

VALORACIÓN PROTEICA DE HARINAS DE INSECTOS EN LA NUTRICIÓN DE RUMIANTES: COMPARACIÓN DE MÉTODOS

González-Rosales, G.¹, Frutos, P.¹, Toral, P.G.¹, Belenguer, A.¹, Mendoza, A.G.¹, Fondevila, M.² y Hervás, G.^{1*}

¹Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-Univ. de León), Finca Marzanas s/n, 24346 Grulleros, León. ²Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Instituto Agroalimentario de Aragón (IA2), Universidad de Zaragoza-CITA, Miguel Servet 177, 50013, Zaragoza; *g.hervas@csic.es

INTRODUCCIÓN

Dada la creciente demanda de fuentes de proteína vegetal, tanto para el consumo animal como humano, se hace necesaria la búsqueda de fuentes alternativas que puedan utilizarse en la alimentación de rumiantes. Diversos estudios (FAO, 2013; Makkar et al., 2014) han propuesto la incorporación de insectos en los piensos de los animales y la sustitución total o parcial de fuentes vegetales de proteína. Sin embargo, y aunque la FAO (2013) apoya el uso de estos productos, hasta la fecha existen muy pocos estudios en rumiantes (e. g., Jayanegara et al., 2017). Además, estos alimentos son extremadamente heterogéneos (no sólo por la especie de insecto sino también por su fase metamórfica), especialmente en lo que se refiere a la cantidad y calidad de su proteína o grasa (Rumpold y Schlüter, 2013).

Por otro lado, el uso de las técnicas *in vitro* de cultivos no renovados de microorganismos ruminales o la *in situ* de las bolsas de nailon para evaluar la degradación ruminal de la proteína está cuestionado, ya que podría haber una sobreestimación por el paso de partículas a través de los poros (bien del crisol o bien de las bolsas) sin ser realmente degradadas (Givens et al., 2000). Raab et al. (1983) propusieron un método alternativo basado en la técnica de producción de gas, pero no ha recibido demasiada atención.

Por todo ello, el objetivo de este trabajo fue realizar un estudio de la valoración proteica de varias harinas de insectos mediante la utilización de diversas técnicas (*in vitro* e *in situ*).

MATERIAL Y MÉTODOS

En este estudio se valoraron 4 harinas de insectos: 1) gusano de la harina (*Tenebrio molitor*, larvas); 2) gusano rey (*Zophobas morio*, larvas); 3) escarabajo de la cama (*Alphitobius diaperinus*, larvas), y 4) grillo doméstico (*Acheta domesticus*, adultos). Además, se utilizó una torta de soja como alimento de referencia. La composición química de estos sustratos se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición química (%) de los alimentos valorados¹.

	MS	MO	PB	FND	FAD	EE	Almidón
Torta de soja	87,5	93,1	50,6	14,5	9,3	3,5	0,3
<i>Tenebrio molitor</i>	93,2	96,6	50,9	19,5	7,6	34,4	4,5
<i>Zophobas morio</i>	93,7	96,6	37,8	9,6	5,3	48,8	1,8
<i>Alphitobius diaperinus</i>	93,3	96,0	64,7	11,4	7,3	24,7	0,9
<i>Acheta domesticus</i>	91,3	94,7	69,9	13,4	8,4	18,1	1,6

¹MS: materia seca; MO: materia orgánica; PB: proteína bruta; FND: fibra neutro detergente; FAD: fibra ácido detergente; EE: extracto etéreo. Resultados en % MS, excepto la propia MS que se expresa en % de la materia fresca.

Para realizar una valoración proteica de los alimentos se utilizaron 3 métodos diferentes. En el primero, se siguió la metodología *in vitro* descrita por Raab et al. (1983) y Mota et al. (2005). Para ello, se realizaron cultivos no renovados de microorganismos ruminales usando 3 ovejas merinas canuladas en el rumen (59,9 kg PV) como donantes del inóculo. Estos animales se alimentaron con una ración completa mezclada (TMR) basada en heno de alfalfa y concentrado (relación F:C 60:40). En cada botella de incubación se pesaron 500 mg de sustrato junto con cantidades crecientes (0, 100, 200 o 300 mg) de almidón de maíz (Fluka, España) a los que se les añadió 50 mL de fluido ruminal tamponado (relación 1:4 entre fluido ruminal –recogido 3-4 horas postingestión y filtrado a través de una membrana de nailon de 250 µm– y saliva artificial; Goering y Van Soest, 1970). Las incubaciones se realizaron a 39,5

°C durante 16 horas, y se repitieron en 3 días diferentes. La producción de gas se registró a las 4, 8 y 16 h y, una vez detenida la incubación, se tomaron muestras para el análisis del N amoniacal (Reardon, 1966) para estimar por regresión la desaparición del nitrógeno (**DN reg**). Posteriormente, el residuo se filtró utilizando crisoles porosos (100-160 µm) y se secó a 45 °C para analizar el contenido de nitrógeno (ISO 5983-2:2009) y determinar así su desaparición (**DN in vitro**).

La degradación ruminal del nitrógeno también se estudió mediante la técnica de las bolsas de nailon (Ørskov y McDonald, 1979). Para ello, se utilizaron bolsas de 50 µm de tamaño de poro que fueron incubadas durante 16 horas en el rumen de 4 ovejas merinas (57,4 kg PV) canuladas. Transcurrido el tiempo de incubación, las bolsas se lavaron primero a mano con agua fría, se congelaron durante 24 horas, se lavaron después en una lavadora con agua fría y finalmente se secaron a 45 °C durante 48 horas. Sobre el residuo se analizó el contenido de nitrógeno para poder estimar así su desaparición (**DN in situ**).

La degradación ruminal del N con la técnica de Raab et al. (1983) se estimó mediante regresión lineal (mL de gas vs. mg de N-amoniaco), utilizando el procedimiento REG del paquete estadístico SAS (v9.4; SAS Inst. Inc., EE. UU.).

Los resultados se analizaron mediante dos análisis independientes de varianza, para estudiar las diferencias entre métodos y entre sustratos, utilizando el procedimiento MIXED del SAS. En ambos casos la tanda se consideró como efecto aleatorio. Las medias se ajustaron para comparaciones múltiples usando la corrección de Bonferroni.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los análisis de composición química de los insectos (Tabla 1) confirman su potencial como ingredientes alternativos a las fuentes tradicionales de proteína. De los insectos valorados, *Z. morio* es el que contiene menor cantidad de PB (38%), aunque mayor proporción de grasa (49%). En general, la composición química observada es similar a la descrita por Rumpold y Schlüter (2013).

En cuanto a la degradación ruminal del N estimada por regresión, a partir de los datos *in vitro* de producción de gas y el N amoniacal, en la Tabla 2 se presentan las ecuaciones obtenidas. En todos los sustratos, la intersección indica que la degradación potencial de su PB es relativamente elevada (entre 52 y 62% para la soja, *A. diaperinus* y *A. domesticus*, y 36-38% para las larvas de *T. molitor* y *Z. morio*). No obstante, estos resultados podrían estar condicionados por la composición del inóculo ruminal, obtenido de donantes que consumían una dieta muy rica en PB (~20%) y recogido 3-4 h post ingestión, lo que podría haber favorecido una elevada actividad proteolítica durante la incubación.

Tabla 2. Ecuaciones de regresión establecidas entre la producción de gas (x , mL) y el contenido de nitrógeno amoniacal (y , mg) tras 16 h de incubación *in vitro* de los alimentos proteicos con cantidades crecientes (0, 100, 200 o 300 mg) de almidón ($n = 12$).

	Ecuación de regresión	R ² -ajustada	RMSE ¹
Torta de soja	$y = 61,7 - 0,210 x$	0,893	1,5172
<i>Tenebrio molitor</i>	$y = 35,7 - 0,136 x$	0,927	1,1049
<i>Zophobas morio</i>	$y = 38,6 - 0,134 x$	0,933	0,9939
<i>Alphitobius diaperinus</i>	$y = 51,7 - 0,092 x$	0,768	1,7472
<i>Acheta domesticus</i>	$y = 55,7 - 0,133 x$	0,905	1,4489

¹Raíz cuadrada del error cuadrático medio.

En la Tabla 3 se muestran las diferencias debidas al método analítico y al sustrato: la degradación de N varió en función del método ($P < 0,05$) en 4 de los 5 sustratos. Únicamente en *A. domesticus* fue similar entre técnicas ($P > 0,10$). Independientemente del método, el alimento con valores más altos de degradación de N fue la torta de soja, mientras que *T. molitor* presentó siempre los más bajos ($P < 0,001$). El resto de insectos se situó en una posición intermedia, con cifras relativamente similares cuando se estimó por regresión o *in situ*, pero más variables en la estimación *in vitro*, algo esperable dadas las características intrínsecas de cada método (Givens et al., 2000).

Tabla 3. Degradación (g/g) del nitrógeno de los alimentos proteicos estimado mediante el método de Raab et al. (1983; DN reg), el método *in vitro* de cultivos no renovados de microorganismos ruminales (DN *in vitro*) o la técnica de las bolsas de nailon (DN *in situ*).

	DN reg	DN <i>in vitro</i>	DN <i>in situ</i>	eed ¹	Prob. ²
Torta de soja	1,141 ^{A/a}	0,853 ^{A/b}	0,914 ^{A/b}	0,0372	<0,001
<i>Tenebrio molitor</i>	0,498 ^{D/a}	0,406 ^{D/b}	0,486 ^{D/a}	0,0264	0,019
<i>Zophobas morio</i>	0,761 ^{B/a}	0,556 ^{C/b}	0,724 ^{BC/a}	0,0185	<0,001
<i>Alphitobius diaperinus</i>	0,701 ^{C/b}	0,699 ^{B/b}	0,778 ^{B/a}	0,0143	<0,001
<i>Acheta domesticus</i>	0,728 ^{BC}	0,715 ^B	0,702 ^C	0,0144	0,266
eed ¹	0,0118	0,0327	0,0202		
Prob. ²	<0,001	<0,001	<0,001		

^{ABC}Para cada método, diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas.

^{ab}Para cada alimento, diferentes superíndices en la misma fila indican diferencias significativas.

¹Error estándar de la diferencia. ²Probabilidad.

A modo de cierre, los resultados no permiten seleccionar con fiabilidad un único valor de degradación ruminal del N, aunque los diferentes métodos parecen establecer un ranking similar. En cualquier caso, independientemente del método de valoración, los resultados sugieren que la proteína de los insectos valorados presenta valores bajos de degradación, inferiores a los de torta de soja, aunque es preciso realizar más trabajos de valoración proteica de estos alimentos alternativos dada la escasez de información al respecto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FAO, 2013. *Edible insects*. FAO, Roma.
- Givens, D.I. et al. 2000. *Forage evaluation in ruminant nutrition*. CABI Publishing, UK
- Goering M.K. & Van Soest, P.J. 1970. *Forage fiber analysis*. Agriculture handbook 379. USDA, USA
- Jayanegara, A. et al. 2017. *J. Indonesian Trop. Anim. Agric.* 42: 247-254.
- Makkar, H.P.S. et al. 2014. *Amin. Feed. Sci. Technol.* 197:1-33.
- Mota, M. et al. 2005. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 123-124: 341-350.
- Ørskov, E. R. & McDonald, I. 1979. *J. Agric. Sci., Camb.* 92: 499-503.
- Raab, L. et al. 1983. *Brit. J. Nutr.* 50: 569-582.
- Reardon, J. et al. 1966. *Clin. Chim. Acta*, 14: 403-405.
- Rumpold, B.A. & Schlüter, O.K. 2013. *Mol. Nutr. Food Res.* 57: 802-823.

Agradecimientos: P.G. Toral disfruta de un contrato Ramón y Cajal (RYC-2015-17230) del MINECO, cofinanciado por el Fondo Social Europeo.

PROTEIN EVALUATION OF INSECT MEALS FOR RUMINANTS NUTRITION: COMPARISON OF METHODS

ABSTRACT: Insects have been considered as promising alternative feed resources for animals, but reports in ruminants are very scarce. This study was conducted to evaluate protein degradation of four insect meals (from *Tenebrio molitor*, *Zophobas morio*, *Alphitobius diaperinus* and *Acheta domesticus*) and soybean meal as a reference feedstuff. The N degradability was estimated by the *in vitro* relationship between gas production and ammonia-N concentration (DN reg), and N disappearance from *in vitro* incubation residue (DN *in vitro*) or from the *in situ* nylon bags technique (DN *in situ*). The results confirmed the potential of these insect meals (with CP contents ranging from 38 to 70%) as protein ingredients and showed that, regardless of the evaluation method, the four of them present a relatively low N degradation (lower than that of soybean meal). However, further research in ruminants is necessary.

Keywords: *in situ* technique, *in vitro* technique, N degradability, sheep