

**Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública, Ciències
de l'Alimentació, Toxicologia i Medicina Legal**

Trabajo Fin de Máster

**Título: Evaluación de Estabilidad Reológica y
Fisicoquímica de Geles Proteicos aislados de Grillo
Común (*Acheta domestica*) y Tratados por Altas
Presiones Hidrostáticas**

**Máster Universitario en Calidad y Seguridad Alimentaria 9ª
Edición 2017-2018**

Estudiante: Javier Pietro Urbina Padilla

Tutor/a: Dr. Antonio Martínez López

MASTER EN CALIDAD Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

AUTORIZACIÓN DEL TUTOR PARA LA PRESENTACIÓN DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

MÁSTER: 2021. Máster en Calidad y seguridad Alimentaria de la Universitat de València

DATOS DEL TUTOR/A (*)	
Dr./ Dra.	Antonio Martínez López Dolores Rodrigo Aliaga
Centro/Departamento	Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC)

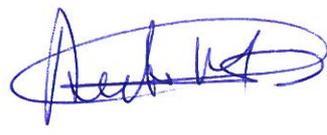
(*) En caso de más de un tutor/a indicar el nombre e incluir la firma de cada uno de los tutores/as.

Como tutor/a del Trabajo Fin de Máster:

DATOS DEL TRABAJO	
Título del Trabajo	Evaluación de Estabilidad Reológica y Fisicoquímica de Geles Proteicos aislados de Grillo Común (<i>Acheta domesticus</i>) y Tratados por Altas Presiones Hidrostáticas
Realizado por (estudiante)	Javier Pietro Urbina Padilla

Hace constar que el trabajo citado cumple los requisitos según la normativa de la Universitat de València y, por tanto, autoriza su depósito y defensa pública.

Firmado en... Paterna ... a 13 de Agosto ... de 20 18



M. DOLORES RODRIGO ANTONIO MARTÍNEZ

El tutor/a (los tutores/as)

CONTENIDO

	PÁG.
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El grillo común (<i>A. domesticus</i>) como fuente proteica emergente	1
1.1.1. Aspectos nutricionales	1
1.1.2. Aspectos de sustentabilidad económica y ambiental	5
1.1.3. Aspectos de seguridad alimentaria	10
1.1.4. Aspectos legales en la Unión Europea	13
1.1.5. Desarrollo de productos a base de grillo	14
1.1.6. Situación del comercio de productos basados en grillo en el mundo y España	17
1.2. Geles en la industria alimentaria	19
1.2.1. Definición de gel	19
1.2.2. Mecanismos de formación de geles proteicos	20
1.2.3. Efecto de las APH en alimentos e inducción de modificaciones estructurales en proteínas	20
1.2.3. Enzimas y gelatina como gelificantes en alimentos	23
a. Transglutaminasa y glucosa oxidasa	23
b. Colágeno y gelatina	24
2. OBJETIVOS	25
2.1. Objetivo general	25
2.2. Objetivos específicos	26
3. METODOLOGÍA	26
3.1. Extracción de proteínas	26
3.2. Cuantificación del porcentaje de proteínas	27
3.3. Identificación de proteínas	28
3.3.1. Análisis en gel monodimensional por SDS PAGE 1D	28
3.3.2. Identificación de proteínas por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem	29
3.4. Evaluación de gelificación de fracciones de proteína de grillo tratada con enzimas, altas presiones y calor	30
3.5. Obtención de geles con adición de gelatina porcina (E-441) y tratamiento por altas presiones	31

3.5.1. Medición del pH	32
3.5.2. Medición del color	33
3.5.3. Determinación de sinéresis	33
3.5.4. Determinación de la dureza	34
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
4.1. Contenido proteico de fracciones de proteína de grillo	34
4.2. Identificación de proteínas	35
4.3. Evaluación de gelificación de fracciones de proteínas de grillo tratadas con enzimas, calor y altas presiones.	38
4.4. Estudio de estabilidad de geles obtenidos con adición de E-441	40
4.4.1. Evolución del pH	40
4.4.2. Evolución del color	42
4.4.3. Evolución de la sinéresis	48
4.4.4. Evolución de la dureza	50
5. CONCLUSIONES	53
6. BIBLIOGRAFÍA	55
7. ANEXOS	67
7.1. ANEXO 1: Resumen bibliográfico	67

ÍNDICE DE TABLAS

	PÁG.
Tabla 1. Composición nutricional de la harina de grillo comparada con otras proteínas	1
Tabla 2. Perfil aminoácídico de la proteína de grillo común comparado con el estándar FAO, soya y pescado	2
Tabla 3. Composición de extracto lipídico del grillo común en comparación a otros insectos	4
Tabla 4. Principales constituyentes del grillo versus otros insectos, pescado y soya	5
Tabla 5. Contenido vitamínico de insectos usados en piensos.	5
Tabla 6. FCR del grillo y otros animales de granja	7
Tabla 7. Emisión de GHG de <i>A. domesticus</i> comparado con otros insectos y animales de granja	8
Tabla 8. Balance anual de consumo de recursos para producción de grillo en granjas del noroeste de Thailandia	9
Tabla 9. Carga bacteriana de grillo en estado fresco y sometido a distintos tratamientos	11
Tabla 10. Modificaciones inducidas en alimentos por las altas presiones	21
Tabla 11. Parámetros de extracción de proteína de grillo por vía ácida y alcalina	27
Tabla 12. Composición de tubos de prueba con distintas fracciones de proteína de grillo	30
Tabla 13. Formulación de geles con distintas fracciones de proteína de grillo y gelatina porcina	32
Tabla 14. Contenido proteico de fracciones de proteína de grillo	34
Tabla 15. Proteínas identificadas por LC-MS/MS en fracción insoluble de proteínas de grillo obtenida por vía ácida	36
Tabla 16. Resultados de la evaluación de gelificación de fracciones de PG con enzimas, calor y altas presiones	38
Tabla 17. Evolución de parámetros de color CIELab en geles formulados con WPI y proteína de grillo	43

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1. Composición grasa y proteica de distintos ordenes de insectos	3
Figura 2. Porción comestible y FCR de grillo y otros animales de granja	6
Figura 3. Emisión de GHG por kilo de ganancia de peso de grillo y otros animales de granja	8
Figura 4. Oferta de productos gourmet a base de grillo de las compañías Don Grillo y Carrefour	19
Figura 5. Desnaturalización de la B-lactoglobulina por acción de las altas presiones	22
Figura 6. Formación de enlaces cruzados lys-lys por acción de la transglutaminasa	23
Figura 7. Reacción de oxidación catalizada por glucosa oxidasa	24
Figura 8. Estructura de la proteína de colágeno	25
Figura 9. Diagrama experimental de procedimiento de extracción de proteína de grillo	27
Figura 10. Geles formulados a base de pellet extraído de <i>A. domesticus</i> por vía ácida con adición de distintos niveles de gelatina porcina (E-441)	31
Figura 11. Espacio del color CIElab	33
Figura 12. SDS PAGE 1D de fracciones aisladas de proteína de grillo por vía ácida y alcalina	36
Figura 13. Tubos de prueba luego de incubación con enzimas	38
Figura 14. Evolución del pH en geles formulados a base de WPI	40
Figura 15. Evolución del pH en geles formulados a base de fracciones solubles de proteína de grillo	41
Figura 16. Evolución del pH en geles formulados a base de fracciones insolubles de proteína de grillo	41
Figura 17. Geles formulados en base de WPI y fracciones de proteína de grillo con adición de E-441	45
Figura 18. Variación del color en geles formulados en base a WPI	45
Figura 19. Variación del color en geles formulados en base a fracciones solubles de proteína de grillo	46
Figura 20. Variación del color en geles formulados en base a fracciones insolubles de proteína de grillo	46

Figura 21. Evolución de la sinéresis en geles formulados a base de WPI	48
Figura 22. Evolución de la sinéresis en geles formulados a base de fracciones solubles de proteína de grillo	49
Figura 23. Evolución de la sinéresis en geles formulados a base de fracciones insolubles de proteína de grillo	49
Figura 24. Evolución de dureza en geles formulados a base de WPI	51
Figura 25. Evolución de dureza en geles formulados a base de fracciones solubles de proteína de grillo	51
Figura 26. Evolución de dureza en geles formulados a base de fracciones insolubles de proteína de grillo	52

ABREVIATURAS

ACN: Acetonitrilo

APH: Altas presiones hidrostáticas

b.h: Base húmeda

b.s: Base seca

CHCA: ácido alfa-ciano

CRA: Capacidad de retención de agua

DDT: Diclorofeniltricloroetano

EA-P: Extracción ácida pellet

EA-R: Extracción ácida residuo

EA-S: Extracción ácida sobrenadante

EB-P: Extracción básica pellet

EB-R: Extracción básica residuo

EB-S: Extracción básica sobrenadante

EFSA: European Food Safety Authority

EPA: Ácido Eicosapentanoico

FA: Ácido fórmico

FCR: Tasa de conversión alimenticia-Feed Conversion Rate

GC: Grillo común

GHG: Green House Gase

LC-MS/MS: Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa en tandem

PCB: Policlorobifenilos

PG: Proteína de grillo

SDS PAGE 1D: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis one-dimensional

TCA: ácido tricloroacético

TFA: Ácido trifluoroacético

UE. Unión Europea

ω -3: Omega 3

ω -6: Omega 6

ABSTRACT

Population growth has led to the search for environmentally sustainable alternative protein sources. In the present work, soluble and insoluble fractions of cricket protein were extracted by acid and alkaline ways in order to explore their possible use in new foods. The fractions presented protein contents between 55.13 and 71.6%. Analysis by SDS-PAGE 1D revealed a large variety of peptides. Through LC / MS-MS was identified presence of different isoforms of myosin, tropomyosin, α and β actin, troponin, and ATP synthetase. The formation of gels was evaluated in all the fractions. Dispersions at 15% of the isolates were pre-treated with transglutaminase or glucose oxidase (1%) incubating at 50 °C for 24 hours, then they were thermally treated at 85 °C for 15 min and pressurized at 500 MPa for 15 min (25 ° C). The insoluble fractions formed unstable paste aggregates and the soluble fractions increased their viscosity. Then, with the protein fractions, gels were formulated with 7, 11 and 15% of each isolate and porcine gelatin (2%). The stability of these was evaluated for 28 days. The pH varied slightly depending on the fraction used. The color varied notably the first week and then remained stable. The syneresis was higher in gels with 7% protein and in those corresponding to soluble fractions. The hardness was higher in gels formulated with insoluble fractions and showed a tendency to increase until 14 days to then stabilize.

Keywords: Insect protein, *Acheta domesticus*, gelation, high pressure.

RESUMEN

El crecimiento demográfico ha conllevado a la búsqueda de fuentes proteicas alternativas ambientalmente sostenibles. En el presente trabajo, se extrajeron por vía ácida y alcalina fracciones solubles e insolubles de proteína de grillo con el objeto de explorar su posible utilización en nuevos alimentos. Las fracciones presentaron contenidos proteicos entre 55.13 y 71.6 %. El análisis por SDS-PAGE 1D reveló una gran variedad de péptidos. Mediante LC/MS-MS se identificó presencia de: distintas isoformas de miosina, tropomiosina, α y β actina, troponina, y ATP sintetasa. En todas las fracciones se evaluó la formación de geles. Dispersiones al 15% de los aislados se pre-trataron con transglutaminasa o glucosa oxidasa (1%) incubando a 50 °C por 24 horas, luego se trataron térmicamente a 85 °C por 15 min y se presurizaron a 500 MPa por 15 min (25 °C). Las fracciones insolubles formaron agregados pastosos inestables y las fracciones solubles incrementaron su viscosidad. Luego, con las fracciones proteicas se formularon geles con 7, 11 y 15 % de cada aislado y gelatina porcina (2 %). Se evaluó la estabilidad de estos por 28 días. El pH varió ligeramente en función de fracción utilizada. El color varió notablemente la primera semana y luego se mantuvo estable. La sinéresis fue mayor en geles con 7% de proteína y en los correspondientes a fracciones solubles. La dureza fue superior en geles formulados con fracciones insolubles y presentó una tendencia al incremento hasta los 14 días para luego estabilizarse.

Palabras Clave: Proteínas de insectos, *Acheta domesticus*, gelificación, altas presiones

1. INTRODUCCIÓN:

1.1. EL GRILLO COMÚN (*A. DOMESTICUS*) COMO FUENTE PROTÉICA EMERGENTE:

Los insectos son ya consumidos en el mundo en forma tradicional por 2000 millones de personas y su consumo se está considerando como una estrategia para combatir la hambruna en países con déficit proteico (Madrid 2013). Estos presentan composiciones nutricionales muy variadas, que cambian además con el estadio de desarrollo en que se encuentren (ninfa, larva, pupa o adulto). Entre los insectos que se consumen habitualmente se encuentra el grillo común (*A. domesticus*).

1.1.1. Aspectos nutricionales:

El grillo adulto en estado fresco aporta alrededor de 120 kcal/100 gramos lo que significa un contenido energético moderado respecto a otros insectos (Kourinska y Adancova 2016); por otro lado, la harina que se obtiene de este brinda alrededor de 447 kcal/100 g. La tabla 1 muestra el contenido de algunos nutrientes en comparación con otros tipos de alimentos de origen animal.

TABLA 1. Composición nutricional de harina de grillo comparado con carne de res, pollo y leche en polvo (Fuente Dossey *et al.* 2014)

Alimento	Proteína (gr)	Grasa (gr)	Calorías (kcal)	Omega 3 (gr)	Hierro (mg)
Whole Cricket Powder (All Things Bugs LLC)	63	19	447	0.25	5.9
Res	25.6	18.7	278	0.009	2.4
Leche en polvo	26.3	26.7	496	0	0.47
Pollo	39	7.4	190	0.05	1.2

Como se puede apreciar en la tabla, las proteínas constituyen el principal macronutriente de interés nutricional presente en la *A. domesticus*. Lizang *et al.* (2008) analizaron la composición proximal de 100 especies de insectos (pupas y estadios adultos) hallando contenidos medios de

proteína cruda (en base seca) entre 15.17 y 78.09% siendo la media por especies de 51.17%. El grillo común presenta niveles muy por encima de la media siendo su contenido proteico de entre 64.38 a 70.75% (Rumplond & Shülter 2013a). Al comparar la presencia de este componente en el grillo con fuentes proteicas convencionales se observa que es equiparable al de fuentes animales como la carne de pollo (69.1% b.s.) y el pescado (71.0% b.s.) y superior al de fuentes vegetales como el grano de soya (51.6% b.s.) según indican Bosch *et al.* (2014) y Makkar *et al.* (2014).

Nogonierma *et al.* (2017) indican que las proteínas de insectos comestibles tienen en general perfiles aminoacídicos adecuados. En particular el contenido de aminoácidos de la proteína de grillo común ha sido estudiado por Yi *et al.* (2015) y Makkar *et al.* (2013) quienes coinciden en que cubre los requerimientos establecidos por FAO para adultos (tabla 2). En cuanto al requerimiento para niños en etapa escolar, según las determinaciones de Yi *et al.* (2015) sí los llega a cubrir; por otra parte según lo investigado por Makkar *et al.* (2013) la proteína de grillo común tendría un leve déficit en triptófano para este grupo etario. En todo caso productos a base de grillo orientados a la alimentación infantil podrían complementarse con otras proteínas para cubrir el requerimiento de aminoácidos.. Por otra parte, las proteínas de insectos del género orthoptera, al que pertenece el grillo, son además altamente digeribles con porcentajes que varían entre el 77,9 y el 98.9% (Ramos *et al.* 2012 y Lizang *et al.* 2008 citados por Arevalo e Inacconde 2015).

TABLA 2. Perfil aminoacídico del grillo común comparado con estandar FAO para distintos grupos etarios y proteínas de soya y pescado (Adaptado de Yi *et al.* 2015 y Makkar *et al.* 2014)

Contenido en aminoácidos (mg/g de proteína cruda)							
Aminoácido	Grillo (Yi <i>et al.</i> 2013)	Grillo (Makkar <i>et al.</i> 2014)	Soya	Pescado	Pre-escolares (2-5 años)	Escolares (10-12 años)	Adultos
Histidina	21	23	25	24	19	19	16
Isoleucina	36	44	47	42	28	28	13
Leucina	66	98	85	72	66	44	19
Lisina	53	54	63	75	58	44	16
Met+Cis	25	22	24	38	25	22	17
Fen+Tir	92	82	97	70	63	22	19

Treonina	35	36	38	41	34	28	9
Triptófano	9	6	11	10	11	9	5
Valina	55	51	49	49	35	25	13

El componente graso del grillo común es también relevante, tanto por el aporte calórico, como por el perfil lipídico que presenta. Los insectos en general tienen un contenido graso promedio de 25.10 % en base húmeda (Lizang *et al.* 2008), para el grillo común se reportan valores entre 17.3 hasta 22.8% en base seca (Makkar *et al.* 2014; Rumpold & Shölter 2013a). En general, los insectos del orden Orthoptera presentan alto contenido proteico y bajo aporte graso respecto a otras especies (figura 1). Al comparar la presencia de este macronutriente con otras fuentes de grasa de origen animal Dossey *et al.* (2014) observaron que la harina de grillo tiene un contenido lipídico mayor al de la carne de pollo y similar al de la carne de res y la leche en polvo.

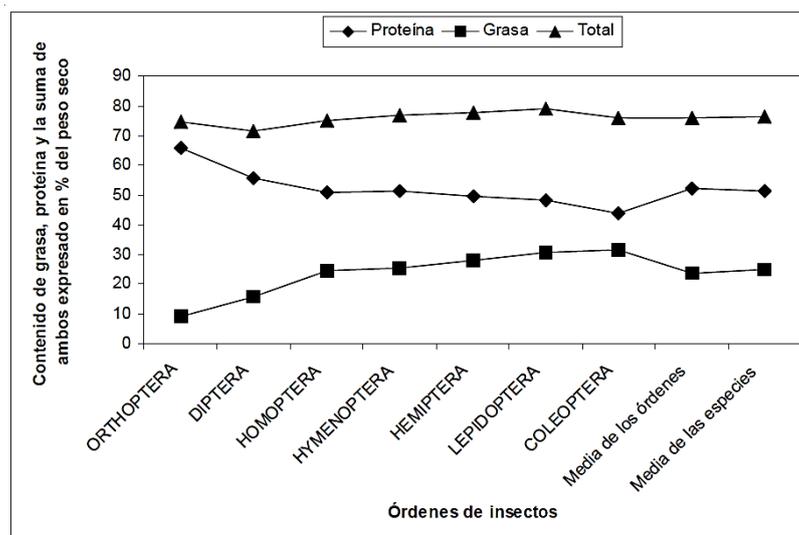


FIGURA 1. Comparación de la composición en grasa y proteínas de en distintos órdenes de insectos (Fuente: Lizang *et al.* 2008)

En lo que respecta al perfil lipídico Saturnino *et al.* (2016) determinaron que el extracto lipídico del grillo es predominante en ácido linoléico (37.88%), ácido oleico (22.5%) y ácido palmítico (25.8%), siendo su aporte de omega 6 (ω -6) superior en al menos 10 puntos porcentuales comparado con otros insectos usados en piensos (tabla 3). Además, la harina de grillo brinda un aporte de omega 3 (ω -3) significativamente mayor al de otros alimentos de origen animal, al menos del doble (tabla 1). En estado natural aporta 1.31 g de ácido α -Linoléico/100 g de peso seco (Collavo 2002

citado por Paoletti & Dreon 2004). Por otra parte, Yi *et al.* (2015) caracterizaron lípidos extraídos de *A. domesticus* y otros insectos (*T. molitor*, *A. diaperinus* y *B. dublia*) identificando solo en *A. domesticus* este primero la presencia de Ácido Eicosapentanoico (EPA) en proporción de 0.75 g/100 g de extracto lipídico, el cual debió de haber sido biosintetizado por el propio insecto ya que el pienso con que se alimento a los insectos no contenía ninguna fuente de EPA. En tal sentido, Zielinska *et al.* (2015), tras estudiar los perfiles nutricionales de tres insectos incluyendo *G. Sigillatus* (otra variedad de grillo), indicaron que el enriquecimiento de alimentos con insectos comestibles podría ser una alternativa de lucha contra la obesidad. Por otra parte, el grillo común (GC) respecto a otros insectos presenta una mayor variedad de lípidos polares incluyendo fosfatidilinositol y fosfatidilserina I que le confiere beneficios potenciales sobre la salud cognitiva, enfermedades neurológicas y cardiovasculares (Saturnino *et al.* 2016).

TABLA 3. Composición de ácidos grasos del grillo común comparado con otros insectos (Fuente: Saturnino *et al.* 2016)

	<i>T. molitor</i> (larva)	<i>Z. morio</i> (larva)	<i>A. domesticus</i> (adulto)	<i>L. migratoria</i> (adulto)
Ácido graso (AG)				
C14:0	2,94	1,17	0,43	1,75
C16:0	20,01	31,14	25,88	26,30
C18:0	4,02	5,40	9,28	7,92
Total AGS (%)	26,97	37,71	35,59	35,97
C16:1	2,23	2,69	0,99	1,20
C18:1 <i>cis</i> 9	48,55	39,45	22,54	34,20
Total AGMI (%)	50,78	42,14	23,53	35,40
C18:2 (n-6) <i>cis</i> 9 <i>cis</i> 12	20,34	16,29	37,88	18,27
C18:3 (n-3) <i>cis</i> 9 <i>cis</i> 12 <i>cis</i> 15	0,61	0,21	0,99	9,33
Total AGPI (%)	20,95	16,50	38,87	27,60
Total AGI (%)	71,73	58,64	62,40	63,00
AGS/AGI	0,38	0,64	0,57	0,57
Ratio n6/n3	33,34	77,57	38,26	1,96

Los insectos de la orden orthotera en general contienen niveles importantes de magnesio que para *A. domesticus* asciende a 55.1 mg/kg de porción comestible (Payne *et al.* 2016); además en general los insectos aportan mayores cantidades de hierro y calcio que la carne de res, cerdo y pollo (Rumpold & Schülter 2013a). Según Dossey *et al.* (2014) la harina de grillo suministra más del doble de hierro que la carne de res (tabla 1). Por otra parte, el contenido de calcio de esta especie (1.01% base seca) es

superior al de otros insectos comestibles y al del frijol de soya (tabla 4). Los niveles de fósforo y potasio son también elevados en esta especie respecto a otros insectos (Payne *et al.* 2016).

TABLA 4. Principales constituyentes del grillo versus otros insectos, pescado y soya (Adaptado de Makkar *et al.* 2014)

Constituyente (% M.S)	Grillo común	Larva de mosca soldado	Gusano de la harina	Pescado	Grano de soya
Proteína cruda	76.5	56.9	82.6	70.6	51.8
Lípidos	17.3	26	36.1	9.9	2
Calcio	1.01	7.56	0.27	4.34	0.39
Fósforo	0.79	0.9	0.78	2.79	0.69

En cuanto a la contribución en vitaminas (tabla 5), en general los miembros de la orden Orthoptera son ricos en ácido fólico, siendo el nivel para *A. domesticus* de 0.49 mg/100g (Rumpold & Schülter 2013a). Respecto a otros insectos utilizados en piensos, el grillo común destaca por su aporte relativamente elevado de riboflavina y vitamina B12 (Finke 2002).

TABLA 5. Contenido vitamínico de insectos utilizados en piensos (Fuente: Adaptado de Finke 2002)

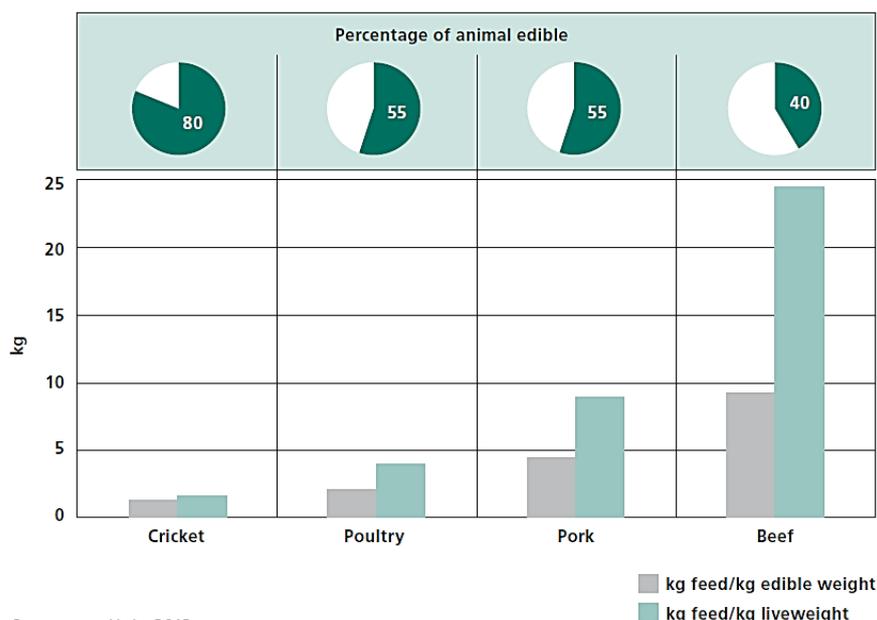
Vitamina	Grillo	Gusano de la harina	Gusano de seda	Larva de gusano gigante
Vitamina E (IU/kg)	19.7	<5	8.9	<5
Vitamina C (mg/kg)	30	54	<10	24
Tiamina (mg/kg)	0.4	1	3.3	1.2
Riboflavina (mg/kg)	34.1	8.5	9.4	16.1
Niacina (mg/kg)	38.4	56.4	26.3	41.3
Vitamina B ₁₂	53.7	5.6	<1.2	1.3

1.1.2. Aspectos de sustentabilidad económica y ambiental:

Las Naciones Unidas proyectan que para el 2050 la población mundial será alrededor de 9 mil millones de personas (Dzamba 2010 citado por Dossey *et al.* 2014); además, en países desarrollados el consumo de carne se incrementa a una tasa anual del 5% (Rumplönd & Schülter 2013a) por lo

que la demanda de fuentes de proteínas que puedan producirse con pocos recursos (pienso, agua y espacio) irá en aumento. En tal sentido en 2013 la FAO recomendó como fuente proteica alternativa los insectos comestibles (Van Huis *et al.* 2013).

La producción de insectos es un proceso altamente eficiente y de relativamente rápido retorno económico debido a que: las tasas de conversión alimenticias de éstos son elevadas ya que al ser poiquilotermos no usan energía en regular la temperatura corporal, tienen un gran número de crías y alcanzan la madurez en pocos días o semanas (Bressa *et al.* 2017). En la tabla 6 se presenta los valores de Feed Conversion Rate (FCR-Tasa de conversión alimenticia) del grillo común comparado con animales de granja convencionales. Se observa que el grillo requiere tan solo 1.7 kg de pienso para producir 1 kg de grillos (Collavo *et al.* 2004) notablemente mucho menor a los requerimientos para animales de granja convencionales (res, pollo, cerdo, etc.) que requieren de 2.3 hasta 12.7 kg de pienso para producir un kg de masa animal. Además, la porción comestible del grillo es casi del 80% lo que para la res y el cerdo es alrededor del 50% (figura 2) por lo que acrecienta el rendimiento final favorable a la producción de grillo (Van Huis *et al.* 2013). Por otra parte, el número de crías por hembra es muy elevado (1200 a 1500) y el ciclo de vida de unas 3 a 4 semanas a 30 °C (DeFoliart 2009).



Source: van Huis, 2013.

FIGURA 2. Porción comestible y FCR del grillo comparado con fuentes proteicas convencionales. (Fuente: Van Huis *et al.* 2013)

TABLA 6. FCR de grillo y otros animales de granja (Fuente: Raamsdok et al. 2017)

Animal (group)	Rate
Beef cattle	12.7
	8.8
	6 (4.5–7.5)
Pig	5.9
	4.0
	3.3
	3.46–4.09
Sheep, lamb	4 to > 6
Poultry, broiler	2.3
	2.3
	1.6, 1.8
Poultry, laying hen	3.8
	2
Carp	1.5
House cricket	1.7
	1.3/1.8
	2.3/3.2–10.0
Black soldier fly	1.8/1.4–2.6
Argentinean cockroach	2.7/1.5–2.3
Yellow mealworm	4.1–4.8/3.8–6.1

Por otra parte, los insectos no requieren consumir fuentes alimenticias costosas de producir, incluso algunos de ellos pueden subsistir consumiendo desechos orgánicos de la actividad agrícola (Bressa *et al.* 2014). En el caso de *Acheta domesticus* se ha comprobado que la alimentación de esta especie con zanahoria versus pienso para pollos no resultaba en diferencias significativas en cuanto a tiempo de desarrollo, ganancia de peso y tasa de conversión alimenticia (Veenenbos y Onincox 2017).

Un aspecto ambiental de amplia relevancia es la emisión de gases de efecto invernadero (GHG-Green House Gase). Se estima que la actividad pecuaria representa del 8 al 18% de las emisiones de origen antropogénico (Herrero *et al.* 2015 citado por Van Huis 2017a). En tal sentido, se ha comprobado que las especies *A. domesticus* y *T. molitor* emiten una cantidad de GHG incluyendo: dióxido de carbono, metano y óxido de nitrógeno del orden de 100 veces menos que los cerdos y las reses (Onincox *et al.* 2010). En este aspecto, *A. domesticus* comparado con otros insectos (tabla 7) produce emisiones casi nulas de metano y muy

baja de dióxido de carbono; siendo el amonio y óxido nitroso sus principales emisiones (Oonincx 2015). Haciendo un balance general el grillo común emite algo más de GHG que *T. Molitor* pero menos que *L. Migratoria* y mucho menos que las fuentes proteicas convencionales (véase figura 3). Es posible también reducir aún más la tasa de emisión de dióxido de carbono variando la temperatura a la que se cría el grillo (Lachenich *et al.* 2010).

TABLA 7. Emisión de GHG de *A. domesticus* comparado con otros insectos y animales de granja (Fuente: Oonincx *et al.* 2010)

Species	CH ₄ (g/kg BM/day)	N ₂ O (mg/kg BM/day)	CO ₂ eq. (g/kg BM/day)
<i>Pachnoda marginata</i> (n=4)	0.16±0.085 ^a	0.0±0.03 ^a	4.00±2.13 ^a
<i>Tenebrio molitor</i> (n=4)	0.00±0.002 ^b	1.5±0.13 ^b	0.45±0.04 ^b
<i>Blaptica dubia</i> (n=3)	0.08±0.021 ^c	0.3±0.24 ^a	2.12±0.57 ^c
<i>Acheta domesticus</i> (n=4)	0.00±0.002 ^c	0.1±0.13 ^a	0.05±0.04 ^b
<i>Locusta migratoria</i> (n=6)	0.00±0.017 ^c	8.0±13.50 ^b	2.37±4.02 ^c
Pigs	0.049-0.098	2.7-85.6	2.03-27.96
Beef cattle	0.239-0.283	N/A	5.98-7.08

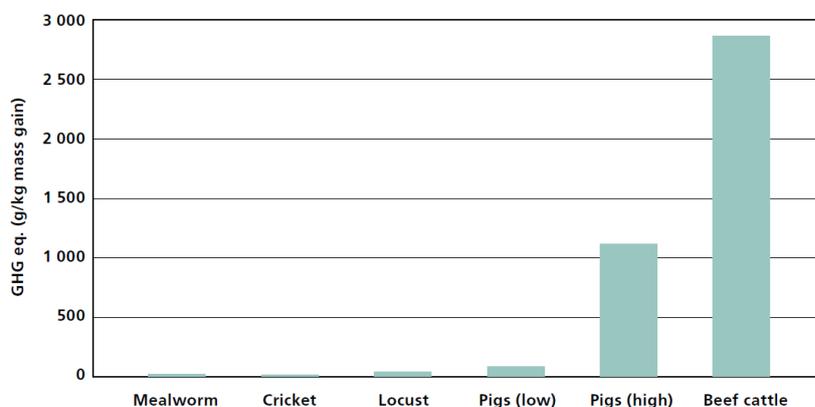


FIGURA 3. Emisión de GHG por kilo de ganancia de peso de grillo y otros animales de granja. (Fuente: Van Huis *et al.* 2013)

Otro beneficio a destacar de la cría de insectos es el notablemente menor requerimiento de espacio; para *T. molitor* se determinó que requería de 29 a 50% menos área para su producción en comparación con la cría de pollos. Además, por sus dimensiones es factible la cría vertical de insectos (Tao & Olive 2018) esta puede hacerse en jaulas apiladas (Arevalo e Innaconde 2015).

El principal recurso por el cual existe una notable preocupación en cuanto a su disponibilidad en el futuro es el agua. En tal sentido, los animales de granja convencionales tienen una huella hídrica elevada que va desde 3400 L/kg para el pollo hasta 15400 L/kg para la producción de carne de res (Mekonen y Hoekstra 2010); los insectos, por su parte al ser animales de sangre fría y más eficientes en la conversión del alimento a biomasa requieren menor cantidad de tierras cultivables y pueden cubrir la demanda de agua de su organismo solo con la humedad del alimento que se le suministre siempre que este sea algún vegetal fresco o fruta, de usar pienso sería necesaria la instalación de bebederos (Arevalo e Inaconde 2015; Rumpold y Schülter 2013b). El grillo tiene un requerimiento de agua muy limitado siendo este aproximadamente de 1 L por kilo de grillo producido; en contraste el pollo de corral que requiere alrededor de 7.3 L de agua para producir un kilo de masa animal (Halloran *et al.* 2017). En la tabla 8 se presentan los requerimientos de agua, pienso, fertilizante, entre otros para una granja de grillos con una capacidad anual de producción de 18 toneladas métricas (TM). Se estima, mediante análisis de ciclo de vida que la producción de grillo en polvo y sustitutos a la carne basados en este serían 2 a 5 veces más beneficiosos ambientalmente respecto a la producción tradicional de carne (Smetana *et al.* 2016).

TABLA 8. Balance anual de consumo de recursos y producción de grillo en granja al noroeste de Thailandia (Halloran *et al.* 2017).

	Amount
Total number of concrete pens	78
Number of concrete pens, <i>Gryllus bimaculatus</i>	38
Number of concrete pens, <i>Acheta domesticus</i>	38
Number of cycles in a year	8.5
Inputs	
Feed (kg)	74,237
DM of feed (%)	87
Total amount of pumpkins (kg)	20,400
DM of pumpkin (%)	12
N content of feed (%)	3.04
C content of feed (%)	44
N content of pumpkin (%)	79
C content of pumpkin (%)	50
Water (L)	19,843
Cricket production	
<i>Acheta domesticus</i> (kg)	18,976
<i>Gryllus bimaculatus</i> (kg)	17,765
DM of crickets (%)	26
Edible portion (%)	100

1.1.3. Aspectos de Seguridad Alimentaria:

El 2010 la comisión del Codex Alimentarius reporto que los aspectos de seguridad alimentaria de los insectos comestibles no habían sido estudiados extensamente (Spiegel *et al.* 2013). En tal sentido, el comité, conjunto FAO/OMS para Asia propuso el establecimiento de un estándar internacional para los grillos comestibles y sus productos (Codex Alimentarius 2010).

En cuanto a los riesgos microbiológicos, los insectos son matrices con nutrientes y humedad adecuados para permitir el crecimiento microbiano, en estado fresco se ha identificado que presentan una flora bacteriana variada compuestas por Gram (+) y Gram (-) siendo predominantes los géneros *Bacillus* y *Staphylococcus* (Amadi y Kiin 2016). En el caso de *A. domesticus* criado en granja, Giaccone (2005) detectó un recuento alto de bacterias totales (10^5 a 10^6 ufc/g) siendo la carga predominante en Gram (+) de los géneros *Micrococcus*, *Lactobacillus* y *Staphylococcus*. Aisló también coliformes totales y fecales pero sin detectarse presencia de *Salmonella* ni *Listeria monocytogenes*. Ahora bien, la flora natural es de interés en cuanto a conocer la carga microbiana de partida al procesar este tipo de especies comestibles; sin embargo, el principal énfasis está en la conservación de productos procesados a base de insectos (Belluco *et al.* 2013). En tal sentido, Klunder *et al.* (2012) estudiaron la evolución de la carga bacteriana de *A. domesticus* sometido a distintas condiciones de conservación (tabla 9) concluyendo que con hervido por un minuto y almacenamiento en refrigeración los conteos de bacterias mesófilas totales se mantenían por debajo de 10^4 ufc/g al menos hasta los 6 días de almacenamiento refrigerado y las enterobacterias por debajo de 10^2 ufc/g al menos hasta los 10 días de almacenamiento a la misma condición. El principal problema detectado fue la presencia de esporas bacterianas debido a que esta especie tiene mayor contacto con el suelo, una crianza controlada en granja podría limitar esta incidencia.

TABLA 9. Carga bacteriana de *A. domesticus* en estado fresco y sometido a distintos tratamientos de calentamiento, pH y temperatura de almacenamiento (Fuente: Klunder *et al.* 2012)

Storage conditions		Log cfu/g	Storage time (days)				
			0	2	6	10	16
Refrigerator (5–7 °C)	Fresh	Total Viable Count	7.2	8.3	8.1	8.0	8.2
		Enterobacteriaceae	4.2	6.5	6.6	4.5	6.1
		Bacterial spores	3.6	4.4	4.4	4.2	2.6
	Boiled (1 min)	Total Viable Count	3.1	3.3	3.8	n.d.	4.1
		Enterobacteriaceae	<1	<1	1.3	1.3	3.2
		Bacterial spores	2.0	2.8	2.4	2.0	2.0
Ambient (28–30 °C)	Boiled (1 min)	Total Viable Count	3.1	10.1	sp	sp	sp
		Enterobacteriaceae	<1	>9			
		Bacterial spores	2.0	7.8			
	Boiled (5 min) dried* and ground	Total Viable Count	5.4	5.6	5.5	n.d.	n.d.
		Enterobacteriaceae	<1	<1	1.3		
		Bacterial spores	1.9	1.7	2.0		
	Boiled in acid (product pH 4.5)**	Total Viable Count	3.0	2.6	n.d.	n.d.	n.d.
		Bacterial spores	2.2	2.0			

sp: spoiled; n.d.: not determined; * dried at 55 °C for 24 h; **: Vinegar with 5% acetic acid. Single experiments, analysed in duplicate. Data represent mean values, with cv < 15%.

En cuanto a productos procesados a base de *A. domesticus*, se han llevado a cabo análisis microbiológicos de productos a base de grillo común comercializados en Bélgica y Holanda incluyendo grillos fritos, deshidratados y extruidos (Grabousky y Klein 2017. De las 12 muestras que analizaron (entre los tres tipos de producto) los recuentos de aerobios mesófilos, enterobacteria, *E. Coli* y *Staphylococcus* coagulasa (+) se hallaron en los límites permitidos según la legislación aplicable en los países donde se comercializaban estos. Sin embargo, después de refrigerar el producto por unos días, dentro de su periodo de vida útil, una muestra de grillo deshidratado presento un recuento de aerobios mesófilos fuera de la tolerancia permitida; hubo también una muestra de grillo extruido y una de grillo deshidratado que después del almacenamiento refrigerado presentaron un recuento de enterobacterias elevado. Un estudio similar fue el presentado por Garofalo *et al.* (2017) quienes evaluaron muestras de grillo en polvo y entero (cocido- deshidratado) comercializado en Países Bajos. Reportaron recuentos bajos de *Listeria* ssp., *Staphylococcus* spp., *Clostridium* spp. y *Bacillus* Spp. y ausencia de cepas patógenas (*L. Monocytogenes* y *Salmonella* spp.). Además, hicieron un estudio de diversidad microbiana por pirosecuenciación de gen 16S rRNA hallando que los productos en estudio (grillo entero y en polvo) eran

predominantes en *Firmicutes*, *Bacterioides* y *Proteobacterias* siendo las primeras más abundantes en grillo en polvo que entero. En resumen, los estudios indican que el grillo no presenta riesgos microbiológicos particularmente problemáticos comparado con otras fuentes proteicas tradicionales y pueden controlarse de forma similar, es decir, tratamiento térmico previo (cocido, fritura) y refrigeración posterior o por deshidratación. La conservación de esta matriz por métodos emergentes es aún un tema en el que se requiere mucha investigación.

Los insectos pueden presentar también peligros químicos tales como: pesticidas, metales pesados, toxinas naturales, micotoxinas, contaminantes formados durante el procesamiento y residuos veterinarios (Spiegel *et al.* 2013). Al respecto, Poma *et al.* (2017) evaluó la presencia de plaguicidas y metales pesados en insectos comestibles (polilla de la cera, langosta migratoria, gusano de la harina) y productos procesados derivados de estos (incluyendo croquetas de grillo) comercializados en Bélgica. Estos autores, hallaron que el contenido de contaminantes como policlorobifenilos (PCB), diclorodifenil tricloroetano (DDT), dioxinas, entre otros fueron inferiores al de otros productos de origen animal; además determinaron que los plaguicidas predominantes eran: viniltolueno, fosfato de tributilo y pirimifos metilo. En cuanto a la presencia de metales, los niveles de Cu y Zn en los insectos fueron similares a los medidos en carne y pescado, mientras que los niveles de As, Co, Cr, Pb, Sn fueron relativamente bajos en todas las muestras (<0.03 mg/kg). La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) considera que la principal vía de introducción de peligros químicos en insectos es mediante el pienso con el que se crén (Finke *et al.* 2015). En consecuencia, los peligros químicos presentes en los insectos dependen del hábitat en que se produzcan y plantas que consuman pudiendo controlarse seleccionando adecuadamente las condiciones de cría y dieta, es decir garantizando que estas no propicien el contacto con químicos tóxicos (Belluco *et al.* 2013).

Otro riesgo a considerar son las reacciones alérgicas derivadas del consumo de insectos. Ribeiro *et al.* (2018) hicieron una recopilación exhaustiva de investigaciones publicadas sobre el tema hallando 25 estudios que reportan reacciones alergias por consumo de: gusanos (*T. molitor*, *A. diaperinus*, *Z. atratus*, *C. sinensis* y *B. mori*), langostas (*P.*

succinta) y grillos (*G. bilmaculatus*, *G. campestris* y *A. domesticus*). Por otra parte, se han reportado reacciones cruzadas entre insectos y gambas producidos por la proteína arginina quinasa presente en el grillo de campo (*G. bilmaculatus*) y otros insectos; adicionalmente un nuevo alérgeno ha sido identificado en este tipo de grillo, el precursor de la hexamerina B1 (Srinroch *et al.* 2015). En cuanto a grillo común, se han reportado reacciones de rinitis y asma por exposición (mujer de 28 años que trabajaba en una granja de grillos) se determinó que estas reacciones se daban por mecanismos relacionados con la IgE (Linares *et al.* 2008); sin embargo, este no es un cuadro muy común. En suma, los riesgos y gravedad de las reacciones reportadas por el consumo de insectos son similares a los de otros alimentos ricos en proteínas como pescados y mariscos (Feng *et al.* 2017). En todo caso la EFSA indica que la potencial alergenicidad de estas materias primas debería indicarse en el etiquetado (Finke *et al.* 2015).

1.1.4. Aspectos legales en la Unión Europea (UE):

En 2015 la EFSA emitió, por encargo de la Comisión de la UE, un informe acerca de los riesgos que podían derivarse del uso de insectos en alimentos y piensos concluyendo que: los riesgos microbiológicos eran similares o menores que para otras fuentes proteicas, los priones de mamíferos no pueden replicarse en insectos por lo que no constituyen un vector y la acumulación de metales pesados o plaguicidas en estos está aún poco estudiada pero puede manejarse controlando la inocuidad de los alimentos utilizados para su cría (Finke *et al.* 2015). En base a esto, los insectos han sido reconocidos como nuevos alimentos por la UE mediante el Reglamento 2283/2015 el cual entro en vigor el 11 de diciembre del 2015 y es aplicable a partir del 1 de enero del 2018 en su totalidad. Cebrián (2018) hace una recopilación de estos aspectos legales e indica que a partir del 2018 la inclusión de productos a base de insectos en la lista de nuevos alimentos que se pueden comercializar en la UE podría tramitarse ante la Comisión Europea, pasando por la evaluación de la EFSA por dos vías: como nuevo alimento (Art. 3 apartado 2a inc. v) de la norma o como alimento tradicional de un tercer país (Art. 3 apartado 2b); sin embargo, es necesario el desarrollo de una legislación futura que

englobe los aspectos de los insectos como alimentos y piensos incluyendo: normas sobre la calidad esperada de productos a base de insectos, substratos con que pueden alimentarse y los criterios microbiológicos aplicables. (Van Huis & Dunke 2017; Cebrián 2018).

En cuanto a la aplicación en alimentación animal, la UE ha autorizado la producción y comercialización de piensos para acuicultura a base de insectos o formulados con harinas de estos, mediante Reglamento 893/2017, en que en la consideración (7) se hace una modificación del Reglamento 999/2001 en el que se establecen disposiciones para la prevención, el control y la erradicación de determinadas encefalopatías espongiiformes transmisibles. Tal modificación añade a los insectos de granja como fuente de proteína para la formulación de piensos para peces y establece las condiciones para su producción y uso (Raamsdoonk *et al.* 2017).

1.1.5. Desarrollo de productos a base de grillo:

Adicionalmente a la posibilidad de consumir los insectos simplemente cocinados (cocidos, fritos, o a la parrilla) en ensaladas u otros alimentos, se están desarrollando productos a base de insectos en matrices más complejas y con mayor procesado. En concreto en el caso del grillo común, Barrios (2017) estudio la sustitución parcial de harina de maíz por harina de *Acheta domesticus* en tortillas (alimento básico de la dieta centroamericana) hallando que a un 20% de reemplazo por el sucedáneo, las propiedades de color, textura y el tiempo de cocción eran óptimos y el nivel de proteínas se enriquecía. Otra experiencia interesante es la de Blanco y Giraldo (2016) quienes formularon una barra tipo granola a base de harina de *A. domesticus* como una alternativa para mejorar la suplementación proteica en Colombia. Se ha estudiado también el efecto de incluir harina de grillo en productos de arroz extruido observándose que con sustituciones de 10 a 15 % el producto final era más suave, oscuro, adhesivo y tenía un mayor nivel de proteínas; además la aceptabilidad con panelistas no entrenados era similar que el producto original (Tao 2016). Una matriz interesante en la que se ha investigado el efecto de adicción de

harina de grillo común son las emulsiones cárnicas. En esa línea, Kim *et al.* (2017) demostró que con una sustitución del 10% de carne por harina de *Acheta domesticus* se enriquecía el contenido mineral y proteico del producto y las propiedades tecno-funcionales de la harina no se modificaban considerablemente. Este tipo de desarrollos ha conllevado a un interés por la evaluación de las propiedades tecno-funcionales de las proteínas de insectos, siendo las especies de la orden orthoptera de las más estudiadas por su alto nivel proteico (Benedict *et al.* 2017). En tal sentido, Hall *et al.* (2017) estudiaron las propiedades de formación de espuma y estabilización de emulsiones de la proteína de grillo sometida a hidrolisis parcial hallando que una hidrolisis leve mejoraba estas propiedades pero podía afectar la estabilidad en el tiempo. Por su parte, Zielinska *et al.* (2018) compararon las propiedades de solubilidad a distintos pH, retención de agua y aceite; actividad emulsificante y formación y estabilización de espumas de tres especies de insectos incluyendo *G. Sigillatus* (Grillo del trópico) hallando que este tenía solubilidad en un rango más amplio de pH y que en general las especies evaluadas tenían propiedades tecno-funcionales buenas respecto a otras proteínas alimenticias excepto en cuanto a formación de espuma. Es así que el mercado de los productos a base de grillo está orientándose al incremento en la oferta comercial y diversificación de productos lo que ha conllevado a la reciente realización de estudios de absorción de humedad y vida útil de la harina de grillo (Kamau *et al.* 2018).

Rumpold y Scshulter (2013b) destacan el potencial de los insectos en la industria de piensos debido a su alto valor nutricional, limitado requerimiento de espacio, buena aceptabilidad (especialmente para peces y aves de corral) y la posibilidad de alimentarse con desechos orgánicos. Según Kvassay (2012) el grillo común es el insecto preferido para producción en masa; su crianza es ampliamente practicada en Thailandia (Halloran *et al.* 2016). Se estima que en este país hay unas 20000 granjas de grillo produciendo unas 7.500 toneladas métricas (Tm) de insectos (Van Huis 2016). También se han introducido granjas de esta especie en: Canadá, EE.UU, Sudáfrica, Europa y Australia (Ssepuyya *et al.* 2017). Los 10 principales productores de grillo en Estados Unidos generan alrededor de 2 billones de insectos equivalente a una biomasa de 1.36 millones de

kilos (Tabassum *et al.* 2010). En China, la entomofagia tiene una larga tradición de más de 2000 años; tan es así que las granjas de insectos constituyen la principal industria de crianza en zonas rurales (Feng *et al.* 2017). La producción está dirigida tanto al mercado local para consumo directo, como a la producción de piensos, siendo 20 especies las consumidas regularmente. En particular al grillo, entre otras especies, se le atribuyen propiedades medicinales (Li *et al.* 2013 citados por Feng *et al.* 2017).

En la línea de investigación de insectos para piensos Velkamp *et al.* (2012) realizaron un estudio de factibilidad acerca del uso de insectos como ingrediente en alimentos balanceados para cerdos y aves de corral criados en Holanda. Concluyeron que era técnicamente viable y eficiente dado que los insectos pueden convertir bioresiduos en proteínas de alto valor. Por su parte, Ssepuyya *et al.* (2017) hicieron una revisión exhaustiva de la situación de la cría de insectos y su uso como fuente de proteína en piensos para aves de corral y peces en regiones de África al sur del Sahara, hallando que esta industria está relativamente desarrollada en Sudáfrica y en otras regiones se encuentra en escala de laboratorio o experimental. Sin embargo, el potencial es amplio ya que el perfil de crecimiento en aves y peces con este producto es similar al obtenido usando piensos a base de grano de soya y harina de pescado (Finke 2002).

Estudios particularmente dirigidos a la aplicación de harinas de insectos en acuicultura indican que el uso de insectos en dietas para peces tiene un buen potencial; sin embargo, nutricionalmente no son equivalentes a la harina de pescado debido al menor contenido de aminoácidos azufrados y en muchas especies (no es el caso del grillo común) la carencia de DHA y EPA. Esto puede remediarse mediante la selección de variedades y especies con mejor perfil y la mejora de composición mediante la dieta (Tran *et al.* 2015). Los insectos de la orden Orthoptera, en particular, tienen un nivel proteico y aporte nutricional importante, que al incluirse en un 13 a 25% en la dieta de tilapias y pez gato mantiene, e incluso mejora, la ganancia de peso (Henry *et al.* 2015). En particular, Irungu *et al.* (2018) determinaron que se podía elaborar pienso en pellets con un 75% de harina

de grillo manteniendo propiedades fisicoquímicas adecuadas en el producto.

1.1.6. Situación de comercio de grillo en el mundo y en España:

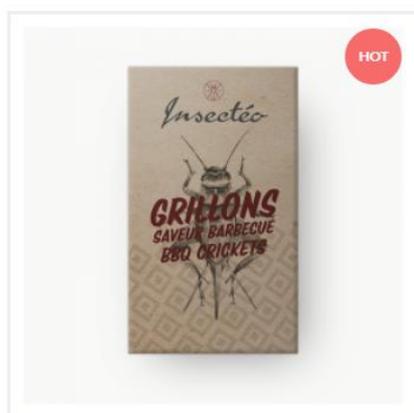
Siendo la década de los 90s DeFoliar (1992) tras recopilar un registro de este tipo de innovaciones distribuidos principalmente en Japón y EE.UU incluyendo: piruletas de escarabajo con sabor a tequila; inago (saltamontes marinados en salsa de soja) y conservas de avispas cocidas con arroz predice el crecimiento de la industria de insectos comestibles implicando que estos formaran una nueva clase de alimentos, “hechos a pedido”, distribuidos por empresas emergentes y producidos en pequeñas granjas. Actualmente al revisar el blog BugBurger (<http://www.bugburger.se/om/>) de Anders Engström (Suecia) se pueden hallar direcciones web de más de 80 compañías de países como: Tailandia, Bélgica, Reino Unido, E.E.U.U., Italia, Francia, Holanda, Finlandia, Canadá, entre otros ofreciendo gamas de productos a base de insectos incluyendo: harinas, barras proteicas, batidos, pasta, dulces, alimento para mascotas, pienso e incluso servicios de restauración.

El Grillo Común es una especie más explotada para consumo humano con compañías como: Thailand Unique (Tailandia- <https://www.thailandunique.com/insect-bug-flour-powder>), Chapul (USA- <https://chapul.com/collections/all>), EntomoFarms (Canadá- <http://entomofarms.com/>), Grilo (Australia- <https://griloprotein.com.au/>), entre otras que ofrecen variedad de productos: pastas, barras energéticas, galletas, etc. En Estados Unidos la compañía All Things Bugs con apoyo de la fundación Bill y Melinda Gates y la USDA está distribuyendo harina de grillo (bajo la marca Whole Cricket Powder) a varios mayoristas que la están incorporando en productos de panificación y barras energéticas (Dossey *et al.* 2014). En Latinoamérica además de las numerosas compañías de productos a base de insectos en México (en este país la entomofagia tiene cierto devenir histórico), se tienen estudios como los de Portillo (2017) quien estimó los costos de instalación de una planta de

harina de grillo para alimentación humana en El Salvador. En Kenia Kipkoech *et al.* (2017) evaluó la actitud nutricional del grillo como recurso para combatir la deficiencia proteica en la población de dicho país.

En España la compañía Insectfit es la pionera en el diseño de productos a base de insectos. Con el apoyo de Juan Roig, dueño de Mercadona, están desarrollando barras energéticas a base de harina de grillo y gusano de la harina utilizando materias prima importada de Tailandia (Noticia publicada en la web de diario El País publicada el 31 de Agosto del 2017 disponible en: https://elpais.com/economia/2017/08/30/actualidad/1504117730_773874.html). Este nicho también está siendo explotado por la compañía Don Grillo que provee platos preparados, snacks, galletas y barras energéticas a base de insectos comestibles (grillo, escorpiones, gusanos) de momento trabaja en modalidad de venta on-line a pedido e importa la materia prima de Francia (Noticia publicada en la web del diario El Economista el 16 de Enero del 2018: <http://www.eleconomista.es/evasion/gourmet/noticias/8869572/01/18/Don-Grillo-la-primer-tienda-espanola-en-vender-insectos-comestibles.html>).

Asimismo, la cadena de supermercados Carrefour viene ofreciendo barras energéticas a base grillo y snack sabor barbacoa a base del mismo (figura 4) En concreto, es un nicho de mercado que ha emergido recientemente dado que el contexto legal, aunque sea aún controvertido, ha permitido su explotación muy recientemente (inicios del 2018); sin embargo, se verifica un creciente interés por el emprendimiento en este rubro. Anticipándose a esta coyuntura, Ramón (2016) elaboró un plan de negocios completo para la puesta en marcha de una empresa productora de harina de grillo para consumo animal en Valencia, concluye que a pesar de las barreras de entrada (pocas grandes empresas dominan el mercado) la inversión es moderada y la puesta en marcha es simple y además el producto es innovador y con un buen plan de marketing podría orientarse a productores con interés en los aspectos ambientales de su actividad.



Grillos Barbaoco



FIGURA 4. Oferta de productos gourmet a base de grillo de las compañías Don Grillo y Carrefour (Fuente: Web de Don Grillo: www.insectoscomestibles.es y foto tomada en Carrefour Campanar).

1.2. GELES EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA:

Otro campo de negocio en la alimentación humana en el que los insectos podría jugar un papel estaría relacionado con el desarrollo de nuevos productos a partir de aislado proteico de insecto. En la misma línea que se hizo con el suero de leche, o con derivados de pescado mediante uso de Altas Presiones Hidrostáticas (APH) u otros agentes que permitan la formación de geles bien por modificación de la proteína o bien por su inclusión como tal en dicho gel.

1.2.1. Definición de Gel:

Según Belitz (2009) un gel es un sistema disperso de al menos dos componentes en el cual la fase dispersa y el dispersante forman una red cohesionada. Se caracteriza por su falta de fluidez y deformabilidad elástica. Estas propiedades se logran entrecruzando un polímero mediante uniones covalentes y no covalentes para formar una red capaz de atrapar agua y sustancias de bajo peso molecular (Badui 2006).

1.2.2. Mecanismo de formación de geles proteicos:

Los geles formados a base de proteínas son agregados de moléculas desnaturizadas con cierto grado de orden resultando en la formación de una red continua. La formación de esta estructura se debe tanto a fuerzas covalentes (disulfuro cruzados) como no covalentes (puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas); estos primeros unen y ordenan la red mientras que los segundos la estabilizan y refuerzan (Wong 2018). En tal sentido, la actitud para gelificar de una proteína viene dada por dos propiedades: la flexibilidad, entendida como la capacidad de desnaturizar y dar cadenas extendidas y el entrecruzamiento dado por la habilidad de formar uniones en tres dimensiones (Spotti 2013). Estos geles pueden ser reversibles, en cuanto predominen las interacciones puente de hidrógeno, como es el caso de la gelatina o irreversibles si es que predominan las interacciones hidrofóbicas y sulfridrilo-disulfuro, como ocurre con las proteínas del huevo o el suero lácteo (Badui 2006).

1.2.3. Efectos de las APH en alimentos e inducción de modificaciones estructurales en proteínas:

Las APH tienen amplias aplicaciones y efectos sobre los alimentos siendo los principales: reducción de carga bacteriana, inactivación de enzimas y cambios en su cinética de acción, gelatinización de almidones y gelificación de proteínas, estos efectos variados dependen de la magnitud del tratamiento de presurización (tabla 10). Este tratamiento actúa principalmente sobre enlaces químicos débiles. En general las proteínas y polisacáridos al ser macromoléculas ricas en este tipo de enlaces son susceptibles de ser modificados irreversiblemente bajo presión (Vanacolcha y Abril 2003). Las APH pueden afectar significativamente las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas. Siendo que esta segunda determina la funcionalidad proteica, la presurización de alimentos puede resultar en nuevas propiedades interesantes desde el punto de vista tecnológico (Tewari 2007).

TABLA 10. Modificaciones inducidas por las APH en los alimentos

Presión (MPa)	Efectos
> 200	Influencia sobre la cinética enzimática Modificación de las propiedades físicas de las proteínas Alteración de la membrana plasmática
> 300	Inactivación irreversible de enzimas Muerte de los microorganismos
> 400	Gelificación de almidones Desnaturalización de proteínas
> 500	Muerte de las esporas bacterianas Inactivación de enzimas involucradas en la esporulación

Paolu *et al.* (2003) indica que el proceso de gelación inducida por calor y altas presiones es diferente ya que este último se atribuye al descenso de volumen de la solución proteica. Esta diferencia se traduce en características físicas particulares de los geles obtenidos mediante APH respecto a lo inducidos por calor, algunas de estas son: mayor porosidad, menor cantidad de enlaces intermoleculares, mayor elasticidad cuando la concentración proteica es alta, menor gomosidad y aspecto más reluciente (Yang & Powers 2016; Palou *et al.* 2003).

Las modificaciones que ocurren en las proteínas de la leche al tratarse por APH han sido ampliamente estudiadas. Keeman *et al.* (2001) evaluó los mecanismos mediante los cuales se induce gelificación en la leche al aplicar presurización. Halló que el principal evento para que se de este fenómeno es la desintegración de la caseína micelar que ocurre en la descompresión y es un proceso baroreversible. Ocurre también denaturalización parcial de la β -Lactoglobulina dependiendo del nivel de presión (figura 5). El tratamiento por APH en leche para elaboración de quesos ha recibido un especial interés ya que al usarse leche pasteurizada las características organolépticas del queso resultante no son tan buenas como las obtenidas con leche cruda o presurizada. En esa línea Liepa *et al.* (2017) evaluaron los efectos en la coagulación de la leche y firmeza final del queso al tratar con presiones de 400 a 600 MPa hallando que a niveles de 500 a 550 MPa por 15 min se mejoraba la coagulación y la firmeza del producto resultante era mayor. Por otro lado, Fernández (2005) indica que

el uso de leche presurizada en elaboración de quesos acorta el tiempo de maduración dado que acentúa la proteólisis facilitando la liberación de péptidos y aminoácidos que den sabor. Respecto a la reutilización de subproductos Torres (2016) estudió la gelificación de mezclas de suero de quesería con WPI (Whey Protein Isolate) a distintas concentraciones (5-15%) demostrando que la utilización de suero mejoraba la estabilidad del gel reduciendo la sinéresis.

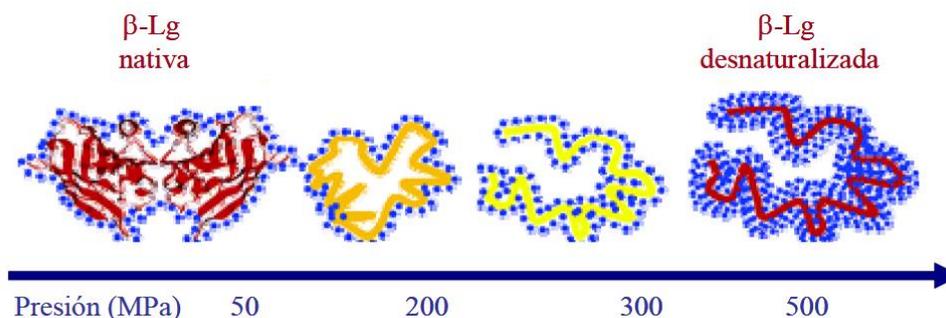


FIGURA 5. Desnaturalización de la β -Lactoglobulina por APH (Adaptado por Bravo 2012 de Orlie et al. 2007)

Tres Palacios (2007) estudió la gelificación por APH de pastas cárnicas a base de carne de pollo, yema de huevo y albumen con y sin adición de transglutaminasa (TGasa). Hallando que las condiciones que favorecían una mejor textura y firmeza para productos tipo salchicha eran 700 MPa por 30 min a 40 °C con una adición de 0.3% de TGasa. Por su parte, Iwasaki (2006) evaluó el efecto de pre-tratar con APH proteínas miofibrilares de pollo y cerdo para luego gelificar con calor. Halló que al aplicar un pretratamiento a 200 MPa los filamentos delgados de las proteínas miofibrilares se disociaban, obteniéndose como resultando en mejores características reológicas de los geles producidos por calor (elasticidad aparente).

Las APH se han aplicado también al procesamiento de productos hidrobiológicos. Ashie y Lanier (1999) evaluaron la obtención de surimi por APH, tratando previamente el producto con TGasa. Aplicando un tratamiento de 300 MPa por 15 min a 4 °C, determinaron que la presurización favorecía la acción de las TGasa obteniendo geles de mejor firmeza que al tratar solo con enzima. Por su parte, Ma et al. (2015)

estudiaron el efecto de aplicar distintos niveles de presión en la gelificación de surimi elaborado a base de *N. Virgatus*, hallando que a 400 MPa (a 25 °C por 15 min) se formaba una red proteica densa produciendo una estructura más firme y menor pérdida durante la cocción.

1.2.4. Enzimas y gelatina como agentes gelificantes en alimentos:

a. Transglutaminasa (TGasa) y Glucosa Oxidasa (GOx):

La TGasa es una enzima ampliamente aplicada en la industria cárnica. Formalmente es una γ -glutamyltransferasa capaz de catalizar reacciones de transferencia de grupos acilo e inducción de enlaces cruzados covalentes en proteínas (Nio *et al.* 1986 citado por Sun & Holley 2011). Por su parte la GOx cataliza la oxidación de la glucosa en ácido glucorónico utilizando oxígeno como aceptor de electrones formando una molécula de peróxido de hidrógeno (Sosa & Galvis 2010). En sistemas proteicos el peróxido resultante del tratamiento con GOx actúa como inductor de formación de puentes disulfuro.

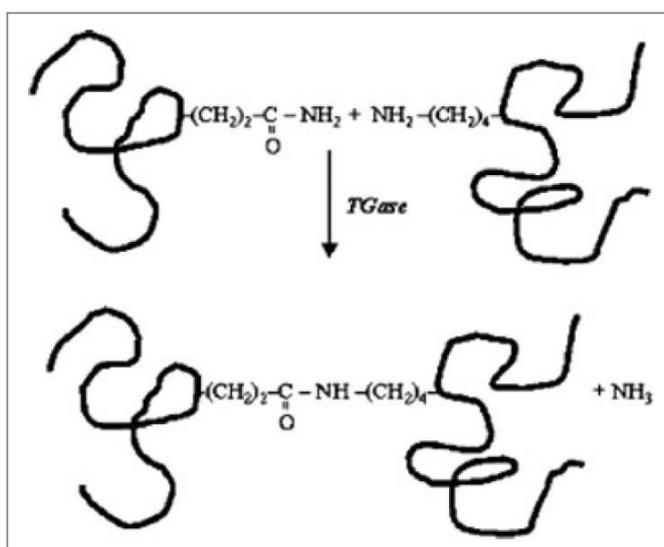


FIGURA 6. Formación de enlaces cruzados lys-lys por acción de la TGasa (Fuente: Sun & Holley 2011)

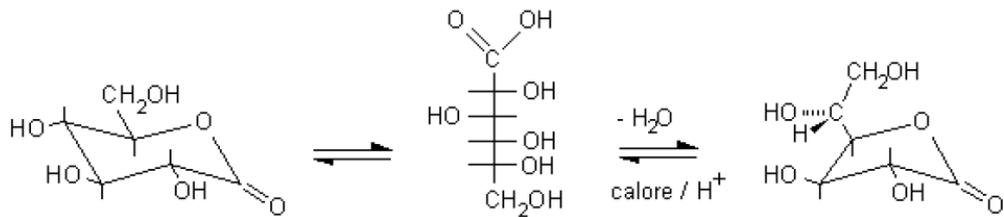


FIGURA 7. Reacción de oxidación catalizada por GOx (Fuente: Sosa & Galvis 2010).

La capacidad de estas enzimas para inducir o mejorar la formación de geles ha sido aprovechada en procesamiento de distintas matrices alimenticias. Ramírez *et al.* (2012) estudiaron los efectos de tratar mezclas de WPI con miosina y tratar con TGasa hallando que no inducía enlaces de una proteína a otra, pero sí intermoleculares mejorando la capacidad de gelificación térmica. Por su parte, Shand *et al.* (2007) demostró que al tratarse proteína de guisantes con TGasa se obtenían geles con mayor elasticidad y resistencia al corte. Se han elaborado también geles a partir de pasta de cangrejo azul utilizando esta enzima (Hernández *et al.* 2017). En cuanto a al GOx, esta enzima ha sido aplicada como inductor de gelificación de proteínas miofibrilares de cerdo. Los investigadores verificaron una relación lineal entre la dosis de GOx y la producción de H₂O₂, el tiempo de incubación también incrementaba la formación de este producto. Se ha evaluado también el efecto combinado de pre-tratar proteínas miofibrilares de cerdo con GOx y luego con TGasa, se concluyó que el uso secuencial de estas enzimas resulta en la formación de geles con propiedades reológicas (firmeza y elasticidad) mejoradas (Wang *et al.* 2017).

b. Colágeno y Gelatina:

Se designa como colágeno un grupo de proteínas fibrosas que forman parte de la matriz extracelular del tejido conectivo. El colágeno se encuentra en la piel, huesos, tendones, cartílagos, vasos sanguíneos, dientes, córnea, etc. de distintas especies animales. Se constituye así en la principal escleroproteína cubriendo un 25% del total de las proteínas de los mamíferos (Garrido *et al.* 2006; Charry 2011). Está conformado por moléculas de estructuras tipo bastón denominadas topocolágeno

compuestas de tres cadenas poli-peptídicas lineales cada una de 1000 aminoácidos de longitud. En la secuencia de aminoácidos aparece la glicina cada tercer residuo y se presenta con regularidad la secuencia glicina-prolina-hidroxiprolina (Berg *et al.* 2008).

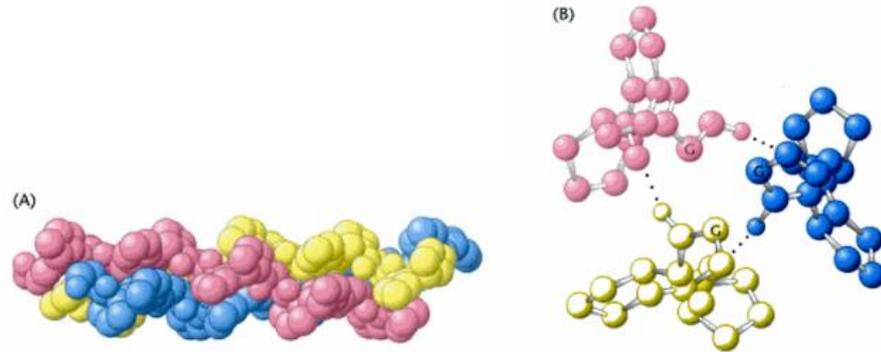


FIGURA 8. Estructura de la proteína de colágeno A) Modelo espacial compacto. B) Sección transversal de un modelo de colágeno. Las hebras se unen mediante puentes de hidrógeno y cada tres carbonos se halla un residuo de glicina (Fuente: Berg *et al.* 2008)

La gelatina es uno de los agentes gelificantes más utilizados en la industria alimentaria. Requiere muy bajas concentraciones (0.5 a 1% p/p) y moderada temperatura (27-34 °C) para ejercer su acción. Con este aditivo pueden obtenerse geles por medios físicos, resultando geles transparentes, termorreversibles y elásticos; y por medios químicos que son más termoestables (Nazir *et al.* 2016).

2. OBJETIVOS:

2.1. OBJETIVO GENERAL:

Estudiar la posible aplicación de proteína aislada de grillo común (*Acheta domesticus*) como ingrediente en una matriz alimentaria.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Extracción y aislamiento de proteínas de harina de *Acheta domesticus*.
- Caracterización de fracciones proteicas de *A. domesticus*. Aisladas.
- Estudiar la capacidad de gelificación de dichas fracciones al someterse a distintos tratamientos tecnológicos (incubación con enzimas, presurización, tratamiento térmico).
- Obtener geles formulados con las fracciones de proteína de grillo aisladas utilizando gelatina porcina como gelificante.
- Evaluar las propiedades reológicas y fisicoquímicas de los geles obtenidos en cada caso.

3. METODOLOGÍA:

3.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS:

Se aplicó el método de Yi *et al.* (2015) con ciertas modificaciones. Para la extracción ácida se consideraron los mismos parámetros de pH y centrifugación que los autores citados; para la extracción básica se seleccionaron los parámetros según pruebas preliminares que optimizaban el rendimiento de la extracción. Para cada vía de extracción (ácida y alcalina) 400 g de harina de grillo (marca Thailand Unique) se diluyeron en 1200 ml de agua destilada. Luego se ajustó el pH adicionando ácido ascórbico o soSa caustica según la vía de extracción (tabla 11). La dispersión resultante fue homogenizada en un agitador magnético por una hora y luego filtrada con un tamiz metálico de 400 μm de luz. El residuo (fracción 1) que no paso por el tamiz se distribuyó en tubos falcon y se congeló a -80°C . El filtrado se centrifugó en un equipo Beckman J-5 aplicando las condiciones indicadas en la tabla 13 para cada forma de extracción (ácida o básica); obteniéndose un pellet (fracción 2-insoluble) y un sobrenadante (fracción 3-soluble).

TABLA 11. Parámetros de extracción de PG por vía ácida y alcalina.

Vía	pH	RCF (g)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Ácida	5	15000	4	30
Alcalina	10	4200	4	10

Las tres fracciones de cada extracción fueron congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para proceder a su liofilización. En la figura 9 se presenta un esquema del proceso.

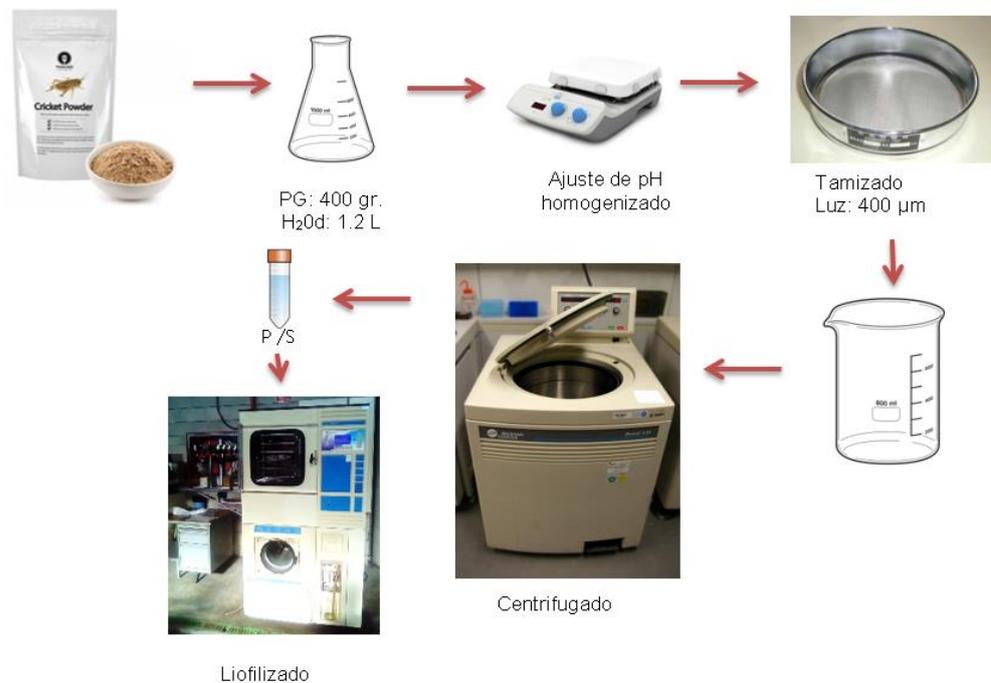


FIGURA 9. Diagrama experimental de procedimiento de extracción de PG

3.2. CUANTIFICACIÓN DEL PORCENTAJE DE PROTEÍNAS:

Se llevó a cabo en colaboración con el servicio científico-técnico de analítica del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. El ensayo se hizo por triplicado para cada muestra (pellet y sobrenadante

de cada extracción) utilizando un equipo analizador de nitrógeno por método de Dumas (Elementar, Alemania). La curva de calibración para la determinación se hizo con patrón de ácido aspártico. Los resultados de nitrógeno total se multiplicaron por el factor 6.25 para estimar el contenido de proteína.

3.3. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS:

El análisis de proteómica se realizó en la instalación del Servicio Central de Apoyo a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia. La identificación de proteínas comprendió las siguientes etapas:

3.3.1. Análisis en gel mono-dimensional por SDS-PAGE 1D:

Se hizo en 6 muestras (3 fracciones por cada modalidad de extracción, ácida o básica). Las proteínas se extraen de cada muestra con un volumen (1:50 w/v) de solución UTC (8M Urea, 2 M thiourea; 4% CHAPS) con agitación vigorosa durante 1 hora. Luego, se precipitan 75 μ L de las proteínas con el siguiente protocolo:

1. Añadir ácido tricloroacético hasta concentración final aproximada del 10%, vortex, e incubar a 4°C.
2. Centrifugar a 15000g X 10min y retirar el sobrenadante.
3. Añadir un volumen de acetona fría igual al volumen inicial de muestra, vortex, y dejar a 4°C al menos 10min.
4. Centrifugar a 15000g X 5min, retirar el sobrenadante y secar el pellet.

Los pellets de proteína se re suspenden con 50 μ L de UTC y se limpian con el Kit CleanUp según protocolo del fabricante. Finalmente, se carga una cantidad muy pequeña (5%) en el gel 1D PAGE para obtener bandas definidas.

3.3.2. Identificación de proteínas por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS):

Se hizo este análisis para el pellet de la extracción ácida. Se seleccionó esta muestra ya que en el SDS-PAGE 1D presentó un mayor número de bandas claramente definidas, además esta fracción tiene un mayor rendimiento y pH más cercano al de la carne. Se tomó la carrera del SDS-PAGE 1D correspondiente a la muestra y se dividió en cuatro partes. Las muestras fueron digeridas con 50 ng de tripsina de grado de secuenciación. La mezcla de digestión se secó en una centrifuga de vacío, se resuspendió en acetonitrilo (ACN) al 2%, ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% (cortes 1 y 2 con 6 μ L, rodajas 3 y 4 con 10 μ L).

Para la determinación por cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem (LC-MS / MS): Se cargaron 5 μ l de muestra en una columna de trampa (Columna NanoLC, 3 μ C18-CL, 350 μ x0,5 mm; Eksigen) y se desalinizaron con TFA al 0,1% a 3 μ l / min durante 5 min. Los péptidos se cargaron después en una columna analítica (columna LC, 3 μ C18-CL, 75 μ m 12 cm, Nikkyo) equilibrada en ACN al 5%, ácido fórmico (FA) al 0,1% (ácido fórmico). La elución se llevó a cabo con un gradiente lineal de 5 a 40% de B en A durante 30 minutos. (A: 0.1% FA; B: ACN, 0.1% FA) a una velocidad de flujo de 300nl / min. Los péptidos se analizaron en un espectrómetro de masas nanoESI qTOF (5600 TripleTOF, ABSCIEX). La muestra se ionizó aplicando 2,8 kV al emisor de pulverizaciones. Los escaneos Survey MS1 se adquirieron a 350-1250 m / z durante 250 ms. La resolución de cuadrupolo se estableció en 'UNIDAD' para experimentos con MS2, que se adquirieron a 100-1500 m / z durante 50 ms en modo 'alta sensibilidad'. Se usaron los siguientes criterios de cambio: cargo: 2+ a 5+; intensidad mínima; 70 cuentas por segundo (cps). Se seleccionaron hasta 50 iones para la fragmentación después de cada exploración. La exclusión dinámica se estableció en 15 s.

Los parámetros predeterminados de ProteinPilot se usaron para generar una lista de picos directamente desde 5600 archivos TripleTof wiff. El

algoritmo Paragon (Shilov, IV, SL Seymour, y otros (2007). Mol Cell Proteomics 6 (9): 1638-55) de ProteinPilot v 4.5 se utilizó para buscar en la base de datos Uniprot Athropoda (versión 06-2018) la que fue generada por el laboratorio de proteómica para este estudio ya que la especie *A. domesticus* está mal representada en las bases de datos de proteínas (sólo existen unas 500 proteínas en el repositorio de NCBI frente a 87.302.391 de homo sapiens) por lo que muchas proteínas se identifican por homología de secuencia con proteínas de otras especies. Finalmente, se reportan cada proteína identificada, la especie en la que está definida y el número de péptidos con al menos un 95% de confianza correspondientes a la proteína identificada. La lista de proteínas comprendía alrededor de 500, de las cuales se reportan en la presente investigación las 20 más abundantes, la especie en la cual está caracterizado el péptido identificado en la base de datos y el número de péptidos hallados en la muestra con al menos un 95% de confianza de corresponder al péptido indicado por la base.

3.4. EVALUACIÓN DE GELIFICACIÓN DE FRACCIONES DE PG TRATADAS CON ENZIMAS, CALOR Y APH:

Con las fracciones proteicas (residuo, pellet, sobrenadante) extraídas por vía ácida y alcalina se prepararon dos baterías de tubos de ensayo de 10 ml cada uno con la composición indicada en la tabla 12:

TABLA 12. Composición de tubos de prueba con fracciones de PG

Tratamiento	Extracción ácida						Extracción alcalina						Blanco	
	Residuo		Pellet		Sobrenadante		Residuo		Pellet		Sobrenadante			
	TGasa	GOx	TGasa	GOx	TGasa	GOx	TGasa	GOx	TGasa	GOx	TGasa	GOx	TGasa	GOx
Proteína (g)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
NaCl (g)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
CaCl₂ (g)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Tapón (ml)	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5
Enzima (mg)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Para el blanco se utilizó proteína aislada de suero lácteo (WPI) y el tampón aplicado como diluyente fue sodio-fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) a concentración 0.1 M. Todas las muestras se llevaron a incubación a 50 °C por 16 horas. Luego, se mantuvieron en refrigeración a 4 °C por 2 días. Pasado este periodo de almacenamiento se sometieron a baño maría con agitación a 85 °C por 15 min. Las muestras sin gelificar (todas las correspondientes a las fracciones de PG) se distribuyeron en tubos de ependorf y se sellaron al vacío en bolsas ROVAC. Finalmente, las fracciones se trataron por altas presiones en un presurizador marca EPSI (Engineered Presurre Systems International-Bélgica) de 2.35 Litros de capacidad. Las condiciones de tratamiento fueron 500 MPa por 15 min a 25 °C.

3.5. Obtención de geles con adición de gelatina porcina (E441) y tratamiento por APH:

En primer lugar, se realizó una prueba preliminar formulando geles con 15 % de aislado proteico (pellet de la extracción ácida, seleccionado por su mayor rendimiento y pH similar al de la carne) y cinco concentraciones de gelatina porcina (E-441): 0.5, 2, 4, 8 y 10%. Los preparados se refrigeraron por 2 horas y luego se evaluó visual y táctilmente la consistencia de los geles resultantes (véase figura 10). Se seleccionó la dosis de 2% ya que fue la mínima a la cual se formaba un gel estable y de consistencia suficientemente firme.

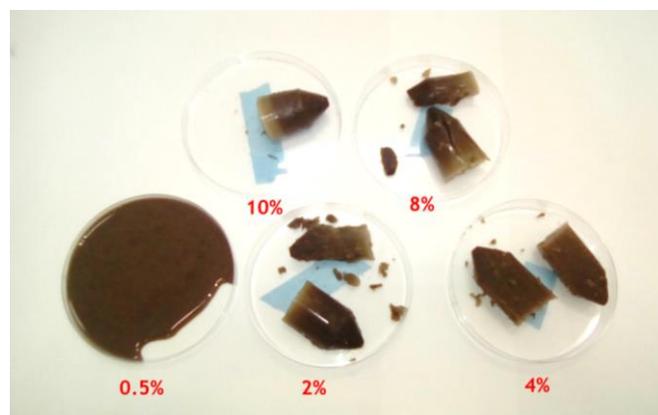


FIGURA 10. Geles formulados a base de pellet extraído de *A. domesticus* por vía ácida con adición de distintos niveles de E-441.

En base a lo anterior se formularon geles con las distintas fracciones de PG (pellet y sobrenadante) obtenidas por vías ácida y alcalina, utilizando además WPI como blanco. Se seleccionaron niveles de proteína de 7, 11 y 15% (p/p) tomando como referencia los estudios de Torres (2016) quien evaluó estabilidad de geles en base a WPI. Por cada tratamiento se prepararon 40 ml de solución según la formulación descrita en la tabla 13:

TABLA 13. Formulación de geles de distintas fracciones de PG con adición de E-441

Tratamiento	WPI			Extracción ácida						Extracción alcalina					
				Sobrenadante			Pellet			Sobrenadante			Pellet		
	7%	11%	15%	7%	11%	15%	7%	11%	15%	7%	11%	15%	7%	11%	15%
Proteína (g)	2.8	4.4	6	2.8	4.4	6	2.8	4.4	6	2.8	4.4	6	2.8	4.4	6
NaCl (g)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
CaCl₂ (g)	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
H₂O.d (ml)	37.2	37.2	37.2	37.2	37.2	37.2	37.2	37.2	37.2	37.2	37.2	37.2	37.2	37.2	37.2
Enzima (mg)	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8

Las soluciones resultantes se distribuyeron en tubos ependorf y se cerraron al vacío en bolsas ROVAC, se mantuvieron en refrigeración a 4°C por 16 horas y luego se trataron por APH a 500 MPa por 15 min. Después del tratamiento, las muestras se almacenaron nuevamente en refrigeración.

Para el estudio de estabilidad de los geles obtenidos se realizaron determinaciones a los 1, 7, 14, 21 y 28 días de textura, sinéresis, pH y color.

3.5.1. Medición del pH:

Se prepararon diluciones 1:4 (1.5 g de gel en 6 ml de H₂O d) según el método de Georgantelis *et al.* (2007). Las soluciones fueron homogenizadas en un vortex y se midió el pH por triplicado con un potenciómetro (Crison Basic 20+, Barcelona, España).

3.5.2. Medición del color:

Se determinó mediante un colorímetro Konica Minolta (Konica Minolta Sensing Inc., Japan). Las mediciones se realizaron por quintuplicado. Los resultados de coordenadas del sistema cromático de Hunter (a^* , b^* y L^*) se exportaron a un ordenador mediante el software SPECTRA MAGIC. Con estos datos se calculó: el valor Chroma (c), Hue (h) y la diferencia de color (ΔE) según las ecuaciones 1,2 y 3.

$$\text{Metric chroma: } C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$\text{Metric Hue-Angle: } h = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \text{ [degrees]} \quad \text{Ecuación 2}$$

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad \text{Ecuación 3}$$

Los cálculos de diferencia de color se realizarán para cada muestra respecto al primer día y se evaluarán teniendo en consideración los criterios indicados por Martínez *et al.* (2011): Para $\Delta E^* < 1$ las diferencias de color no son apreciadas por el ojo humano, $1 < \Delta E^* < 3$ el ojo humano puede apreciar diferencias mínimas de color dependiendo del ángulo, $\Delta E^* > 3$ las diferencias de color son obvias para el ojo humano.

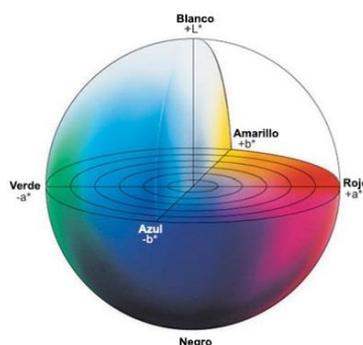


FIGURA 11. Espacio del color CIELab (Konika Minolta 2014)

3.5.3. Determinación de sinéresis:

Se aplicó la metodología de Ribota *et al.* (2012) para lo cual se pesaron los tubos eppendorf conteniendo los geles. Luego, se llevó a centrifugación

en una micro-centrifuga (Eppendorf 5417CR, Alemania). Las condiciones aplicadas fueron 1500 g por 15 min a 4 °C. El líquido liberado se escurrió y se pesó nuevamente la muestra para determinar por diferencia de pérdida de líquido de la muestra. Luego se pesó el tubo ependorff solo para obtener por diferencia el peso inicial del gel. La sinéresis se expresó como porcentaje del agua total. Las determinaciones se hicieron por triplicado.

3.5.4. Determinación de la dureza:

Se realizó mediante un texturómetro TA-Xtplus (Stable Micro Systems, Godalming, Inglaterra). Para la medición se utilizó la sonda P/75, una velocidad de 1 mm/s con tiempo de espera de 5 s entre cada dos ciclos. Las determinaciones se hicieron por triplicado. Los resultados de dureza se registraron aplicando el software TEXTURE EXPONENT 3.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

4.1. CONTENIDO PROTEICO DE FRACCIONES DE PROTEÍNA DE GRILLO (PG):

Los resultados de contenido de nitrógeno y proteína para las distintas fracciones estudiadas se presentan en la tabla 14:

TABLA 14. Contenido de proteína de fracciones de PG obtenidas por vía ácida y alcalina

TIPO DE EXTRACCIÓN	FRACCIÓN	Nitrógeno (%)	Proteína (%)
ÁCIDA	Residuo	10.86 (0.08)	67.84 (0.50)
	Pellet	10.64 (0.15)	66.51 (0.94)
	Sobrenadante	9.82 (0.11)	61.40 (0.69)
BÁSICA	Residuo	10.69 (0.10)	66.81 (0.63)
	Pellet	11.46 (0.04)	71.60 (0.25)
	Sobrenadante	8.82 (0.01)	55.13 (0.06)

Los números entre paréntesis son las desviaciones estándar

Los resultados de la tabla 14 muestran que para el caso del residuo obtenido por las dos vías de extracción los contenidos de proteína son muy similares, lo cual es razonable dado que ambos métodos son iguales hasta este punto (filtrado). En el caso del pellet, este es más abundante en proteínas al extraerse en medio básico. Por otro lado, la fracción del sobrenadante presenta una ligera mayor riqueza en proteínas al fraccionarse en medio ácido.

Los resultados de contenido proteico en fracciones de extracto de *A. domesticus* muestran que son comparables a los que indicó Ndiritu *et al.* (2017) aplicando también el método de Yi *et al.* (2015) para la extracción ácida: 66.66 y 65.79% para las fracciones de pellet y residuo respectivamente. Los resultados también muestran que las proteínas de *A. domesticus* son en su mayoría insolubles ya que para los dos tipos de extracción el pellet presenta mayor contenido proteico, el resultado es consistente con lo estudiado por Adebawale *et al.* (2005) quienes determinaron que de una harina de grillo con un 65% de proteína solo se solubilizaba como máximo el 28% del total de la harina.

4.2. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS:

La figura 12 muestra el SDS-PAGE 1D de fracciones aisladas de PG correspondientes a las distintas formas de extracción (ácida o básica). El SDS-PAGE 1D muestra una variedad abundante de proteínas en todas las fracciones de aislado de PG para las dos vías de extracción siendo las de peso molecular comprendido entre 15 y 50 KDa las más abundantes; sin embargo, el rango se extiende casi desde los 5 a 250 KDa lo que se corresponde con los resultados de Hall *et al.* (2017) quien halló que para proteínas de *G. Sigilatus* las bandas se extendían en un intervalo que iba desde los 14.4 a 212 KDa. Similares resultados reportaron Yi *et al.* (2015) quienes al aplicar extracción ácida determinaron que en el sobrenadante predominaban proteínas de bajo peso molecular (<95 KDa) y que en el pellet se podrían distinguir además proteínas de mayor peso molecular (200 KDa). Por otro lado, Kim *et al.* (2017) hizo este mismo ensayo para las fracciones solubles de PG a distintos pHs hallando que a pHs ácidos las bandas entre 15 y 25 KDa eran más marcadas y abundantes, en cambio en

el rango alcalino las bandas eran más definidas para pesos moleculares entre 25 y 35 KDa.

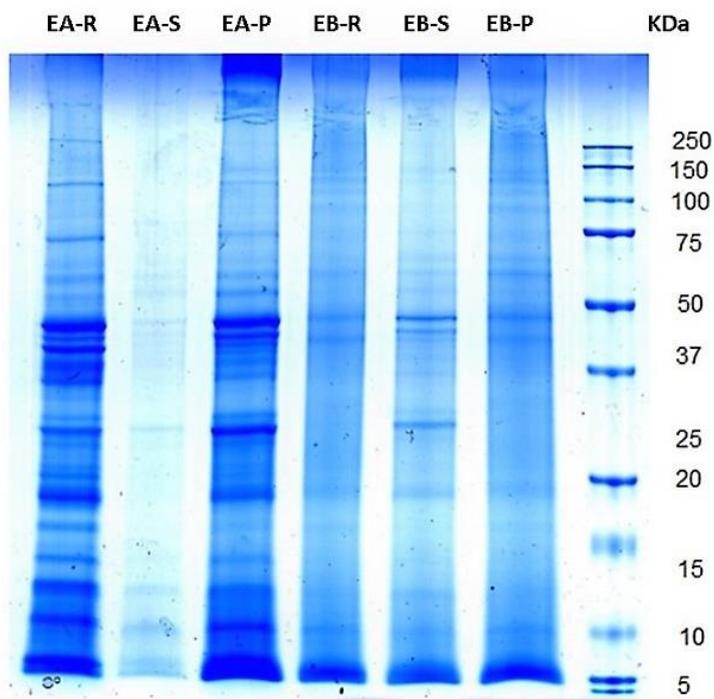


FIGURA 12. SDS-PAGE 1D de fracciones aisladas de PG por vía ácida y alcalina (EA: Extracción ácida, EB: Extracción básica, S: Sobrenadante, P: Pellet, R: Residuo).

En la tabla 15 se presenta el listado de proteínas identificadas por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa en tándem (LC/MS-MS).

TABLA 15. Proteínas identificadas por LC-MS/MS en fracción insoluble de PG obtenida por vía ácida

PROTEÍNA	ESPECIE DE REFERENCIA	N° Peptidos (95%)
Miosina de cadena larga isoforma C	<i>Locusta migratoria</i>	84
Miosina de cadena larga Isoforma E	<i>Drosophila virilis</i>	70
Miosina de cadena larga	<i>Blattella germanica</i>	69
Proteína no caracterizada	<i>Glossina fuscipes</i>	67
Miosina de cadena larga isoforma Mhc	<i>Lethocerus indicus</i>	54
Tropomiosina	<i>Teleogryllus emma</i>	47
Proteína no caracterizada	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	45
Troponina	<i>Teleogryllus emma</i>	39

ATP sintetaza subunidad beta	<i>Oryctes borbonicus</i>	39
ATP sintetaza subunidad beta	<i>Cryptotermes secundu</i>	37
Proteina no caracterizada	<i>Anopheles stephens</i>	36
Tropomiosina isoforma 2	<i>Teleogryllus emma</i>	35
Beta actina	<i>Polyrhachis vicina</i>	32
ATP sintetaza subunidad beta	<i>Enallagma aspersum</i>	31
Alfa actina	<i>Daphnia magna</i>	30
Proteina no caracterizada	<i>Blattella germanica</i>	29
Histona H4	<i>Glossina morsitans</i>	28
Proteina de cuticula larval	<i>Cryptotermes secundus</i>	27
Histona H3	<i>Orchesella cinct</i>	26
Hexamerina 2	<i>Teleogryllus commodus</i>	23

Los resultados de identificación por LC-MS/MS de la fracción insoluble obtenida por vía ácida muestran que la especie *A. domesticus* presenta proteínas y enzimas de estructura similar a las identificadas en otros artrópodos como: *B. germanica*, *T. emma*, *C. secundu*, entre otras siendo las más abundantes la miosina, tropomiosina y troponina. Algunas de estas proteínas se corresponden con las identificadas en *T. molitor* por Yi *et al.* (2015) quienes identificaron, también por LC-MS/MS, 18 proteínas musculares en el pellet incluyendo: α -actinina-4 (106.8 kDa), miosina de cadena pesada (262 kDa), miosina de cadena ligera 2 (16.8 kDa), tropomiosina 2 (32,5 kDa), troponina I (23,8 kDa), troponina T (47,3 kDa) y troponina C (18.3 kDa). Parte de las proteínas identificadas en *A. domesticus* en el presente estudio pueden corresponder también al musculo de vuelo, el cual no presenta *T. Molitor*. En este musculo de vuelo se ha identificado miosina, tropomiosina, actina y troponina para la especie *Lectocerus indicus* (Khayat *et al.* 2003). Considerando el número de péptidos correspondientes a miosina en la muestra respecto a los correspondientes a actina, hay base para fundamentar que la miosina es mucho más abundante en la muestra, lo cual es coherente con lo descrito por Veys & Baeten (2018) quienes indican que la relación miosina/actina es de 6/1 para musculo esquelético y de 3/1 para músculos de vuelo. Por otra parte, los filamentos de miosina son, en los insectos, cuatro veces más gruesos (20 nm) que los de actina (5 nm) según lo que indicaron Nation *et al.* (2016) lo que redundo en una mayor abundancia de miosina.

4.3. EVALUACIÓN DE GELIFICACIÓN CON ENZIMAS, APH Y CALOR:

Teniendo ya caracterizadas las fracciones proteicas en estudio se procedió a evaluar la aptitud de distintos tratamientos tecnológicos (incubación con enzimas, presurización y tratamiento térmico) para inducir gelificación en dispersiones de estas según los procedimientos descritos en el epígrafe 3.4. Luego de la aplicación de los tratamientos descritos en el mencionado apartado se verifico visualmente los cambios ocurridos. Estos se reportan en la tabla 16.

TABLA 16. Resultados de evaluación de gelificación de fracciones de PG y WPI tratadas con enzimas, APH y calor.

Fracción	Extracción Ácida		Extracción Básica		WPI	
	TGasa	GOx	TGasa	GOx	TGasa	GOx
Pellet	P	P	P	P	G	G
Sobrenadante	V	V	V	V		
Residuo	NG	NG	NG	NG		

P: Pastoso, V: Viscoso, G: Gelificado, NG: No gelificado

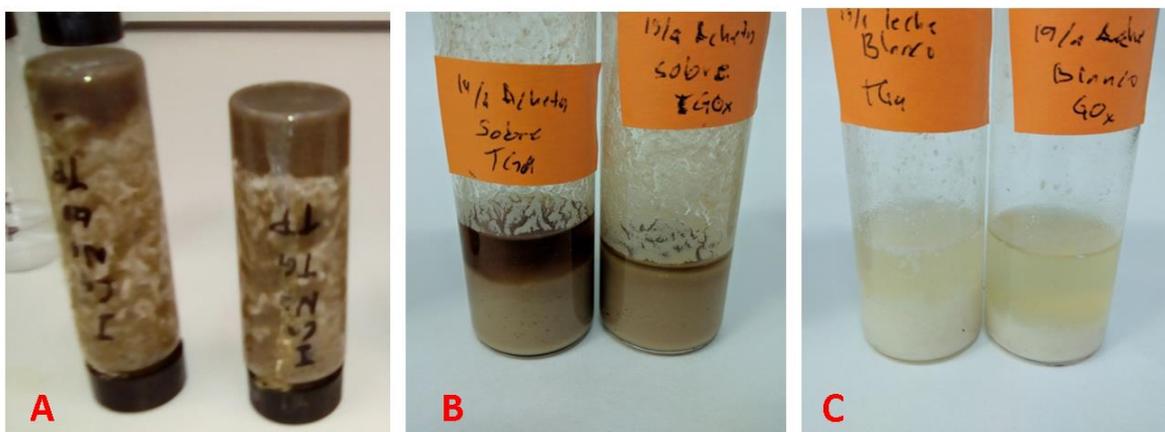


FIGURA 13. Tubos de prueba tras incubación con enzimas A) Fracciones de pellet pastosas B) Fracciones de sobrenadante viscosas C) WPI formando coágulos.

En general se observa que, para los dos tipos de extracción, al tratarse con enzimas el pellet tiende a formar una pasta (figura 13 A); sin embargo, a las 48 hr de almacenamiento esta pierde su estructura y se separa en dos fases. Por su parte el sobrenadante incrementa su viscosidad (figura 13 B)

sin llegar a gelificar, aún con la aplicación de calor y APH. Ahora bien, considerando los resultados de identificación (epígrafe anterior), la principal proteína con capacidad de gelificación presente en las fracciones extraídas es la miosina, la que al ser insoluble debería de hallarse en mayor concentración principalmente en el pellet, lo que explica su tendencia a formar un agregado pastoso y relativa mejor actitud a gelificar que el sobrenadante.

Distintos investigadores han inducido gelificación en proteínas musculares aplicando Transglutaminasa (TGasa) y en menor medida glucosa oxidasa (GOx) como coadyudante. Ramirez & Xiong (2002) obtuvieron geles tratando suspensiones de proteína miofibrilar de pollo (al 2.25%) con TGasa a dosis de 0.5% luego de incubar durante 4 horas y aplicar calor (85 °C). Por su parte, Wang & Xiong (2017) indujeron gelificación en suspensiones al 20 y 40% de proteínas miofibrilares de cerdo pre-tratadas con hasta 0.64% de GOx incubando por 12 horas y luego con TGasa a 0.4% de concentración e incubando por 2 horas. La aplicación combinada de enzimas y APH ha sido estudiada por Trespacios & Pla (2005) quienes tenían por objetivo obtener embutidos bajos en grasa por lo que formularon pastas a base de pechuga de pollo (10%), yema de huevo (10%) y clara (10%). A estas pastas se les adiciono un 0.3% de TGasa y se mantuvieron en reposo para luego aplicar tratamientos de presión de hasta 500 MPa por 30 min a 40 °C, las fotografías de la microestructura de los geles que obtuvieron sugieren que la TGasa indujo enlaces cruzados entre las proteínas miofibrilares del pollo y las globulares del huevo. Las referencias anteriores muestran que la miosina tiene buena aptitud para la formación de geles y aún mejor si es pre-tratada con enzimas. En tal sentido la formación de una estructura pastosa observada en los pellets obtenidos en el presente trabajo se puede fundamentar por la acción de las enzimas y las APH en la miosina; sin embargo, es probable no se halle en cantidad suficiente para formar una red estable capaz de soportar el volumen de moléculas de agua del sistema; otra posibilidad es que la configuración de la miosina de artrópodos difiera en configuración de la de animales vertebrados y no tenga la misma aptitud para gelificar.

4.4. ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE GELES OBTENIDOS CON ADICIÓN DE GELATINA:

Después de los estudios anteriores en los que no fue posible obtener geles estables, solo ligeros aumentos en la viscosidad, se ensayó la incorporación de los extractos proteicos en gelatinas. Como se describe en el epígrafe 3.5. se formularon geles utilizando las fracciones de pellet (P) y sobrenadante (S) de cada extracción (ácida-EA y básica-EB) y WPI como blanco. Se adicionó un 2% de gelatina porcina (E-441) a cada formulación para lograr la formación del gel. En los geles obtenidos se estudió la estabilidad de las propiedades físicas presentadas a continuación:

4.4.1. Evolución del pH:

Se estudió la evolución del pH durante un periodo de almacenamiento de 28 días. Las figuras 14,15 y 16 muestran dicha evolución para las distintas muestras en estudio:

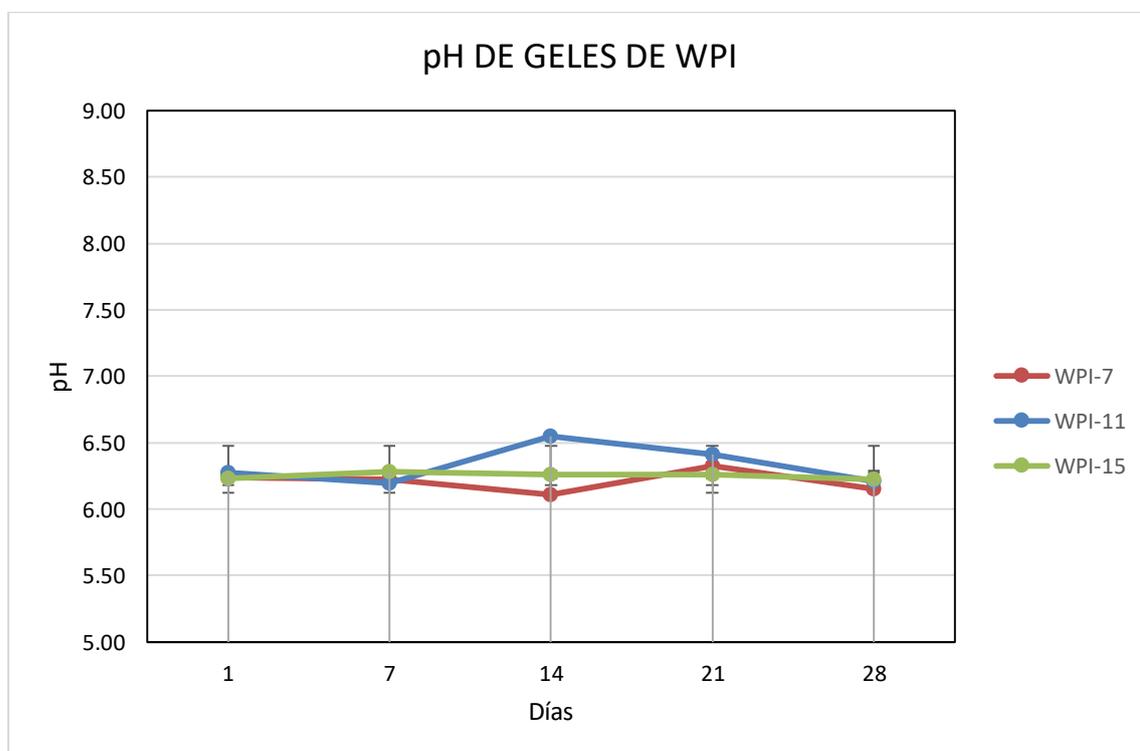


FIGURA 14. Evolución del pH en geles formulados a base de WPI

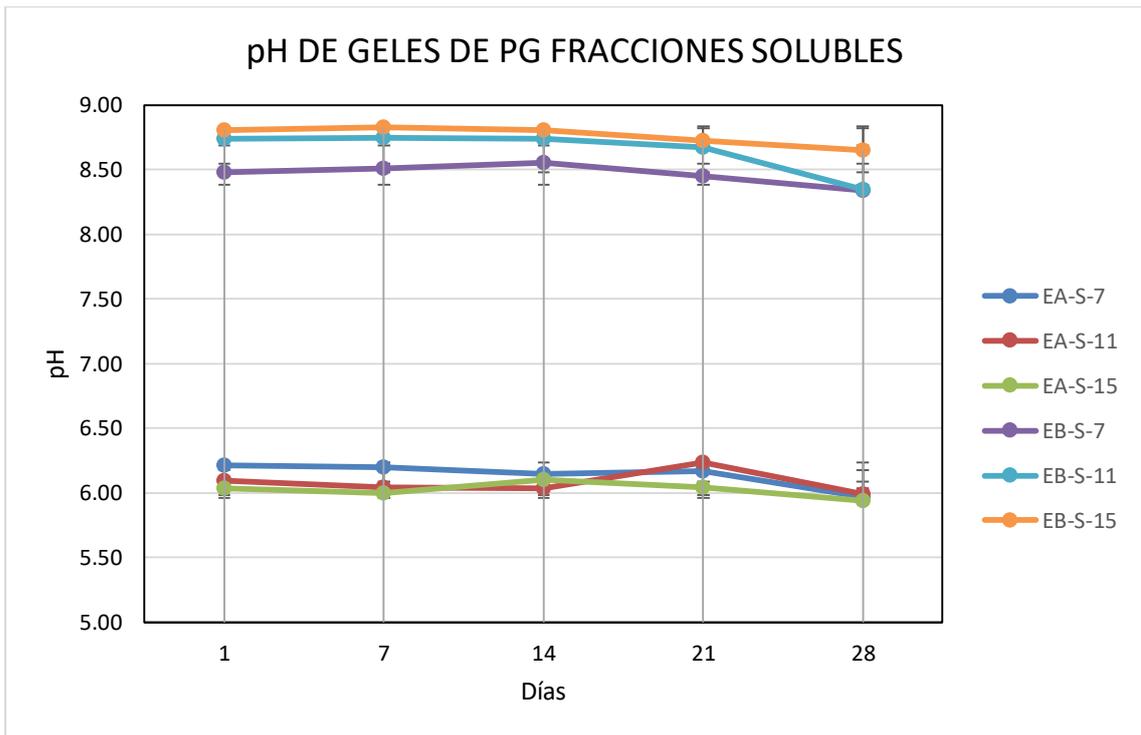


FIGURA 15. Evolución del pH en geles formulados a base de fracciones solubles de PG

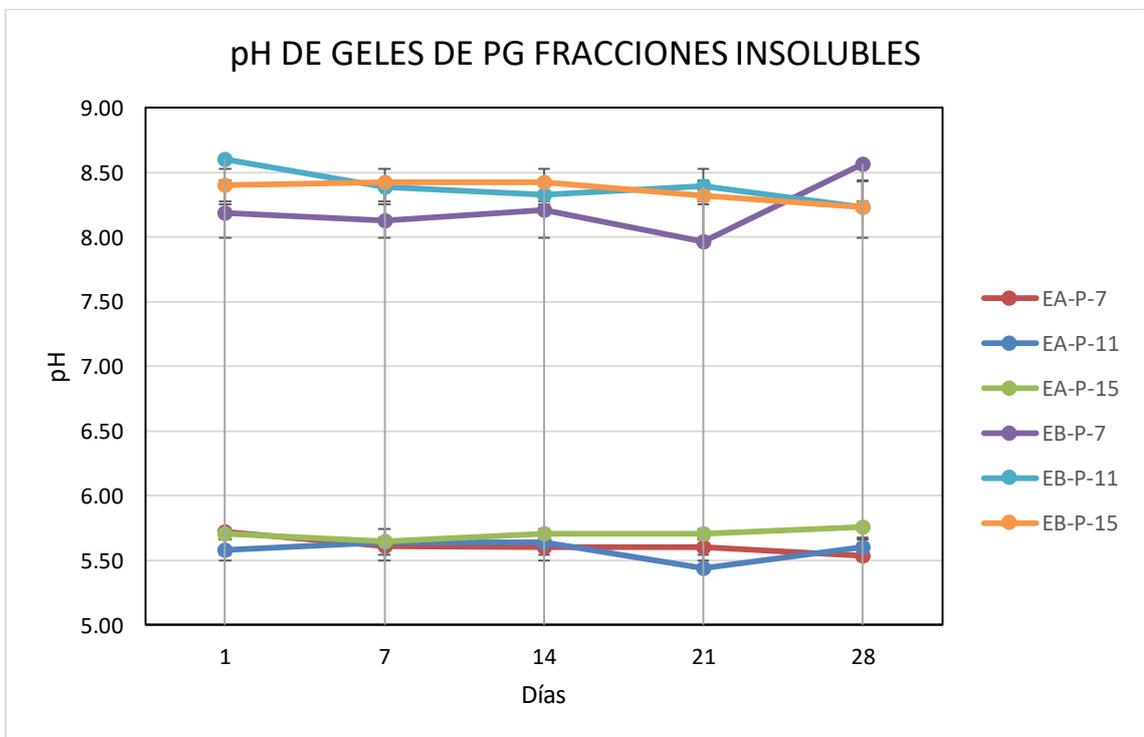


FIGURA 16. Evolución del pH en geles formulados a base de fracciones insolubles de PG

Para el caso de los geles del grupo control (WPI) varían de 6.15 a 6.55. Este parámetro se mantiene bastante constante excepto a los 14 días en que para las concentraciones de 7 y 15% ocurre una acidificación y alcalinización leve respectivamente, probablemente por una ruptura temporal de enlaces intermoleculares que exponen grupos funcionales ácidos o alcalinos según sea el caso. Torres (2016) reporta valores para geles a base de WPI a los mismos niveles de proteína (7,11 y 15%) entre 7.95 y 8.10, valores superiores a los obtenidos en la presente investigación probablemente debido al pH que aporta la gelatina, con tendencia a la acidificación leve a través del tiempo.

Los resultados obtenidos para los geles a bases de fracciones proteicas de *Acheta domesticus* muestran que el pH del gel viene condicionado por el método de extracción ya que para el ajuste del pH se utilizaron compuestos solubles que probablemente permanecen en el extracto final, además la solubilización a un determinado pH se da por afinidad de potencial eléctrico entre las proteínas y el medio por lo que un medio ácido extraerá principalmente proteínas con grupos de aminoácidos ácidos, de similar manera se da este fenómeno a pH alcalino.

Por otro lado, se observa también que los geles obtenidos a pH alcalino tanto para la fracción soluble como insoluble presentan una mayor variabilidad en este parámetro lo que indica probablemente que son más inestables y en el tiempo se produce la ruptura de enlaces peptídicos que implican grupos ácidos que liberan H⁺.

4.4.2. Evolución Color:

La tabla 17 muestra la evolución del color a lo largo del tiempo para cada una de las muestras del estudio. La figura 17 muestra es aspecto de los geles obtenidos con cada una de las fracciones proteicas y con el aislado de proteína láctea como referencia, mientras que las figuras 18, 19 y 20 muestran la evolución del color para cada una de las muestras.

TABLA 17. Evolución de parámetros de color CIELab en geles formulados a base de WPI y fracciones de PG almacenados por 28 días.

DÍA	MSTRA.	%Prot	L	A	b	C	H	E
1	WPI	7	72.40 (0.42)	-2.73 (0.10)	-1.81 (0.21)	3.27	0.59	
		11	73.32 (0.62)	-1.77 (0.21)	2.32 (0.26)	2.92	-0.92	
		15	75.78 (0.60)	-1.43 (0.06)	4.24 (0.38)	4.48	-1.25	
	EA-S	7	23.27 (0.73)	3.32 (0.14)	13.88 (0.41)	14.27	1.34	
		11	24.36 (0.64)	4.00 (0.17)	15.43 (0.44)	15.94	1.32	
		15	32.84 (2.02)	4.83 (0.75)	17.42 (1.64)	18.08	1.30	
	EA-P	7	23.08 (1.10)	3.27 (0.18)	7.69 (0.26)	8.35	1.17	
		11	22.96 (0.81)	3.54 (0.09)	8.24 (0.17)	8.97	1.16	
		15	24.08 (0.91)	3.43 (0.14)	8.17 (0.47)	8.86	1.17	
	EB-S	7	33.77 (0.47)	4.75 (0.14)	16.81 (0.45)	17.47	1.30	
		11	30.39 (0.62)	6.27 (0.21)	17.76 (0.42)	18.84	1.23	
		15	36.72 (0.75)	7.69 (0.21)	19.00 (0.48)	20.50	1.19	
	EB-P	7	21.36 (0.36)	3.09 (0.05)	7.46 (0.09)	8.08	1.18	
		11	28.60 (1.34)	2.27 (0.21)	8.24 (0.54)	8.55	1.30	
		15	21.34 (0.34)	2.68 (0.13)	6.22 (0.29)	6.77	1.16	
7	WPI	7	39.64 (3.38)	-1.02 (0.08)	-0.79 (0.43)	1.29	0.65	32.82
		11	45.09 (2.97)	-0.79 (0.11)	0.32 (0.36)	0.85	-0.39	28.31
		15	46.39 (6.34)	-1.16 (0.22)	0.12 (0.40)	1.17	-0.11	29.67
	EA-S	7	11.37 (0.51)	0.11 (0.08)	2.09 (0.39)	2.09	1.52	17.05
		11	15.04 (0.29)	0.31 (0.04)	3.95 (0.61)	3.96	1.49	15.24
		15	16.22 (0.30)	1.39 (0.12)	8.53 (0.33)	8.65	1.41	19.16
	EA-P	7	16.20 (0.83)	1.33 (0.40)	3.24 (1.10)	3.50	1.18	8.41
		11	16.93 (1.35)	1.85 (0.20)	4.35 (0.58)	4.73	1.17	7.37
		15	16.46 (1.23)	1.63 (0.30)	3.71 (0.73)	4.05	1.16	9.01
	EB-S	7	19.78 (0.39)	0.51 (0.09)	6.31 (0.22)	6.33	1.49	18.00
		11	18.99 (0.18)	1.48 (0.04)	6.26 (0.24)	6.43	1.34	16.89
		15	23.54 (2.65)	2.80 (0.39)	9.79 (0.64)	10.18	1.29	16.81
	EB-P	7	15.94 (0.70)	1.16 (0.21)	3.06 (0.48)	3.27	1.21	7.25
		11	17.74 (0.47)	2.05 (0.17)	5.50 (0.27)	5.87	1.21	11.20
		15	16.20 (0.51)	1.62 (0.14)	3.59 (0.34)	3.94	1.15	5.88
14	WPI	7	38.86 (2.50)	-1.06 (0.07)	-1.31 (0.47)	1.68	0.89	33.58
		11	38.75 (3.86)	-0.86 (0.08)	1.01 (0.59)	1.33	-0.87	34.61
		15	43.97 (1.23)	-0.88 (0.09)	1.11 (0.31)	1.41	-0.90	31.96
	EA-S	7	12.57 (0.73)	1.61 (0.24)	7.98 (0.41)	8.14	1.37	12.33
		11	13.36 (1.19)	0.64 (0.32)	4.85 (0.50)	4.89	1.44	15.63
		15	12.47 (0.54)	1.63 (0.14)	7.70 (0.46)	7.87	1.36	22.80
	EA-P	7	14.22 (1.69)	0.64 (0.68)	1.80 (1.48)	1.91	1.23	10.96
		11	14.16 (0.88)	1.45 (0.50)	3.64 (1.59)	3.92	1.19	10.14
		15	18.41 (0.47)	2.27 (0.11)	4.96 (0.41)	5.45	1.14	6.62
	EB-S	7	16.91 (1.02)	0.87 (0.18)	6.80 (0.33)	6.85	1.44	19.99
		11	18.12 (1.73)	1.66 (0.16)	7.17 (0.82)	7.36	1.34	16.86

		15	19.89 (1.59)	3.22 (0.34)	10.13 (0.33)	10.63	1.26	19.54
	EB-P	7	17.11 (0.56)	1.60 (0.20)	4.33 (0.35)	4.62	1.22	5.48
		11	15.23 (0.12)	1.46 (0.10)	4.50 (0.11)	4.73	1.26	13.91
		15	17.46 (0.28)	1.75 (0.21)	4.35 (0.18)	4.69	1.19	4.40
21	WPI	7	37.36 (1.40)	-1.10 (0.03)	-0.62 (0.15)	1.26	0.52	35.10
		11	35.35 (0.45)	-1.06 (0.02)	0.66 (0.12)	1.25	-0.56	38.01
		15	41.31 (2.25)	-0.81 (0.07)	1.41 (0.50)	1.62	-1.05	34.59
	EA-S	7	7.76 (0.24)	0.27 (0.08)	3.46 (0.25)	3.47	1.49	18.93
		11	10.91 (0.07)	0.50 (0.08)	5.66 (0.07)	5.68	1.48	16.99
		15	10.34 (1.51)	1.56 (0.32)	6.70 (0.25)	6.88	1.34	25.14
	EA-P	7	14.78 (1.03)	1.10 (0.44)	4.53 (0.97)	4.67	1.33	9.14
		11	9.78 (1.75)	1.47 (0.71)	3.75 (1.75)	4.02	1.20	14.08
		15	13.98 (0.84)	1.76 (0.21)	5.23 (0.54)	5.52	1.25	10.65
	EB-S	7	13.83 (0.29)	0.96 (0.13)	6.16 (0.11)	6.24	1.42	22.92
		11	17.20 (0.05)	1.70 (0.05)	8.24 (0.06)	8.41	1.37	16.90
		15	17.67 (0.04)	2.82 (0.08)	8.95 (0.09)	9.39	1.27	22.08
	EB-P	7	13.89 (0.32)	1.74 (0.06)	5.18 (0.02)	5.46	1.25	7.93
		11	10.69 (0.37)	1.56 (0.07)	4.59 (0.04)	4.85	1.24	18.29
		15	13.65 (0.27)	1.66 (0.11)	5.05 (0.10)	5.32	1.25	7.85
28	WPI	7	40.61 (1.13)	-0.95 (0.04)	-0.58 (0.91)	1.11	0.55	31.86
		11	43.07 (2.51)	-0.86 (0.04)	0.32 (0.59)	0.91	-0.35	30.33
		15	44.63 (0.23)	-0.85 (0.01)	1.46 (0.11)	1.69	-1.04	31.28
	EA-S	7	10.03 (0.23)	0.07 (0.10)	2.70 (0.29)	2.70	1.54	17.63
		11	11.59 (0.32)	0.41 (0.08)	3.81 (0.13)	3.83	1.46	17.64
		15	13.45 (0.34)	1.44 (0.15)	5.98 (0.18)	6.15	1.33	22.77
	EA-P	7	13.34 (0.61)	0.61 (0.31)	1.66 (0.96)	1.77	1.22	11.76
		11	12.71 (0.64)	1.22 (0.14)	3.35 (0.46)	3.57	1.22	11.58
		15	15.63 (0.44)	1.97 (0.13)	4.53 (0.20)	4.94	1.16	9.31
	EB-S	7	18.17 (0.04)	0.69 (0.01)	5.99 (0.07)	6.03	1.46	19.42
		11	18.86 (0.27)	1.82 (0.11)	7.36 (0.39)	7.58	1.33	16.16
		15	21.83 (0.26)	2.77 (0.12)	8.89 (0.24)	9.31	1.27	18.66
	EB-P	7	14.33 (0.34)	1.62 (0.06)	4.18 (0.19)	4.48	1.20	7.90
		11	15.32 (0.12)	1.52 (0.09)	4.05 (0.29)	4.32	1.21	13.95
		15	14.41 (0.16)	1.90 (0.03)	4.77 (0.11)	5.13	1.19	7.13

WPI= Aislado de proteína de suero lácteo, EA-S= Extracción ácida fracción sobrenadante, EA-P=Extracción ácida fracción pellet, EB-S=Extracción básica fracción sobrenadante, EB-P=Extracción básica fracción pellet, valores de desviación estandar entre parentesis

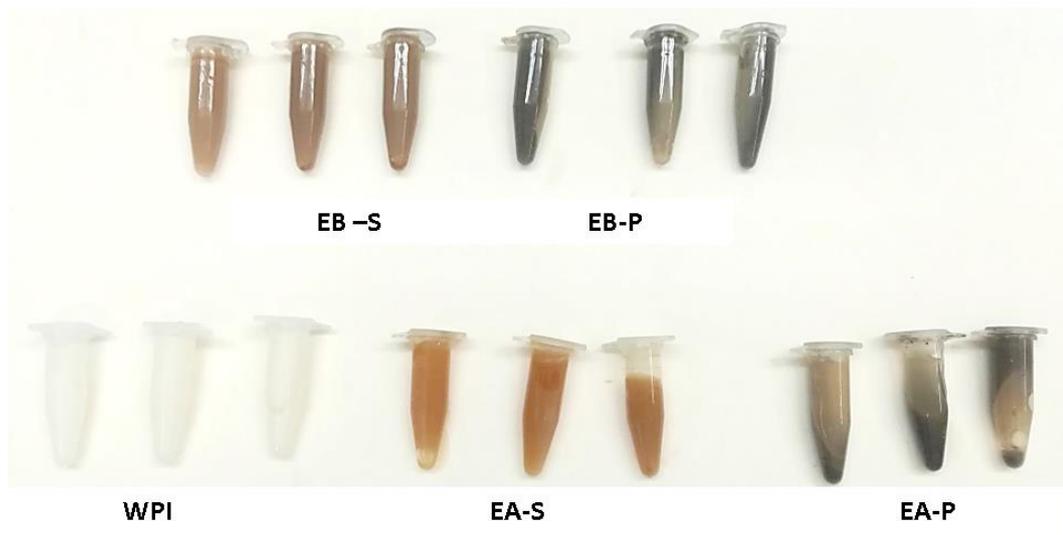


FIGURA 17. Geles a base de WPI y fracciones de PG obtenidos con adición de gelatina E-441 (WPI= Aislado de proteína de suero lácteo, EA-S= Extracción ácida fracción sobrenadante, EA-P=Extracción ácida fracción pellet, EB-S=Extracción básica fracción sobrenadante, EB-P=Extracción básica fracción pellet, valores de desviación estandar entre parentesis)

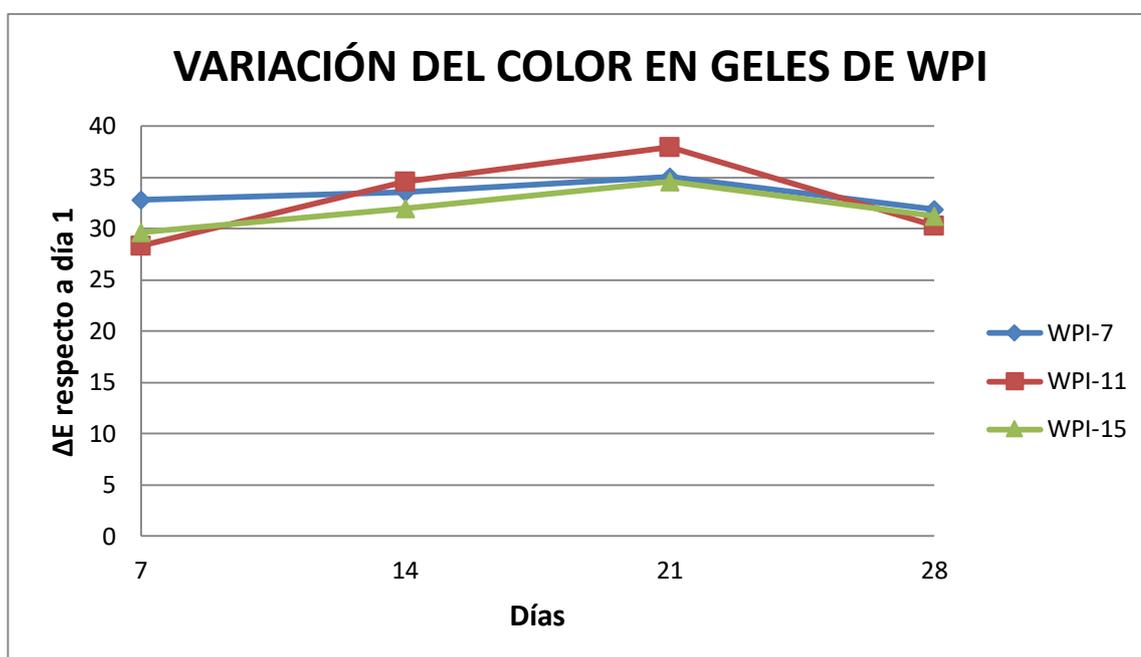


FIGURA 18. Variación del color en geles formulados a base de WPI, en función del porcentaje de aislado de proteína

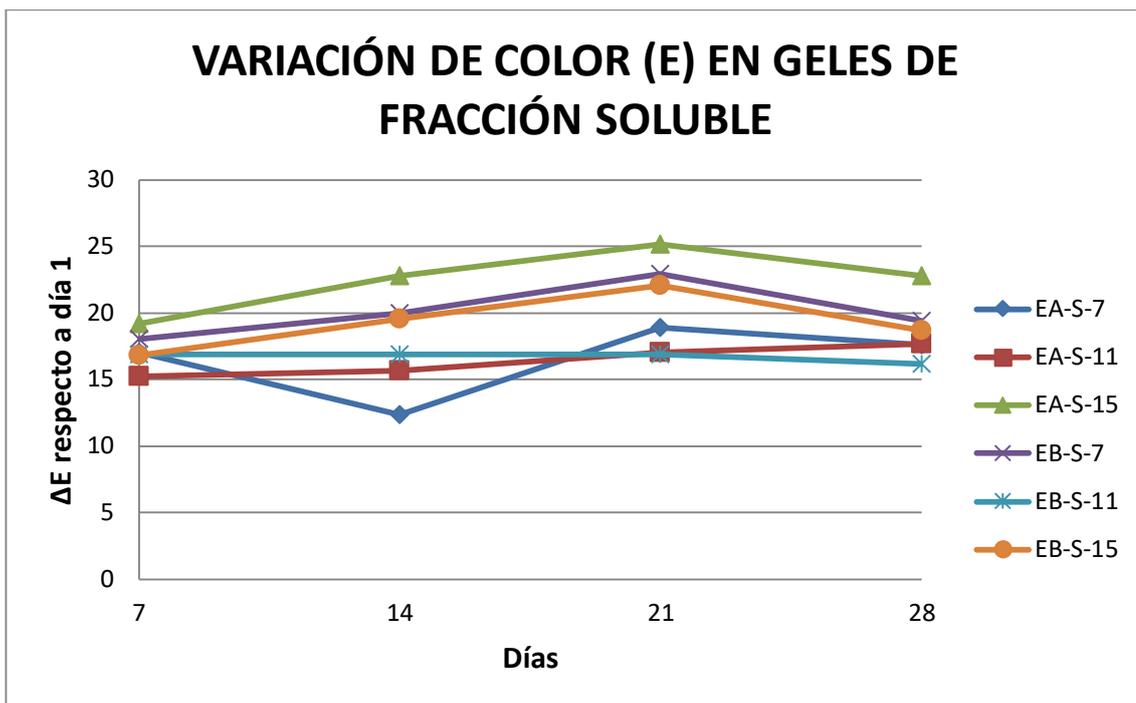


FIGURA 19. Variación del color en geles formulados a base de fracciones solubles de PG, en función del porcentaje de aislado de proteína

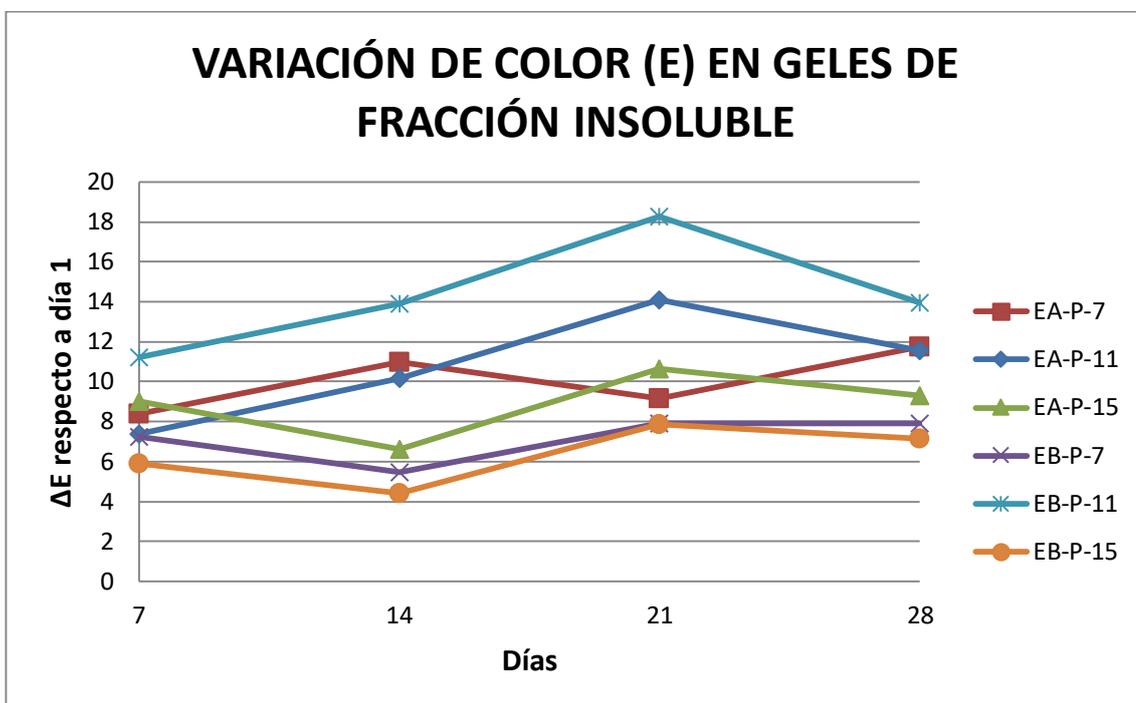


FIGURA 20. Evolución de la variación del color en geles obtenidos a base de fracciones insolubles de PG, en función del porcentaje de aislado de proteína

Algunos autores han publicado datos de color para pellet aislado por vía ácida a partir de *A. domesticus* (Ndiritu *et al.* 2017). Estos autores obtuvieron valores de L*, Chroma y Hue para este extracto del orden de: 58.53, 77.84 y 13. 61; mientras que en el presente trabajo, los geles formulados con 15% de pellet también extraído por vía ácida presentan los siguientes valores: 24.08, 8.86 y 1,17 respectivamente. Estas diferencias pueden explicarse en razón de que tanto la dilución como la adición de gelatina pueden modificar el color del gel dando lugar a un color más opaco y matices menos intensos que el color original del aislado proteico sin estar incluido en el gel. Por otra parte, Stephen *et al.* (2018) demostró que el color de la harina de grillo puede variar según esta se obtenga por secado en horno o atomización siendo los valores de L*, a* y b* para la harina al aplicar secado al horno de: 52.15, 11.6 y 29.18 y de 59.42, 6.69 y 29.18 respectivamente al aplicar la atomización. Respecto a los geles basados en fracciones solubles de PG estos difieren claramente en color tanto al revisar los parámetros numéricos como al apreciarlos a simple vista, teniendo el obtenido por vía alcalina una tonalidad marrón más opaca (figura 17). Todo lo anterior parece indicar que los pigmentos solubles presentes en la harina de grillo varían en su configuración según el pH del medio dando tonalidades más claras a pH ácido.

Para las dos proteínas (WPI y PG) en la mayoría de muestras se observa, en primer lugar, un cambio teóricamente observable ($\Delta E > 3$) en el color al pasar los primeros 7 días, siendo este más pronunciado en orden creciente para geles a base de: fracciones insolubles de PG (ΔE entre 6 y 12), fracciones solubles de PG (ΔE entre 15 y 20) y WPI (ΔE entre 30 y 35). Con el almacenamiento se produce una tendencia a incrementos más moderados de la diferencia de color respecto al primer día con una disminución de esta diferencia al día 28. Por otra parte, el color tiende a ser más estable (cambios de ΔE menos pronunciados) en los geles a base de WPI en comparación a los formulados con la PG. Estas variaciones en el color podrían atribuirse principalmente a dos factores: uno a cambios en el pH (se describieron en el epígrafe precedente) que como se expuso hay indicios de que esta condición induce cambios en los pigmentos del grillo. Por otra parte, es probable que ocurran reacciones de oxidación. Este tipo de reacciones, estas fueron estudiadas en grillo deshidratado al sol y grillo

cocido por Kamau *et al.* (2018) quien demostró que en estas matrices ocurrían este tipo de reacciones al menos en grasas (cambios en los índices de peróxidos, iodo y p-anisidina). Ahora bien, el método de fraccionamiento aplicado en el presente trabajo elimina la mayor parte del componente graso de los extractos; sin embargo, los pigmentos del grillo pueden también haber estado sometidos a este tipo de reacciones y por ello cambiar su configuración.

En todo caso, se recomendaría para un estudio posterior confirmar mediante métodos de evaluación sensorial como comparación pareada si el consumidor realmente detecta diferencias visuales entre geles recién elaborados y geles con 7 días de almacenamiento refrigerado.

4.4.3. Evolución de la sinéresis:

En las figuras 21, 22 y 23 se presenta la evolución de la sinéresis en los geles estudiados durante el almacenamiento:

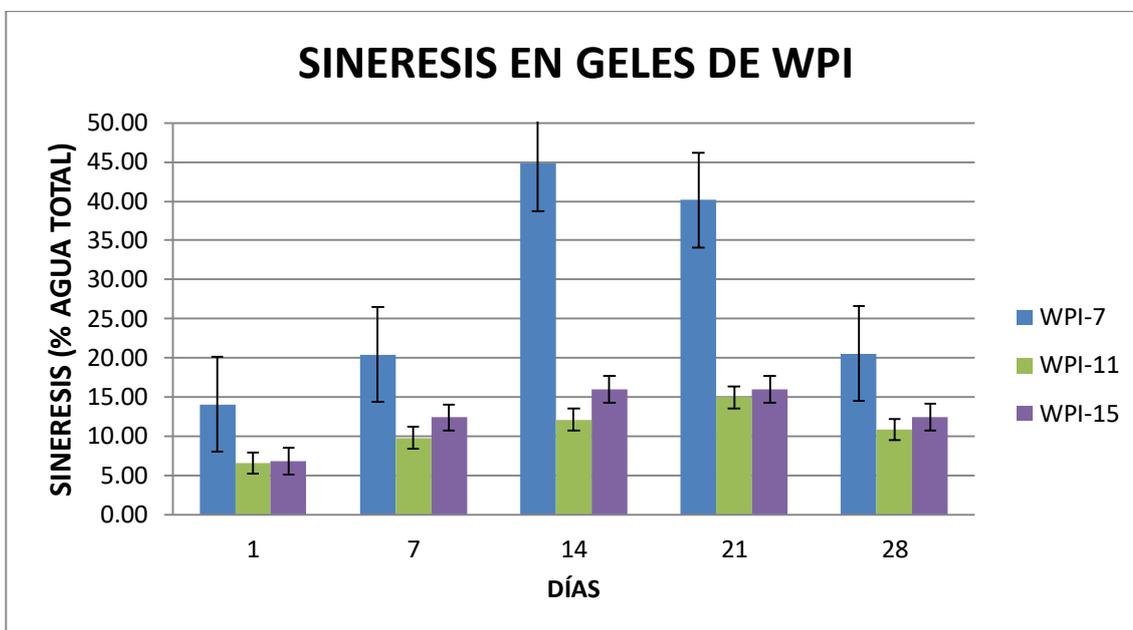


FIGURA 21. Evolución de la sinéresis en geles formulados a base de WPI y almacenados por 28 días.

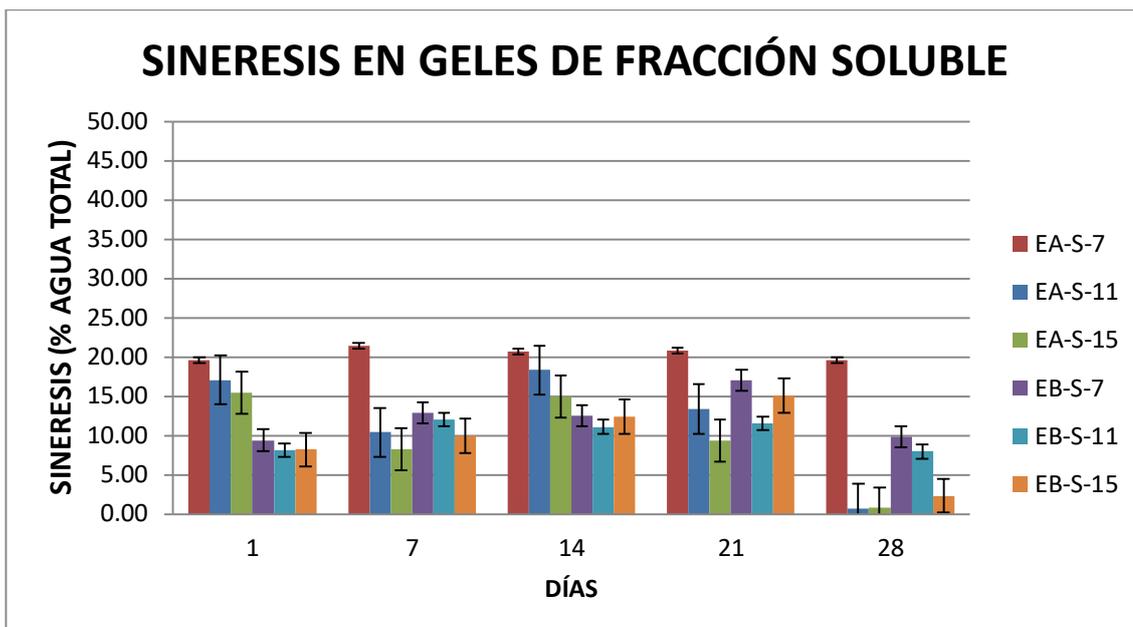


FIGURA 22. Evolución de la sinéresis en geles formulados a base de fracciones de PG solubles obtenidas por vía ácida y alcalina y almacenados por 28 días.

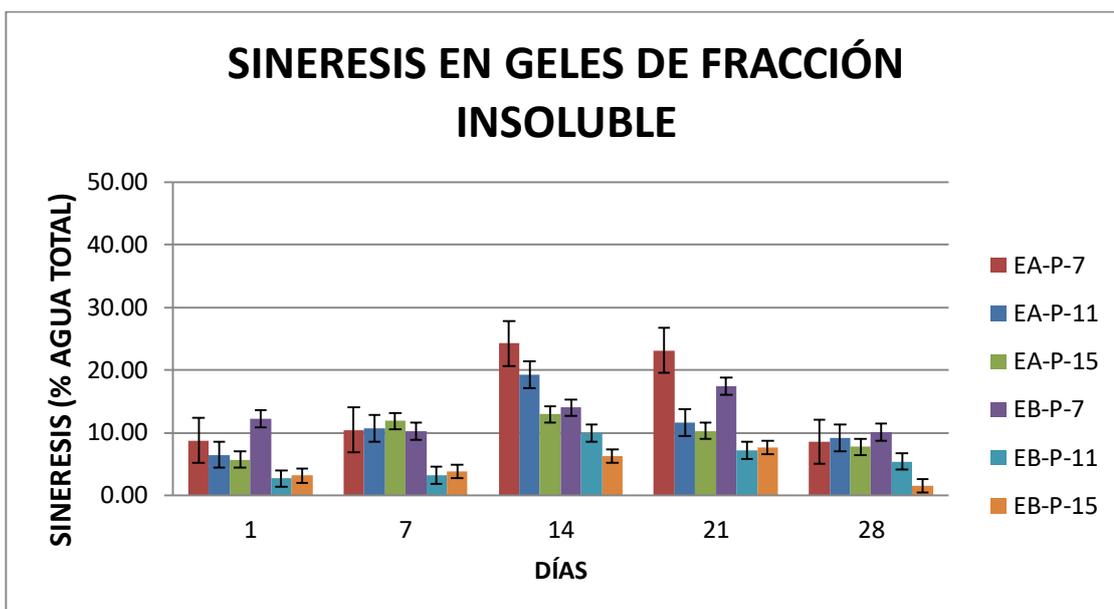


FIGURA 23. Evolución de la sinéresis en geles formulados a base de fracciones de PG insolubles obtenidas por vía ácida y alcalina y almacenados por 28 días.

La sinéresis es una propiedad aún poco estudiada en matrices alimentarias basadas en proteínas de insectos; sin embargo, con el fin de evaluar los resultados obtenidos, esta se relacionará con la capacidad de retención de agua (CRA) la cual es una propiedad adecuadamente

caracterizada en proteínas aisladas de grillo. Adebowale *et al.* (2005) determinó un valor de 238.47% de CRA para polvo obtenido a partir de *G. signillatus*. Para el polvo obtenido a partir de harina de *A. domesticus* este valor es algo superior (260 %) según los resultados obtenidos por Kim *et al.* (2017).

En general los geles a base de WPI tienen una tendencia a la sinéresis algo mayor pero similar a la de los geles formulados con fracciones proteicas solubles de PG. Por su parte, los geles obtenidos de fracciones proteicas insolubles de PG exhiben una menor tendencia a la liberación de agua, ello es consistente con las investigaciones de Ndiritu *et al.* (2017) quien determino que al aislar proteínas insolubles (pellet) de *A. domesticus* estas tenían una CRA de 273% algo superior al valor para la harina en estado puro (260 %), asimismo, Zielinska *et al.* (2018) al aislar proteínas insolubles de grillo africano mediante solubilización en medio alcalino y posterior precipitación a pH ácido obtuvo un concentrado con una CRA de 344%. Lo anterior expuesto da fundamentos para plantear que la fracción proteica insoluble tiene mayor aptitud para ligar agua que la soluble. Respecto a la evolución de esta propiedad en el tiempo para los tres tipos de proteína se observa en general una tendencia al incremento de la sinéresis hasta el día 14 para luego decaer. Los resultados muestran también, para las tres proteínas (WPI y fracciones solubles e insolubles de PG) que a un 7% hay una clara mayor tendencia a la sinéresis; sin embargo, para concentraciones de 11 a 15% estas las diferencias en esta propiedad no son tan claras.

4.4.4. Evolución de la dureza:

La evolución de la dureza fue evaluada durante 28 días en los geles formulados, en las figuras 24, 25 y 26 se presentan los resultados obtenidos en cuanto a esta propiedad para los geles formulados en base a cada tipo de proteína estudiada:

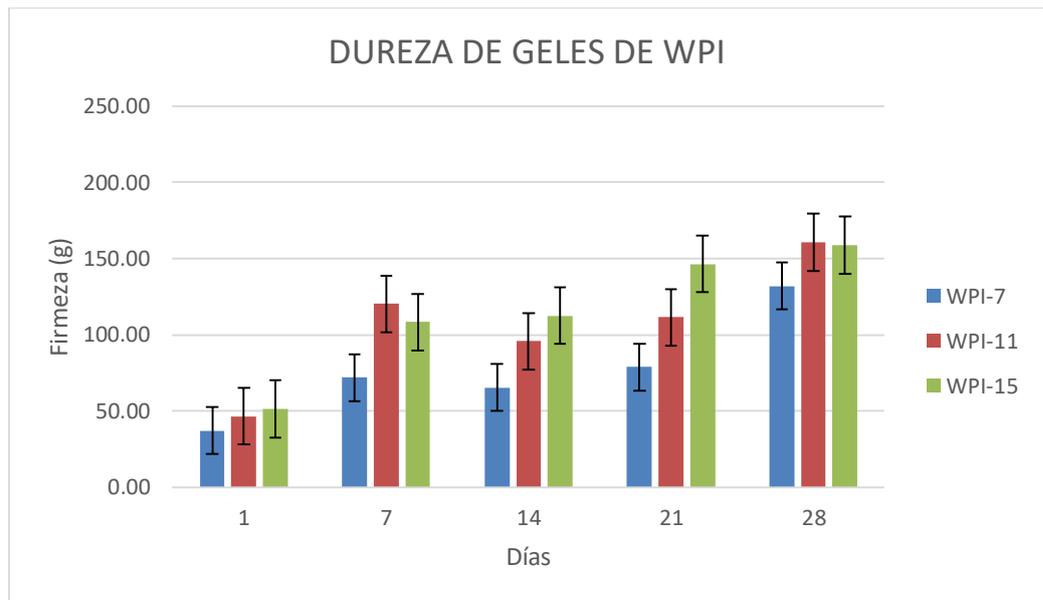


FIGURA 24. Evolución de dureza en geles a base de WPI almacenados por 28 días

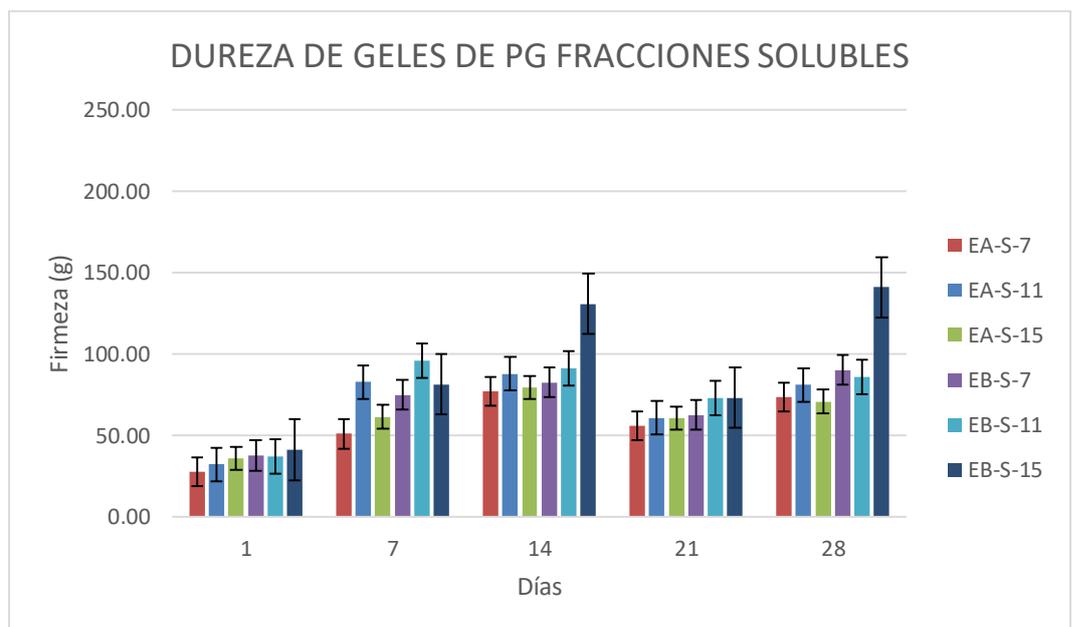


FIGURA 25. Evolución de dureza en geles a base de fracciones solubles de PG almacenados por 28 días

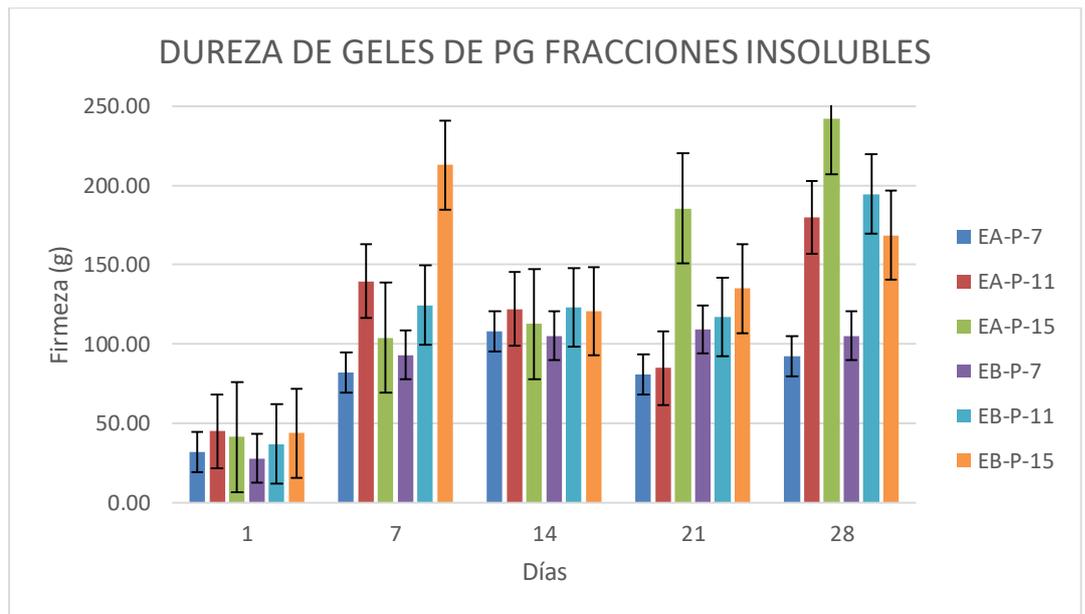


FIGURA 26. Dureza de geles a base de fracciones insolubles de PG almacenados por 28 días.

La dureza para los geles formulados en base a WPI observada a lo largo del almacenamiento es menor (en el orden de los 50 a 170 g) que los reportados por Torres (2016) utilizando la misma formulación y concentraciones de proteínas (7, 11 y 15%). Los geles obtenidos por este autor presentan valores de dureza de entre 200 y 500 g para los geles con 7 y 11% de WPI y entre 800 y 1400 g para los geles al 15% de concentración de proteína. Esta diferencia podría deberse a que en el estudio se aplicaron 5 min más de presurización respecto al tratamiento utilizado por el autor citado. Al parecer el mayor tiempo de presurización permitió a la proteína ligar una mayor cantidad de moléculas de agua ya que los valores de sinéresis del presente estudio son mucho menores a los reportados por Torres (2016). Es así que al contener más agua el gel es más blando. Por otra parte, en los dos estudios se da la tendencia al incremento de dureza al aumentar la concentración de WPI y este parámetro tiende a aumentar o decrecer en momentos debido a los fenómenos simultáneos de degradación proteica, que debilita el gel al romperse enlaces cruzados y sinéresis, la cual resulta en un incremento de la dureza por la pérdida de agua.

Los resultados muestran que es posible obtener geles basados en proteínas insolubles de grillo de mayor dureza que geles a base de WPI. En

contraste, los geles obtenidos con fracciones solubles de PG son más débiles. Lo anterior da indicio de que las proteínas presentes en la fracción insoluble (pellet) de los extractos de PG tienen mayor capacidad de formar enlaces cruzados y retener moléculas de agua. Posiblemente son más abundantes en grupos sulfhidrilo y aminoácidos polares. Ahora bien, teniendo en consideración la dosis de gelatina utilizada (2%) los geles obtenidos deberían asemejarse en cuanto a textura a productos cárnicos para los cuales el rango de dosis usuales es de 1 a 5% (Ritzoulis & Karayannakidis 2018). Sin embargo, como ya se dijo, la dureza de los geles formulados con fracciones insolubles de PG son más firmes que los obtenidos con fracciones solubles a pesar de que la dosis de agente gelificante (E-441) es la misma para todos. Lo anterior redundante en que las fracciones soluble e insoluble de PG sí que interactúan químicamente ya sea con el agua del medio o con la gelatina dando perfiles de textura diferentes. Se observa también que para la mayoría de casos los geles formulados con PG obtenida por extracción básica (EB) tienden a ser más firmes, ello es consistente con lo reportado por Mohd *et al.* (2011) quienes determinaron que los pHs de mayor y menor firmeza para geles de formulados con gelatina porcina a dosis de 6.67% son 5 y 9 siendo los valores correspondientes a estos de 326.47 y 415.1 g respectivamente. Este fenómeno se da porque a pHs ácidos la gelatina está cercana a su punto isoeléctrico y al ser las cargas neutras las interacciones entre las cadenas poliméricas son moderadas (Mohd *et al.* 2011; Amed 2016). Finalmente, se observa también que los geles con 7% de proteína son menos duros, en cambio, los formulados con 11 o 15% de proteína presentan valores de dureza similares siendo mayor en algunos casos para una concentración u otra, una tendencia similar a la observada en la sinéresis.

5. CONCLUSIONES:

El fraccionamiento de proteínas presentes en la harina de *A. domesticus* por vía ácida o alcalina permite obtener aislados con hasta un 71.6% de proteínas. La extracción en medio alcalino favorece la recuperación de proteínas insolubles y la vía ácida por su parte la de proteínas solubles. Estos aislados presentan una amplia variedad de péptidos, habiéndose

identificado en la fracción insoluble obtenida por vía ácida los siguientes: miosina de cadena pesada isoformas C, E y Mhc; tropomiosina, troponina, α y β actina y algunas enzimas como la APT sintetasa subunidad β . Los resultados de caracterización obtenidos aportan fundamentos para entender mejor los fenómenos fisicoquímicos que pueden darse en la PG durante el procesado.

El tratamiento con enzimas TGasa y GOx pueden inducir agregación reversible en dispersiones de fracciones proteicas insolubles de PG e incremento de la viscosidad en dispersiones de fracciones solubles, siendo la GOx la que produce una solución más homogénea. Este fenómeno puede aprovecharse en la fabricación de productos fluidos untables a base de PG.

Es técnicamente factible obtener geles agregando un 2% de gelatina porcina a dispersiones de fracciones PG y tratando por APH. Los geles obtenidos al almacenarse en refrigeración por 28 días mantuvieron en general un pH estable. El color varió la primera semana y luego se estabilizó. La sinéresis fue del orden de 10 a 20% observándose que los geles con 7% de proteína y los formulados en base a fracciones solubles de PG tenían una mayor tendencia a la pérdida de agua. La dureza en la mayoría de geles tendió a incrementar hasta las 2 semanas de almacenamiento para luego estabilizarse. Los geles formulados en base a fracciones insolubles presentaban una dureza superior entre 50 y 100 g respecto a los formulados con fracciones solubles. En resumen, los geles con 11 y 15% de PG y formulados con fracciones insolubles presentaron una mayor estabilidad y mejor textura.

Como conclusión general podemos decir que se pueden generar nuevas materias primas de interés para la industria alimentaria a base de aislados de PG, pudiéndose utilizar para hacer postres con un porcentaje elevado de proteína, para usarlos en impresión 3D y hacer alimentos a la carta, o para sustituir porcentajes de grasa en bollería o emulsiones cárnicas contribuyendo al menor uso de grasa.

6. BIBLIOGRAFÍA:

1. Adebowale, Y., Adebowale, K. & Ogontokum, M. (2005). Evaluation of Nutritive Properties of the Large African Cricket (*Grillidae sp.*). Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research, 48(4),274-278.
2. Amadi E., Kiin-Kabari D. (2016) Nutritional Composition and Microbiology of Some Edible Insects Commonly Eaten in Africa, Hurdles and Future Prospects: A Critical Review. Journal in Food: Microbiology, Safety & Hygiene, 1(1), 1-7.
3. Amed, J. (2017). Rheological properties of gelatin and advances in measurement. En: Advances in food rheology and its applications. Amed, J. (Editor). Woodhead Publishing. Cap. 15, pp. 377-404.
4. Arevalo, L. & Inaconde, J. (2015). Crianza de grillo (*Acheta domestica*) como fuente alternativa de proteínas para el consumo humano. Scientia, 17, 161-173.
5. Ashie, I. & Lanier, T. (1999). High pressure effects on gelation of surimi and turkey breast muscle enhanced by microbial transglutaminase. Journal of Food Science, 64 (4), 704-708.
6. Badui, S. (2006). Química de los Alimentos. Cuarta Edición. Pearson Education, Mexico.
7. Barbosa-Cánovas, G. & Juliano, P. (2008). Food sterilization by combining high pressure and thermal energy. En: Food engineering: integrated approaches. New York, N.Y.: Springer Science, Gutiérrez-Lopez GF, Barbosa-Cánovas, G., Welti-Chanes, J., Parada-Arias, E., (editors). Business Media, pp. 9–46.
8. Barrios, K. (2017). Desarrollo de un prototipo de tortilla funcional de maíz (*Zea mays*) y harina de grillo (*Acheta domestica*), como fuente de proteína para la dieta humana. Tesis para optar el grado de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria. Escuela Agrícola Panamericana. Zamorano, Honduras.
9. Belitz, H., Grosh, W. & Schieberle, P. (2009). Food Chemistry. Fourth Edition. Springer, Berlín, Alemania.
10. Belluco, S., Losasso, C., Maggioletti, M., Alonzi, C., Paoletti, M.& Ricci, A. (2013). Edible insects in the food safety and nutritional perspective: a critical

- review. *Comprehensive Review in Food Science and Technology*. 12(3), 296-313.
11. Berg, J., Tymoczko, J. & Stryer, L. (2008). *Bioquímica*. Editorial Reverté, Barcelona, España. Revisado el 07/05/2018 a las 14.12 horas. Disponible en: https://books.google.es/books?id=HRr4MNH2YssC&pg=PA46&dq=colageno&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjFj9G0x_PaAhVB1ywKHS0qDcEQ6AEIUjAI#v=onepage&q=colageno&f=false
 12. Bessa, L. W., Pieterse, E., Sigge, G., & Hoffman, L. C. (2017). Insects as human food; from farm to fork. *Journal of the Science of Food and Agriculture*
 13. Blanco, D. & Giraldo, D. (2016). Desarrollo de una barra tipo granola a base de harina de grillo *Acheta domesticus* como principal fuente proteica. Tesis para optar el grado de Ingeniero de Alimentos. Universidad de la Salle. Bogotá.
 14. Bosch, G., Zhang, D., Oonincx, D. & Hendriks, W. (2014). Protein quality of insects as potential ingredients for dog and cat foods. *Journal of Nutritional Science*, 3(29), 1-4.
 15. Bravo, F. (2012). Estudio de la fracción proteica de la leche y formulas infantiles sometidas a altas presiones. Tesis para optar el grado de doctor. Universidad Autónoma de Madrid.
 16. Cebrian, M. (2018). Por qué todavía no comemos insectos: Marco legal en la Unión Europea. *Revista de Bioética y Derecho*, 42, 311-341.
 17. Cetin, H., & Morgan, C. (2018). Inactivation of bacillus cereus spores in infant formula by combination of high pressure and trans-cinnamaldehyde. *LWT- Food Science and Technologies*, 97, 254-260.
 18. Charry, L. (2011). Desarrollo de un producto golosina a base de colágeno, subproducto de la industria cárnica. Trabajo de titulación para optar el grado de Ingeniero Agroindustrial y de Alimentos. Universidad de las Américas. Santiago de Chile.
 19. Codex Alimentarius Commission (2010). Development of regional standard for Edible Crickets and their products.
 20. Collavo, A., Glew, R., Huang, Y., Chuang, L., Bosse, R. & Paoletti, M. (2004). House Cricket Small-scale Farming. En: *Ecological implications of*

- minilivestock: potential of insects, rodents, frogs and snails. Paoletti, M. (Editor). Enfield, N.H.: Science Publishers. Capítulo 27 pp 515-540.
21. DeFoliart, G. (1992). Insects as human food. *CROP Protection*, 11, 395-399.
 22. DeFoliart, G. (2009). Food, insects as. En: *Enciclopedia of insects*. Segunda edición. Editado por: Resh, V. & Cardé, R. pp. 376-381.
 23. Dossey, A. & Méndez, I. (2014). Los insectos como fuente de proteína limpia y sustentable para el futuro. *Entomología Mexicana*, 1, 1039-1044
 24. Feng, Y., Chen, X. M., Zhao, M., He, Z., Sun, L., Wang, C. Y., & Ding, W. F. (2017). Edible insects in china: Utilization and prospects. *Insect Science*, 0, 1-15.
 25. Fernández, C. (2005). Fabricación de quesos mediante pasterización por altas presiones. Trabajo de Fin de Carrera, Universidad Politécnica de Cataluña, Barcelona, España.
 26. Finke, M. (2002). Complete nutrient composition of commercially raised invertebrates used as food for insectivores. *Zoo-Biology*, 21, 269-285.
 27. Finke, M., Rojo, S., Roos, N., Van Huis, A. & Yen, A. (2015). The european food safety authority opinion on a risk profile related to production and consumption of insects as food and feed. *Journal of Insects as Food and Feed*, 1(4), 245-247.
 28. Garofalo, C., Osimani, A., Milanović, V., Taccari, M., Cardinali, F., Aquilanti, L., Clementi, F. (2017). The microbiota of marketed processed edible insects as revealed by high-throughput sequencing, *Food Microbiology*, 62, 15-22.
 29. Garrido, A., Teijón, J., Blanco, D., Villaverde, C., Mendoza, C. & Ramírez, J. (2006). *Fundamentos de Bioquímica Estructural*. Segunda Edición. Editorial Tebál S.L, Madrid. Revisado el 07/05/2018 a las 14:08 horas. Disponible en: https://books.google.es/books?id=avt8LFmp8q4C&pg=PA117&dq=colageno&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjFj9G0x_PaAhVB1ywKHS0qDcEQ6AEIMzAC#v=onepage&q=colageno&f=false
 30. Georgantelis, D., Ambrosiadis, I., Katikou, P., Blekas, G., & Georgakis, S. A. (2007). Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on microbiological

parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4°C. *Meat Science*, 76, 172-181.

31. Giaccone V. 2005. Hygiene and health features of Minilivestock. In: Paoletti, G, editor. *Ecological implications of minilivestock: potential of insects, rodents, frogs and snails*. Enfield, N.H.: Science Publisher, pp. 579–98.
32. Grabowski, N. T., & Klein, G. (2017). Microbiology of processed edible insect products -results of a preliminary survey. *International Journal of Food Microbiology*, 243, 103-107.
33. Hall, F. G., Jones, O. G., O'Haire, M. E., & Liceaga, A. M. (2017b). Functional properties of tropical banded cricket (*Gryllobates sigillatus*) protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 224, 414, 422.
34. Halloran, A., Hanboonsong, Y., Ross, N. & Bruun, S. (2017). Life cycle assessment of cricket farming in north-eastern Thailand. *Journal of Cleaner Production*, 156, 83-94.
35. Halloran, A., Roos, N., Flore, R. & Hanboonsong, Y. (2016). The development of the edible cricket industry in Thailandia. *Journal of Insects as Food and Feed*, 2(2), 91-100.
36. Hernández, V., Martínez, M., Uresti, R., Ramirez, J. & Velasquez, G. (2017). Effect of washing treatment and microbial transglutaminase on the gelling properties of blue crab (*Callinectes Sapidus*) protein. *CYTA-Journal od food*, 15(2), 165-170.
37. Irungu, F., Mutungi, C., Farai, A., Affognon, H., Kibet, N., Tanga, C., Ekesi, S., Nakimbuqwe, D. & Fiamboe, K. (2018). Physico-chemical properties of extruded aquafeed pellets containing black soldier fly (*Hermetia illucens*). *Journal of Insects as Food and Feed*, 4 (1), 19–30.
38. Iwasaki, T., Noshiroya, K., Saitoh, N., Okano, K., & Yamamoto, K. (2006). Studies of the effect of hydrostatic pressure pretreatment on thermal gelation of chicken myofibrils and pork meat patty. *Food Science*, 97,474-483.
39. Kamau, E., Mutungi, C., Kinyuru, J., Imathiu, S., Tanga, C., Affognon, H., Fiaboe, K. K. M. (2018a). Moisture adsorption properties and shelf-life

- estimation of dried and pulverised edible house cricket *Acheta domestica* (L.) and black soldier fly larvae *hermetia illucens* (L.). *Food Research International*, 106, 420-427.
40. Keenan, D., Young, J., Tier, M., Jones, D., & Underdown, J. (2001). Mechanism of pressure-induced gelation of milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(7), 3394-3402.
41. Khayat, H. A., Hudson, L., Reedy, M. K., Irving, T. C., & Squire, J. M. (2003). Myosin head configuration in relaxed insect flight muscle: X-ray modeled resting cross-bridges in a pre-powerstroke state are poised for actin binding. *Biophysical Journal*, 85, 1063-1079.
42. Kim, H., Setyabrata, D., Lee, Y., Jones, O. & Kim, Y. (2017) Effect of house cricket (*Acheta domestica*) flour addition on physicochemical and textural properties of meat emulsion under various formulations. *Journal of Food Science*, 82(12), 2787-2793.
43. Kipkoech, C., Kinyuru, J. N., Imathiu, S., & Roos, N. (2017). Use of house cricket to address food security in Kenya: "Nutrient and chitin composition of farmed crickets as influenced by age". *African Journal of Agricultural Research*, 12(44), 3189-3197. ncia. Valencia, España.
44. Klunder, H. C., Wolkers-Rooijackers, J., Korpela, J. M., & Nout, M. J. R. (2012). Microbiological aspects of processing and storage of edible insects. *Food Control*, 26,628-631.
45. Konica Minolta (2014). Entendiendo el espacio del color CIE L* a* b*. Revisado el 19/07/18 a las 1:36 horas. Disponible en:
<http://sensing.konicaminolta.com.mx/2014/09/entendiendo-el-espacio-de-color-cie-lab/>
46. Kouřimská, L., & Adámková, A. (2016). Nutritional and sensory quality of edible insects. *NFS Journal*, 4, 22-26.
47. Kvassay, G. (2012). *The complete breeding cricket manual*. Zega Enterprises. Queensland. Australia.

48. Lachenicht, M. W., Clusella-Trullas, S., Boardman, L., Le Roux, C., & Terblanche, J. S. (2010). Effects of acclimation temperature on thermal tolerance, locomotion performance and respiratory metabolism in *Acheta domesticus* L. (Orthoptera: Gryllidae), *Journal of Insect Physiology*, 56, 822-830.
49. Liepa, M., Zagorska, J. & Galoburda, R. (2017). Effect of high pressure processing in milk coagulation properties. *Food Science*. 1, 223-229.
50. Linares, T., Hernandez, D., & Bartolome, B. (2008). Occupational rhinitis and asthma due to crickets. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 100(6), 566-569.
51. Lizhang, W., Montesinos, J. & Dinghong, Y. (2008). Los insectos como fuente de alimento: análisis de proteína y grasa de 100 especies. *Boletim do Museu Municipal do Funchal*, 14, 55-70.
52. Ma, X., Yi, S., Yu, Y., Li, J., & Chen, J. (2015). Changes in gel properties and water properties of *Nemipterus virgatus* surimi gel induced by high-pressure processing. *LWT-Food Science and Technology*, 61, 377-384.
53. Madrid, A. (2013). La lucha contra el hambre en el mundo. En: *Tratado de nutrición y dietética*. Madrid, A. (Editor). AMV Ediciones. Cap 28, pp. 406-415.
54. Makkar, H., Tran, G., Heuzé, V., & Ankers, P. (2014). State-of-the-art on use of insects as animal feed. *Animal Feed Science and Technology*. 197, 1-33.
55. Martínez, S., Salvador, A., Muguerza, B., Moulay, L., & Fiszman, S. M. (2011). Cocoa fibre and its application as a fat replacer in chocolate muffins. *LWT-Food Science and Technology*, 44(3), 729-736.
56. Mekonnen, M. & Hoekstra, A. (2010). The green, blue and grey water footprint of farm animals and animal products. *Value of Water*, 2(48)
57. Mohd, R., Yaakob, C., Amin, I. & Noorfaizan, A. (2011). Chemical and functional properties of bovine and porcine skin gelatin. *International Food Research Journal*, 18, 787-791.
58. Nation, J. (2016). *Insect physiology and biochemistry*. Taylor & Francis group. Gainesville, U.S.A.

59. Nazir, A., Asgarh, A. & Aslam, A. (2016). Food gels: gelling process and food application. En: Advances in food rheology and its application. Amed, J (Editor). Capítulo 13, pp. 335-353.
60. Ndiritu, K., Kinyuru, N., Kenji, M., & Gichuhi, N. (2017). Extraction technique influences the physico-chemical characteristics and functional properties of edible crickets (*Acheta domesticus*) protein concentrate. Journal of Food Measurement and Characterization, 11(4), 2013-2021.
61. Nongonierma, A. B., & FitzGerald, R. J. (2017). Unlocking the biological potential of proteins from edible insects through enzymatic hydrolysis: A review. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 43, 239-252.
62. Oonincx, D. (2015). Insects as food and feed: Nutrient composition and environmental impact. Tesis para optar el grado de doctor. Universidad de Wageningen.
63. Oonincx, D. G., van Itterbeeck, J., Heetkamp, M. J., van den Brand, H., van Loon, J. J., & van Huis, A. (2010). An exploration on greenhouse gas and ammonia production by insect species suitable for animal or human consumption. Entomophagy and Environment, 5(12), 1-7.
64. Palou, E., López, A., Barbosa, C. y Swanson, G. 2003. El tratamiento de alta presión en la conservación de alimentos. En: Manual de conservación de los alimentos. Shafivrahman, M (Editor). Editorial Acribia SA. Zaragoza, España. Capítulo 19 pp 569-613.
65. Paoletti, M. & Dreon, A. (2004). Minilivestock Environment, Sustainability, and the Local Knowledge Disappearance. En: Ecological implications of minilivestock: potential of insects, rodents, frogs and snails. Paoletti, M. (Editor). Enfield, N.H.: Science Publishers. Cap. 1, pp 1-18.
66. Payne, C. L. R., Scarborough, P., Rayner, M., & Nonaka, K. (2016). A systematic review of nutrient composition data available for twelve commercially available edible insects, and comparison with reference values. Trends in Food Science & Technologies, 47, 69-77.
67. Poma, G., Cuykx, M., Amato, E., Calaprice, C., Focant, J. F., & Covaci, A. (2017). Evaluation of hazardous chemicals in edible insects and insect-based

- food intended for human consumption. *Food and Chemistry Toxicology*. 100, 70-79.
68. Portillo, E. (2017). Estimación piloto de los costos en la producción y proceso de harina de grillo (*Acheta domestica*), como fuente de proteína para la dieta humana, en la finca Santa Marta, Morazán, El Salvador. Tesis para optar el grado de Ingeniero en Administración de Negocios. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras.
69. Purschke, B., Meinschmidt, P., Horn, C., Rieder, O., & Jäger, H. (2018). Improvement of techno-functional properties of edible insect protein from migratory locust by enzymatic hydrolysis. *European Food Research and Technology*, 244(6), 999-1013.
70. Ramírez, J. & Xiong, Y. (2003). Effect of transglutaminase induced cross-linking on gelation of myofibrillar/soy protein mixtures. *Meat Science*, 65, 899-907.
71. Ramón, J. (2016). Plan de negocio: Creación de una empresa productora de harina de insecto para consumo animal. Trabajo de fin de carrera. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España.
72. Reglamento CE 2017/893. modifica los anexos I y IV del Reglamento (CE) n.o 999/2001 del Parlamento Europeo y del Consejo y los anexos X, XIV y XV del Reglamento (UE) n.o 142/2011 de la Comisión por lo que se refiere a las disposiciones sobre proteína animal transformada.
73. Reglamento CE 2283/2015. relativo a los nuevos alimentos, por el que se modifica el Reglamento (UE) no 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo y se derogan el Reglamento (CE) no 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo y el Reglamento (CE) no 1852/2001 de la Comisión.
74. Ribeiro, J. C., Cunha, L. M., Sousa-Pinto, B., & Fonseca, J. (2018). Allergic risks of consuming edible insects: A systematic review. *Molecular Nutrition & Food Research*, 62(1), 1-12.
75. Ritzoulis, C. & Karayannakidis, P. (2018). Protein as texture modifiers. En: *Modifying food texture. Vol I: Novel ingredients and processing techniques*. Chen, J. & Rosenthal, A. (Editores). Woodhead Publishing. Cap 3, pp. 51-69.

76. Rumpold, B. & Schülter, O. (2013). Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Molecular Nutrition & Food Researching*, 57, 802-823.
77. Rumpold, B. A., & Schlüter, O. K. (2013b). Potential and challenges of insects as an innovative source for food and feed production. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 17, 1-11.
78. Saturnino, C., García, A., García, J., Sierra, P., Castro, M., Calvo, M. & Frontecha, J. (2016). Los insectos como complemento nutricional de la dieta: fuente de lípidos potencialmente bioactivos. *Alimentación, Nutrición y Salud*, 23(2), 50-56.
79. Shand, J., Ya, H., Pietrasik, Z., & Wanasundara, D. (2008). Transglutaminase treatment of pea proteins: Effect on physicochemical and rheological properties of heat-induced protein gels. *Food Chemistry*, 102, 1119-1130.
80. Smetana, S., Palanisamy, M., Mathys, A., & Heinz, V. (2016). Sustainability of insect use for feed and food: Life cycle assessment perspective. *Journal of Cleaner Production*, 137, 741-751.
81. Sosa, M. & Galvis, P. (2010). Caracterización de la enzima glucosa oxidasa libre e inmovilizada en dos soportes (alginato de sodio y agarosa) para la producción de ácido glucurónico. Tesis para optar el grado de Ingeniero en Alimentos. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Bogotá.
82. Spieguel, M., Noordam, M. & Van Der Fels, H. (2013). Safety of Novel Protein Sources (Insects, Microalgae, Seaweed, Duckweed, and Rapeseed) and Legislative Aspects for Their Application in Food and Feed Production. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12, 662-678.
83. Spotti, M. (2013). Estudio de propiedades y estructura de geles mixtos proteína-polisacárido. Influencia de la relación de glicosilación. Tesis para optar el grado de Doctor en Química. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina.
84. Srinroch, C., Srisomsap, C., Chokchaichamnankit, D., Punyarit, P., & Phiriyangkul, P. (2015). Identification of novel allergen in edible insect, *gryllus bimaculatus* and its cross-reactivity with *macrobrachium* spp. *Food Chemistry*, 184, 160-166.

85. Ssepuuya, G., Namulawa, V., Mbabazi, D., Mungerwa, S., Fuuna, P., Nampijja, Z., Ekesi, S., Fiaboe, K. & Nakimbuwe, D. (2017). Use of insects for fish and poultry compound feed in sub-Saharan Africa – A systematic review. *Journal of insects as food and feed*, 3(4), 289-302.
86. Tabassum-Abbasi, T., & Abbasi, S. A. (2016). Reducing the global environmental impact of livestock production: The minilivestock option. *Journal of Cleaner Production*, 112, 1754-1766.
87. Tao, J. & Olive, Y. (2018). Edible insects as a means to address global malnutrition and food insecurity issues. *Food Quality and Safety*, 2(1), 17-26.
88. Tao, J., Davidov-Pardo, G., Burns-Whitmore, B., Cullen, E. & Li, Y. (2017). Effects of edible insects ingredients on the physicochemical and sensory properties of extruded rice products. *Journal of Insects as Food and Feed*, 3(4), 263-278.
89. Teijón, J. (2006). *Fundamentos de Bioquímica Estructural*. Segunda Edición. Editorial Tébar. Madrid.
90. Telléz, S., Ramírez, J., Pérez, C., Vazquez, M. & Simal, J. (2001). Aplicación de la alta presión hidrostática en la conservación de alimentos. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3(2), 66-80.
91. Tewari, G. 2007, *High-Pressure Processing of Foods*, En: *Advances in Thermal and Non-Thermal Food Preservation*. Tewary, G y Juneja, V (Editor). Blackwell Publishing. Iowa, USA. Capítulo 12 pp 203-239.
92. Torres, E. (2016). Efecto del tratamiento por altas presiones hidrostáticas (HHP) en la calidad de queso fresco y en las proteínas del suero de queserías. Tesis para optar el grado de doctor. Universidad Politécnica de Valencia.
93. Tran, G., Heuzé, V. & Makkar, H. (2015). Insects in fish diets. *Animal Frontiers*, 5(2), 37-44.
94. Tres Palacios, M. (2007). Gelificación de productos avícolas por alta presión isostática: Actividad sinérgica de transglutaminasa microbiana. Tesis para optar el grado de doctor. Universidad Autónoma de Barcelona.

95. Van Huis, A. & Dunke, F. (2017). Edible insects: A neglected and promising food source. En: Sustainable Protein Source. Editado por: Nadathur, S., Wanasundara, Y. & Scalin, L, Cap. 21, pp. 341-355.
96. Van Huis, A. (2016). Edible insects are the future? Proceedings of the Nutrition Society, 75, 294-305.
97. Van Huis, A. (2017). Edible insects: Marketing the impossible? Journal of Insects as Food and Feed, 3(2), 67-68.
98. Van Huis, A., Van Itterbeeck, J., Klunder, H., Mertens, E., Halloran, Afton, Muir, G & Vantomme, P. (2013). Edible insects, future prospects for food and feed security. Food and Agriculture Organization of the United Nation, Rome.
99. Van Raamsdonk, L W D, van der Fels-Klerx, H J, & de Jong, J. (2017). New feed ingredients: The insect opportunity. Food Additives & Contaminants. Part A. Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, 34(8), 1384-1397.
100. Vanacolcha, A. & Abril, J. 2003. Procesos de conservación de alimentos. Segunda edición. AMV ediciones y ediciones Mundi-prensa. Madrid.
101. Veenenbobos, M. & Oonincx, D. (2017). Carrot supplementation doesn't affect house cricket performance (*Acheta domesticus*). Journal of insects as food and feed. 3(3), 217-221.
102. Veldkamp, T., Van Duinkerken, G., Van Huis, A., Lakemond, C., Ottevanger, E., Bosch, G. & Boekel, M. (2002). Insects as a sustainable feed ingredient in pig and poultry diets- a feasibility study. Publisher Wageningen UR Livestock Research.
103. Veys, P., & Baeten, V. (2018). *Protocol for the isolation of processed animal proteins from insects in feed and their identification by microscopy*. Food Control, 92, 496-504.
104. Wang, X., Xiong, Y. & Sato, H. (2017). Rheological enhancement of pork myofibrillar protein-lipid emulsion composite gels via glucose oxidase oxidation/transglutaminase Cross-Linking Pathway. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 65, 8451-8458.

105. Yang, J. & Powers, J. (2016). Effects of high pressure in food proteins. En: High Pressure Processing. Balasubramania, V., Barbosa-Canovas, G. & Lelieved, H. (Editores). Capítulo 18 pp. 353-390.
106. Yi, L. (2015). A study on the potential of insect protein and lipid as a food source. Tesis para optar el grado de Doctor. Universidad de Wageningen.
107. Zielińska, E., Baraniak, B., Karaś, M., Rybczyńska, K., & Jakubczyk, A. (2015). Selected species of edible insects as a source of nutrient composition. Food Research International, 77, 460-466.
108. Zielińska, E., Karaś, M., & Baraniak, B. (2018). Comparison of functional properties of edible insects and protein preparations thereof. Lwt, 91, 168-174.

7. ANEXOS:

7.1. ANEXO 1: RESUMEN BIBLIOGRÁFICO

Barrios, K. (2017). Desarrollo de un prototipo de tortilla funcional de maíz (*Zea Mayz*) y harina de grillo (*Acheta domesticus*), como fuente de proteína para la dieta humana

Se formularon tortillas de maíz con sustitución parcial con harina de grillo con el objetivo de mejorar el score de aminoácidos. Se determinó por método de superficie de respuesta que a una sustitución con 20% de harina de grillo y un tiempo de cocción de 3.42 min se optimizaba el contenido proteico, textura y color del producto final.

Birman, T. et al. (2018). Effects of thermal treatments on the colloidal properties, antioxidant capacity and in-vitro proteolytic degradation of cricket flour

Se estudiaron los efectos de la cocción en las propiedades coloidales, capacidad antioxidante y digestibilidad in vitro de harina de grillo. Se evidenciaron cambios marginales en el tamaño de los coloides, un incremento de la capacidad antioxidante (400 mM Trolox-eq) y una mayor bioaccesibilidad respecto a las muestras sin tratar.

Blanco, D. & Giraldo, D. (2016). Desarrollo de una barra tipo granola a base de harina de grillo *Acheta domesticus* como principal fuente proteica

Se evaluaron distintas formulaciones de barra tipo granola con harina de grillo. La formulación con un 50% de granola, 24.9% de jarabe invertido y 25.1% de harina de grillo presentaba una buena composición de aminoácidos, aportaba un 16.76% de la CDR de proteínas, tenía una fracturabilidad adecuada (9.7 N) y buena aceptación sensorial.

Bosch et al. (2014). Protein quality of insects as potential ingredients for dog and cat foods

Se evaluó la calidad de proteínas de distintos insectos (grillo común, mosca soldado, gusano de la harina, etc.). Se analizó materia seca, nitrógeno, grasa bruta, cenizas, aminoácidos y digestibilidad in vitro. La mayoría de sustratos tenían como aminoácido limitante el requerimiento Met+Cys, menos el grillo y las pupas de mosca.

Cebrián, M. (2018). Porqué todavía no comemos insectos: marco legal en la Unión Europea

Se presenta la evolución de la legislación europea respecto al consumo de insectos. La AFSCA de Bélgica son los pioneros autorizando 10 insectos para comercialización en su territorio. Luego, en base a la recomendación de la FAO, en 2015 el Reglamento UE 2283/2015 reconoce a los insectos como nuevos alimentos. En 2018 España se adhiere a esta norma.

Finke, M. (2015). The European Food Safety Authority scientific opinion on a risk profile related to production and consumption of insects as food and feed

En base a la información científica disponible sobre riesgos asociados al consumo de insectos la EFSA concluye que: en tanto los insectos se alimenten con insumos autorizados los riesgos microbianos son iguales que con otros animales. Por otro lado se requieren mayores estudios respecto a la acumulación de químicos.

González, C. et al. (2018). Insects as ingredients for bakery goods. A comparison study of *H. illucens*, *A. domestica* and *T. molitor* flours

Se formularon tres panes reemplazando un 5% de la harina de trigo por harina de insectos (*A. domesticus*, *H. ilucens* y *T. molitor*). Se observó una reducción de la absorción de agua durante el amasado. El pan sustituido con harina de *A. domesticus* mostró parámetros de volumen y textura similares al pan de trigo

Hall, F. et al. (2017). Functional properties of tropical banded cricket (*Grylloides Sigillatus*) protein hydrolysates

Grillos enteros se licuaron e hidrolizaron con alcasa (0.5 a 3.0%) obteniéndose hidrolizados con entre 26-52 % de péptidos. La solubilidad proteica incrementaba entre un 50-90% a pH alcalino. El índice de emulsión varió de 7 a 32 m²/g y la espumabilidad de 100 a 155% respecto al control sin hidrolizar demostrándose la viabilidad de incorporar en matrices alimenticias.

Kim et al. (2017) Effect of house cricket (*Acheta domestica*) flour addition on physicochemical and textural properties of meat emulsion under various formulations

Se evaluó las propiedades funcionales (solubilidad de proteína, absorción de agua, capacidad emulsificante y formación de gel) de harina de grillo sola y en emulsión cárnica (5 a 10% w/w). Se demostró que el pH y concentración de NaCl influyen en la solubilidad. No hubo formación de gel en el rango evaluado (20% p/p) ni cambios en la textura.

Lee, C. et al. (2016). Effects of pork gelatin levels on the physicochemical and textural properties of model sausages at different fat levels

Salchichas con distintos contenidos grasos se formularon con tres niveles de gelatina porcina (0.5, 1.0 y 1.5 %). Se observó que para salchichas de bajo contenido graso la pérdida por cocción y la dureza incrementaban; en cambio para salchichas de alto contenido graso estos parámetros disminuían lo que sugiere una interacción gelatina-proteína-grasa.

Ndiritu, K. et al. (2017). Extraction technique influences the physicochemical characteristics and functional properties of edible crickets (*Acheta domestica*) protein concentrate

Se extrajo la proteína de *A. domesticus* por vía acuosa y con hexano. El método por hexano extrajo más proteína y menos grasa. Las proteínas extraídas por vía acuosa fueron más abundantes en globulinas. Se evaluó capacidad emulsificante, retención de agua y absorción de grasa, en general la extracción acuosa favoreció las características funcionales.

Oonincx, D. (2015). Insects as food and feed: Nutrient composition and environmental impact

Se analiza la calidad nutricional de los insectos comestibles. Luego se describen un ensayo de determinación de emisión de gases de efecto invernadero y eficiencia de conversión alimentaria de distintos insectos y se comparan con los valores conocidos para ganado. Se concluye que la producción de insectos deja menor huella ambiental y es más sostenible.

Purschke, B. et al. (2017) Improvement of techno functional properties of edible insect protein from migratory locust by enzymatic hydrolysis

Se hidrolizó harina de *L. Migratoria* mediante un complejo de proteasas (alcalasa, neutrasa, papaína). Perfiles de SDS-PAGE revelaron una disminución de las bandas de alto peso molecular (25 y 75 KDa a 10 y 15 KDa). La solubilidad a pH alcalino incremento un 30% con la hidrólisis y mejoró la capacidad emulsificante y espumabilidad.

Rumpold, B. A., & Schlüter, O. K. (2013). Nutritional composition and safety aspects of edible insects

Se discuten los aspectos nutricionales de varios insectos comestibles. En general se concluye que muchos de estos brindan aportes satisfactorios de energía y proteínas, con una composición de aminoácidos adecuada para adultos. Son además fuente de MUFA y PUFA así como importantes micronutrientes: riboflavina, biotina, cobre, hierro, magnesio, entre otros.

Tao et al. (2017). Effects of edible insects ingredients on the physicochemical and sensory properties of extruded rice products

Arroz extruido se sustituyó con harina de grillo (10-15%). El análisis nutricional sugiere que se mejoró los niveles de proteína, fibra y hierro. Los cocerse fueron más oscuros y suaves; sin embargo, la evaluación sensorial con 120 panelistas concluyó que el producto tenía buena aceptabilidad en cuanto a: color, aroma, textura y sabor.

Torres, E. (2016). Efecto del tratamiento por altas presiones hidrostáticas (HHP) en la calidad de queso fresco y en las proteínas del suero de queserías

Fue evaluado el efecto de las APH en la inactivación de patógenos y alterantes en queso fresco a distintos niveles de presión (200-500 MPa). Las reducciones de carga fueron del orden de 5 ciclos logarítmicos. Se estudió también la gelificación por APH de WPI diluido en suero a 5,7,11 y 15% w/w obteniéndose geles de distinta dureza y gomosidad.

Van Huis, A. (2017). Edible insects: Marketing the impossible?

Se hace una revisión de artículos donde se promueve la entomofaga. Se amplía el argumento de sostenibilidad de la producción de insectos respecto a la de ganado, la cual equivale a un 8-18% de las emisiones de gases invernadero, finalmente indica que además de comunicar este aspecto es crucial el desarrollo de productos sensorialmente aceptables.

Wang, X. et al. (2016). Controlled cross-linking with glucose oxidase for the enhancement of gelling potential of pork myofibrillar protein

Se evaluó los cambios en cantidad de grupos sulfidrilos, solubilidad, reticulación y gelificación de proteínas miofibrilares de cerdo tratadas con GOx en presencia de glucosa y H₂O₂. El uso de GOx incremento el nivel de polimerización de proteínas y disminuyo los grupos sulfidrilos firmes los geles obtenidos en presencia de H₂O₂ fueron más firmes y elásticos.

Wang, X., et al. (2017). Rheological enhancement of pork myofibrillar protein-lipid emulsion composite gels via glucose oxidase oxidation/transglutaminase Cross-Linking Pathway

Se modificó proteína miofibrilar de cerdo con complejo GOx-Fe y se trató con TGasa para inducir agregación y gelificación. Se evidencio que la adición de GOx indujo formación de agregados proteicos que mejoraron la firmeza y elasticidad del gel.

Yi, L. et al. (2015). A study on the potential of insect protein and lipid as a food source

Se extrajo las proteínas de *T. molitor*, *Z. morio*, *A. diaperinus*, *A. domesticus*, and *B. dubia* y se determinó: proteína cruda, perfil de aminoácidos y formación de gel. Los niveles de proteína fueron de entre 19-22% y la calidad de aminoácidos similar a la del grano de soya. Valores de pH de 7 y 10 y altas concentraciones favorecieron la gelificación.

Zhu, Q. et al. (2018). Physical stability, microstructure and micro-rheological properties of water-in-oil-in-water (W/O/W) emulsions stabilized by porcine gelatin

Se estudió la estabilización de emulsiones W/O/W dispersadas en MgCl₂ 2.0 M con gelatina porcina. A dosis de 4.0% se evidenció un cambio en la visco elasticidad de las gotas de la emulsión. Los resultados de microscopia evidenciaron que la adición de gelatina retardaba la coalescencia.

Zielińska, E. et al. (2015). Selected species of edible insects as a source of nutrient

Se evaluó la composición proximal y perfil aminoacídico de *G. Singillatus*, *T. Molitor* y *S. Gregaria*. Los contenidos de proteína fueron de 52-76% y los perfiles aminoacidicos completos. El aporte de ácidos grasos monoinsaturados y PUFA también era bueno. Todas las especies eran ricas en: magnesio, fierro, cobre y zinc.

Zielińska, E. et al. (2018). Comparison of functional properties of edible insects and protein preparations thereof

Proteína extraída de tres especies de insectos: *G. Sigillatus*, *S. Gregaria* y *T. Molitor* se evaluó en cuanto a solubilidad, capacidad de retención de agua y aceite, formación de espuma y capacidad emulsificante. Para las tres la solubilidad fue mínima a pH 5. *T. Molitor* y *G. Singillatus* mostraron buen capacidad de retención de agua y aceite (3.95 y 3.33 g/g).

Van Raamsdonk, L. et al. (2017). New feed ingredients: The insect opportunity.

El autor hace una recopilación de los aspectos legales, ambientales y de seguridad del uso de insectos en piensos. Se concluye que los insectos constituyen una buena fuente proteica; sin embargo, el costo energético y huella de su producción es algo mayor que los granos. Podría darse un valor agregado utilizando subproductos y residuos para su alimentación.