

## Evaluación de tratamiento térmico de insectos comestibles (*Acheta domesticus*, *Locusta migratoria* y *Gryllus assimilis*) utilizando un test comercial de fosfatasa alcalina

### Assessment of heat treatment of edible insects (*Acheta domesticus*, *Locusta migratoria* y *Gryllus assimilis*) using a commercial alkaline phosphatase test

GONZÁLEZ-AGUILAR, Delia Guillermina\*†, GRABOWSKI, Nils, BARBA-LEÓN, Jeannette y GALVÁN-LOZANO, Diana

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Camino Ing. Ramón Padilla Sánchez No. 2100, La Venta del Astillero, Zapopan, jalisco. C.P. 45510

ID 1<sup>er</sup> Autor: Delia Guillermina, González-Aguilar

ID 1<sup>er</sup> Coautor: Nils, Grabowski

ID 2<sup>do</sup> Coautor: Jeannette, Barba-León

ID 3<sup>er</sup> Coautor: Diana, Galván-Lozano

Recibido Junio 20, 2018, Aceptado Septiembre 30, 2018

#### Resumen

Evaluación de tratamiento térmico de insectos comestibles (*Acheta domesticus*, *Locusta migratoria* y *Gryllus assimilis*) utilizando un test comercial de fosfatasa alcalina. El objetivo fue evaluar la efectividad del tratamiento por calor (pasteurización) en 3 insectos comestibles para la eliminación de microorganismos patógenos mediante el método de la Fosfatasa Alcalina. Los insectos fueron sacrificados por enfriamiento y homogenizados con agua bidestilada (1:10) en un Stomacher. El líquido fue pasteurizado durante 10 minutos, cambiando la temperatura cada 5°C y evaluado usando un kit comercial de detección de la fosfatasa alcalina (Lactognost®, Heyl, Hildesheim, Alemania). La presencia de la enzima fosfatasa alcalina indica que el tratamiento con calor no fue correcto. Una muestra se consideró activa cuando mostró un color azul e inactiva, cuando se observó un color parduzco. Cuando ocurría un cambio de color, se evaluó la temperatura a cada 1° C escogidos entre el último resultado “activo” y el primer “inactivo”, después se evaluó el tiempo de calentamiento. El presente trabajo podría ser importante para que los gobiernos y organizaciones, tanto nacionales como internacionales, puedan establecer normas que garanticen la inocuidad de los insectos comestibles, así como para que las empresas y productores puedan comercializarlos.

#### Insectos, Pasteurización, Fosfatasa Alcalina

#### Abstract

Assessment of heat treatment of edible insects (*Acheta domesticus*, *Locusta migratoria* y *Gryllus assimilis*) using a commercial alkaline phosphatase test. The main objective was to evaluate the effectiveness of heat treatment (pasteurization) in 3 edible insects for the elimination of pathogenic microorganisms by the Alkaline Phosphatase method. The insects were killed by freezing and homogenized with double-distilled water (1:10) in a Stomacher. The liquid was pasteurized during 10 minutes, changing the temperature every 5°C and analyzed using a commercial alkaline phosphatase kit. (Lactognost®, Heyl, Hildesheim, Germany). The presence of the alkaline phosphatase enzyme indicates that the heat treatment was incorrect. A sample was considered active, when showed a blueish color, and inactive, when showed a brownish color. Once a color changed occurred, steps of 1°C were chosen between the last “active” and the first “inactive” results. Then the time was tested. The present work could be important to governments and organizations, both national and international, can establish norms that guarantee the safety of edible insects, as well as so that companies and producers can commercialize them.

#### Insects, Pasteurization, Alkaline Phosphatase

**Citación:** GONZÁLEZ-AGUILAR, Delia Guillermina, GRABOWSKI, Nils, BARBA-LEÓN, Jeannette y GALVÁN-LOZANO, Diana. Evaluación de tratamiento térmico de insectos comestibles (*Acheta domesticus*, *Locusta migratoria* y *Gryllus assimilis*) utilizando un test comercial de fosfatasa alcalina. Revista de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales. 2018, 4-13: 14-20.

\*Correspondencia al Autor (Correo electrónico: delia.gonzalez@academicos.udg.mx)

† Investigador contribuyendo como primer Autor.

## Introducción

El consumo de insectos (entomofagia) como fuente de proteína es una de las acciones que está promoviendo la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) en varios países. La entomofagia puede ser promovida principalmente por 3 razones:

**Factores socioeconómicos y culturales:** La recolección o crianza de insectos es una opción de inversión de baja tecnología y bajo capital que ofrece una entrada hasta los sectores más pobres de las sociedades, también ofrece oportunidades tanto al sector rural como al urbano.

**Salud:** Los insectos son alternativas saludables y nutritivas a las carnes tradicionales como pollo, cerdo, res y hasta el pescado (capturado en océano). Muchos insectos son ricos en proteínas y grasas buenas y altos en calcio, hierro y zinc. Además, los insectos forman parte de muchas dietas regionales y nacionales.

En la tabla siguiente se agrupan la cantidad de los principales nutrientes de las tres especies utilizadas en el presente trabajo:

Insecto	Energía (kcal)	Proteína (g)	Grasa (g)	Cenizas (g)
<i>Acheta domesticus</i>	165.54	20.119	4.278	1.767
<i>Locusta migratoria</i>	157.81	20.119	5.766	1.24
<i>Gryllus assimilis</i>		19.7985	11.457	1.4281

**Tabla 1** Comparación de la composición nutricional de las especies que se utilizaron en este estudio. FAO, 2017

**Impacto ambiental:** El incremento en la deforestación, la intensificación de la agricultura, y la contaminación ambiental amenazan el planeta, mientras que altas demandas y el incremento de los precios podría llevar a la sobreexplotación. Los insectos promovidos como alimentos emiten considerablemente menos gases de efecto invernadero que la mayoría del ganado. Las emisiones de amoníaco asociadas a la crianza de insectos también son mucho menores que las relacionadas con el ganado convencional. Debido a que son de sangre fría, son muy eficientes para convertir el alimento en proteína (los grillos, por ejemplo, necesitan doce veces menos alimento que el ganado bovino, cuatro veces menos que el ganado ovino, y la mitad que lo que necesitan cerdos y aves para producir la misma cantidad de proteína).

También pueden ser alimentados con residuos orgánicos. Por otra parte, los insectos forman parte de las dietas tradicionales de por lo menos 2 mil millones de personas en el mundo y se consumen de un modo habitual en 102 países del mundo de los cinco continentes. Se calcula que se consumen más de 1900 especies de insectos, siendo América el continente donde mayor número de especies se consumen con 699, además México es el país de América con mayor número de especies que se consumen con 415.

## Métodos de procesamiento térmico de los alimentos

Hay dos tipos principales de categorías empleadas en el procesamiento térmico: Pasteurización y Esterilización. El propósito básico del procesamiento térmico de los alimentos es reducir o destruir la actividad microbiana, reducir o destruir la actividad enzimática y producir cambios físico o químicos para hacer que los alimentos lleguen a un cierto estándar de calidad.

**Pasteurización:** La pasteurización es un tratamiento térmico de mínimo procesamiento en donde el alimento es calentado a  $<100^{\circ}\text{C}$ . Como una operación unitaria en el procesamiento de los alimentos puede ser usado para destruir las enzimas y microorganismo relativamente sensibles al calor.

**Esterilización:** El objetivo principal de la esterilización es la destrucción de todas bacterias incluidas sus esporas. El tratamiento térmico de esos productos necesita ser lo suficientemente severo para inactivar /matar la mayoría de los microorganismos resistentes al calor, que son las esporas de *Bacillus* y *Clostridium*.

## La enzima fosfatasa alcalina en la naturaleza y en los insectos

La fosfatasa alcalina se da extensamente en la naturaleza, y se encuentra en muchos organismos desde bacterias al humano. Con algunas excepciones, las fosfatasas alcalinas son enzimas homodiméricas y cada sitio catalítico contiene tres iones de metal necesariamente para la actividad enzimática. Estas propiedades, sin embargo, difieren notablemente entre las diferentes AP isoenzimas de los mamíferos y tienden a reflejar funciones in vivo muy diferentes.

Estas enzimas esta incluidas en procesos bioquímicos fundamentales. La fosfatasa alcalina en una variedad de organismos indica propiedades comunes en reacciones hidrolasa/transferasa, estructura dimerica, actividad dependiente de  $ZN^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  y secuencias de aminoácidos idénticas alrededor del sitio activo.

Se ha encontrado presencia de la enzima fosfatasa alcalina se encontró en grillos, langostas, abejas, algunas polillas, y en algunos escarabajos. De los insectos utilizados en este trabajo se encontraron reportes de la presencia de fosfatasa en la hemolinfa del grillo domestico *Acheta domesticus* y en algunos órganos de la langosta migratoria *Locusta migratoria*.

### Prueba de fosfatasa alcalina

La fosfatasa alcalina está presente en la leche cruda y es progresivamente inactivada por calentamiento a temperaturas superiores a  $60^{\circ}C$ . Por ello debe estar ausente en una leche correctamente pasteurizada. El método de la Fosfatasa Alcalina ha sido adoptado por muchos países como la prueba estándar para la rápida validación del proceso de pasteurización de la leche. La premisa del test de fosfatasa alcalina se basa en las características de inactivación térmica de la enzima endógena de la fosfatasa alcalina de la leche. En resumen, la Fosfatasa Alcalina es ligeramente más resistente a la inactivación térmica que los patógenos bacterianos (específicamente *Coxiella burnetti* y *Mycobacterium tuberculosis*); por consiguiente, si la actividad de la fosfatasa alcalina es enormemente reducida, se puede inferir que los patógenos bacterianos se reducen y los requerimientos térmicos legales para la pasteurización se cumplen.

Las pruebas empleadas para detectar la actividad de la fosfatasa alcalina se pueden clasificar en forma general en cuatro tipos: método colorimétrico, fluorimétrico, quimioluminiscencia e inmunoquímico. En el presente trabajo se utilizó un kit comercial colorimétrico de la prueba para encontrar la presencia de fosfatasa alcalina en leche. La mayoría de los test colorimétricos actuales se basan en el primer test de fosfatasa alcalina. En este test, el fenol es liberado desde el sustrato fenil fosfato disódico y reacciona con un reactivo formador de color.

### Metodología a desarrollar

El presente estudio se realizó en el laboratorio del Instituto de Calidad e Inocuidad de Alimentos de la Fundación Universidad de Medicina Veterinaria de Hannover, Alemania.

### Obtención de las muestras

Las tres especies de insectos comestibles seleccionadas se obtuvieron de una tienda de mascotas local. Los insectos se almacenaron en recipientes de plástico y se sacrificaron por enfriamiento a una temperatura de  $-18^{\circ}C$  por 24 horas. Posteriormente se lavaron los insectos, se pesaron hasta obtener una muestra de 25 gramos, se obtuvo una dilución de 1:10 con agua bidestilada y se homogenizo en el Stomacher® por 2 minutos a una velocidad de 200 rpm.

### Método de prueba

Se tomo la temperatura y se colocó en dos tubos de ensayo un ml de la muestra en cada uno, el primero se utilizó como control y el segundo se puso a prueba variando temperatura y tiempo en baño María; se empezó con  $10^{\circ}C$  por 10 minutos y se subió la temperatura cada 5 grados hasta obtener un resultado negativo con la prueba de fosfatasa alcalina de Lactognost® (Heyl, Hildesheim, Alemania.), después se hicieron variaciones de  $1^{\circ}C$  entre el último resultado positivo y el primer negativo, y posteriormente se cambió el tiempo de calentamiento.

### Método de análisis

Como comprobación se utilizó el test comercial de fosfatasa alcalina para leche de Lactognost® y se siguieron las instrucciones del fabricante. Se colocaron en un tubo de ensayo 10 mL de agua destilada, se le añadió una pastilla de Lactognost® I y otra de Lactognost® II, se tapó el tubo y se agito hasta la completa disolución. A continuación, se añadieron 1 mL de la muestra de insecto al tubo de ensayo y se incubo a  $37^{\circ}C$  en baño maría por una hora. Seguidamente, se agregó una cucharadita dosificadora de Lactognost® III, se agito y se incubo durante 10 minutos a la misma temperatura comprobando el resultado.

**Lectura de resultado**

La lectura de resultado se obtuvo comparando el color de las muestras con el color de los posibles resultados que señala el fabricante del test, siendo tres las posibilidades:

- Color café: prueba negativa, ausencia de fosfatasa alcalina.
- Color verde: prueba parcialmente positiva, débil presencia de la enzima.
- Color azul: prueba positiva, presencia de enzima.



**Figura 1** Interpretación de la lectura de resultados de la prueba Lactognost®. Lactognost®, Heyl, Hildesheim, Alemania

Esta metodología se aplicó a las 3 especies de insectos seleccionadas de manera individual

**Resultados**

La prueba de la fosfatasa alcalina (FA) es utilizada para evaluar la efectividad de la pasteurización. El método es cualitativo y se basa en evidenciar la presencia de la enzima mediante el desarrollo de una reacción colorimétrica. Cuando el método de pasteurización es aplicado, se destruye la enzima, no apareciendo color en los 30 segundos siguientes al desarrollo de la reacción. En las muestras de insectos, la reacción positiva a la fosfatasa alcalina (indica presencia) mostró una coloración azul, azulosa o verdosa.

La reacción negativa fue de color cafésoso, del mismo modo que cuando se aplica en muestras de leche y calostro. La pasteurización es un método cuyo objetivo es eliminar patógenos, particularmente enterobacterias, en los alimentos y es utilizado como método de rutina en el procesamiento de la leche.

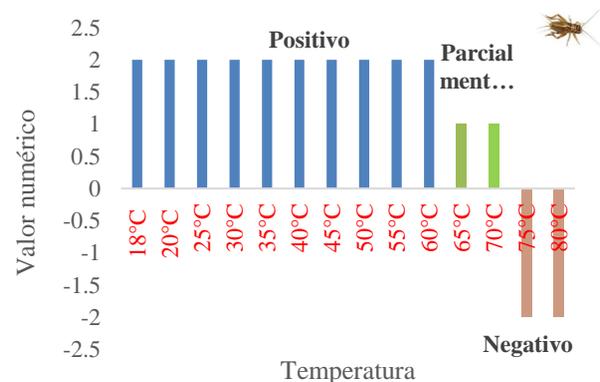
Este método se llevó a cabo en el presente trabajo y se utilizaron 25 gramos de insectos a una dilución 1:10 y los resultados mostraron que la fosfatasa alcalina de las especies grillo del campo jamaicano (*Gryllus assimilis*) y grillo doméstico (*Acheta domesticus*) se inactivó a una temperatura de 75°C aplicada en un tiempo de entre 10 a 15 minutos. Esto coincide con los resultados de pasteurización usadas en otros alimentos. En la especie langosta migratoria (*Locusta migratoria*) se aplicaron temperaturas mayores a 80°C por 20 minutos y aún daba resultados positivos, indicando esto presencia de la enzima y la no pasteurización

Con la finalidad de graficar los resultados, se procedió a otorgar valores numéricos a las categorías positivo= 2, parcialmente positivo = 1 y negativo = -1.

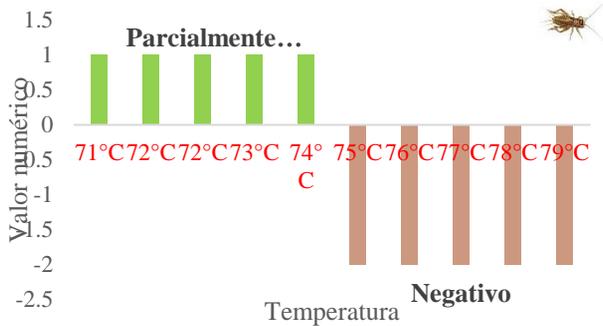
Resultado	Significado	Color	Valor
Positivo. Presencia de la enzima	No pasteurización	Tonos azules	2
Parcialmente positivo Presencia de la enzima	No pasteurización	Tonos verdes	1
Negativo No presencia de la enzima	Pasteurización	Tonos cafés	-2

**Tabla 3** Valores numéricos relacionados con la presencia de enzima y el color de los resultados de la prueba fosfatasa alcalina. Lactognost®, Heyl, Hildesheim, Alemania.

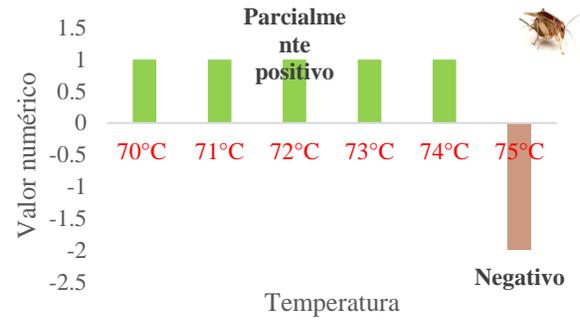
**Resultados obtenidos en las muestras del grillo doméstico (*Acheta domesticus*)**



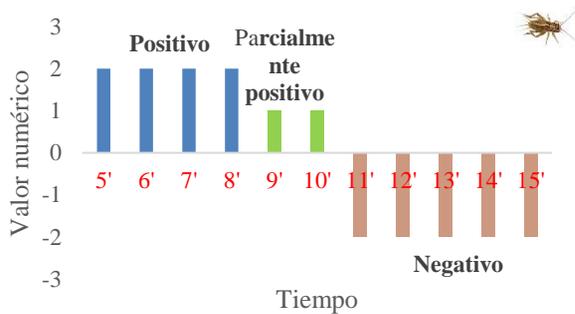
**Gráfico 1** Proceso de pasteurización aplicado a el grillo doméstico (*Acheta domesticus*) a temperaturas de 18°C a 80°C por 10 minutos



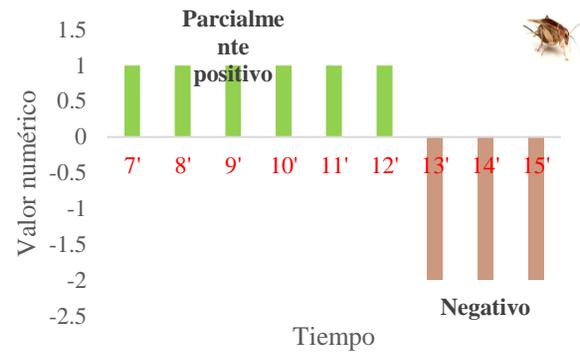
**Gráfico 2** Proceso de pasteurización aplicado a el grillo doméstico (*Acheta domestica*) a temperaturas de 71°C a 79°C por 10 minutos



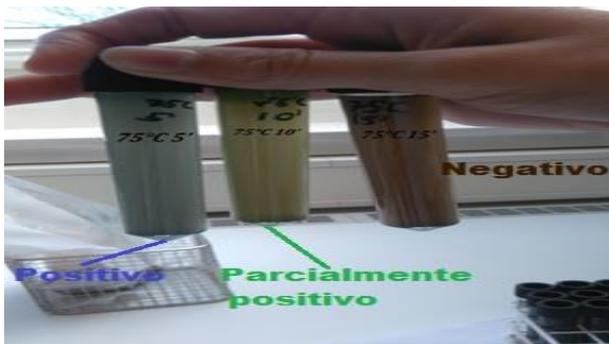
**Gráfico 5** Proceso de pasteurización aplicado a el grillo común (*Gryllus assimilis*) a temperaturas de 70°C a 75°C por 10 minutos



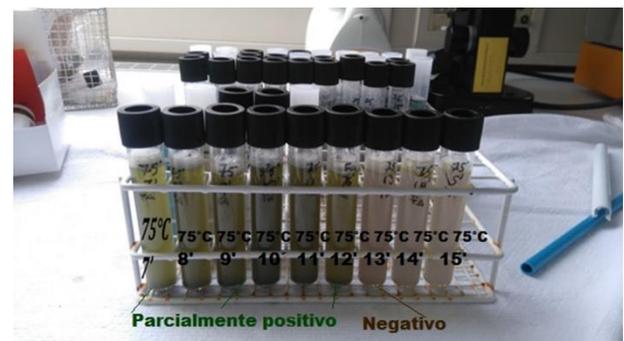
**Gráfico 3** Proceso de pasteurización aplicado al grillo doméstico (*Acheta domestica*) a temperaturas de 71 a 79°C por 10 minutos.



**Gráfico 6** Proceso de pasteurización aplicado a el grillo común (*Gryllus assimilis*) a temperatura de 75°C de 7 a 15 minutos

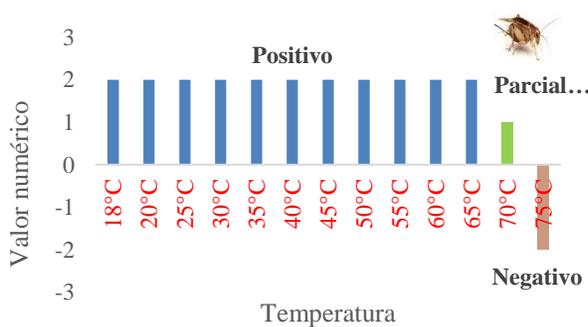


**Figura 2** Reacción colorimétrica del método de la fosfatasa alcalina en grillo doméstico (*Acheta domestica*) a 75°C por 5 minutos (reacción positiva), 10 minutos (reacción parcialmente positiva) y 15 minutos (reacción negativa)



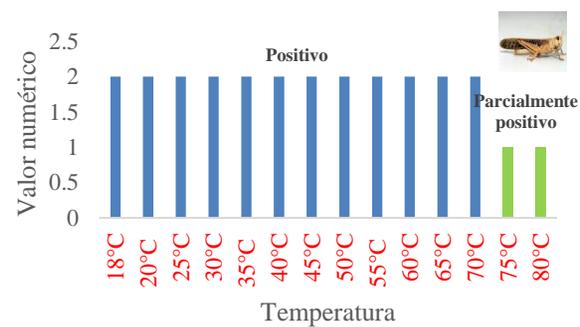
**Figura 3** Reacción colorimétrica del método de la fosfatasa alcalina en grillo común (*Gryllus assimilis*) a 75°C de 7 a 12 minutos (reacciones parcialmente positivas) y de 13 a 15 minutos (reacciones negativas)

**Resultados obtenidos en las muestras del grillo del campo jamaicano (*Gryllus assimilis*)**

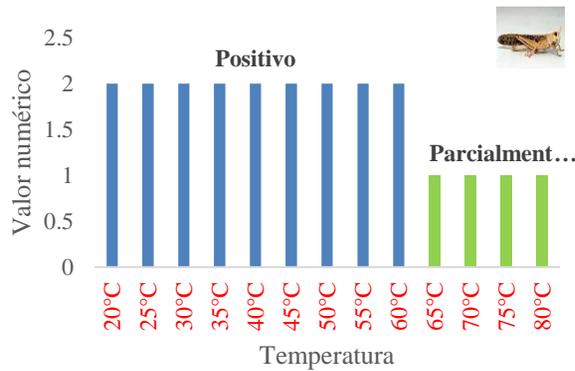


**Gráfico 4** Proceso de pasteurización aplicado a el grillo común (*Gryllus assimilis*) a temperaturas de 18°C a 75°C por 10 minutos

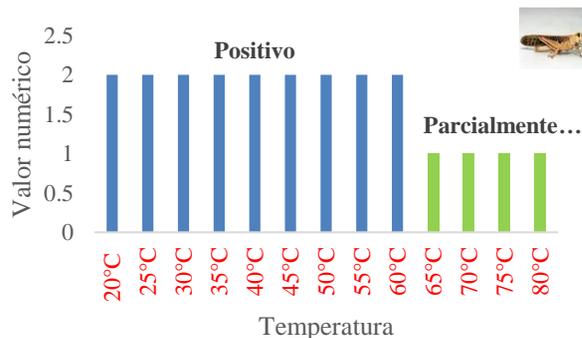
**Resultados obtenidos en las muestras de la langosta migratoria (*Locusta migratoria*)**



**Gráfico 7** Proceso de pasteurización aplicado a la langosta migratoria (*Locusta migratoria*) a temperaturas de 18°C a 80°C por 10 minutos



**Gráfico 8** Proceso de pasteurización aplicado a la langosta migratoria (*Locusta migratoria*) a temperaturas de 20°C a 80°C por 15 minutos



**Gráfico 9** Proceso de pasteurización aplicado a la langosta migratoria (*Locusta migratoria*) a temperaturas de 20°C a 80°C por 20 minutos



**Figura 4** Reacción colorimétrica del método de la fosfatasa alcalina en la langosta migratoria (*Locusta migratoria*) a 80°C por 10 minutos (reacción parcialmente positiva)

### Agradecimientos

Al Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara.

Al Instituto de Calidad e Inocuidad de los Alimentos de la Fundación Universidad de Medicina Veterinaria de Hannover, Alemania.

Por financiar y permitirme realizar este proyecto.

### Conclusiones

La prueba de fosfatasa alcalina resulto ser una herramienta eficaz para evaluar la pasteurización en dos de las tres especies utilizadas en este trabajo. Se comprobó que se puede usar la prueba de fosfatasa alcalina diseñada para la leche como una opción económica y relativamente oportuna. Sin embargo, los resultados con respecto a las combinaciones de temperatura-tiempo son específicos para cada especie de insecto.

No se obtuvo un resultado negativo en *Locusta migratoria* a fosfatasa alcalina por lo que son necesarios más estudios. Es necesario comprobar la eficacia de este método al hacer un análisis microbiológico y fisicoquímico de los insectos pasteurizados a estas combinaciones de tiempo y temperatura.

### Referencias

Day, M. F. (1948). The distribution of alkaline phosphatase in insects. *Australian Journal of Biological Sciences*, 2(1), 31-41.

Eguchi, M. (1995). Alkaline phosphatase isozymes in insects and comparison with mammalian enzyme. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 111(2), 151-162.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2017). *FAO/INFOODS Food Composition Database for Biodiversity Version 4.0 BioFoodComp4.0*. Rome, Italy. Recuperado Octubre, 2017 de:

<http://www.fao.org/infoods/infoods/tablas-y-bases-de-datos/bases-de-datos-faoinfoods-de-composicion-de-alimentos/es/>

Jongema, Y. (2017) World list of edible insects. [Archivo pdf]. Recuperado Octubre, 2017 de: <https://www.wur.nl/en/Research-Results/Chair-groups/Plant-Sciences/Laboratory-of-Entomology/Edible-insects/Worldwide-species-list.htm>

Kay, H. D., and W. R. Graham, Jr. (1935). The phosphatase test for pasteurized milk. *J. Dairy Res*, 6,191–203.

Lactognost® (Heyl, HiIdesheim, Alemania.)

Lauga, J. (1972). Etude par electrophorese de l'evolution des phosphatases alcalines de l'hémolymph au cours des stades terminaux du développement post-embryonnaire du grillon domestique *Acheta domesticus* L. Acad Sci Paris CR Ser D.

McComb, R. B., Bowers Jr, G. N., & Posen, S. (2011). Alkaline phosphatase. Springer Science & Business Media.

Millán, J. L. (2006). Alkaline phosphatases. Purinergic signalling, 2(2), 335 – 341.

Oonincx, D. G. A. B., van Itterbeeck, J., Heetkamp, M. J. W., van den Brand, H., van Loon, J. J. A., & van Huis, A. (2010). An Exploration on Greenhouse Gas and Ammonia Production by Insect Species Suitable for Animal or Human Consumption. PLOS ONE, 5(12), e14445.

Ramos-Elorduy, J. y Viejo Montesinos, J. L. (2007) Los insectos como alimento humano: Breve ensayo sobre la entomofagia, con especial referencia a México. Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural. Sección biológica, 102(1-4), 61-84. Recuperado Octubre, 2017 de: <http://historia.bio.ucm.es/rsehn/cont/publis/boletines/43.pdf>

Rankin, S. A., Christiansen, A., Lee, W., Banavara, D. S., & Lopez-Hernandez. (2010). Invited review: The application of alkaline phosphatase assays for the validation of milk product pasteurization. Journal of Dairy Science, 93(12), 5538- 5551.

Safefood 360. (2014). Thermal Processing of Food. Recuperado Octubre, 2017 de: <http://safefood360.com/resources/Thermal-Processing-of-Food.pdf>

Van Huis, A., Van Itterbeeck, J., Klunder, H., Mertens, E., Halloran, A., Muir, G., & Vantomme, P. (2013). Edible insects: future prospects for food and feed security (Vol. 171). Recuperado Octubre, 2017 de: <http://www.fao.org/docrep/018/i3253e/i3253e.pdf>

Van Huis, A. y Oonincx, D. (2017) The environmental sustainability of insects as food and feed. A review. Agronomy for Sustainable Development. Vol. 37. Recuperado Octubre, 2017 de:

<http://www.fao.org/docrep/018/i3253e/i3253e.pdf>