estado de pupa (Barroso et al., 2014) Sus larvas han sido incluidas en alimentación animal, por ejemplo, para la alimentación de pollos donde se ha visto como esta inclusión mejora el consumo de los piensos y en consecuencia el peso de los animales (González de Rodríguez y Cabrera Herrera, 2016). Así, su inclusión podemos encontrarla también en la acuicultura, habiéndose utilizado por ejemplo para la alimentación de tilapia (*Oreochromis niloticus*) donde no se vieron efectos negativos sobre el peso y el estatus de los animales con esta inclusión de *M. domestica* en la dieta (Corbalá-Bermejo et al., 2019).

En el caso del coleóptero *Tenebrio molitor*, se trata de una especie perteneciente a la familia Tenebrionidae. Podemos encontrarlos en múltiples zonas del planeta. Cuando se encuentra en estado larvario es rico en proteína (53,2 %), contiene un buen perfil de ácidos grasos rico en ácido oleico, niveles adecuados de zinc, selenio, riboflavina, biotina, péptidos antimicrobianos, aminoácidos esenciales como la isoleucina, lisina y leucina (Arru et al., 2019). Su alimentación puede llevarse a cabo a partir de residuos orgánicos, convirtiendo estos en biomasa rica en proteínas y grasas (Khusro et al., 2012). Este es utilizado en acuicultura para la alimentación de peces, donde se ha visto como su inclusión en la dieta favorece el sistema inmunitario de los peces con beneficios probióticos (Józefiak et al., 2019) y en la respuesta antiinflamatoria (Llagostera et al., 2019). Además de estos beneficios nutricionales se ha planteado beneficiarse de las plagas que produce mediante su consumo, pudiéndose ahorrar costos en términos de insecticidas y con ello reducir la contaminación del suelo y el agua por estos (Shockley y Dossey, 2014).

Tabla 1. Aminoácidos esenciales de *Hermetia illucens*, *Tenebrio molitor*, *Musca domestica*, harina de soja y harina de pescado.

Aminoácidos	<i>Hermetia illucens</i> ^a	<i>Tenebrio molitor</i> ^b	<i>Musca domestica</i> ^c
Histidina	1,32	2,5	2
Isoleucina	5,08	3,5	2,4
Leucina	8,8	6,2	3,4
Lisina	6,45	5,4	3,8
Metionina	2,72	0,7	1,6
Phenilalanina + Tirosina	13,91	7,	6,8
Treonina	4,48	3,2	2,1
Valina	5,8	5,4	2,7
Triptófano	1,32	1,2	-

^a Huang et al., 2019

^b Azagoh et al., 2016

^c El Boushy, 1991

1.4. Digestibilidad proteica

Como fuente proteica, además del contenido en proteína bruta, y del balance de aminoácidos esenciales y no esenciales, es necesario conocer la biodisponibilidad de las harinas de insectos. La biodisponibilidad depende en gran medida del grado de hidrólisis proteica tras la digestión y de la capacidad de absorción aminoácidos del intestino y, en definitiva, de la digestibilidad de la fuente proteica

La digestibilidad de los nutrientes, provenientes del alimento, hace referencia a la proporción de estos que es transformada por el proceso de digestión en compuestos que puedan ser accesibles, viéndose implicados diferentes procesos físicos y químicos (Lucas González, 2016).

Determinar la digestibilidad *in vivo* de una fuente proteica es un proceso largo que implica cría de animales con una dieta específica, recogida de heces y análisis de estas, que resulta muy costoso cuando se pretende determinar la digestibilidad de varias fuentes, e implica la utilización de muchos animales. Además, está diseñado para determinar la digestibilidad de un pienso, no de un ingrediente. El desarrollo de las técnicas de hidrólisis proteica *in vitro* permite una estimación de la digestibilidad de la proteína de la fuente proteica sin los inconvenientes de la digestibilidad *in vivo*. Así mismo, las técnicas de digestibilidad *in vitro* se utilizan como medio para obtener hidrolizados de proteína que permitan mayor biodisponibilidad de los aminoácidos.

Los procesos de digestión y absorción en los animales son complejos y dinámicos, por tanto, simular un sistema tan complejo utilizando métodos *in vitro* es difícil y el resultado nunca será tan preciso como *in vivo*, pero es una buena alternativa, teniendo en cuenta la complejidad y tiempo requerido en sus experimentos, al método *in vivo*.

Los ensayos de digestibilidad *in vitro* consisten en una extrapolación de las condiciones fisiológicas que ocurren en el aparato digestivo durante la digestión al laboratorio. Se debe buscar que dicha técnica sea lo suficientemente sensible para poder comprobar el impacto del procesamiento, para describir de la mejor manera la calidad del ingrediente a estudiar (Nieto López, 2003).

Los métodos de hidrólisis proteica *in vitro* imitan las condiciones simuladas por los procesos digestivos a través de enzimas proteolíticas, midiendo el porcentaje de proteínas que son hidrolizadas por dichas enzimas (Almeida et al., 2015). Estos métodos son rápidamente reproducibles y proporcionan una estimación fiable de la digestibilidad para una amplia gama de alimentos (Butts et al., 2012), y permite comparar entre ingredientes al utilizarse con las mismas condiciones experimentales. No obstante, aunque la digestión *in vitro* intenta simular los procesos digestivos *in vivo*, difícilmente estos métodos pueden imitar completamente las condiciones reales de pH y temperatura del sistema digestivo (Wickham et al., 2009). Por ello, las digestibilidades obtenidas *in vitro* suelen originar valores más bajos que la digestibilidad determinada en estudios *in vivo* con animales (Butts et al., 2012).

El procedimiento consiste en ir creando de manera controlada fluidos en condiciones lo más cercanas posibles a la realidad e incluirlos junto con las muestras para que se produzcan las reacciones correspondientes, siendo primordiales las enzimas, las biomoléculas encargadas de la hidrólisis de los alimentos durante la digestión. Los parámetros que han de tenerse en

cuenta a la hora de realizar una digestión *in vitro* son la concentración, composición y origen de las enzimas utilizadas con lo que se calculan los tiempos de las reacciones y el tipo de reacción que tiene lugar, y por otro lado la temperatura, el pH, tiempo de incubación y la agitación mecánica (Lucas González, 2016). En el caso de las digestiones *in vitro* para proteínas, convencionalmente se han utilizado proteasas comerciales de origen animal, aunque en los últimos años se está promoviendo el uso de proteasas de origen bacteriano y fúngico (Guadix et al., 2000).

Y tal como hemos indicado anteriormente, la consideración negativa de este tipo de experimento recae en que los ensayos *in vitro* no pueden simular al completo todos los procesos que se pueden dar *in vivo*, por ejemplo, los derivados del ambiente o las complejas relaciones entre el alimento y el propio cuerpo (Lucas González, 2016).

Para poder plantear un ensayo de digestión *in vitro* es necesario conocer el proceso de digestión *in vivo* para concretar los parámetros antes mencionados, en el caso de este trabajo debemos de conocer la digestión proteica en el ser humano.

La digestión hace referencia a un complejo sistema de procesos que tiene el objetivo de transformar el alimento en nutrientes que puedan ser captados por las células del organismo. Centrándonos en la digestión de proteínas, su digestión da comienzo en el estómago por acción de la enzima pepsina (EC 3.4.23.1) gástrica que es producida por las células principales del estómago, que se activa por existencia de un pH ácido se hidroliza proteínas hasta aminoácidos libres. Después, una vez que el contenido del estómago se libera al intestino delgado, donde por la presencia de aminoácidos producidos por la pepsina estimula la secreción de la hormona colecistoquinina en el duodeno y yeyuno, dando lugar a la secreción de proteasas pancreáticas que continúan con la digestión de proteínas a aminoácidos y oligopéptidos en un medio con pH básico (García Luna y López Gallardo, 2007)

Así, encontramos una digestión proteica ácida en el estómago y otra básica en el intestino delgado, siendo en esta última fase donde se produce el mayor porcentaje de digestión proteica. En la *Figura 3* podemos observar un esquema de este proceso.

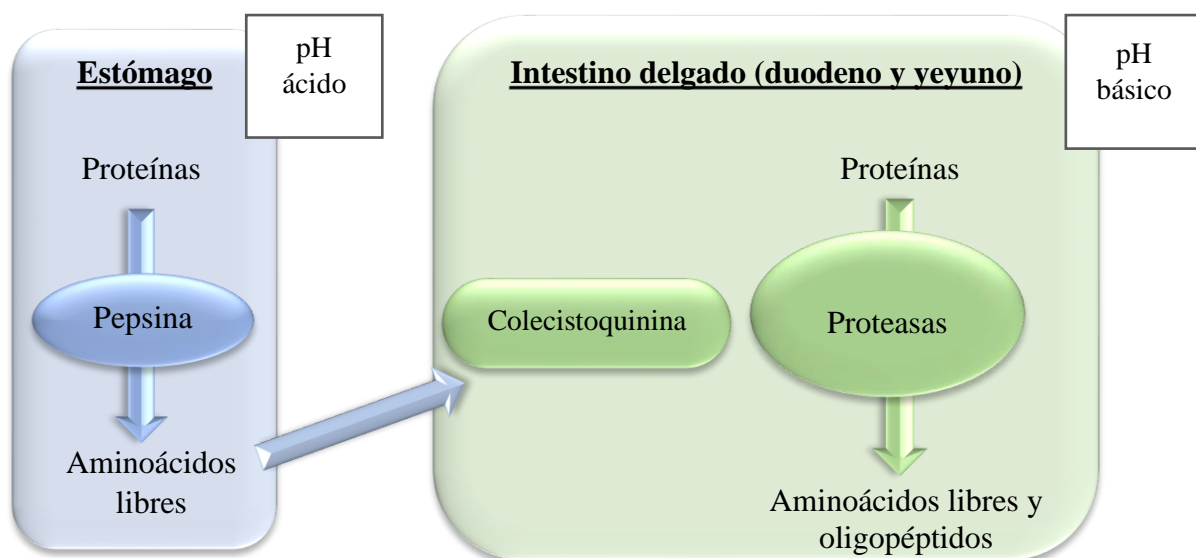


Figura 4. Esquema resumen del proceso de digestión, incluyendo la fase ácida gástrica y la fase básica intestinal.

Como hemos mencionado anteriormente, los insectos son una alternativa proteica con múltiples ventajas, entre ellas sus altos porcentajes de contenido proteico, sin embargo, hay que tener en cuenta la presencia de quitina (poli-[1-4]-beta-Nacetil-Dglucosamina), se trata de un polímero formado por aminoazúcares presente en el exoesqueleto de insectos, conchas de crustáceos y hongos. Debido a que se trata de una molécula insoluble en agua, de gran tamaño, con una estructura compleja y heterogénea, para degradarla es necesaria la secreción de quitinasa (EC 3.2.11.14), esta se ha encontrado en bacterias, hongos, plantas, invertebrados y vertebrados, entre ellos el ser humano (Castro et al., 2011). Ello no quiere decir que los niveles de quitinasa en el caso del ser humano sean suficientes en cantidad y funcionalidad como para ser capaces de digerir la quitina de los insectos al completo, de hecho, se ha visto como en humanos las cantidades de quitinasas solo se sobreexpresan y son detectables ante ciertas patologías, teniendo un objetivo más autoinmune que digestivo (Boot et al., 2005).

La quitina puede provocar efectos negativos sobre la salud humana como asma y alergias, por otro lado, también encontramos estudios que afirman que si se trata de moléculas de quitina de tamaño mediano estas contribuyen a la reducción de la respuesta inflamatoria del tracto digestivo (Brinchmann et al., 2011).

Tal y como hemos comentado, la quitina contiene N en sus moléculas (Jonas-Levi y Martínez, 2017), y está en el exoesqueleto incrustado en una matriz de escleroproteína (Andersen et al., 1995), que no se degrada ni se absorbe en el intestino delgado (Vidanarachchi et al., 2010). Esto tiene dos implicaciones, en primer lugar, que la quitina puede tener propiedades "antinutritivas" debido a sus efectos potencialmente negativos sobre la digestibilidad de las proteínas (Belluco 2013), y la segunda que no hay una correlación exacta entre el contenido en proteína bruta y el nitrógeno biológicamente disponible (Yang et al., 2014), ya que el nitrógeno es un componente importante de la cutícula indigestible de los insectos.

De esta manera, la presencia de quitina en los insectos ha de ser un factor que debe considerarse, necesitando continuar con estudios sobre las implicaciones de esta molécula sobre el organismo. Por ello, es interesante valorar si la separación mecánica del exoesqueleto del resto de insecto (hemocele) podría ser una opción de manejo, que permitirá incrementar la digestibilidad de la fracción sin exoesqueleto, y ser más adecuada para su uso como alimento.

1.5. Métodos para evaluar el porcentaje de digestibilidad *in vitro*

En cuanto al método empleado para evaluar el porcentaje de digestibilidad, existen un gran número de modificaciones. Pero en general, la digestibilidad *in vitro* de las proteínas se suele determinar mediante dos métodos principales:

1. Grado de hidrólisis: valora el número de enlaces peptídicos escindidos durante la hidrólisis, respecto al total de enlaces peptídicos, y se estudia en el sobrenadante. En este caso se emplea la fórmula:

$$\text{Grado de hidrólisis: } \%DH = \frac{h}{htot} * 100$$

Donde h son los enlaces peptídicos hidrolizados de la muestra, y $htot$ los enlaces peptídicos totales. Para obtener el número de grupos aminos totales se realiza una hidrólisis completa (6 N HCl a 110 °C durante 24 h).

A su vez, para la determinación del grado de hidrólisis de la proteína existen diversos métodos (Nielsen et al., 2001). Este puede ser cuantificado por la determinación de los grupos aminos liberados durante la hidrólisis utilizando compuestos que reaccionan específicamente con los grupos aminos como el ácido 2,4,6-trinitrobenceno sulfónico (TNBS), o-ftaldialdehído (OPA) o la ninhidrina.

Otro método para determinar el grado de hidrólisis es el pH-stat/drop method, que se basa en determinar la liberación de protones producidos al escindir los enlaces peptídicos por acción de las enzimas (Bryan & Classen, 2020). Esta liberación origina un cambio del pH (acidificación) del medio de reacción, y es necesario adicionar una base para mantener el pH. Para el cálculo de la digestibilidad proteica en el hemíptero *Carbula marginella* y en el lepidóptero *Cirina butyrospermi*, Séré et al. (2021) utilizaron la siguiente fórmula:

$$\text{Digestibilidad} = 4.33 + 53.21X$$

Donde X es el volumen de NaOH (mL) vertido a $T=10$ min para mantener el pH en 8,0.

Nielsen et al. (2001) indican que la técnica del pH-stat se debe utilizar únicamente en condiciones de pH superiores a 7, y Bryan y Classen (2020) apuntan que este método no es adecuado para determinar la digestibilidad de alimentos en animales terrestres, sino que está especialmente indicado para la investigación nutricional acuática. En su revisión, estos autores consideran que el tracto de los peces es más simple y que en la acuicultura se emplean alimentos altamente digestibles, como la harina de pescado, y por eso se obtienen unas altas correlaciones de digestibilidad.

2. Balance del nitrógeno: se evalúa la diferencia entre la cantidad de nitrógeno ingerido y la cantidad de nitrógeno presente en el sustrato final no digerido. Se emplea fórmula:

$$\text{Digestibilidad (\%)} = (A - B) / A \times 100 \%$$

donde A es el contenido de N de la muestra original previa a la digestión, y B es el contenido de N de la muestra final después de la digestión.

2. Objetivos

Los objetivos principales de este trabajo son:

-Conocer la digestibilidad proteica de los insectos *Tenebrio molitor*, *Hermetia illucens* y *Musca domestica*.

-Evaluar si las fracciones de estos insectos, separando su hemocele y su exoesqueleto, sería un procesado adecuado atendiendo a su digestibilidad.

3. Material y métodos

3.1. Toma y procesamiento de muestras

En el presente TFM se han analizado la larva de *Hermetia illucens* (O: Díptera), la pupa de *Musca domestica* (O: Díptera) y la larva de *Tenebrio molitor* (O: Coleóptera).

Los individuos de las diferentes especies de insectos de este estudio fueron sacrificados por las correspondientes empresas distribuidoras (ENTOMOTECH, BIOFLYTECH y REPTIMERCADO, respectivamente), llevándose a cabo su transporte por medio de congeladores para mantenerlos en todo momento a temperaturas inferiores a cero grados para su correcta conservación.

De cada especie de insecto se separaron dos muestras:

- a) insectos enteros para su desecación y molienda.
- b) insectos que tras la descongelación fueron separadas la fracciones (exoesqueleto y hemocele).

La primera muestra (insectos enteros), se desecaron en estufa a 50°C durante 24 horas, tiempo en el que se comprobó que su peso fuera constante. Tras ello se procedió a la molienda en un molino de malla de 1 mm para la obtención de la harina, tras ello la harina obtenida fue envasada a 4°C.

Con la segunda muestra, para obtener las diferentes fracciones de los insectos, parte de ellos se sometieron a un prensado mecánico con una prensa de aceite electrónica CGOLDENWAL, obteniendo así el exoesqueleto y por otro lado el hemocele. Posteriormente ambas fracciones fueron desecadas y molidas siguiendo el mismo procedimiento indicado anteriormente.

Con objeto de poder valorar la digestibilidad de los insectos en un contexto alimenticio, se ha considerado usar como alimentos de referencia a la harina de pescado y la harina de soja, ya que son los ingredientes más frecuentemente empleados en la alimentación de ganado y en acuicultura.

3.2. Digestión *in vitro*

Las digestiones *in vitro* de las diferentes muestras se llevaron a cabo en vasos con una circulación de agua a 37°C y colocados sobre un agitador magnético digital con 4-5 posiciones de la marca OVAN ajustando la agitación a 400 rpm, llevándose a cabo la digestión *in vitro* de 1 muestra a con tres réplicas.

Se recogieron muestras (15 µL) durante el ensayo que eran depositadas en tubos eppendorf que contenían ácido tricloroacético (TCA) (150 µL) para la interrupción de la reacción, y posteriormente eran congelados para la realizar más tarde la determinación de grupos amino libres en cada punto tomado de la digestión. Durante la fase ácida gástrica se

procedió a la recogida de muestras de cada vaso en intervalos de 20 minutos hasta la duración final de 100 minutos. Por otro lado, en la fase básica intestinal, se recogieron tomas en intervalos de 30 minutos con una duración final de 180 minutos.

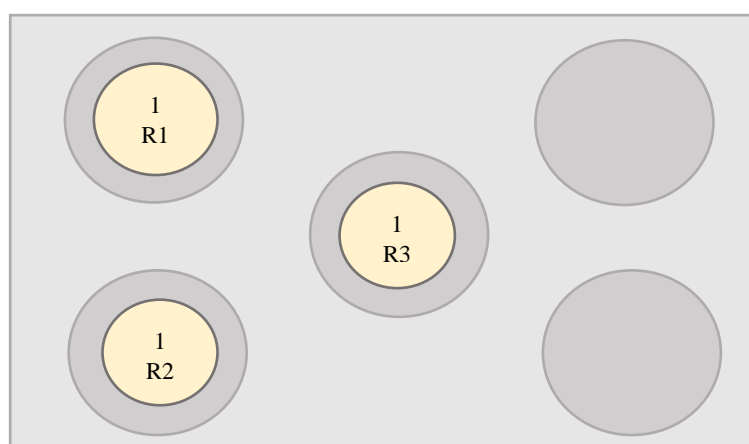


Figura 5. Representación de los matraces sobre el agitador magnético.

A continuación, se describen los diferentes pasos seguidos durante la digestión in vitro:

-Fase 1° (Fase ácida gástrica): en cada uno de los matraces de incubación se vertió 80 mL de ácido clorhídrico 0,075 M, pH 2 después se añadió las muestras conteniendo 300 mg de proteína cada una, se calculó la cantidad de muestra a partir de los porcentajes de proteína de estas (Tabla 2). Una vez que la muestra queda diluida se procedió a la toma de la primera muestra (blanco), a continuación, se adicionó 200 mg de pepsina (EC 3.4.23.1) dando comienzo la reacción de hidrólisis de proteínas y recogiendo las muestras pertinentes.

Tabla 2. Porcentaje y cantidad de muestra requerida de cada muestra, incluyendo las tres fracciones analizadas (Insecto entero, hemocele y exoesqueleto) de *Hermetia illucens*, *Musca domestica*, y *Tenebrio molitor*.

	Insecto entero		Hemocele		Exoesqueleto	
	Contenido proteico (%)	Cantidad muestra (g)	Porcentaje proteico (%)	Cantidad muestra (g)	Porcentaje proteico (%)	Cantidad muestra (g)
<i>Hermetia illucens</i>	33	0,909	17	1,760	30	1
<i>Musca domestica</i>	49,6	0,6048	48	0,625	63	0,488
<i>Tenebrio molitor</i>	38,81	0,772	14,35	2,090	63,15	0,476

-Una vez completados los 100 minutos de fase ácida gástrica, se enfriaron las muestras hasta llegar a unos 25°C y se procedió al ajuste de pH con hidróxido de sodio (NaOH) 20 % hasta un pH de 8.

- Fase 2° (Fase básica intestinal): se adicionó 20 mL de tampón fosfato 3,2 M para mantener el pH a 8 durante la fase básica intestinal. Tras ello, se vuelve a llevar a 37°C los matraces y se recogió la toma “blanco” de esta fase, añadiendo a continuación 80 mg de

pancreatina para dar comienzo a la reacción de hidrólisis de proteínas y recogiendo las muestras pertinentes.

-Una vez completados los 180 minutos de la fase básica intestinal se filtra el contenido de cada uno de los matraces para después secar el material restante tras la digestión *in vitro*, para más tarde determinar su contenido de nitrógeno.

3.3. Análisis realizados

Para evaluar la digestibilidad de las proteínas se realizaron dos análisis diferentes:

- Determinación de los grupos aminos
- El balance del contenido en nitrógeno

3.3.1. Determinación de grupos amino libres.

Para la determinación de grupos amino libres primero se centrifugaron las muestras a 1500 rpm durante 15 minutos. Después se utilizó el reactivo o-fluoraldehído (OPA), este por presencia del 2-mercaptoetanol (reductor fuerte) y a pH básico entre 9-11 reacciona con los aminoácidos dando lugar a derivados isoindólicos fluoróforos, la detección de estos se realizó por medio de espectrofotometría a 280 nm en un espectrofotómetro UV-VIS Power Wavex ((Bio-Tek Instruments, Winooski, EEUU) en placas de 96 pocillos (UV-star, Greiner Bio-One, Frikenhausen, Alemania) a 25 °C. En cada uno de los pocillos de la placa para la lectura espectrofotométrica se añadió 190 µL de reactivo OPA y 10 µL de muestra. Se preparó así mismo una curva patrón con glicina en un rango de 6 concentraciones distintas.

En la Tabla 3 vemos descritos los componentes del reactivo OPA utilizado para 25 mL finales.

Tabla 3. Componentes del reactivo OPA y sus cantidades

Componentes	Cantidades
Tetraborato sódico 100 mM	12,5 mL
SDS 20%	1,25 mL
OPA	20 mg
Metanol	1 mL
B-mercaptoetanol	50 µL
H ₂ O destilada	10,25 mL

3.3.2. Balance del contenido en nitrógeno.

El método utilizado para la medición de nitrógeno final tras la digestión *in vitro*, fue el procedimiento Kjeldahl (AOAC, 2005), en el cual las muestras se mineralizaron con ácido sulfúrico con la utilización de un digestor Büchi, dándose sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) que en exceso de hidróxido de sodio (NaOH) libera amoniaco (NH₃). Dicho amoniaco finalmente se valora con ácido clorhídrico (HCl) para determinar el nitrógeno total de la muestra analizada.

Se evalúa así la diferencia entre la cantidad de nitrógeno ingerido y la cantidad de nitrógeno presente en el sustrato final no digerido. Se emplea fórmula:

$$\text{Digestibilidad (\%)} = (A - B) / A \times 100 \%$$

donde A es el contenido de N de la muestra original previa a la digestión, y B es el contenido de N de la muestra final después de la digestión

Todo el procedimiento descrito, tanto la digestión *in vitro* como los análisis realizados, se llevaron a cabo también con harina de pescado y harina de soja, para así utilizar estas muestras como referencia.

4. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente utilizando un análisis de predicción IBM SPSS Statistics v.20. Como los datos no mostraron una distribución normal, se procedió a utilizar el método no paramétrico, concretamente el análisis de varianza Kruskal-Wallis. Aunque como criterio usual en las publicaciones científicas se asume un nivel de significación del 0,05, debido a la complejidad del proceso y limitantes de capacidad del laboratorio, sólo pudo realizarse un duplicado de cada análisis, lo que creemos que provoca que en muchos casos que la variabilidad intragrupo enmascare las diferencias entre grupos, aunque aparentemente se aprecien diferencias. Por eso, se consideró interesante, asumir, en los análisis sobre liberación de grupos aminos, un nivel de significación de 0,1. Aunque somos conscientes de en estos casos la probabilidad de cometer el error tipo I (rechazar la hipótesis nula cuando es verdadera) es del doble (del 10%), esto nos permitió realizar las comparaciones de media por pares en esos casos.

5. Resultados

5.1. Hidrólisis proteica de los diferentes insectos y sus fracciones

5.1.1. Dinámica de liberación de grupos amino libres de las diferentes fracciones de los insectos

5.1.1.1. *Hermetia illucens*

Observamos como, cabría esperar, los grupos amino libres aumentan a lo largo del tiempo en la fase ácida de la digestión *in vitro* de las diferentes fracciones analizadas de *Hermetia illucens*, comprobándose como la fracción de hemocele es la que finalmente proporciona mayores aminoácidos libres, seguido por el insecto entero y por último la fracción de exoesqueleto (*Figura 6*). Aunque en el insecto entero y en el exoesqueleto la liberación de aminoácidos parece permanecer constante, en el hemocele esta liberación parece estar todavía en crecimiento.

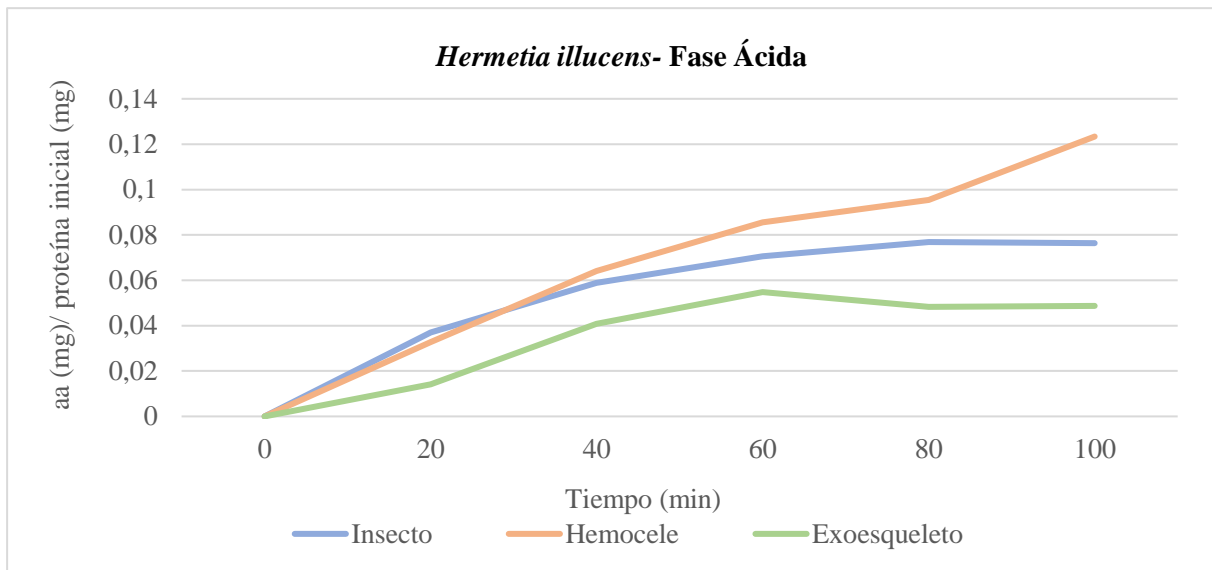


Figura 6. Grupos amino libres, expresados en mg de aminoácidos entre mg de proteína inicial, de las diferentes fracciones de *Hermetia illucens* analizadas (Insecto entero, hemocele y exoesqueleto) a lo largo de 100 minutos en la fase ácida de la digestión *in vitro*.

Similarmente, en la fase básica de la digestión *in vitro* también se produce un aumento de concentración de grupos amino libres a lo largo del tiempo pudiéndose ver como este aumento se estabiliza en el insecto entero y en el hemocele, pero no parece tan claro en el exoesqueleto. Al igual que en la anterior fase la fracción de hemocele es la que proporciona mayores aminoácidos libres, no apreciándose diferencias de estos entre el exoesqueleto y el insecto entero (Figura 7). Aunque todo esto será estudiado con mayor profundidad en los próximos apartados.

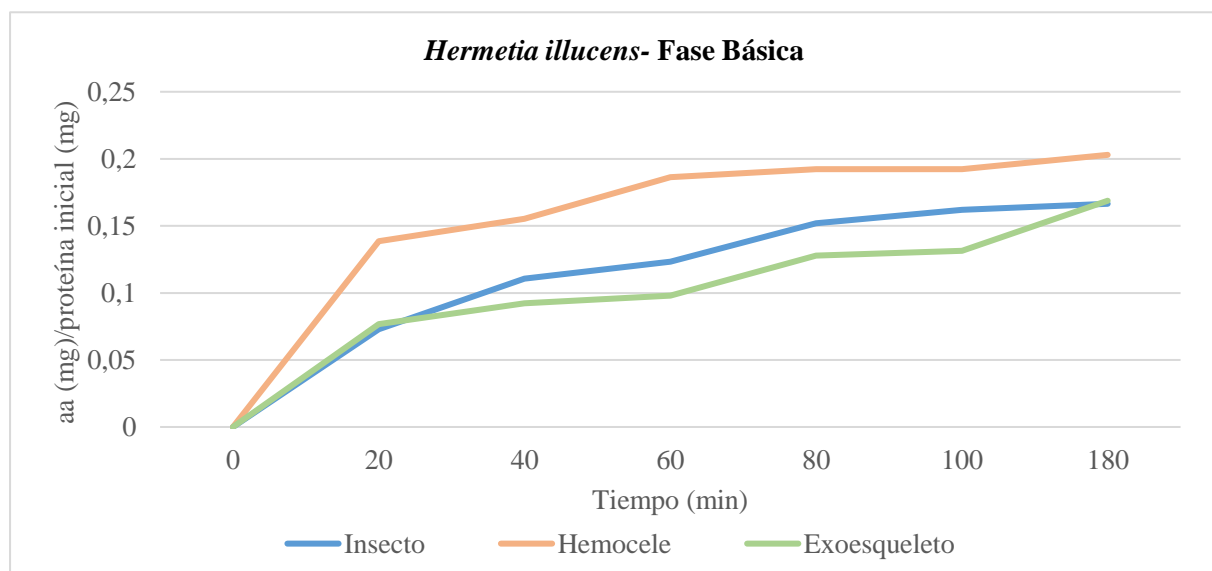


Figura 7. Grupos amino libres, expresados en mg de aminoácidos entre mg de proteína inicial, de las diferentes fracciones de *Hermetia illucens* analizadas (Insecto entero, hemocele y exoesqueleto) a lo largo de 180 minutos en la fase básica de la digestión *in vitro*.

5.1.1.2. *Musca domestica*

Observamos como los grupos amino libres aumentan hasta llegar a una fase de estabilización en la fase ácida de la digestión de las diferentes fracciones analizadas de *Musca domestica*, comprobándose como la fracción de hemocele es la que finalmente proporciona

mayores aminoácidos libres, siendo muy similar la liberación en el insecto entero y por último la fracción de exoesqueleto (Figura 10).

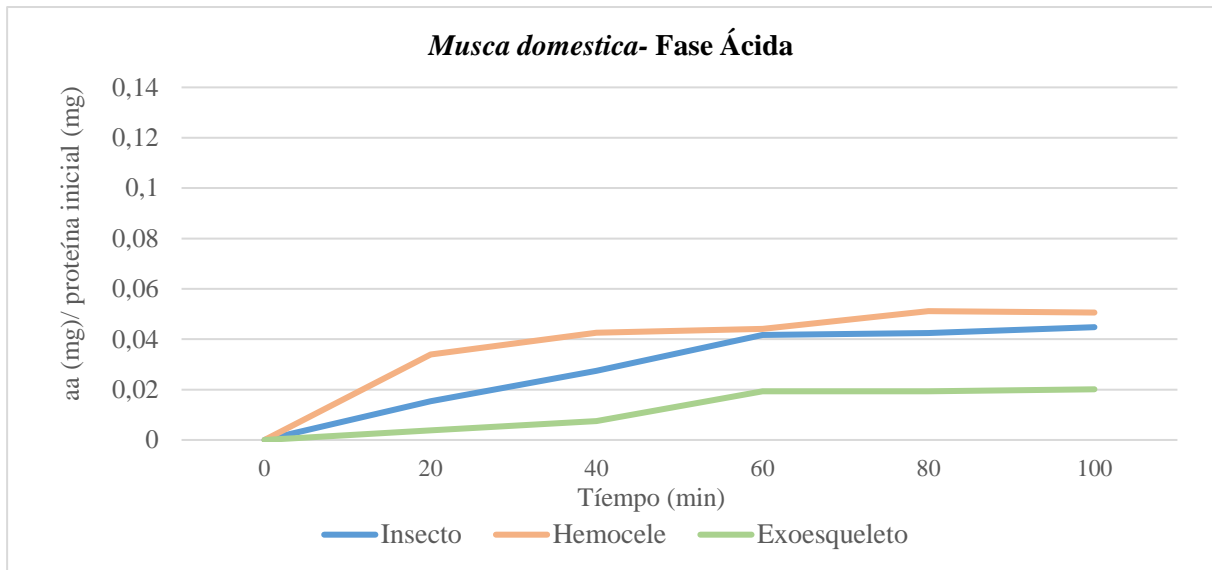


Figura 8. Grupos amino libres, expresados en mg de aminoácidos entre mg de proteína inicial de las diferentes fracciones de *Musca domestica* analizadas (Insecto entero, hemocele y exoesqueleto) a lo largo de 100 minutos en la fase ácida de la digestión *in vitro*.

Por otro lado, en la fase básica de la digestión *in vitro* también se produce un aumento de aminoácidos a lo largo del tiempo pudiéndose ver como este aumento se estabiliza en las tres fracciones. Finalmente, los grupos aminoácidos libres son muy parecidos en las fracciones de hemocele y del insecto entero, estando la fracción de exoesqueleto por debajo de estas dos (Figura 11).

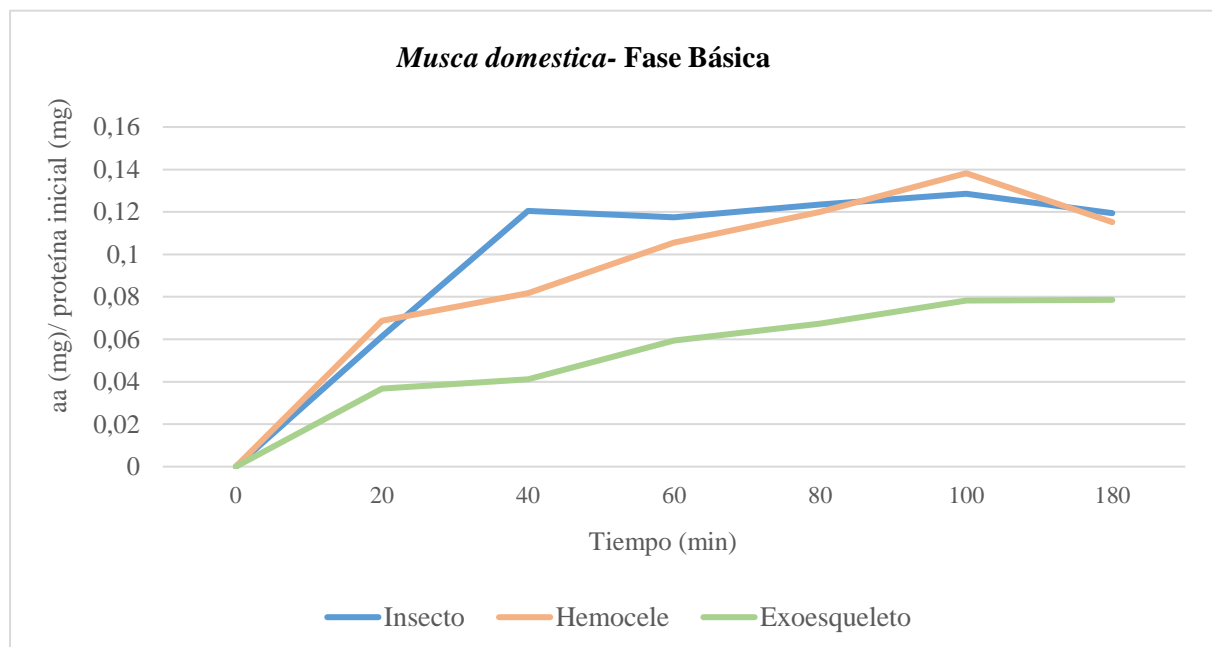


Figura 9. Grupos amino libres, expresados en mg de aminoácidos entre mg de proteína inicial, de las diferentes fracciones de *Musca domestica* analizadas (Insecto entero, hemocele y exoesqueleto) a lo largo de 180 minutos en la fase básica de la digestión *in vitro*.

5.1.1.3. *Tenebrio molitor*

Observamos como los grupos amino libres aumentan a lo largo del tiempo en la fase ácida de la digestión *in vitro* de las diferentes fracciones analizadas de *Tenebrio molitor*, no apreciándose diferencias en los grupos amino libres producidos a partir de las tres fracciones analizadas en comparación al insecto entero (*Figura 8*).

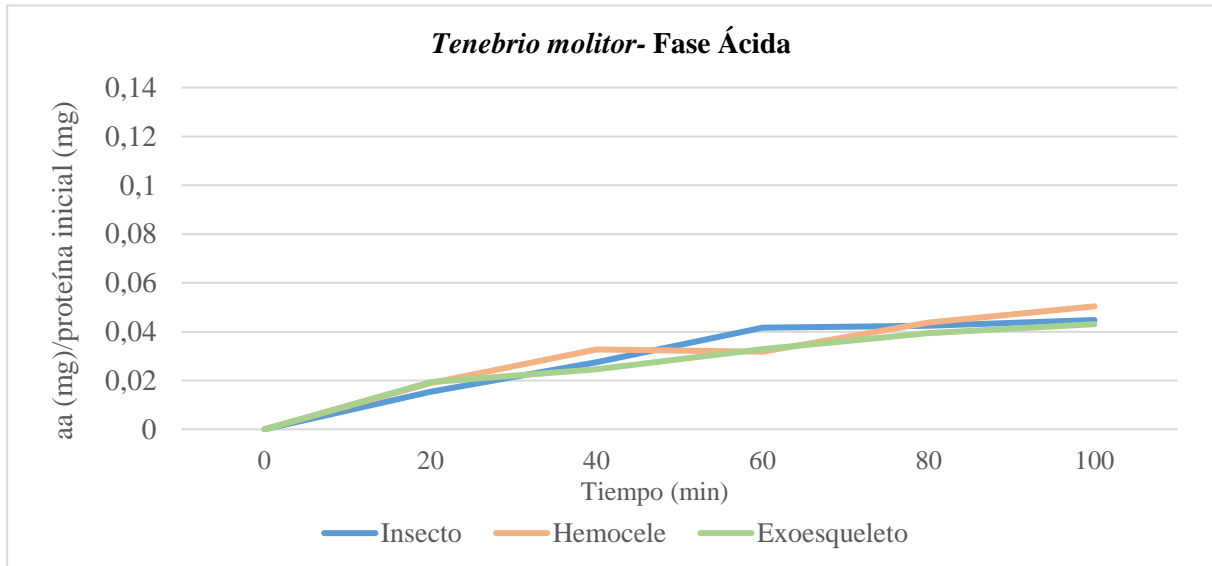


Figura 10. Grupos amino libres, expresados en mg de aminoácidos entre mg de proteína inicial, de las diferentes fracciones de *Tenebrio molitor* analizadas (Insecto entero, hemocele y exoesqueleto a lo largo de 100 minutos en la fase ácida de la digestión *in vitro*).

Por otro lado, en la fase básica de la digestión *in vitro* también se produce un aumento de aminoácidos a lo largo del tiempo pudiéndose ver como este aumento se estabiliza en las tres fracciones. Al igual que en la anterior fase la fracción el hemocele y el insecto entero proporciona mayor cantidad de aminoácidos libres, estando el exoesqueleto por debajo de estas (*Figura 9*).

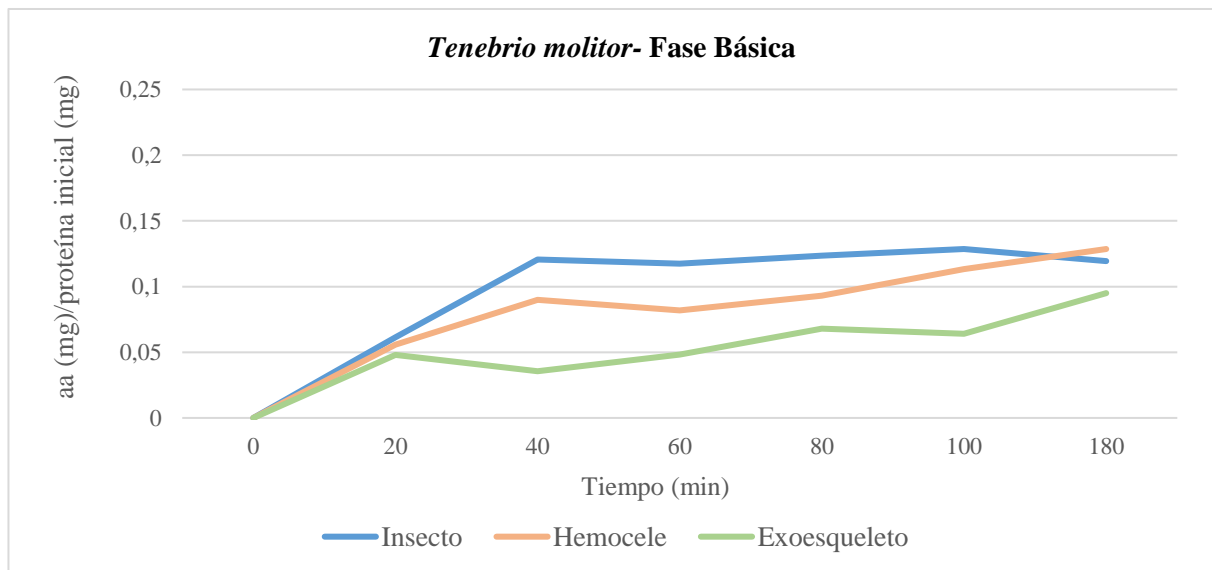


Figura 11. Grupos amino libres, expresados en mg de aminoácidos entre mg de proteína inicial de las diferentes fracciones de *Tenebrio molitor* analizadas (Insecto entero, hemocele y exoesqueleto) a lo largo de 180 minutos en la fase básica de la digestión *in vitro*.

5.1.2. Comparación entre los insectos en el grado de hidrólisis proteica

La comparación entre los diferentes insectos y sus fracciones se llevó a cabo primero analizando el punto final de fase ácida (t=100 min) y de la fase básica (t=180 min), y posteriormente la digestión completa que corresponde con la suma de la concentración de grupos amino libres de las dos fases (ácida y básica). Y para tener un valor de referencia, tal como se indicó en material y métodos, se han utilizado la harina de pescado y de soja.

5.1.2.1. Insecto entero

Observamos como en la comparación de los insectos, harina de pescado y de soja, en el punto final de la fase ácida, encontramos diferencias significativas. *Hermetia illucens* es el que mayor concentración de grupos amino ha proporcionado teniendo diferencias significativas con el resto, de los cuales *Tenebrio molitor*, *Musca domestica* y la harina de pescado no presentan diferencias significativas entre ellos, pero sí con la harina de soja (Figura 12).

En cuanto a la fase básica no encontramos diferencias significativas entre las fracciones de insecto entero ni entre estos y las harinas analizadas (Figura 12).

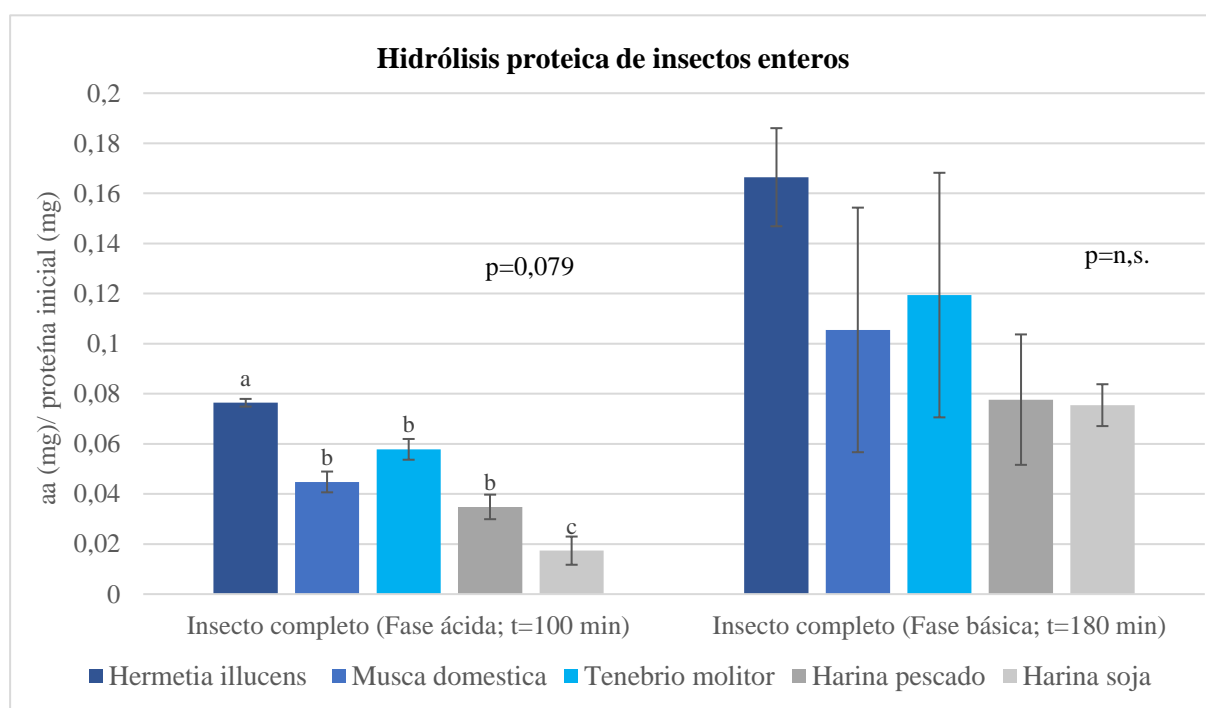


Figura 12. Comparación en el grado de hidrólisis (medida mg de aminoácidos liberados entre mg de proteína inicial), tras la hidrólisis enzimática, de los insectos *Hermetia illucens*, *Musca domestica* y *Tenebrio molitor*, harina de pescado y harina de soja, en el punto final de la fase y en el punto final de la fase básica.

En la comparación de la digestión completa de lo de los insectos no encontramos diferencias significativas. Sin embargo, aparentemente la *Hermetia illucens* presenta una mayor proporción de grupos amino libres, aunque posiblemente la alta variabilidad en las réplicas ha impedido determinar diferencias significativas (Figura 13).

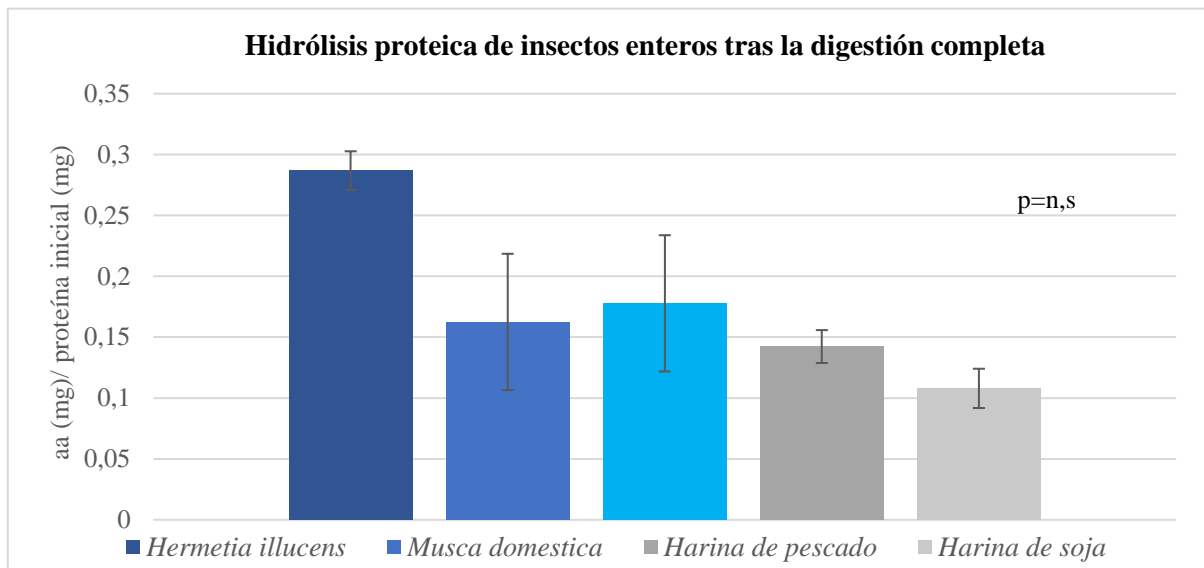


Figura 13. Comparación en el grado de hidrólisis (medida en mg de aminoácidos liberados entre mg de proteína inicial), tras la hidrólisis enzimática de los insectos *Hermetia illucens*, *Musca domestica* y *Tenebrio molitor*, harina de pescado y harina de soja, tras la digestión completa (suma de fase ácida y fase básica).

5.1.2.2. Hemocele

Observamos como en la comparación de la fracción de hemocele de los insectos analizados y la harina de pescado y de soja, en el punto final de la fase ácida, encontramos diferencias significativas. El hemocele de *Hermetia illucens* es el que mayor concentración de grupos amino ha proporcionado teniendo diferencias significativas con el resto, los cuales entre ellos no las presentan. En cuanto a la fase básica no encontramos diferencias significativas entre los hemoceles de insectos, ni entre estos y las harinas analizadas (Figura 14).

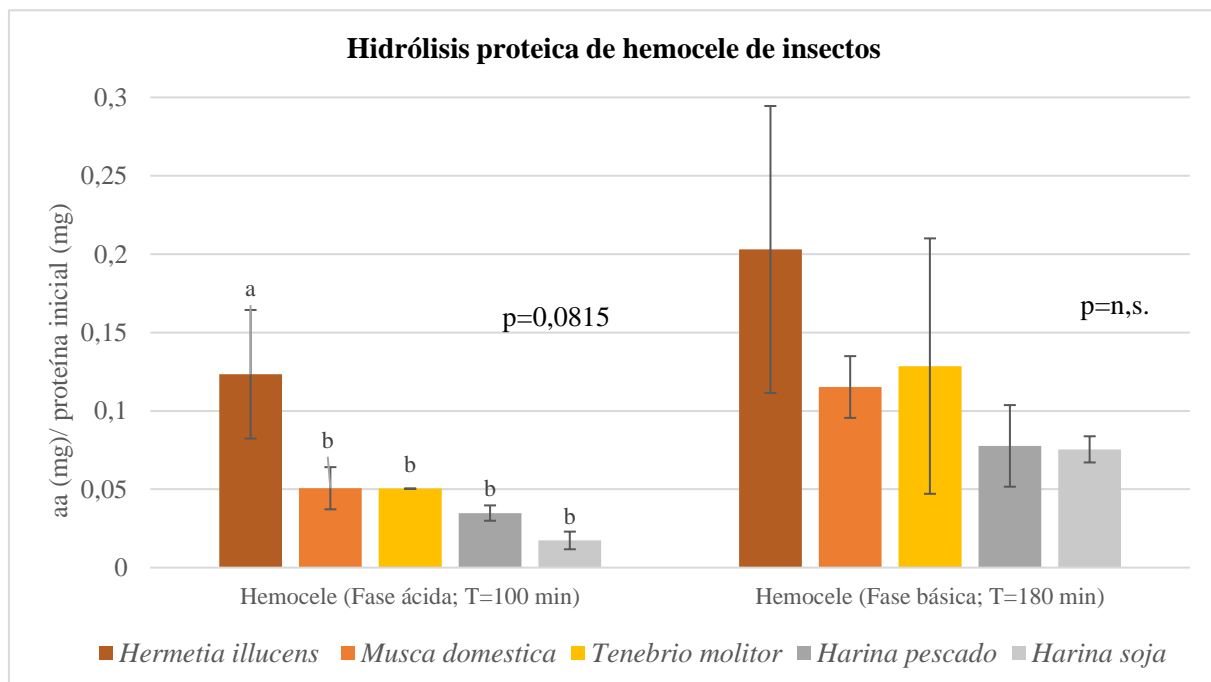


Figura 14. Comparación en el grado de hidrólisis (medida en mg de aminoácidos liberados entre mg de proteína inicial), tras la hidrólisis enzimática de los hemoceles de *Hermetia illucens*, *Musca domestica* y *Tenebrio molitor*, harina de pescado y harina de soja, en el punto final de la fase ácida y en el punto final de la fase básica.

En la comparación de la digestión completa de los hemoceles de los insectos y harinas analizadas encontramos diferencias significativas. El exoesqueleto de *Hermetia illucens* es el que mayor proporción de grupos amino libres ha generado, presentando diferencias significativas con el de *Musca doméstica*, la harina de soja y la harina de pescado. Entre el resto de los grupos no encontramos diferencias significativas (*Figura 15*).

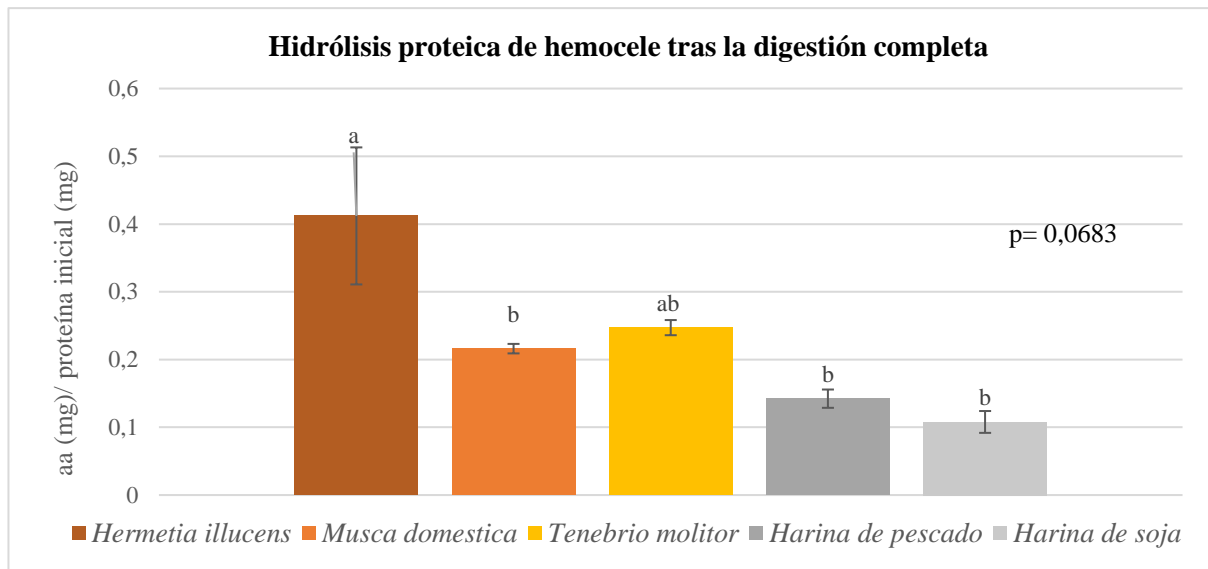


Figura 15. Comparación en el grado de hidrólisis (medida en mg de aminoácidos liberados entre mg de proteína inicial), tras la hidrólisis enzimática de los hemoceles de *Hermetia illucens*, *Musca domestica* y *Tenebrio molitor*, harina de pescado y harina de soja, tras la digestión completa (suma de fase ácida y fase básica).

5.1.2.3. Exoesqueleto

En la comparación de la fracción de exoesqueleto de los diferentes insectos analizados y la harina de soja y harina de pescado, en el punto final de la fase ácida encontramos diferencias significativas. El exoesqueleto de *Hermetia illucens* es el que ha proporcionado mayor concentración de grupos amino libres con diferencias significativas con el exoesqueleto de *Musca doméstica* y con la harina de soja (*Figura 16*).

En el caso de la fase básica, no encontramos diferencias significativas entre la fracción de exoesqueleto de los insectos analizados y la harina de soja y harina de pescado. Aún así el exoesqueleto de *Hermetia illucens*, aparentemente libera una mayor concentración de grupos amino libres (*Figura 16*).

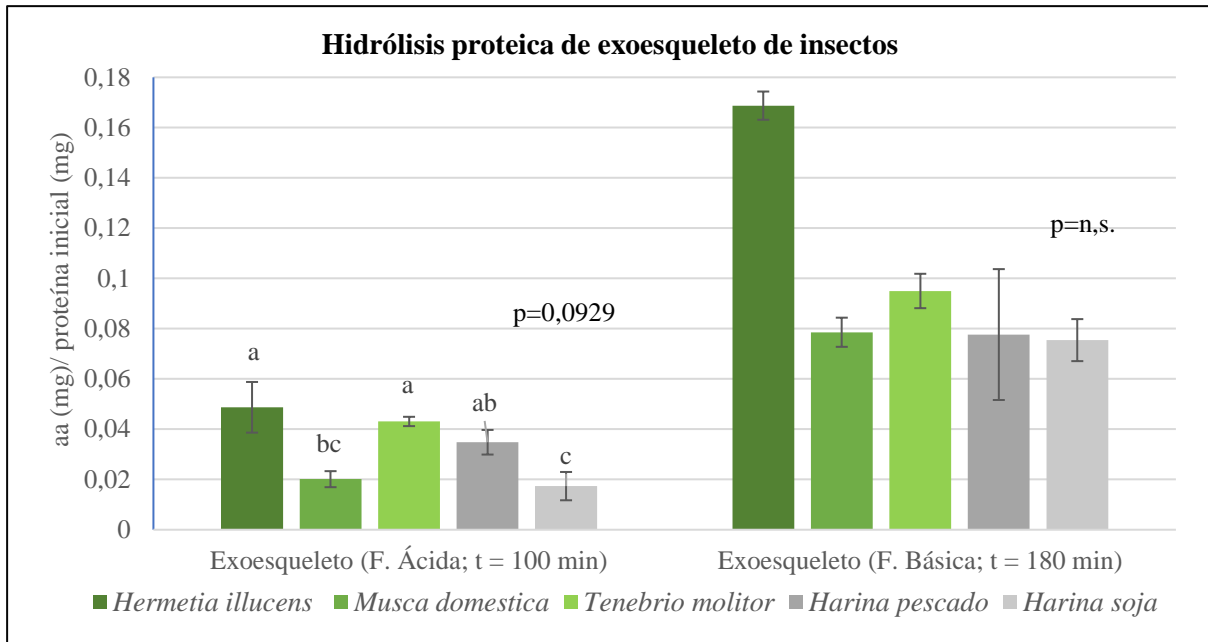


Figura 16. Comparación en el grado de hidrólisis (medida en mg de aminoácidos entre mg de proteína inicial), tras la hidrólisis enzimática de los exoesqueletos de *Hermetia illucens*, *Tenebrio molitor* y *Musca domestica*, harina de pescado y harina de soja, en el punto final de la fase ácida y el en el punto final de la fase básica.

En la comparación de la digestión completa de los exoesqueletos de los insectos y harinas analizadas encontramos diferencias significativas. El exoesqueleto de *Hermetia illucens* es el que mayor proporción de grupos amino libres ha generado, presentando diferencias significativas con la harina de soja, que representa el valor más bajo. Entre el resto de grupos no encontramos ninguna diferencia significativa (Figura 17).

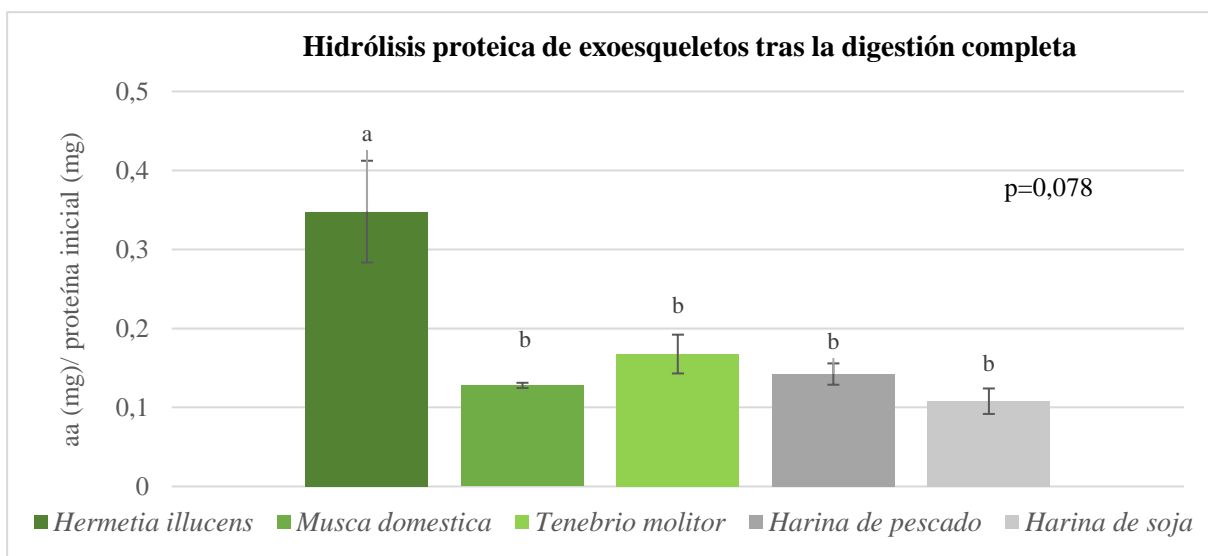


Figura 17. Comparación en el grado de hidrólisis (medida en mg de aminoácidos entre mg de proteína inicial), tras la hidrólisis enzimática de los exoesqueletos de *Hermetia illucens*, *Tenebrio molitor* y *Musca domestica*, harina de pescado y harina de soja, tras la digestión completa (suma de fase ácida y fase básica).

5.1.3. Comparación del grado de hidrólisis entre el insecto entero y sus fracciones.

Al igual que en el apartado anterior, para realizar estas comparaciones se han utilizado los datos de los puntos finales tanto de la fase ácida, de la fase básica y la digestión completa (fase ácida más fase básica).

5.1.3.1. *Hermetia illucens*

Aunque aparentemente el hemocele *Hermetia illucens* sea la fracción que mayor proporción de grupos amino libres ha dado, en comparación con el insecto entero y el exoesqueleto, sin embargo, no hemos encontrado diferencias significativas ni en la fase ácida ni en la fase básica (Figura 18).

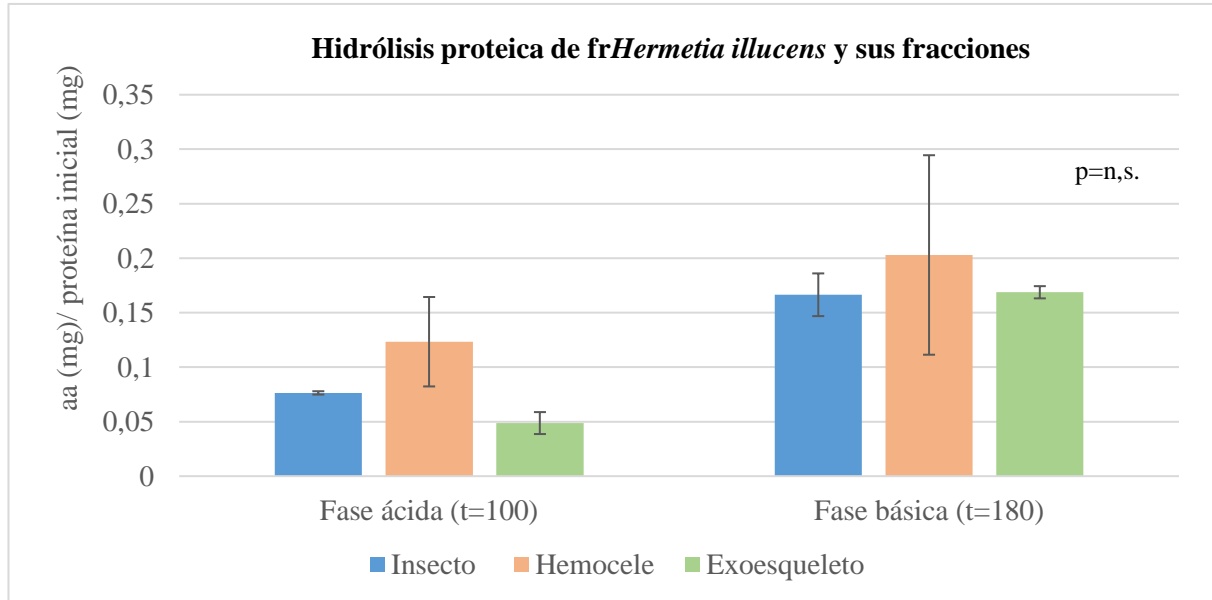


Figura 18. Comparación en el grado de hidrólisis (medida en mg de aminoácidos liberados entre mg de proteína inicial), tras la hidrólisis enzimática de las fracciones insecto entero, hemocele y exoesqueleto, de *Hermetia illucens* en el punto final de la fase ácida y el punto final de la fase básica.

Similarmente al evaluar la digestión completa de *Hermetia illucens* tampoco encontramos diferencias significativas entre el insecto entero y sus fracciones, aunque parezca mayor la hidrólisis del hemocele (Figura 19).

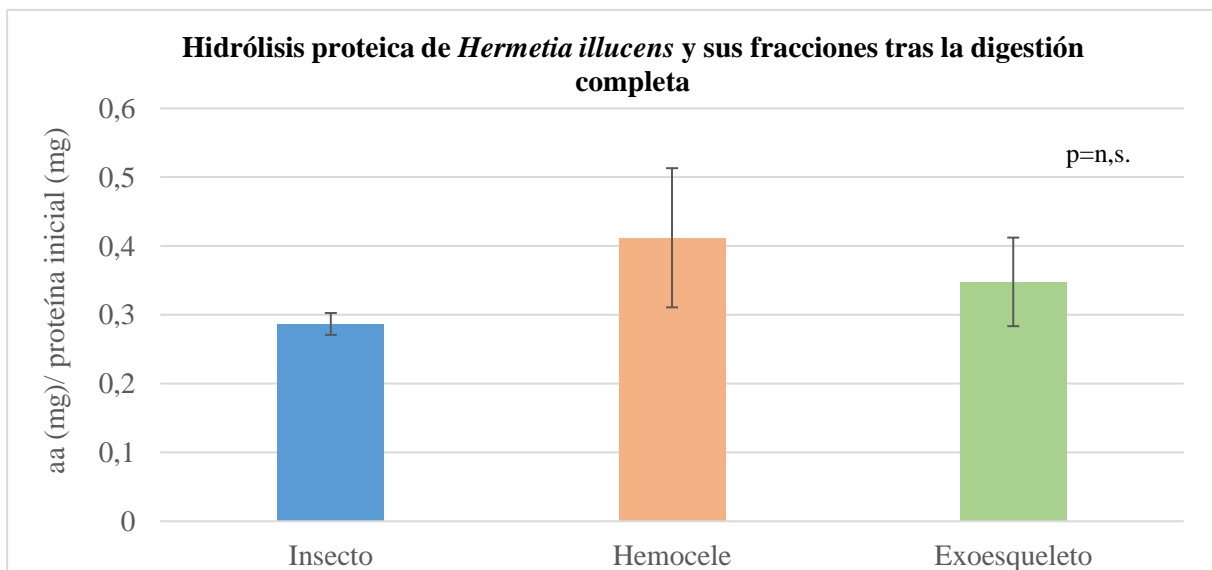


Figura 19. Comparación en el grado de hidrólisis (medida en mg de aminoácidos liberados entre mg de proteína inicial), tras la hidrólisis enzimática de *Hermetia illucens* y sus fracciones hemocele y exoesqueleto, tras la digestión completa (fase ácida más fase básica de la digestión completa).

5.1.3.2. *Musca domestica*

En el otro díptero *Musca domestica*, en la hidrólisis ácida hemos obtenido unos resultados muy similares entre el insecto entero y sus dos fracciones. Por otro lado, en el punto final de la fase básica de la digestión *in vitro* tampoco encontramos diferencias significativas, aunque parece que el exoesqueleto del insecto proporciona la mayor concentración de grupos amino libres (Figura 20).

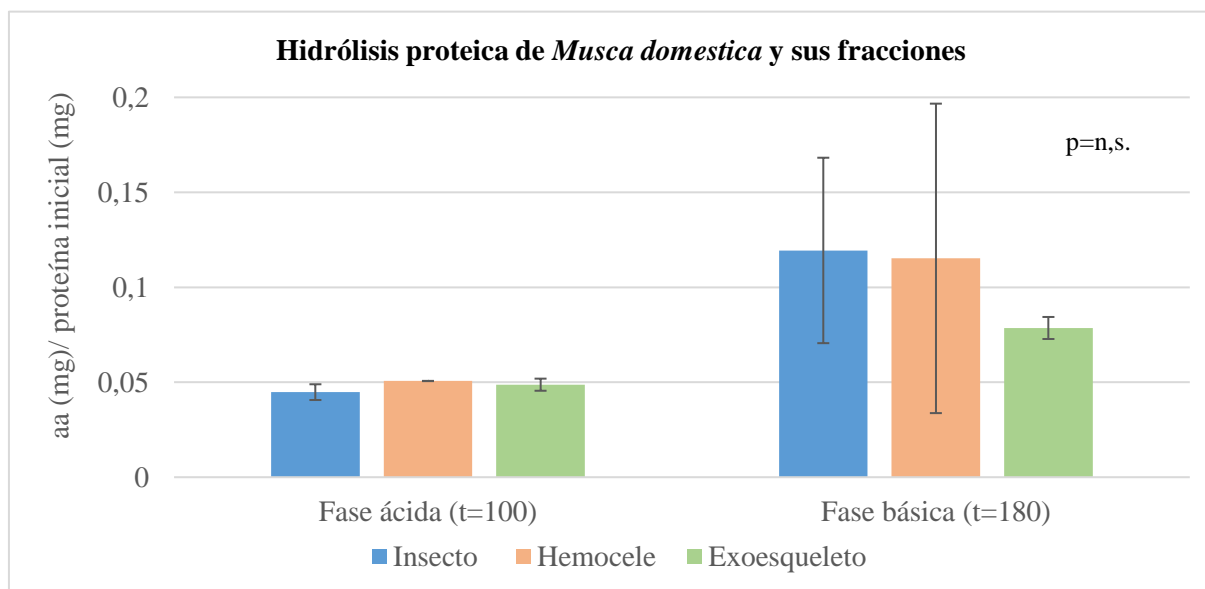


Figura 20. Comparación en el grado de hidrólisis (medida en mg de aminoácidos liberados entre mg de proteína inicial), tras la hidrólisis enzimática de las fracciones insecto entero, hemocele y exoesqueleto, de *Musca domestica* en el punto final de la fase ácida y el punto final de la fase básica.

En la hidrólisis completa de *Musca domestica* no encontramos diferencias significativas entre el insecto entero y las fracciones analizadas. Aparentemente, la fracción de hemocele es la que más grupos amino libera, seguida del insecto entero y finalmente el exoesqueleto (Figura 19).

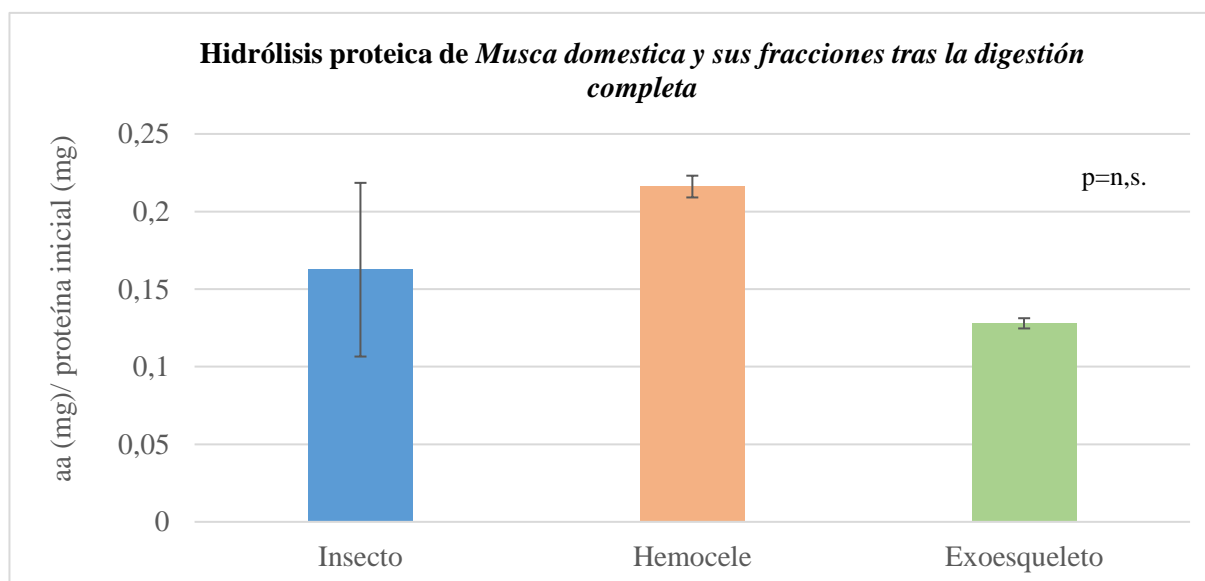


Figura 21. Comparación en el grado de hidrólisis (medida en mg de aminoácidos entre mg de proteína inicial), tras la hidrólisis enzimática de *Musca domestica* y sus fracciones hemocele y exoesqueleto, tras la digestión completa (fase ácida más fase básica).

5.1.3.3. *Tenebrio molitor*

Los resultados obtenidos en *Tenebrio molitor* han seguido la misma tendencia que las dos especies anteriores. No observándose diferencias significativas entre el insecto entero y sus fracciones, ni en la fase ácida de la digestión *in vitro*, ni en la fase básica (Figura 22).

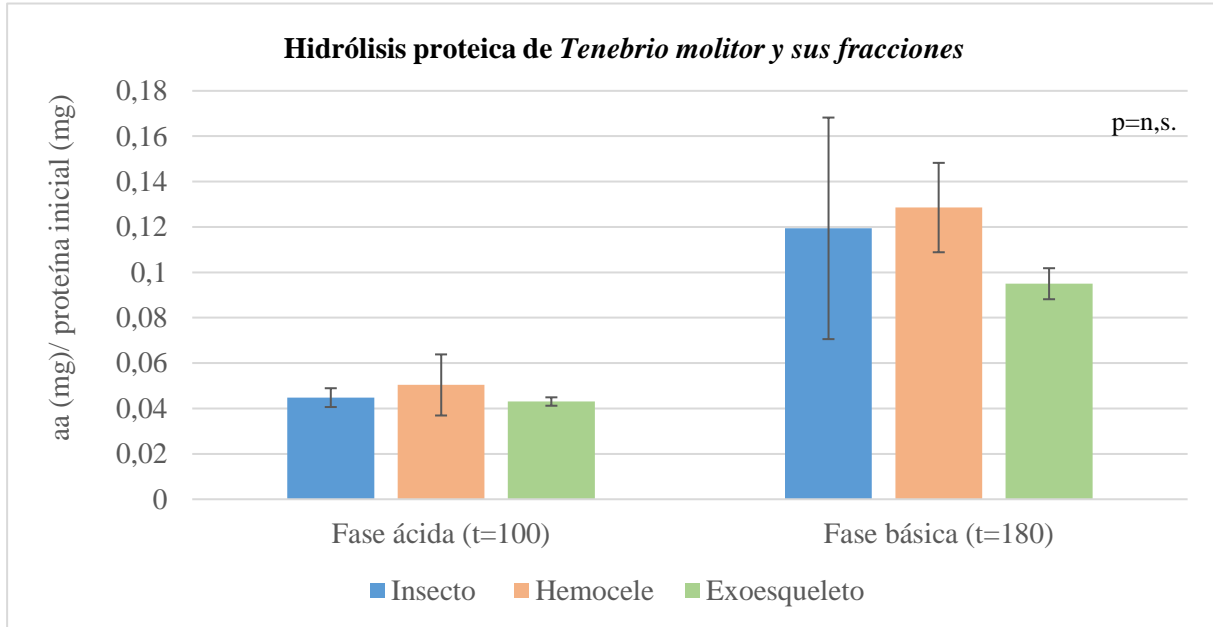


Figura 22. Comparación en el grado de hidrólisis (medida en mg de aminoácidos liberados entre mg de proteína inicial), tras la hidrólisis enzimática *Tenebrio molitor* y sus fracciones hemocele y exoesqueleto, en el punto final de la fase ácida y el punto final de la fase básica.

En la hidrólisis completa de *Musca domestica* vemos que aparentemente la fracción de hemocele es la que más aminoácidos libera, aunque, como en los insectos anteriores, tampoco encontramos diferencias significativas (Figura 23).

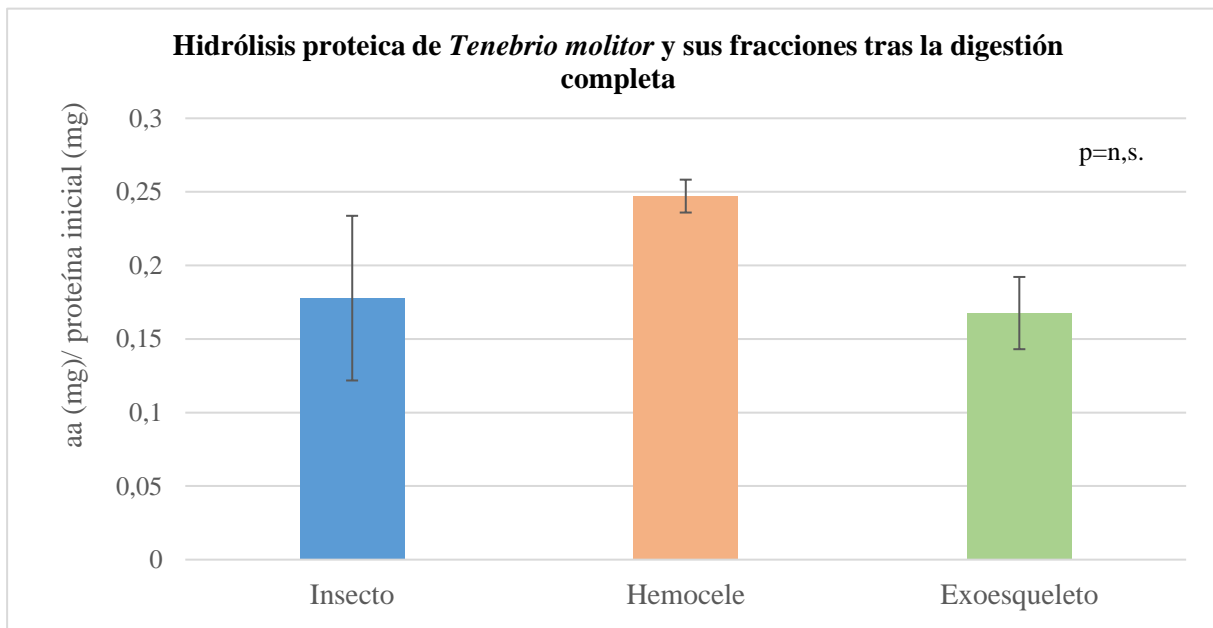


Figura 23. Comparación en el grado de hidrólisis (medida en mg de aminoácidos liberados entre mg de proteína inicial), tras la hidrólisis enzimática de *Musca domestica* y sus fracciones hemocele y exoesqueleto tras la digestión completa (fase ácida más fase básica).

5.2. Balance del contenido en nitrógeno de los insectos analizados.

Al evaluar el balance del nitrógeno, nitrógeno que resta en las muestras tras la hidrólisis (Figura 24), encontramos, en general, unas digestibilidades elevadas, y con diferencias significativas entre los insectos y fracciones, con relación a las harinas de soja y de pescado.

Si nos centramos en los insectos enteros, tanto *Musca domestica* (93,8 %) como *Tenebrio molitor* (97 %) presentan una digestibilidad similar a las harinas de soja y pescado, mientras que *Hermetia illucens*, aunque muy elevada, muestra una digestibilidad menor (88,6 %).

Dentro de *Hermetia illucens*, podemos observar como el hemocele presenta la mayor digestibilidad de nitrógeno final, mientras que la menor digestibilidad se aprecia en el exoesqueleto. Igualmente, en *Musca domestica* la digestibilidad del exoesqueleto es muy inferior al insecto entero y al hemocele. Sin embargo, en *Tenebrio molitor* es el insecto entero la que presenta mayor digestibilidad de nitrógeno y, sorprendentemente sin diferencias significativas con el hemocele y el exoesqueleto.

Otro aspecto a destacar es que la digestibilidad de los exoesqueletos de *Hermetia illucens* y *Musca domestica* son significativamente menores al de *Tenebrio molitor* (Figura 24).

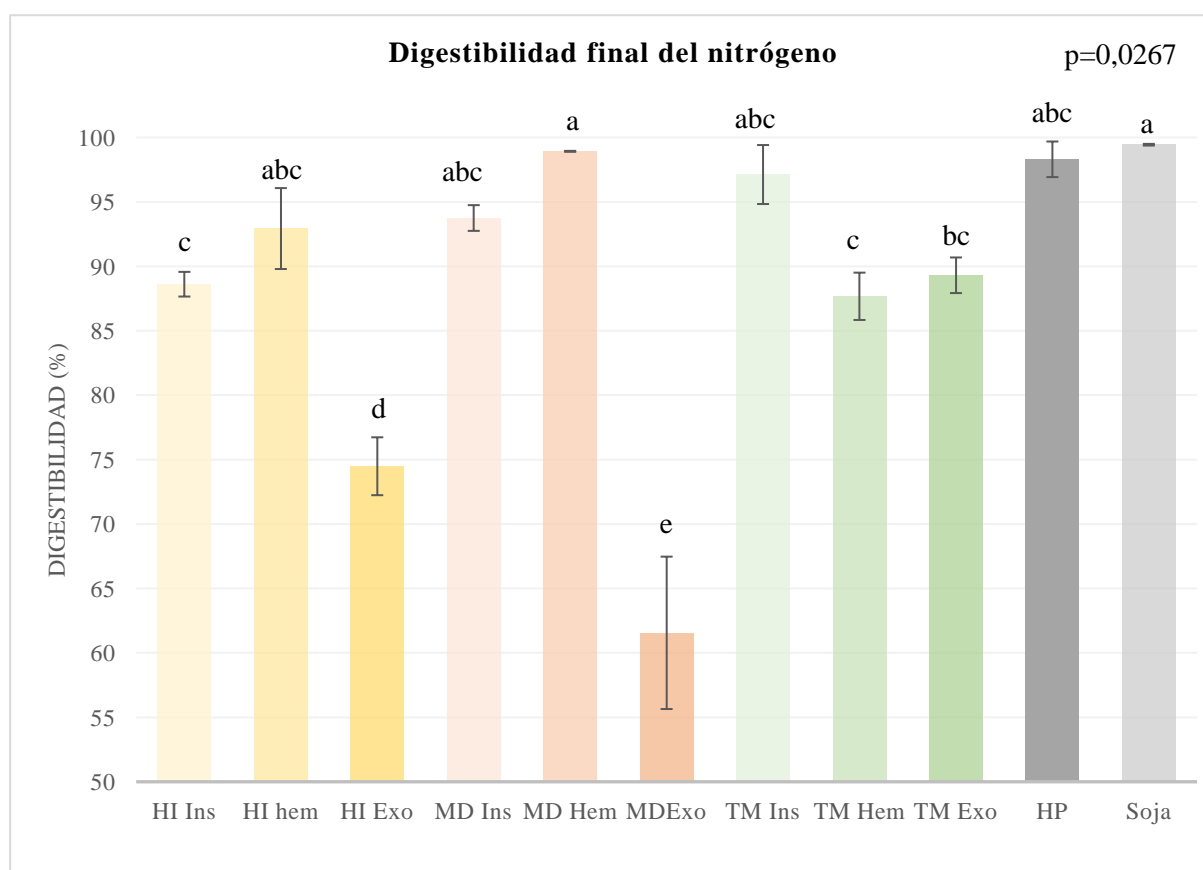


Figura 24. Digestibilidad de la proteína (medida por el balance del nitrógeno), de los insectos *Hermetia illucens* (HI), *Musca domestica* (MD) y *Tenebrio molitor* (TM) y sus fracciones hemocele y exoesqueleto, además de harina de pescado (HP) y harina de soja.

6. Discusión

Los insectos pueden llegar a suponer una alternativa alimenticia para evitar muchos de los problemas derivados de la producción de alimentos, no solo en términos de alimentación animal sino también para el ser humano. Así, aunque ya se encuentran incluidos en la dieta de muchos animales e incluso de personas de diferentes zonas del planeta, se hace necesario su estudio para comprobar su viabilidad como alimentos para que así mediante el mayor conocimiento de estos, se puedan ir rebajando los estigmas negativos que por ejemplo la sociedad occidental tiene sobre ellos.

Las proteínas son esenciales para el correcto funcionamiento y mantenimiento de los organismos, por ello deben encontrarse presente en su dieta diaria. La proteína animal aporta aminoácidos esenciales, y aunque, no se contemple normalmente a los insectos como alimentos, estos son ricos en proteína animal de alto valor biológico. De esta manera, el estudio sobre la calidad de los insectos como alimento debe incluir análisis proteicos, y en nuestro caso el análisis de su digestibilidad proteica, ya que esto nos permitirá evaluar su biodisponibilidad.

En nuestro estudio hemos abordado esta biodisponibilidad desde dos enfoques diferentes, pero complementarios. En primer lugar, hemos estudiado la liberación de aminoácidos que se produce durante la hidrólisis proteica enzimática, medido como liberación de grupos amino (OPA), tanto durante la digestión ácida como la básica. Y en segundo lugar hemos evaluado el balance de nitrógeno final, entendido como nitrógeno que resta en las muestras del nitrógeno inicial, tras la hidrólisis.

Con el análisis OPA comprobamos como la dinámica general de los insectos analizados, tanto en la fase ácida como en la fase básica, se produce una tendencia de aumento de la concentración de grupos amino libres hasta un punto en el que la concentración comienza a verse constante. En algunos casos esta meseta de concentración no llega a apreciarse tan bien como en otro, sino que la concentración sigue aumentando, esto parece indicar que los tiempos tanto de la fase ácida como de la fase básica deberían de aumentarse para que cada muestra analizada llegue a esa meseta de concentración, aun así, podemos ver la tendencia y comprobar así la idoneidad del proceso de digestión *in vitro* seguido.

Al comparar el grado de hidrólisis completa (fase ácida más básica) de los insectos, hemos comprobado como la *Hermetia illucens* es el insecto que se destaca, al tener una mayor liberación de aminoácidos con relación a los otros dos insectos y las harinas de referencia, que no muestran diferencias entre ellas. Este hecho en sí es destacable, ya que los insectos parecen mostrar tanta biodisponibilidad de sus proteínas como las harinas de pescado y de soja.

Son muy escasos los estudios que han abordado el grado de hidrólisis proteica de los insectos mediante la liberación de grupos amino. Así, en los dípteros no hay ningún estudio sobre *Musca domestica*, y el único dato que hay sobre *Hermetia illucens* es de Janssen et al. (2019), con un grado de hidrólisis del 20%, aunque empleando la técnica pH-stat. Con relación a *Tenebrio molitor* existen valores similares a los nuestros obtenidos por Janssen et al. (2019), con 14,9 % de grado de hidrólisis mediante pH-stat, y unos resultados muy superiores, del 54%, observados por mediante OPA por Yi et al. (2016).

Al comparar, en cada especie de insecto, el grado de hidrólisis de las fracciones (hemocele y exoesqueleto) con el del insecto entero, hemos podido comprobar que no existen diferencias significativas entre ellas. Tal como indicamos anteriormente en el exoesqueleto la quitina se incrusta en una matriz de escleroproteína (Andersen et al., 1995), dificultando en gran medida su degradación y su absorción en las paredes intestinales (Vidanarachchi et al., 2010). Por tanto, a priori, cabría pensar que el hemocele sería la fracción más digestible al separar mecánicamente el exoesqueleto, que, en teoría, debería ser la fracción menos biodisponible, debido a la estructura del exoesqueleto; y, por tanto, el grado de hidrólisis del insecto entero debería estar en un valor intermedio. Aunque esta tendencia se aprecia en todos ellos, estas diferencias no llegan a ser significativas. Creemos que, la alta variabilidad dentro de cada tratamiento, impide mostrar la diferencia entre tratamiento, y, por tanto, pensamos que en futuros estudios las muestras deberían estar por triplicado o cuatuplicado.

Consideramos que es importante comprobar si la separación del exoesqueleto del insecto puede ser rentable para mejorar su digestibilidad, es decir, si el fraccionamiento de insectos en exoesqueleto y hemocele, con todo el proceso necesario para realizarlo, mejora a los insectos como alimento. Y aunque en este estudio no se ha llegado a demostrar, creemos que las tendencias apreciadas invitan a seguir en esta línea de trabajo, aunque, como hemos comentado, incrementando el esfuerzo analítico en laboratorio.

Sin embargo, podemos ver como los exoesqueletos de *Hermetia illucens* y *Tenebrio molitor* presentan en la digestión completa una mayor concentración de grupos amino libres que la harina de pescado y harina de soja, en cambio *Musca domestica* se encuentra por debajo de la harina de soja, lo que podría explicarse por el hecho de que para *Musca domestica* se utilizaron pupas, así Bosch et al. (2014) obtuvo una menor digestibilidad de la fase pupa (77,7 %) de *Hermetia illucens* que en su fase larvaria (89,7 %).

Hay numerosos factores que pueden condicionar la calidad de los insectos como alimentos, que van desde su propia fisiología hasta el proceso de tratamiento para prepararlos como alimento. Entre estos factores encontramos la etapa en el ciclo de vida que se encuentran viéndose grandes diferencias en la composición de los insectos según esta (Iaconisi et al., 2018; Severini et al., 2018).

Hay que decir también que la mejor digestibilidad del exoesqueleto varía según el paquete enzimático de la especie que los consume, numerosos animales basan su dieta en la ingesta de insectos, gracias a que presentan enzimas con capacidad de hidrolizar la quitina, como la quitinasa (EC 3.2.1.14), siendo una ventaja en la inclusión de insectos en dietas para la producción animal. Así, muchos peces presentan quitinasa en el sistema digestivo independientemente de los hábitos dietéticos (Smith et al., 1989), en cambio, el ser humano no parece digerir la quitina, pero los insectos llevan siendo consumidos por este desde la antigüedad, de hecho, hay estudios que han comprobado la presencia de enzimas quitinolíticas que tienen su procedencia en bacterias del tracto gastrointestinal (Paoletti et al., 2007; Duskova et al., 2011).

Por otro lado, extrayendo el exoesqueleto nos quedaría el hemocele, que, en este estudio, aunque presenta un mayor grado de hidrólisis, es decir, una mayor liberación de aminoácidos, no llega a ser significativa con respecto al insecto entero. Otros autores que han reducido la

proporción de exoesqueleto de grillo (*Gryllus assimilis*) con la eliminación manual de partes de este (patas y alas) o con su extracción a partir de disolventes químicos, y no obtuvieron tampoco diferencias significativas en la digestibilidad *in vitro* (Jayanegara et al., 2017).

Con relación al balance de nitrógeno (*Figura 19*) notamos como las harinas de pescado y de soja tienen los valores más elevados, lo que contrasta con los resultados obtenidos en el cálculo de los grupos amino libres en la digestión completa. Esto puede deberse a que el procedimiento Kjeldahl (AOAC, 2005), por el que se calcula el nitrógeno no solo mide el nitrógeno de los aminoácidos sino de todas las moléculas presentes en la muestra que lo contienen, aunque estas no estén disponibles biológicamente para los organismos.

Otro aspecto a resaltar es que los insectos parecen ser una alternativa adecuada a la harina de soja y harina de pescado en alimentación animal, al tener una digestibilidad similar. No obstante, es necesario tener en cuenta otros aspectos de los insectos, como su contenido proteico o en grasa, efecto alergénico de la quitina o la búsqueda de las mejores técnicas para optimizar su producción en masa.

Hermetia illucens, presenta una digestibilidad de la proteína muy elevada, porcentaje similar al observado por Huang et al. (2019) con un 90 %, Bosch et al. (2016) con un 81,6 % y Arango et al. (2014) con un 81,6 %. Pero *Musca domestica* y *Tenebrio molitor* muestran una digestibilidad aún superior, 93,8 % y 97,1 % respectivamente. Esta alta digestibilidad de *Musca domestica* es destacable, ya que como se ha indicado, en este estudio se ha utilizado la pupa de este díptero, y si comparamos con otros estudios, es superior o igual a valores obtenidos por otros autores tales como un 93,3 % (Bosch et al., 2016) y 73 % (Kovitvadhí et al., 2019), habiendo estos analizado el estadio larvario de *Musca domestica*.

En cuanto a la larva de *Tenebrio molitor* los estudios previos son más numerosos y con resultados más variables, desde 60 % (Mancini et al., 2021), 72,5 % (Poelaert et al., 2016), 85 % (Caparros et al., 2018) hasta un 92,5 % (Bosch et al., 2016), entre otros.

Aunque aparentemente la fracción del hemocele de los dípteros es superior, tampoco con el balance de nitrógeno podemos sacar conclusiones claras, ya que esas diferencias no llegan a ser significativas.

Pero lo que sí parece claro es que la fracción de exoesqueleto es, como cabría esperar, la fracción más indigestible, aunque sólo sea significativa en las dos moscas. *Musca domestica* es la que presenta una diferencia en la digestibilidad de la proteína entre el insecto entero (93,8%), y su exoesqueleto (61 %), lo que reitera la limitación de nitrógeno accesible de la quitina al estar el exoesqueleto de la pupa más quitinizado.

Aunque a simple vista, las larvas de *Tenebrio molitor* tiene el aspecto de una mayor dureza que las de *Hermetia illucens*, la digestibilidad del exoesqueleto de la larva del díptero es significativamente menor (¿74%?) que la del coleóptero (89,3%). Esto puede seguramente ratificar la relación con la concentración de quitina del exoesqueleto, ya que Finke (2013) determinó como en *Hermetia illucens* la quitina representaba un 5,4 % y en *Tenebrio molitor* un 2,8 %.

Por último, apuntar que, según los resultados obtenidos en este trabajo, en especies como *Tenebrio molitor*, el fraccionamiento no parece aportar una mejoría en la digestibilidad, y quizás, no tendría mucho sentido el esfuerzo y coste de este procesamiento. En los dípteros, *Hermetia illucens* y *Musca domestica* son necesarios estudios más amplios y profundos que confirmen si las mejoras aparentes en la digestibilidad del hemocele llegan a ser significativas para justificar la rentabilidad del fraccionamiento. Lo que sí parece claro es que los insectos enteros, debido a su similar digestibilidad de la proteína.

Con los resultados obtenidos podemos decir que los insectos parecen ser una alternativa adecuada a la harina de pescado y la harina de soja para la producción de piensos animales, y además que debido a la simulación de la digestión in vitro con enzimas, podemos decir que estos aportarían buenas concentraciones de aminoácidos disponibles para el organismo.

7. Conclusiones

1. Desde un punto de vista metodológico, para obtener resultados más concluyentes es necesario realizar un mayor esfuerzo analítico, ampliando el tiempo de acción de las enzimas, 120' para la digestión ácida y 240' para la básica, e incrementando el número de réplicas por muestra.

2. Según los resultados obtenidos bajo nuestras condiciones experimentales la fase ácida de la digestión de la harina de insectos es menos efectiva en cuanto a liberación de aminoácidos que la básica, lo que resulta coherente con la actividad de la pepsina.

3. Los insectos muestran una digestibilidad muy elevada, similar a la de la harina de pescado y soja. Sólo en *Hermetia illucens* es algo menor, aunque es superior al 88%.

4. En la comparación entre fracciones los resultados en el hemocele no son definitivos, aunque exista una tendencia de una mayor digestibilidad esta no llega a ser significativa. Sin embargo, según el balance de nitrógeno se confirma una menor digestibilidad del exosqueleto en las dos especies de dípteros analizadas.

1. Referencias

- A.O.A.C. 1995. *Official methods of analysis*, 16 ed., Horowitz, Washington DC, USA, 12, 7.
- Almeida, C.C., Monteiro, M.L.G., Costa-Lima, B.R.C. da, Alvares, T.S., Conte-Junior, C.A. 2015. In vitro digestibility of commercial whey protein supplements. *LWT - Food Sci. Technol.* 61, 7–11.
- Al-Qazzaz, M. F., & Ismail, D. B. 2016. Insect Meal as a Source of Protein in Animal Diet. *Animal Nutrition and Feed Technology*, 16, 527-547.
- Andersen, S.O., Hojrup, P., Roepstorff, P. 1995. Insect cuticular proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25, 153–176.

- Arango, G.P., Vergara, R.A., Mejía, H. 2004. Análisis composicional, microbiológico y digestibilidad de la proteína de la harina de larvas de *Hermetia illuscens* (diptera: Stratiomyidae) en angelópolis-antioquia. *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín*, 57, 2491–2500.
- Arru, B., Furesi, R., Gasco, L., Madau, F. A., Pulina, P. 2019. The Introduction of Insect Meal into Fish Diet: The First Economic Analysis on European Sea Bass Farming. *Sustainability*, 11, (1–16).
- Azagoh, C., Ducept, F., Garcia, R., Rakotozafy, L., Cuvelier, M. E., Keller, S., Lewandowski, R., Mezdour, S. 2016. Extraction and physicochemical characterization of *Tenebrio molitor* proteins. *Food Research International*, 88, 24-31.
- Belluco, S., Losasso, C., Maggioletti, M., Alonzi, C. C., Paoletti, M. G., Ricci, A. 2013. Edible Insects in a Food Safety and Nutritional Perspective: A Critical Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12, 296–313
- Boot, R. G., Bussink, A. P., Verhoek, M., de Boer, P. AJ., Moorman, A. FM., Aerts, J. 2005. Marked Differences in Tissue-specific Expression of Chitinases in Mouse and Man. *Journal of Histochemistry*.
- Borgogno, M., Dinnella, C., Laconisi, V., Fusi, R., Scarpaleggia, C., Schiavone, A., Monteleone, E. Gasco, L., Parisi, G. 2016. Inclusion of *Hermetia illucens* larvae meal on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) feed: effect on sensory profile according to static and dynamic evaluations. *Society of Chemical Industry*, 97, 3402–3411.
- Bosch, G., Zhang, S., Oonincx, D.G.A.B., Hendriks, W.H. 2014. Protein quality of insects as potential ingredients for dog and cat foods. *Nutr. Sci.* 3, 1–4.
- Brinchmann, B.C., Bayat, M., Brogger, T., Muttuvelu, D.V., Tjonneland, A. and Sigsgaard, T. 2011. A possible role of chitin in the pathogenesis of asthma and allergy. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 18.
- Bryan, D.D.S.L., Classen, H. L. 2020. In vitro methods of assessing protein quality for poultry. *Animals*, 10, 1–19.
- Butts, C.A., Monro, J.A., Moughan, P.J. 2012. In vitro determination of dietary protein and amino acid digestibility for humans. *Br. J. Nutr.* 108.
- Caparros Megido, R., Poelaert, C., Ernens, M., Liotta, M., Blecker, C., Danthine, S., Tyteca, E., Haubruge, É., Alabi, T., Bindelle, J., Francis, F. 2018. Effect of household cooking techniques on the microbiological load and the nutritional quality of mealworms (*Tenebrio molitor* L. 1758). *Food Res. Int.* 106, 503–508.
- Castro, R., Álvarez, A., Machado, E., Mendoza, M., Gómez, R., & García, P. 2011. Caracterización de una quitinasa extracelular producida por *Serratia* sp. Biomi-363706 usando quitina coloidal como sustrato. *Sociedad Química de Perú*, 2 (77), 101-108.
- Corbalá-Bermejo, J. A., Vargas-Magaña, J. J., López-Téllez, N. A., Lastra-del Rivero, C. A., Contreras, J., Castollo-Salas, J. M. 2019. Uso de proteína derivada de larvas de mosca doméstica (*Musca domestica*) para el cultivo de tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 6 (1), 10.

- Duskova J, Tishchenko G y Ponomareva, E. 2011 Chitinolytic enzymes from bacterium inhabiting human gastrointestinal tract - critical parameters of protein isolation from anaerobic culture. *Acta Biochimica* 58, 261–3.
- EFSA. 2015. *Risk profile related to production and consumption of insects as food and feed*. EFSA Journal, 13 (10).
- El Boushy, A. R. 1991. House-Fly as Poultry Manure Converters for Animal Feed. *Bioresource Technology*, 38, 45-49.
- FAO. 2006. *Livestock's long shadow, environmental issues and options*. Roma.
- FAO. 2018. *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible*. Roma.
- FAO. 2021. *Looking at edible insects from a food safety perspective. Challenges and opportunities for the sector*. Roma.
- Finke, M.D., 2013. Complete nutrient content of four species of feeder insects. *Zoo Biology* 32, 27-36.
- García Luna, P. P., y López Gallardo, G. 2007. Evaluación de la absorción y metabolismo intestinal. *Nutrición Hospitalaria* (22), 5-13.
- Guadix, A., Guadix, E. M., Páez-Dueñas, M. P., González-Tello, P., Camacho, F. 2000. Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica*, 41 (1), 79-89.
- Herrero, M. A., y Gil, S. B. 2008. Consideraciones ambientales de la intensificación en producción animal. *Ecología Austral*, 18, 273-289.
- Huang, C., Feng, W., Xiong, J., Wang, T., Wang, W., Wang, C., Yang, F. 2019. *European Food Research and Technology*, 245, 11-21.
- Iaconisi, V., Bonelli, A., Pupino, R., Gai, F., Parisi, G. 2018. Mealworm as dietary protein source for rainbow trout: Body and fillet quality traits. *Aquaculture*, 484, 197–204.
- Janssen, R. H., Lakemond, C. M. M., Fogliano, V., Renzone, G., Scaloni, A., & Vincken, J. 2017. Involvement of phenoloxidase in browning during grinding of *Tenebrio molitor* larvae. *PLoS One*, 12, e0189685.
- Jayanegara, A., Sholikin, M.M., Sabila, D.A.N., Suharti, S., Astuti, D.A. 2017. Lowering chitin content of cricket (*Gryllus assimilis*) through exoskeleton removal and chemical extraction and its utilization as a ruminant feed in vitro. *Pakistan J. Biol. Sci.* 20, 523–529.
- Jonas-Levi, A., Martinez, J.J.I. 2017. The high level of protein content reported in insects for food and feed is overestimated. *J. Food Compos. Anal.* 62, 184–188.
- Józefiak, A., Nogales-Mérida, S., Mikołajczak, Z., Rawski, M., Kkieronczyk, B., Mazurkiewicz, M. 2019. The utilization of full-fat insect meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) nutrition: the effects on growth performance, intestinal microbiota and gastrointestinal tract histomorphology. *Annals of Animal Science*, 19 (3), 747–765.

- Kovitvadhi, A., Chundang, P., Thongprajukaew, K., Tirawattanawanich, C., Srikachar, S., Chotimanothum, B. 2019. Potential of insect meals as protein sources for meat-type ducks based on in vitro digestibility. *Animals*, 9(4), 1–10.
- Khusro, M., Andrew, N. R., Nicholas, A. 2012. Insects as poultry feed: a scoping study for poultry production systems in Australia. *World's Poultry Science Journal*, 68, 435–446
- Llagostera, P. F., Kallas, Z., Reig, L., de Gea, D. A. 2019. The use of insect meal as a sustainable feeding alternative in aquaculture: Current situation, Spanish consumers perceptions and willingness to pay. *Cleaner Production*, 229, 10–21.
- Lucas González, R. 2016. Digestión de alimentos: Tendencias en los modelos de digestión *in vitro*. *Revista Doctorado UMH*, 2(2).
- Magalhães, R., Sánchez-López, A., Silva, R., Martínez-Llorens, S., Oliva-Teles, A., Pérez, H. 2017. Black soldier fly (*Hermetia illucens*) pre-pupae meal as a fish meal replacement in diets for European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 476, 79-85.
- Mancini, S., Mattioli, S., Paolucci, S., Fratini, F., Dal Bosco, A., Tuccinardi, T., Paci, G. 2021. Effect of Cooking Techniques on the in vitro Protein Digestibility, Fatty Acid Profile, and Oxidative Status of Mealworms (*Tenebrio molitor*). *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 1–11.
- Nielsen, P. M., Petersen, D., Dammbmann, C. 2001. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science*, 66 (5), 642–646.
- Nieto López, M. G. 2003. Desarrollo de una técnica de digestibilidad in vitro para el control de harinas de pescado y alimentos para camarón (Tesis doctoral). *Universidad Autónoma de Nuevo León, México*.
- Paoletti, M. G., Norberto, L., Damini, R., Musumeci, S. 2007. Human gastric juice contains chitinase that can degrade chitin. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 51 (3), 244–251.
- Pino Cebrián, M. 2018. Por qué todavía no comemos insectos: marco legal en la Unión Europea. *Revista de Bioética y Derecho*, 42, 311-341.
- Poelaert, C., Beckers, Y., Despret, X., Portetelle, D., Francis, F., Bindelle, J., 2016. In vitro evaluation of fermentation characteristics of two types of insects as potential novel protein feeds for pigs. *J. Anim. Sci.* 94, 198–201.
- Ramos-Elorduy B, J., y Viejo Montesinos, J. L. 2007. Los insectos como alimento humano: Breve ensayo sobre la entomofagia, con especial referencia a México. *Real Sociedad Española de Historia Natural*, 102, 61-84.
- Ritchie, H., y Roser, M. 2019. Meat and Dairy Production. *Publicación online de OurWorldInData.org*. Obtenido de: <https://ourworldindata.org/meat-production>
- Ritchie, H., y Roser, M. 2021. Environmental impacts of food production. *Publicación online de OurWorldInData.org*. Obtenido de: <https://ourworldindata.org/environmental-impacts-of-food>.
- Sánchez-Muros, M., Barroso, F. G., Manzano-Agugliaro, F. 2014. Insect meal as renewable source of food for animal feeding. *Cleaner Production*, 65, 16–27.

- Séré, A., Bougma, A., Bazié, B. S. R., Traoré, E., Parkouda, C., Gnankiné, O., & Bassolé, I. H. N. 2021. Chemical composition, energy and nutritional values, digestibility and functional properties of defatted flour, protein concentrates and isolates from *Carbula marginella* (Hemiptera: Pentatomidae) and *Cirina butyrospermi* (Lepidoptera: Saturniidae). *BMC Chemistry*, 15 (1), 1–11.
- Severini, C., Azzollini, D., Albenzio, M., Derossi, A. 2018. On printability, quality and nutritional properties of 3D printed cereal based snacks enriched with edible insects. *Food Research International*, 106, 666–676.
- Shockley, M., & Dossey, A. T. 2014. Insects for Human Consumption. *Mass Production of Beneficial Organisms*, 18, 617-652.
- Smith, J.L., Opekun, A.R., Larkai, E., Graham, D.Y. 1989. Sensitivity of the esophageal mucosa to pH in gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology*, 96, 683–689.
- van Huis, A., van itterbeeck, J., Klunder, H., Mertens, E., Halloran, A., Muir, G., Vantomme, P. 2013. *Edible insects: future prospects for food and feed security*, 171. Roma.
- Vidanarachchi, J.K., Kurukulasuriya, M.S., Kim, S.K. 2010. Chitin, Chitosan and their oligosaccharides in food industry. In: S.K. Kim (ed.), *Chitin, chitosan, oligosaccharides and their derivatives: biological activities and applications*. *CRC Press, New York, USA*, 543-560.
- WHO, 2021. World Population Prospects. *Department of Economic and Social Affairs Population Dynamics*.
- Wickham, M., Faulks, R., Mills, C. 2009. In vitro digestion methods for assessing the effect of food structure on allergen breakdown. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(8), 952–958.
- Yang, Q., Liu, S., Sun, J., Yu, L., Zhang, C., Bi, J., Yang, Z. 2014. Nutritional composition and protein quality of the edible beetle *Holotrichia parallela*. *Journal of Insect Science*, 14, 1–4.
- Yi, L., Van Boekel, M. A. J. S., Boeren, S., y Lakemond, C. M. M. 2016. Protein identification and in vitro digestion of fractions from *Tenebrio molitor*. *European Food Research and Technology*, 242 (8), 1285–1297.