

UNIVERSITEIT GENT

FACULTEIT DIERGENEESKUNDE

Academiejaar 2014 – 2015

**Insecten als ‘novel food’ in de kippensector: Onderzoek naar
chitineverteerbaarheid en evaluatie van een nieuwe chitine
analysemethode**

Door

Silke BUKENBERGS

Promotor: Dierenarts Jana Pauwels
Co-promotor: Prof. Dr. Geert Janssens

Onderzoek in het kader
van de Masterproef

Universiteit Gent, haar werknemers of studenten bieden geen enkele garantie met betrekking tot de juistheid of volledigheid van de gegevens vervat in deze masterproef, noch dat de inhoud van deze masterproef geen inbreuk uitmaakt op of aanleiding kan geven tot inbreuken op de rechten van derden.

Universiteit Gent, haar werknemers of studenten aanvaarden geen aansprakelijkheid of verantwoordelijkheid voor enig gebruik dat door iemand anders wordt gemaakt van de inhoud van de masterproef, noch voor enig vertrouwen dat wordt gesteld in een advies of informatie vervat in de masterproef.

UNIVERSITEIT GENT

FACULTEIT DIERGENEESKUNDE

Academiejaar 2014 – 2015

**Insecten als ‘novel food’ in de kippensector: Onderzoek naar
chitineverteerbaarheid en evaluatie van een nieuwe chitine
analysemethode**

Door

Silke BUKENBERGS

Promotor: Dierenarts Jana Pauwels
Co-promotor: Prof. Dr. Geert Janssens

Literatuurstudie in het kader
van de Masterproef

VOORWOORD

Dit werk kon slechts tot stand komen dankzij de steun en hulp van vele mensen. Bijzondere dank gaat uit naar mijn promotoren Dierenarts Jana Pauwels en Prof. Dr. Geert Janssens, voor het aanreiken van dit interessant en actueel onderwerp, het delen van kennis, het bezorgen van essentiële informatie en het leveren van feedback. Ik ben hen zeer dankbaar voor de kans die ik heb gekregen een deel van mijn onderzoek uit te voeren in Zuid-Afrika. Het was een leerrijke ervaring waarbij ik veel toffe mensen heb ontmoet en onvergetelijke momenten heb beleefd. Speciale dank gaat uit naar Gavin en Rika voor hun enorme gastvrijheid en hun hulp bij de voorbereiding van de proeven. Ook een welgemeend woord van dank aan Herman voor het aanleren van de analyses in het labo en voor An Cools, bij wie ik altijd terecht kon met vragen rond interpretatie van eiwit- en vezelanalyses. Ten slotte wil ik ook de sponsors van de stalen (Jonas Claeys en Peter De Babtiste) bedanken, alsook vrienden en familie voor hun morele steun gedurende het voorbije jaar en het nalezen van het werk.

INHOUDSOPGAVE

SAMENVATTING	1
INLEIDING	2
1. LITERATUURSTUDIE	4
1.1. INSECTEN	4
1.1.1. Insecten: de ontbrekende schakel in de voedselketen	4
1.1.2. Insecten als alternatieve eiwitbron in de kippensector	5
1.1.3. Effect op de productieparameters	7
1.1.4. Nutriëtsamenstelling van insecten	7
1.1.4.1. Algemeen	7
1.1.4.2. Specifieke nutriëtsamenstelling van de mopaneworm	10
1.1.5. Uitdagingen voor de toekomst	12
1.2. CHITINE	12
1.2.1. Natuurlijk voorkomen en structuur	12
1.2.2. Biomedische toepassingen	14
1.2.3. Analysemethoden	15
1.2.4. Invloed van chitine op ruw eiwitbepaling	18
1.3. CHITINASEN	19
1.3.1. Voorkomen, indeling, werking en toepassingen	19
1.3.2. Chitinasen van vertebraten	20
1.3.3. Bacteriële chitinasen	22
1.3.4. Fungale chitinasen	22
1.3.5. Insect chitinasen	22
1.3.6. Plant chitinasen	22
1.4. VERTEERBAARHEID VAN CHITINE	22
2. MATERIAAL EN METHODEN	26
2.1. EXPERIMENT 1: CHITINEVERTEERBAARHEID BIJ SCHARRELKIPPEN	26
2.1.1. Dieren en huisvesting	26
2.1.2. Verteringsproef	27
2.1.3 Analytische methoden	28
2.1.3.1. Chitineanalyse en bepaling van de gestandaardiseerde chitineverteerbaarheid	28

2.1.3.2. Weende-analyse.....	29
2.1.3.2.1. As.....	30
2.1.3.2.2. Ruwe celstof.....	30
2.2. EXPERIMENT 2: EVALUATIE VAN EEN NIEUWE CHITINE ANALYSEMETHODE	31
2.2.1. Staalvoorbereiding.....	31
2.2.2. Analytische methoden	32
2.2.2.1. Chitineanalyse	32
2.2.2.3. As- en onoplosbare asanalyse	37
2.3. STATISTISCHE DATAVERWERKING	37
3. RESULTATEN.....	39
3.1. CHITINEVERTEERBAARHEIDSSSTUDIE BIJ KIPPEN	39
3.1.1. Gewichtsverloop	39
3.1.2. Chitineverteerbaarheid	39
3.1.3. Chemische samenstelling van de mopaneworm.....	41
3.2. UITWERKEN VAN EEN BETROUWBARE CHITINE ANALYSEMETHODE	42
3.2.1. Chemische samenstelling van de verschillende substraten.....	42
3.2.2. Statistische dataverwerking.....	46
4. DISCUSSIE	52
4.1. CHITINEVERTEERBAARHEIDSSSTUDIE BIJ KIPPEN	52
4.2. UITWERKING VAN EEN EEN BETROUWBARE CHITINE ANALYSEMETHODE.....	55
5. REFERENTIELIJST	58
6. BIJLAGEN	68
BIJLAGE I: RUW VET-, RUW EIWIT- EN STIKSTOFGEHALTES VAN VERSCHILLENDE SUBSTRATEN.....	68

SAMENVATTING

Uit eerdere studies is gebleken dat insecten omwille van hun nutritionele waarde een groot potentieel hebben als diervoedersupplement en duurdere eiwitbronnen zoals vismeel op termijn kunnen vervangen. Deze studie had tot doel het gebruik van insecten als alternatieve eiwitbron voor de kippensector te evalueren. Dit werd gedaan door de nutritionele samenstelling van de mopaneworm (*Gonimbrasia Belina*) te onderzoeken alsook de verteerbaarheid van chitine, een structurele component van het exoskelet van insecten. Chemische analyse bracht aan het licht dat mopanewormen op droge stof basis 53,3% eiwit, 13,7% vet, 11,9% as, 9,4% ruwe celstof en 8,9% chitine bevatten. Om een beeld te krijgen van de fysiologische en biochemische adaptaties die kippen in staat stellen chitine af te breken, werd een schatting gemaakt van de chitineverteerbaarheid. Gedurende vier weken werd aan eendagskuikens een dieet bestaande uit mopanewormen gegeven en werden de voedselopname en fecesuitscheiding gemeten. Na correctie voor basale endogene verliezen bedroeg de chitineverteerbaarheid 55% wat impliceert dat kippen reeds op jonge leeftijd in staat zijn een wezenlijk deel van het opgenomen chitine te weerhouden en te verwerken. Verder onderzoek moet uitwijzen welke mechanismen betrokken zijn bij de afbraak van chitine (endogene/exogene chitinaseactiviteit en/of bacteriële afbraak) en in welke mate afbraakproducten van chitine geabsorbeerd en benut kunnen worden. In deze studie werd ook onderzocht of de gebruikte methode voor chitinebepaling geschikt was voor het schatten van de verteerbaarheid. Hiervoor werden 24 substraten van plantaardige en dierlijke oorsprong onderworpen aan chitineanalyse. Uit de resultaten bleek dat de methode voor chitinebepaling in staat is een onderscheid te maken tussen chitinebevattende en niet-chitinebevattende dierlijke producten. Ook voor zuivere plantaardige producten zoals cellulose bleek de methode accuraat en werd correct geen chitine gedetecteerd. Zodra lignine/lignocellulose aanwezig was, werd echter verkeerdelijk chitine gemeten. Algemeen kan geconcludeerd worden dat deze methode betrouwbare informatie levert over het chitinegehalte in insecten, schaaldieren en fungi, maar geherevalueerd moet worden voor plantaardige producten.

Sleutelwoorden: Analytische methode – Chitine – Insecten – Kippen – Verteerbaarheid

INLEIDING

Tegen 2050 zullen er volgens de Food and Agriculture Organization (FAO) naar schatting 9 miljard mensen op aarde leven en zal de vraag naar voedsel verdubbeld zijn (FAO, 2009). Om te voorzien in voldoende voedsel, zal sterk geïnvesteerd moeten worden in modernere technieken voor de landbouwsector en duurzame productie. Grondstoffen en landbouwgronden geraken uitgeput en de druk op ecosystemen neemt alsmaar toe. Door de hoge ecologische kost van vlees en overbevissing van de zeeën is men genoodzaakt op zoek te gaan naar alternatieve dierlijke eiwitbronnen en teeltwijzen. Zowel ecologisch, economisch en op vlak van gezondheid zijn insecten een veelbelovend alternatief voor vis en vlees. Verschillende studies brachten aan het licht dat insecten rijk zijn aan eiwitten, vetten, vitamines en mineralen (van Huis *et al.*, 2013).

De meest gebruikte methode voor het bepalen van het eiwitgehalte is de Kjeldahl-analyse. Dit is een methode waarmee de totale fractie organische stikstof in een staal wordt gemeten. Vanuit het stikstofgehalte kan dan het eiwitgehalte in het staal berekend worden. Deze methode maakt deel uit van de Weende-analyse, een overkoepelende term voor de analyse van vocht, ruwe as, ruw eiwit, ruw vet en ruwe celstof, die oorspronkelijk ontwikkeld werd voor het analyseren van plantaardige voeders. Deze methode is echter minder accuraat als ze voor dierlijke producten zoals insecten, beenderen, haar en collageen wordt gebruikt (Cools *et al.*, 2014). Vooral het bepalen van vezels en eiwit in dierlijke producten aan de hand van de Weende-analyse geeft minder betrouwbare resultaten. De fractie die door de Weende-analyse beschouwd wordt als ruw eiwit zou in dierlijke producten niet enkel uit eiwit bestaan, maar ook uit andere stikstofbevattende componenten zoals chitine en collageen. Deze componenten worden geklasseerd onder de term 'dierlijke vezels' (Cools *et al.*, 2014). Hoewel dierlijke vezels nog grotendeels onbekend terrein zijn in het onderzoek, is het vrij zeker dat ze niet in dezelfde mate verteerd worden als plantaardige eiwitbronnen (Depauw, 2013). Dit heeft tot gevolg dat dierlijke vezels de interpretatie van ruw eiwit- en vezelanalyse bemoeilijken en specifieke analysemethoden voor dierlijke vezelbronnen een noodzaak zijn. Er werden reeds verdienstelijke pogingen gedaan om accurater waarden voor vezels (Cools *et al.*, 2014) en chitine (Finke, 2007; Liu *et al.*, 2012) in dierlijke producten te bepalen. De vraag blijft of deze methoden ook bruikbaar zijn voor voeders opgebouwd uit zowel plantaardige als dierlijke ingrediënten. In deze studie werd een methode onderzocht om eiwit- en chitinewaarden in producten van dierlijke en plantaardige oorsprong correcter in te schatten. Verschillende plantaardige en dierlijke substraten werden onderworpen aan de nieuwe analysemethode. Momenteel is enkel een aminozuuranalyse in staat een onderscheid te maken tussen eiwit en chitine in de ruw eiwit fractie. Dit is echter een dure techniek en het op punt stellen van een nieuwe analysetechniek is dan ook vanuit economisch standpunt zeer gunstig.

De evaluatie van de nieuwe analysemethode gaat ook na of deze betrouwbaar is voor het bepalen van de verteerbaarheid van chitine. Een correcte schatting hiervan wordt immers maar verkregen wanneer chitinegehalten in de voeding en de feces accuraat bepaald kunnen worden. De weinige studies die de verteerbaarheid van chitine bij vogels onderzochten, hebben grotendeels betrekking tot

wilde vogels en niet tot de gedomesticeerde kip (Jackson *et al.*, 1992; Weiser *et al.*, 1997). Daarnaast werd in eerdere studies meestal gebruik gemaakt van schaaldierchitine in plaats van insectchitine. In deze studie werd via een *in vivo* verteringsproef een beter inzicht verkregen in de verteerbaarheid van insectchitine bij kippen.

1. LITERATUURSTUDIE

1.1. INSECTEN

1.1.1. Insecten: de ontbrekende schakel in de voedselketen

Met het oog op een toenemende wereldbevolking en daarmee gepaard gaande voedselnood, is er nood aan nieuwe, goedkope voedselbronnen en alternatieve voedselproductiemethoden (FAO, 2009). Hogere inkomens en urbanisatie in ontwikkelingslanden hebben de vraag naar dierlijke producten spectaculair doen toenemen. Tegen 2050 wordt een toename van de vraag naar vlees en melk verwacht met respectievelijk 58% en 70% (FAO, 2011). Uitbreiding van de veestapel biedt geen duurzame oplossing aangezien vleesproductie sterk milieubelastend is. De veeteelt- en landbouwsector draagt in belangrijke mate bij tot klimaatveranderingen, verlies aan biodiversiteit, vermindering van landarealen en watervervuiling (Gerber *et al.*, 2013). Ook de vraag naar vis neemt sterk toe. Volgens de Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) moet er tegen 2050 80 miljoen ton vis geproduceerd worden om aan de vraag te voldoen. De meeste visgebieden en visserijen hebben echter hun maximumcapaciteit bereikt (Subasinghe, 2005). De snelle groei van de veesector en de schaarsheid van natuurlijke bronnen leidt tot competitie voor water, land en voedingsstoffen met andere sectoren (Gerber *et al.*, 2013). Momenteel gaat een derde van de totale graanopbrengst naar de veesector (Steinfeld en Opio, 2010). Ten gevolge van hogere inkomens wijzigt het eetpatroon van populaties en stijgt de humane vraag naar dure, hoogwaardige dierlijke eiwitbronnen waardoor er voedselcompetitie ontstaat tussen mens en dier. Een toenemende vraag naar dierlijke producten leidt indirect tot een toename van de vraag naar en de prijs van granen die als voedselbron voor vee worden gebruikt. Vooral arme populaties zijn slachtoffer van deze prijsstijging omdat hun dieet, in tegenstelling tot de rijke middenklasse, voornamelijk uit granen bestaat. De uitdaging voor de toekomst is dan ook te voldoen aan de toenemende vraag naar dierlijke eiwitbronnen in een wereld waar land, water en natuurlijke bronnen eindig zijn (Steinfeld en Opio, 2010).

Consumptie van alternatieve eiwitbronnen zoals insecten, fungi, kweekvlees, bonen en zeewier biedt mogelijks een oplossing. Insecten zijn minder milieubelastend, hebben minder watervereisten en een veel efficiëntere voedselconversie dan kippen, varkens en rundvee (van Huis en Itterbeeck, 2013). Momenteel wordt in Westerse landen het eten van insecten echter nog vaak verafschuwd of geassocieerd met primitief gedrag (Rozin en Fallon, 1987). Dit in tegenstelling tot verschillende landen in Afrika, Azië en Latijns-Amerika waar ze bijna dagelijks op het menu staan (Bukkens, 1997). Wereldwijd eten minstens twee miljard mensen insecten en werden reeds meer dan 1900 eetbare insectspecies gerapporteerd (Van Huis en Itterbeeck, 2013).

Insecten zijn niet alleen een waardevolle eiwitbron voor humane consumptie. Ook in samengestelde voeders voor vee, pluimvee en vissen kunnen ze gebruikt worden ter vervanging van dure eiwitbronnen zoals granen en vismeel (Madibela *et al.*, 2007; Yen, 2009; Van Huis en Itterbeeck, 2013). Aangezien insecten tot het natuurlijke dieet van kippen en vissen behoren worden ze door

deze dieren goed onthaald. Vervanging van de klassieke eiwitbronnen door insecten zou ook productieparameters zoals groei, karkaskwaliteit en eileg niet beïnvloeden (Pieterse en Pretorius, 2014). Daarnaast hebben insecten niet veel ruimte nodig en kunnen ze gekweekt worden op organisch afval (Rumpold en Schlüter, 2013). Volgens Veldkamp *et al.* (2012) zijn insecten gekweekt op organisch afval en organische nevenstromen een goede alternatieve eiwitbron voor varkens en pluimvee. Bovendien zorgen ze via degradatie van het biologisch afval voor een aanzienlijke reductie van de meststapel. Insecten met een korte cyclus en goede overlevingscapaciteit op laagwaardig organisch afval lenen zich het best voor grootschalige productie. Insecten die deze eigenschappen bezitten zijn bijvoorbeeld de zwarte soldatenvlieg, de huisvlieg en de gele meelworm (Veldkamp *et al.*, 2012). Sheppard *et al.* (1994) bedachten een methode voor het kweken van insecten op mest van pluimvee die de meststapel voor de helft kon reduceren. De insecten waren daarnaast ook rijk aan eiwitten (42%) en vetten (35%) en konden bijgevolg als veevoeder gebruikt worden (Sheppard *et al.*, 1994). Mogelijks zouden insecten ook de groei van schadelijke bacteriën in de mest tegengaan. Larven van de zwarte soldaatvlieg zouden in staat zijn de microflora van de mest te wijzigen en de groei van pathogene bacteriën zoals *Escherichia coli* 0157:H7 en *Salmonella enterica* te remmen (Veldkamp *et al.*, 2012).

1.1.2. Insecten als alternatieve eiwitbron in de kippensector

Snelle uitbreiding van de kippenindustrie in ontwikkelingslanden en uitputting van de huidige eiwitbronnen leidde ertoe dat allerlei insecten zoals krekels, kakkerlakken, sprinkhanen, termieten, rupsen en vliegen geïntroduceerd werden als aanvullende voedingsbron (Ravindran en Blair, 1993). Er werd reeds succesvol onderzoek verricht naar de mogelijkheid om dure producten zoals vleesmeel, vismeel, sojameel en maïs te vervangen door insecten (Pieterse en Pretorius, 2014). De optimale hoeveelheid insecten in het dieet van pluimvee is afhankelijk van het gebruiksdoel (vleeskip of leggen) (Makkar *et al.*, 2014). Insecten zijn ook nuttig voor afvalverwerking in pluimveebedrijven omdat ze grote hoeveelheden kippenmest kunnen afbreken en omzetten naar biomassa (El Boushy *et al.*, 1991). Momenteel verhindert de huidige Europese wetgeving (Europese Verordening nr. 142/2011) nog dat insecten gebruikt worden als voedingrediënt voor voedselproducerende dieren zoals varkens, pluimvee en vissen (Veldkamp *et al.*, 2012).

Uit een studie van Awoniyi *et al.* (2003) bleek dat madenmeel een goede alternatieve eiwitbron is voor vismeel bij vleeskuikens van drie tot zes weken oud. Wanneer het dieet uit 4% vismeel bestond en 25% hiervan vervangen werd door madenmeel, werden geen significante verschillen waargenomen in lichaamsgewicht, voedselconsumptie, voederefficiëntie en karkas- en spierontwikkeling. Wel werd een gewichtsafname bemerkt wanneer meer dan 25% van het vismeel in het dieet vervangen werd door madenmeel (Awoniyi *et al.*, 2003). Ojewola *et al.* (2005) stelden vast dat vleeskuikens die een dieet op basis van sprinkhanen kregen beter groeiden dan deze die vismeel kregen. Deze studie suggereerde dat het aanwezige chitine in sprinkhanen hiervoor verantwoordelijk was. Na afbraak van chitine door intestinale bacteriële chitinasen wordt glucosamine gevormd, dat een groeibevorderend effect zou hebben. Ook stimulatie van bifidobacteriën door chitinerijk materiaal zorgde mogelijks voor een betere gewichtstoename bij kuikens die het sprinkhaandieet kregen (Ojewola *et al.*, 2005).

Insecten kunnen ook als alternatieve eiwitbron voor sojameel dienen (Ramos-Elorduy *et al.*, 2002). Meelwormen en huisvliegen bezitten gelijkaardige of hogere eiwitgehaltes dan sojameel (Ocio en Vinaras, 1979; Ramos-Elorduy *et al.*, 2002; Veldkamp *et al.*, 2012). Meelwormen bevatten echter te weinig methionine en calcium om aan de behoeften van pluimvee te voldoen (Ramos-Elorduy *et al.*, 2002; Anderson, 2000). Pretorius (2011) bemerkte een hogere voedselinname, hogere dagelijkse gewichtstoename en hoger slachtgewicht bij vleeskippen die huisvlieglarven gesupplementeerd kregen dan bij vleeskippen die het commerciële rantsoen bestaande uit maïs en sojameel kregen. Hale (1973) concludeerde dat kuikens gevoed met een dieet van gedroogde zwarte soldaatvliegen een zelfde gewicht bereikten als kuikens gevoed met sojameel (Newton *et al.*, 2005). Tabellen 1 en 2 geven een overzicht van de eiwit-, vet-, calcium-, fosfor- en aminozuurgehalten van verschillende insecten in vergelijking met de gehalten in vismeel en sojameel.

Tabel 1: Eiwit-, vet-, calcium- en fosforgehaltes en de Ca:P ratio (% in droge stof) van insecten, vismeel en sojameel (Uit: Makkar *et al.*, 2014)

Constituents (% in DM)	Black soldier fly larvae	Housefly maggot meal	Meal-worm	Locust meal	House cricket	Mormon cricket	Silkworm pupae meal	Silkworm pupae meal (defatted)	Fishmeal	Soymeal
Crude protein	42.1 (56.9)	50.4 (62.1)	52.8 (82.6)	57.3 (62.6)	63.3 (76.5)	59.8 (69.0)	60.7 (81.7)	75.6	70.6	51.8
Lipid	26.0	18.9	36.1	8.5	17.3	13.3	25.7	4.7	9.9	2.0
Calcium	7.56	0.47	0.27	0.13	1.01	0.20	0.38	0.40	4.34	0.39
Phosphorus	0.90	1.60	0.78	0.11	0.79	1.04	0.60	0.87	2.79	0.69
Ca:P ratio	8.4	0.29	0.35	1.18	1.28	0.19	0.63	0.46	1.56	0.57

Values in parentheses are calculated values of the defatted meals.

Tabel 2: Aminozuursamenstelling (g / 16 g stikstof) van insecten, sojameel en vismeel (Uit: Makkar *et al.*, 2014)

Amino acids	Black soldier fly larvae	Housefly maggot meal	Meal-worm	Locust meal	House cricket	Mormon cricket	Silkworm pupae meal	Silkworm pupae meal (defatted)	Fishmeal	Soymeal
Essential										
Methionine	2.1	2.2	1.5	2.3	1.4	1.4	3.5	3.0	2.7	1.32
Cystine	0.1	0.7	0.8	1.1	0.8	0.1	1.0	0.8	0.8	1.38
Valine	8.2	4.0	6.0	4.0	5.1	6.0	5.5	4.9	4.9	4.50
Isoleucine	5.1	3.2	4.6	4.0	4.4	4.8	5.1	3.9	4.2	4.16
Leucine	7.9	5.4	8.6	5.8	9.8	8.0	7.5	5.8	7.2	7.58
Phenylalanine	5.2	4.6	4.0	3.4	3.0	2.5	5.2	4.4	3.9	5.16
Tyrosine	6.9	4.7	7.4	3.3	5.2	5.2	5.9	5.5	3.1	3.35
Histidine	3.0	2.4	3.4	3.0	2.3	3.0	2.6	2.6	2.4	3.06
Lysine	6.6	6.1	5.4	4.7	5.4	5.9	7.0	6.1	7.5	6.18
Threonine	3.7	3.5	4.0	3.5	3.6	4.2	5.1	4.8	4.1	3.78
Tryptophan	0.5	1.5	0.6	0.8	0.6	0.6	0.9	1.4	1.0	1.36
Non-essential										
Serine	3.1	3.6	7.0	5.0	4.6	4.9	5.0	4.5	3.9	5.18
Arginine	5.6	4.6	4.8	5.6	6.1	5.3	5.6	5.1	6.2	7.64
Glutamic acid	10.9	11.7	11.3	15.4	10.4	11.7	13.9	8.3	12.6	19.92
Aspartic acid	11.0	7.5	7.5	9.4	7.7	8.8	10.4	7.8	9.1	14.14
Proline	6.6	3.3	6.8	2.9	5.6	6.2	5.2	–	4.2	5.99
Glycine	5.7	4.2	4.9	4.8	5.2	5.9	4.8	3.7	6.4	4.52
Alanine	7.7	5.8	7.3	4.6	8.8	9.5	5.8	4.4	6.3	4.54

Notes:

^a Methionine plus cystine.

^b Phenylalanine plus tyrosine.

1.1.3. Effect op de productieparameters

Studies rond het effect van insectenconsumptie op groeiprestaties, eiproduktie, voedselinname en vruchtbaarheid zijn zeer uiteenlopend en vaak tegenstrijdig. Overschrijden van de optimale hoeveelheid insecten in het rantsoen heeft nadelige effecten op de produktie (Makkar *et al.*, 2014). Dankwa *et al.* (2002) stelden in een studie met scharrelkippen vast dat supplementatie van 30-50 gram huisvliegmaden per dag een positief effect had op het eigewicht, het aantal uitgekomen eieren, de grootte van de broedsels en de groei en het gewicht van de kuikens. DeFoliart *et al.* (1982) stelden vast dat jonge vleeskippen die maïs en krekels kregen beter groeiden dan vleeskippen die een dieet kregen van maïs en sojameel. Finke *et al.* (1985) vonden daarentegen geen significante verschillen tussen deze twee diëten in gewichtstoename en voederconversie bij vleeskippen. Agunbiade *et al.* (2007) vervingen vismeel door madenmeel van huisvliegen en bestudeerden het effect ervan op de eiproduktie en eischaaikwaliteit bij leghennen. Het controledieet bestond uit 50% sojameel, 25% maniokmeel en 25% vismeel. Vismeei kon voor 50% vervangen worden door madenmeel zonder nadelige effecten op de eiproduktie en de kwaliteit van de eischaa (Agunbiade *et al.*, 2007). Mahanta *et al.* (2004) rapporteerden een negatief effect op de vruchtbaarheid van fokhanen gevoederd met zijdewormdiëten. Wanneer vismeel voor minstens 50% vervangen werd door zijdewormmeel namen de spermamotiliteit, het percentage levende spermatozoa en het ejaculaatvolume af.

1.1.4. Nutriëntsamenstelling van insecten

1.1.4.1. Algemeen

De nutriëntsamenstelling van insecten varieert sterk tussen de verschillende species en wordt mede bepaald door de voeding van het insect en het stadium waarin het zich bevindt (Bukkens, 1997; Pieterse en Pretorius, 2014). Insecten bevatten grote hoeveelheden vocht, eiwit en vet en een kleine hoeveelheid vezels (Veldkamp *et al.*, 2012). Op basis van de sterke structurele gelijkenis met cellulose en het feit dat de ADF-fractie (Acid-Detergent Fibre; i.e. cellulose en lignine) van insecten stikstof bevat, wordt verondersteld dat vezels door chitine vertegenwoordigd worden (Finke, 2007). Sommige insectenspecies zijn rijk aan essentiële aminozuren zoals lysine, tryptofaan en threonine (Bukkens, 2005).

Er is veel variatie in eiwitgehalte tussen en binnen de verschillende insectspecies: Xiaoming *et al.* (2010) vonden voor 100 insectenspecies eiwitgehaltes die varieerden tussen 13 en 77% op droge stof basis. Er zijn verschillende factoren die deze variaties kunnen verklaren. Allereerst is het eiwitgehalte afhankelijk van het ontwikkelingsstadium van het insect. Jongere stadia bevatten meer eiwit dan oudere stadia (Oonincx en Dierenfeld, 2012). Een tweede verklaring voor de variatie is de overschatting van het eiwitgehalte wanneer men ook niet-eiwit stikstof, zoals chitine, in rekening brengt (Bernard *et al.*, 1997). Aniebo en Owen (2010) beweren dat het eiwitgehalte van een insect ook afhankelijk is van de voeding die het krijgt, de droogmethode en de methode van verwerking (ontvet of niet).

Insecten hebben over het algemeen lagere arginine- en cystinegehalten en hogere methionine- en tyrosinegehalten dan sojameel (Veldkamp *et al.*, 2012). Aangezien vogels urinezuur als eindproduct van het eiwitmetabolisme uitscheiden, kunnen ze slechts in beperkte mate arginine aanmaken en hebben ze bijgevolg hogere argininebehoeften dan zoogdieren (Finke, 2002). Het is dus aanbevolen arginine te supplementeren (Makkar *et al.*, 2014). Methionine en cystine zijn zwavelbevattende aminozuren. Via transsulfuratie kan methionine tot cystine worden omgezet, waardoor cystine een niet-essentieel aminozuur is zolang methionine voldoende aanwezig is. Methionine speelt een rol in de biosynthese van substanties betrokken bij de groei zoals creatinine, carnitine en choline. Methioninedeficiëntie leidt tot een afname van gewicht, voederefficiëntie en eiwitgehalte (Goulart *et al.*, 2011). Lysinegehalten zijn insectafhankelijk: lysine is voldoende aanwezig in zwarte soldaatvlieglarven, huisvliegmaden en zijdewormpoppen, maar beperkt in meelwormen, sprinkhanen en krekels (Makkar *et al.*, 2014). Lysine en methionine spelen een rol bij de ontwikkeling van de borstspier van vleeskippen (Hickling *et al.*, 1990). Zwarte soldaatvliegprepupae en meelwormlarven leveren aan vleeskippen meer essentiële aminozuren dan nodig (Veldkamp *et al.*, 2012).

Insecten zijn rijk aan de essentiële onverzadigde vetzuren linolzuur en α -linoleenzuur (Bukkens, 1997; Finke, 2002; Womeni *et al.*, 2009). Linolzuur is belangrijk voor de membraanintegriteit, weerstand tegen ziekten, spermatogenese en embryo-ontwikkeling. Alfa-linoleenzuur is betrokken bij de ontwikkeling van membranen in de retina en het zenuwstelsel (Subcommittee on Poultry Nutrition & National Research Council, 1994). De verhouding verzadigde versus onverzadigde vetzuren is afhankelijk van het insect. Zwarte soldaatvlieglarven bestaan voornamelijk uit verzadigde vetzuren, terwijl meelwormen, krekels en huisvliegmaden rijk zijn aan onverzadigde vetzuren (Makkar *et al.*, 2014). Het vetgehalte van insecten varieert van 4 - 55% op droge stof basis en is net zoals het eiwitgehalte afhankelijk van het ontwikkelingsstadium: larvale stadia zijn vetrijker (Bernard *et al.*, 1997; Barker *et al.*, 1998). Het vetgehalte verschilt ook per soort: rupsen, termieten en larven van palmkevers hebben een hoog vetgehalte; sprinkhanen en mieren daarentegen hebben een lager vetgehalte (Bukkens, 1997). In de oven gedroogde huisvliegmaden hebben lagere vetgehaltenes dan zongedroogde huisvliegmaden (Aniebo en Owen, 2010). Verder beïnvloedt ook de samenstelling van het voeder de vetzuursamenstelling van het insect (Hwangbo *et al.*, 2009).

Naast variatie in eiwit- en vetgehaltenes, bestaat er ook wat betreft vitamine- en mineralengehaltenes veel variatie tussen en binnen insectspecies (Bukkens, 2005; Oonincx en Dierenfeld, 2012). Binnen eenzelfde species zijn de concentraties van natrium, kalium, calcium, fosfor, zink, koper, mangaan en molybdeen hoger in jongere stadia dan in adulte of grote nymfestadia (Oonincx en Dierenfeld, 2012). Barker *et al.* (1998) stelden vast dat de concentraties koper, ijzer, magnesium en zink in insecten hoog genoeg zijn om de mineraalbehoeften van vogels en zoogdieren te dekken (Barker *et al.*, 1998). De gehaltenes van vitamine A, D3, E, B12, B1 en calcium zijn eerder laag (Barker *et al.*, 1998; Finke, 2000). Calcium is een belangrijk mineraal voor pluimvee. De calcium:fosfor verhouding bedraagt idealiter 2:1 is en bij legkippen zelfs 12:1 (Subcommittee on Poultry Nutrition & National Research Council, 1994). Het optimaal calciumgehalte in een kippenrantsoen bedraagt 1% van de droge stof. Te lage calciumgehaltenes of een gestoorde calcium:fosfor balans leidt tot een abnormale groei en abnormale

botontwikkeling (Anderson, 2000). Het calciumgehalte in insecten kan verhoogd worden door insecten te kweken op een calciumrijk substraat (Allen en Oftedal, 1989). Ook fosfor is een belangrijk mineraal voor pluimvee. Fosfor speelt een rol bij de beenvorming, energievoorziening en celwandvorming (Subcommittee on Poultry & National Research Council, 1994). Sommige insecten zoals huisvliegmaden en krekels zijn rijk aan fosfor (Makkar *et al.*, 2014).

Finke (2007) suggereerde dat insecten een bron van vezels zijn door de aanwezigheid van chitine. In tegenstelling tot plantvezels zijn vezelcomponenten van insecten echter nog weinig bestudeerd en is informatie over chitinegehalten in insecten schaars (Finke, 2007). Vezels kunnen worden opgedeeld in plantaardige en dierlijke vezels. Plantaardige voedingsvezels worden voornamelijk teruggevonden in de celwand van planten en worden volgens de American Association of Cereal Chemists (AACC) gedefinieerd als: "Voedingsvezels zijn het overblijfsel van het eetbare deel van planten en analoge koolhydraten die weerstaan aan vertering en absorptie in de dunne darm met gedeeltelijke tot volledige fermentatie in de dikke darm tot gevolg. Ze hebben voordelige fysiologische eigenschappen zoals laxatie en normalisering van de cholesterol- en glucosespiegels". Tot de voedingsvezels worden niet-zetmeel polysacchariden (bv. (hemi)cellulose, pectine, gommen), oligosacchariden, lignine en geassocieerde plantensubstanties (bv. wassen, cutine, suberine) gerekend (Jones, 2000). Hoewel reeds voorstellen gedaan werden om ook onverteerbare fracties van dierlijk afgeleide producten tot voedingsvezel te rekenen (Trowel *et al.*, 1978), worden tot op de dag van vandaag enkel plantaardige vezels in de definitie van voedingsvezel opgenomen (De Vries, 2003). Dit heeft in belangrijke mate bijgedragen tot de schaarste in onderzoek naar dierlijke vezels (De Vries, 2003).

Volgens verschillende onderzoekers (Barker *et al.*, 1998; Finke, 2002) duiden twee zaken erop dat chitine de vezelfractie van insecten vormt. Enerzijds vertoont chitine sterke structurele gelijkenissen met cellulose en anderzijds wordt in de ADF-fractie van insecten stikstof aangetroffen (Finke, 2007). Razdan en Pettersson (1994) menen dat chitosan, de gedeacetylerde vorm van chitine, beschouwd kan worden als 'alternatieve' voedingsvezel omdat het, net zoals wateroplosbare vezels, cholesterolverlagende eigenschappen heeft. Chitosan beschikt over een hoge anion-uitwisselingscapaciteit waardoor het kan binden met galzuren. Dit heeft een blokkering van de enterohepatische galzuurcirculatie, afgenomen vetabsorptie en verhoogde fecale cholesteroluitscheiding tot gevolg (Razdan en Pettersson, 1994). Razdan en Pettersson (1994) suggereren dat het oplosbare en viskeuze karakter van chitosan het duodenum kan doen dilateren en een verzadigend effect creëert waardoor kippen minder voedsel opnemen en een lager lichaamsgewicht hebben. De verhoogde viscositeit in de dunne darm wordt mee in de hand gewerkt door het hoge waterbindende vermogen van chitosan. Bij een chitinebevattend dieet werden deze effecten niet waargenomen omdat chitine in tegenstelling tot chitosan altijd onoplosbaar is en geen viskeuze eigenschappen heeft (Razdan en Pettersson, 1994). Wanneer kippen met chitine gesupplementeerd worden, vermindert het droge stofgehalte van de digesta in het duodenum en verlaagt de verteerbaarheid van nutriënten. Razdan en Pettersson (1994) vermoedden dat chitine net zoals cellulose een snellere maaglediging induceert en de fecale bulkmassa doet toenemen (Razdan

en Pettersson, 1994). Volgens Belluco *et al.* (2013) zou chitine bijdragen tot de energiewaarde van een insect en een alternatief zijn voor plantaardige vezels.

Net zoals het eiwit- en vetgehalte, is het chitinegehalte afhankelijk van de insectspecies, de leeftijd van het insect en de methode die gebruikt wordt om het chitinegehalte te bepalen (Finke, 2002; Veldkamp *et al.*, 2012). Finke (2002) concludeerde dat de nymfestadia van krekels minder vezels bevatten dan de adulte krekels. Frye en Calvert (1989) suggereerden dat insecten met een zacht exoskelet minder chitine bevatten en beter verteerbaar zijn dan deze met een hard exoskelet. Nation (2002) en Finke (2007) beweerden dan weer dat de hardheid van de cuticula niet door het chitinegehalte bepaald wordt, maar door de hoeveelheid aminozuren aanwezig in de cuticula. Finke (2007) stelde vast dat gele meelwormen en huiskrekels sterk verschilden in chitinegehalte (respectievelijk gemiddeld 137,2 mg / kg en 67,6 mg / kg chitine). Cauchie (2002) vond chitinegehaltenes van 2,9 tot 10,1% (op droog gewicht basis) in aquatische insectlarven. Ozimek *et al.* (1985) vonden een chitinegehalte van 11,1% bij honingbijen. Dit is echter vermoedelijk een overschatting aangezien niet gecorrigeerd werd voor aminozuren.

Over de droge stofgehaltenes in insecten is nog maar weinig gekend. Een vergelijkende studie van Barker *et al.* (1998) tussen meelwormen, krekels, wasmotten, fruitvliegjes en aardewormen bracht aan het licht dat deze insecten een watergehalte van meer dan 50% van hun lichaamsgewicht bezitten. De meeste insecten hebben een droge stofgehalte rond de 40%. Ook de kennis over nutriëntverteerbaarheid van insecten in het dieet van pluimvee is nog beperkt (Veldkamp *et al.*, 2012). De eiwitverteerbaarheid van huisvlieglarven was 69% bij vleeskuikens van drie weken oud en 98,5% bij vleeskuikens van vier weken oud (Hwangbo *et al.*, 2009; Pretorius, 2011). Zowel Hwangbo *et al.* (2009) als Pretorius *et al.* (2011) vonden een verteerbaarheid van aminozuren van 90%. Dit komt overeen met de verteerbaarheid van aminozuren in maïs en sojameel (Subcommittee on Poultry Nutrition & National Research Council, 1994).

1.1.4.2. Specifieke nutriëntsamenstelling van de mopaneworm

De mopaneworm (Figuur 1) is het rupsstadium van de mot *Gonimbrasia belina* (Madibela *et al.*, 2007). De mopanerupsen voeden zich met bladeren van mopanebomen (*Colophospermum mopane*) en hebben twee generaties per jaar, namelijk tussen november en januari en tussen maart en mei (Stack *et al.*, 2003; Ghazoul, 2006).



Figuur 1: Gedroogde mopanewormen (*Gonimbrasia belina*)

Mopanewormen worden frequent geconsumeerd in het noorden van Zuid-Afrika, Botswana, Namibië, Zimbabwe en Mozambique (van Huis *et al.*, 2013). Vooral in gebieden met mineraalarme bodems en in periodes van droogte zijn ze erg gewenst als voedingssupplement omdat ze rijk zijn aan calcium, fosfor, ruw eiwit, ruw vet en essentiële aminozuren (Madibela *et al.*, 2007). Ook in de veevoedersector worden mopanewormen vaak gebruikt. Vooral in landen die afhankelijk zijn van dure importproducten zoals vismeel of waar men te kampen heeft met droogte. Mopanewormen zijn rijk aan stikstof en zijn bijgevolg een goede energiebron voor de microflora van de pens (Madibela *et al.*, 2009). Verwerking van mopanewormen in veevoeder bevordert indirect ook de gezondheid van de mens. De aanwezige geconjugeerde linolzuren, die na consumptie van het vee in het menselijk lichaam terechtkomen, hebben namelijk een anticarcinogene werking (Madibela *et al.*, 2007).

Moreki *et al.* (2012) vergeleken de voedingswaarde van de mopaneworm met deze van andere dierlijke eiwitbronnen en concludeerden dat mopanewormen een waardevolle eiwitbron zijn (Tabel 3). Deze opvatting werd gedeeld door Sekhwela (1989), die vaststelde dat de mopaneworm dubbel zoveel eiwit bevat als gekookt rundvlees of rauw kippenvlees (Motshegwe *et al.*, 1998).

Tabel 3: Vergelijking van de voedingswaarde van de mopaneworm met andere dierlijke eiwitbronnen (Uit: Moreki *et al.*, 2012)

Protein source	Crude protein, %	Fat, %	Carbohydrate, %	Calcium, %
Beef	22	8	0	0.016
Chicken	20.5	6.5	0	0.010
Mopane worms	56.8	16.4	13.8	0.458
Fishmeal	65.5	4.1	0	4.07

Mopanewormen bestaan op droge stof basis voor 48 - 61% uit eiwit, voor 16 - 20% uit vet (waarvan 40% essentiële vetzuren), voor 7,6% uit as en voor 11,4% uit ruwe vezels (Bukkens, 1997; van Huis *et al.*, 2013). Daarnaast zijn ze ook rijk aan chitine (Madibela *et al.*, 2007). Ze zijn een bron van mineralen en voorzien in zink, ijzer en calcium (Glew *et al.*, 1999). Bij vleeskippen nemen de gehalten kalium, natrium en fosfor toe naarmate mopanewormen een groter deel van het dieet uitmaken (Moreki *et al.*, 2012). Volgens Pharithi *et al.* (2004) maken onverzadigde vetzuren, en in het bijzonder

α -linoleenzuur, de grootste fractie uit van het vetgehalte in de mopaneworm. Ohiokepehai *et al.* (1996) stelden vast dat het aminozuurpatroon van mopanewormen vergelijkbaar is met dat van sojabonen en vismeel en dat de gehalten tryptofaan, threonine, phenylalanine en valine zelfs hoger zijn in mopanewormen. Ook lysine en methionine, essentieel voor pluimvee, waren rijkelijk aanwezig (Moreki *et al.*, 2012).

1.1.5. Uitdagingen voor de toekomst

Momenteel is het kweken van insecten nog beperkt en duur, maar als men wil voldoen aan de toenemende vraag naar insecten als alternatieve eiwitbron voor dierlijke voeders, dan moeten massaproductiesystemen ontwikkeld worden met lage werk- en huisvestingskosten die kwaliteit en veiligheid garanderen (Meuwissen, 2011; Makkar *et al.*, 2014). Het Wageningen UR Livestock Research and Central Veterinary Institute voerde in opdracht van het Ministerie van Economische Zaken, Landbouw en Innovatie een haalbaarheidsstudie uit naar het inzetten van insecten op grote schaal in varkens- en pluimveevoeders. Uit de studie is gebleken dat het technisch haalbaar is om insecten als duurzame, eiwitrijke grondstof in varkens- en pluimveevoeders te verwerken, maar dat er nog enkele complicaties zijn. Het is nog niet duidelijk binnen welke termijn schaalvergroting gerealiseerd kan worden en er is geen wet- en regelgeving omtrent het gebruik van insecten als grondstof in diervoeding. Ook het aantal insectenbedrijven moet sterk toenemen. Productie van mengvoeder voor vleeskuikens bestaande uit 5% insecten vereist 200 insectenbedrijven die in totaal 72 000 ton insecten per jaar produceren (Veldkamp *et al.*, 2012).

1.2. CHITINE

1.2.1. Natuurlijk voorkomen en structuur

Chitine (β -(1–4)-poly-N-acetyl-D-glucosamine) is een polysaccharide dat in de natuur voorkomt als α -chitine of β -chitine (Aam *et al.*, 2010). α -Chitine is het talrijkst aanwezig en wordt teruggevonden in de cuticula van arthropoden, de schelp van schaaldieren, microfilaria van nematoden en de celwand van gisten en schimmels (Guan *et al.*, 2009; Aam *et al.*, 2010; Muzzarelli *et al.*, 2014). β -Chitine komt voor in inktvispennen en diatomeeën (Wan en Tai, 2013). Diatomeeën of kiezelwieren zijn 10-200 μm grote unicellulaire algen met een verkiezelde wand, de zogenaamde frustule (Gillard, 2009). Chitine bestaat uit herhaalde eenheden van een zuurstofbevattende hexosering met op de tweede koolstof een acetamidogroep verbonden door β -glycosidebindingen (Bartnicki-Garcia, 1968). Op microscopisch niveau bestaat α -chitine uit microvezels die opgebouwd zijn uit nanofibrillen (2-5 nm breed en 300 nm lang) ingebed in een proteïnematrix (Azuma *et al.*, 2012). Zowel α -chitine als β -chitine hebben een kristallijne structuur waarbij de ketens in bladen ('sheets') zijn geschikt (Figuur 2). Sterke C-O-NH waterstofbindingen verbinden de sheets onderling en zorgen ervoor dat de ketens op 0,47 nm afstand van de a-as liggen. In tegenstelling tot β -chitine, bevat α -chitine nog bijkomende intra-sheet waterstofbindingen, die gelegen zijn langs de b-as (Muzzarelli *et al.*, 2014). α -Chitine is dus opgebouwd uit inter- en intramoleculaire waterstofbindingen en N-acetylglucosaminegroepen die antiparallel gelegen zijn langs een rigide en lineaire polymere ruggengraat. In tegenstelling tot α -

chitine bestaat β -chitine slechts uit één keten en zijn de N-acetylglucosamineketens parallel gerangschikt (Adrangi *et al.*, 2010; Ogawa *et al.*, 2011). De zwakke waterstofbindingen hebben tot gevolg dat β -chitine meer reactief is en dat er gemakkelijk waterstofatomen kunnen ingebouwd worden, zodat kristallijne complexen (crystallosolvaten) worden gevormd (Wan en Tai, 2013). De afwezigheid van waterstofbindingen tussen de ketens in het vlak van de pyranosering maakt dat β -chitine uitzet in water en beter oplosbaar is in water, mierenzuur en andere organische solventen dan α -chitine (Cho *et al.*, 2000).

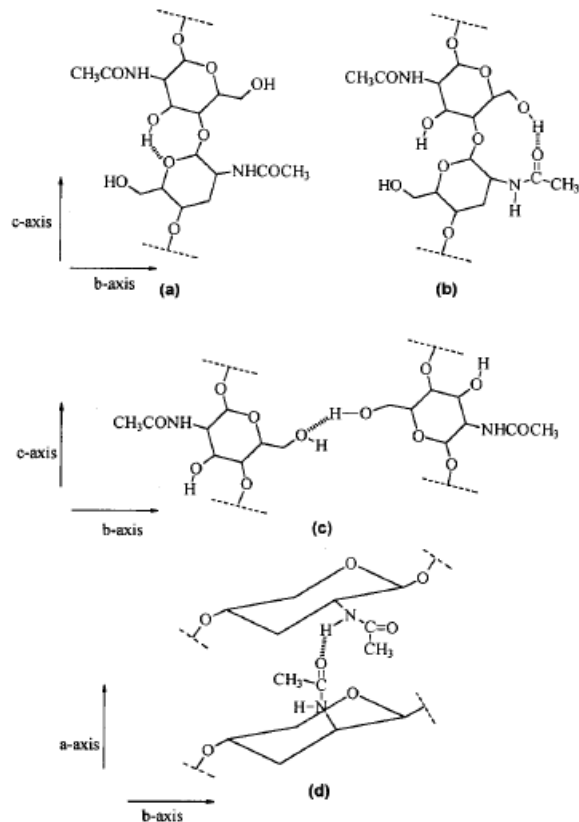


Figure 4. Modes of hydrogen bonding in α -chitin: (a) intrachain C(3')-OH...OC(5) bond; (b) intrachain C(6')-OH...O=C(7) bond; (c) interchain C(6')-O...HOC(6₂) bond; (d) interchain C(2₁)NH...O=C(7₃) bond

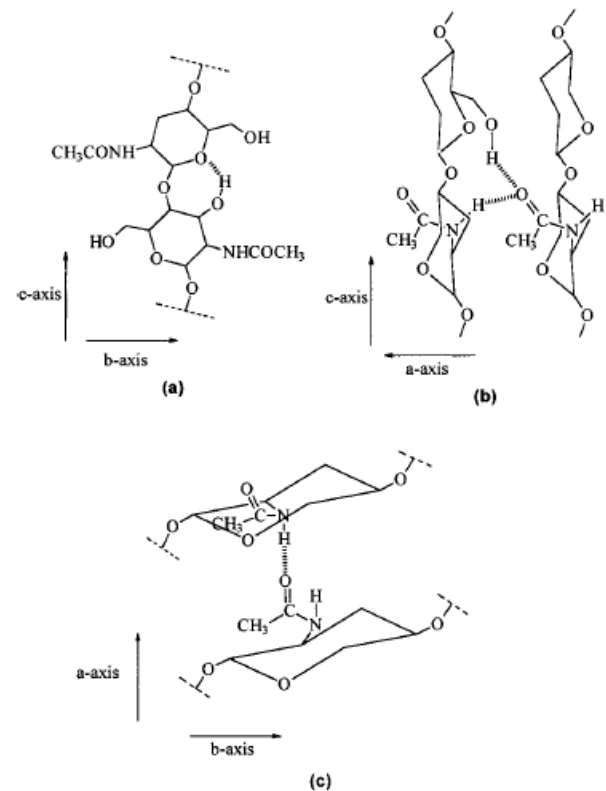


Figure 5. Modes of hydrogen bonding in β -chitin: (a) intrachain C(3')-OH...OC(5) bond; (b) interchain C(2₁)NH...O=C(7₃) bond and C(6'₁)-OH...O=C(7₃) bond (ac plane projection); (c) interchain C(2₁)NH...O=C(7₃) bond (ab plane projection).

Figuur 2: Structuur van α -chitine (links) en β -chitine (rechts) (Uit: Cho *et al.*, 2000)

Via N-deacetylatie van chitine bekomt men het derivaat chitosan dat minder verspreid voorkomt dan chitine en aanwezig is in de celwand van fungi (Cho *et al.*, 2000). Chitosanen worden ingedeeld op basis van acetylatiegraad en polymerisatieparameters. Dankzij de goede oplosbaarheid in verdunde zuuroplossingen, biocompatibiliteit, non-toxiciteit en biodegradeerbaarheid kent chitosan tal van toepassingen in de agricultuur en geneeskunde (Aam *et al.*, 2010).

De aanwezigheid van glucosamine-eenheden in chitosan zorgt ervoor dat chitosan met een deacetylatiegraad van 50% oplosbaar is als polykation in verdunde zuren. Ook chitine wordt wateroplosbaar wanneer de deacetylatiegraad 50% benadert. De graad van deacetylatie heeft een invloed op de antimicrobiële activiteit, oplosbaarheid en wondhelende eigenschappen van chitine (Cho

et al., 2000). Deacetylatisie van chitine verhoogt de mechanische sterkte en verlaagt de inflammatoire weefselrespons (Tomihata en Ikada, 1997).

1.2.2. Biomedische toepassingen

Chitine- en chitosan-nanovezels hebben recent hun intrede gemaakt in de biomedische wereld met onder andere toepassingen op gebied van wondheling, anti-kankerbehandeling, anti-inflammatoire therapie, geneesmiddelfgifte en stamceltechnologie (Muzzarelli *et al.*, 2014). In biomedisch onderzoek maakt men voornamelijk gebruik van chitinederivaten zoals chitosan, chito-oligomeren en glucosamine met N-acetylglucosamine. Chitine kan ook in zijn zuivere vorm gebruikt worden, maar men dient hierbij wel rekening te houden met het feit dat industrieel geproduceerd chitine sterk verschilt van *in vivo* chitine dat gebonden is aan (an)organische componenten. Isolatie van chitine gaat gepaard met verlies van eiwitten, vetten en andere componenten, waardoor gezuiverd chitine niet meer als schaaldierderivaat beschouwd kan worden (Muzzarelli, 2010).

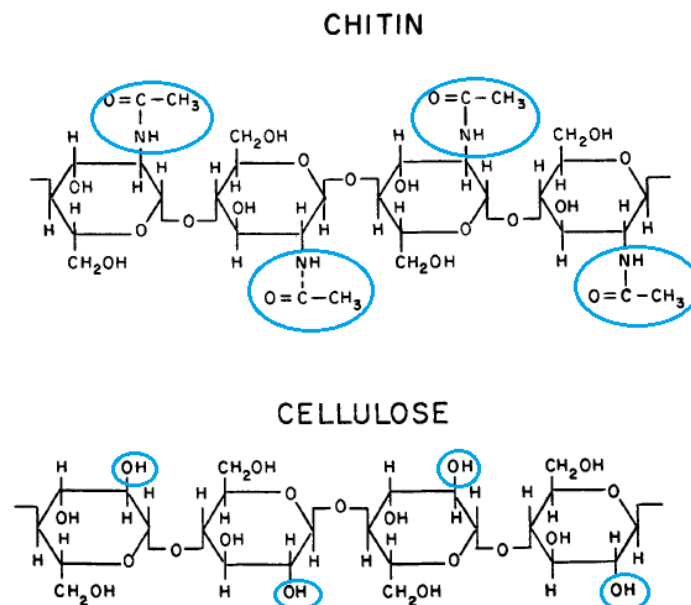
Uit experimenten met apen, honden, katten en kalveren bleek dat een snellere wondsluiting verkregen wordt door behandeling van huidwonden met chitinesponzen, chitinevlokken of chitinepartikels verwerkt in niet-geweven polyester. Er werd een verhoogde expressie van bepaalde groeifactoren en cytokines waargenomen evenals een stimulatie van de angiogenese, celproliferatie en reëpithelialisatie (Muzzarelli, 1993). Ook Lindner *et al.* (2011) concludeerden dat chitine wondhelende en wondinfectieonderdrukkende eigenschappen heeft. Deze onderzoekers gingen de antimicrobiële activiteit van chitine-nanovezels na door *S.aureus* geïnfecteerde wonden bij wildtype muizen te behandelen met korte poly-N-acetyl-glucosamine-nanovezels. Na vijf dagen werd een verhoogde expressie van defensines en een vermindering van het aantal *S.aureus* kiemen waargenomen (Lindner *et al.*, 2011). Uit een studie van Fischer *et al.* (2011) bleek dat N-chitine-nanovezels bloedplaatjes activeren en bijgevolg de bloedstolling versnellen. Volgens Muise-Helmericks *et al.* (2011) zou chitine ook een stimulerend effect hebben op nieuwbeenvorming in de femur van konijnen. Het positief effect op de wondheling en het beperken van bloedingen hebben er toe geleid dat chitine frequent gebruikt wordt in de chirurgie (Muzzarelli *et al.*, 2014). Het sluiten van complexe wonden door gebruik te maken van membranen opgebouwd uit chitine-nanovezels in combinatie met vacuümapparaten leverde reeds bevredigende resultaten op bij muizen (Erba *et al.*, 2011). Ook in hechtmateriaal en medisch textiel wordt chitine verwerkt omwille van de hoge stevigheid en integriteit (Wan en Tai, 2013).

Suzuki *et al.* (1986) onderzochten het effect van chitine en chitosan op tumoren bij muizen en stelden een regressie van de tumoren vast na behandeling met hexa-N-acetylchitohexaose (hexameer van N-acetylglucosamine) en chitohexaose (hexameer van glucosamine). Chitine kan namelijk optreden als immunologisch adjuvant door binding aan de oppervlaktereceptoren van macrofagen. Dit leidt tot vrijstelling van cytokines die zowel een anti-tumoractiviteit uitoefenen als instaan voor de aspecifieke gastheerabweermechanismen. Toediening van chitine-micropartikels in de long van muizen resulteerde in een verminderde allergische respons op *Dermatophagoides pteronyssinus* en *Aspergillus fumigatus* (Muzzarelli, 2010).

Azuma *et al.* (2012) suggereerden dat chitine-nanovezels gebruikt kunnen worden als therapie voor inflammatoire darmziekten (IBD; inflammatory bowel disease) daar ze de myeloperoxidaseactiviteit in het colon onderdrukken en de interleukine-6-serumconcentraties doen afnemen. Uit de studie bleek dat chitine-nanovezels bereid uit schaaldieren niet alleen de klinische symptomen van acute ulceratieve colitis bij muizen verzachten, maar ook het optreden van symptomen verhinderen en beschadiging en inflammatie van de darmmucosa beperken (Azuma *et al.*, 2012).

1.2.3. Analysemethoden

Chitine vertoont structurele gelijkenissen met cellulose (Figuur 3) en vaak wordt het chitinegehalte dan ook bepaald met methoden die oorspronkelijk bedacht werden voor plantaardige vezels (of er op gebaseerd zijn) (Stelmock *et al.*, 1985; Razdan en Pettersson, 1994; Barker *et al.*, 1998; Finke, 2007; Hossain en Blair, 2007). Het gebruik van analysemethoden voor vezels om chitine te bepalen kan echter tot grote variaties leiden en bemoeilijkt de vergelijking van data tussen studies onderling (Finke, 2007). Barker *et al.* (1998) gebruikten 'Neutral Detergent Fibre' (NDF; i.e. hemicellulose, cellulose, lignine) als maat voor chitine. Bernard *et al.* (1997) schatten het chitinegehalte als ADF gecorrigeerd voor as. De ADF-methode bleek zeer efficiënt voor het bepalen van chitinegehaltenes in schaaldiermeel (Watkins *et al.*, 1982; Stelmock *et al.*, 1985). Lubitz *et al.* (1943), Black en Schwartz (1950), Jeuniaux en Cornelius (1978), Jackson *et al.* (1992) en Weiser *et al.* (1997) bepaalden chitine dan weer met een methode gebaseerd op de klassieke ruwe vezel (crude fibre, CF) methode. Jackson *et al.* (1992) vergeleken chitinegehaltenes in krekels berekend volgens de ruwe vezel methode en gemeten via een spectrofotometrische analyse met specifieke chitinasen en concludeerden dat beide methoden vergelijkbare resultaten gaven.



Figuur 3: Vergelijking van de moleculaire structuur van chitine en cellulose. Chitine bezit een N-acetylgroep (NCOCH_3) aangehecht op C_2 in plaats van een OH-groep zoals cellulose (naar: Stelmock *et al.*, 1985)

Hoewel verschillende onderzoekers (Lovell *et al.*, 1968; Watkins *et al.*, 1982; Stelmock *et al.*, 1985) van mening zijn dat methoden voor plantaardige vezels ook geschikt zijn voor chitinebepaling en chitineverteerbaarheid vaak gerapporteerd word als ADF- en CF-verteerbaarheid (Jackson *et al.*, 1992; Weiser *et al.*, 1997; Akaki en Duke, 1999), is het niet onwaarschijnlijk dat deze methoden resulteren in rapportering van onjuiste chitinewaarden voor insecten. De bruikbaarheid van de klassieke vezelmethode werd immers reeds in twijfel getrokken voor bepaling van dierlijke vezels omdat ze zouden leiden tot onderschatting van de werkelijke vezelgehaltes in dierlijk afgeleide producten (Cools *et al.*, 2014). Finke (2007) meende dat het succes van de klassieke vezelmethode (ADF, CF) voor bepaling van chitine in schaaldieren geen garanties verschaft voor chitinebepaling in insecten, gezien de structurele verschillen tussen het exoskelet van insecten en schaaldieren. De cuticula van insecten is namelijk veel complexer daar deze niet enkel opgebouwd is uit chitine, eiwitten en mineralen, maar ook vetten en andere componenten bevat (Finke, 2007). Gezien de klassieke methoden nog frequent gebruikt worden, zullen ze hieronder kort toegelicht worden. Daarnaast zullen ook andere methoden voor chitinebepaling in schaaldieren en insecten besproken worden.

Twee methoden die nog routinematig gebruikt worden voor bepaling van de vezelfractie in plantaardige producten zijn de Acid-Detergent Fibre (ADF) bepaling van Van Soest (1973) en de Total Dietary Fibre (TDF) bepaling van Prosky *et al.* (1985). De ADF-bepaling van Van Soest heeft tot doel de vezelfractie die onoplosbaar is in zuur te bepalen en is bijgevolg zeer geschikt om cellulose en lignine te kwantificeren (Cools *et al.*, 2014). Watkins *et al.* (1982) bepaalden het chitinegehalte in de koningskrab en garnalen via demineralisatie met mierenzuur en eiwitextractie met NaOH en concludeerden dat chitine- en ADF-waarden nauw geassocieerd waren. Kleine verschillen in waarden zouden louter te wijten zijn aan aanwezigheid van silica en het mogelijks oplossen van een deel van chitine tijdens het demineralisatieproces (Watkins *et al.*, 1982). Finke (2007) voerde op verschillende insecten een ADF-bepaling uit, alsook een stikstof- en aminozuuranalyse op de ADF-fractie. De ADF-fractie bleek niet alleen uit chitine te bestaan, maar ook een aanzienlijke hoeveelheid aminozuren (9,3 - 32,7%) te bevatten die specifieke eiwitten in de cuticula vertegenwoordigen. Dit impliceert dat het gebruik van ADF als maat voor chitine tot een overschatting van het chitinegehalte leidt. Een betere schatting van het chitinegehalte zou verkregen worden door de ADF-fractie te corrigeren voor aminozuren aanwezig in de ADF-fractie (Finke, 2007).

De TDF-analyse is de meest frequent gebruikte enzymatisch-gravimetrische methode voor het bepalen van niet-verteerbare koolhydraten en lignine in diervoeders en bestaat uit het nabootsen van een *in vitro* zetmeelverteringsproces. Voederstalen worden gedroogd, ontvet en vervolgens blootgesteld aan verteringsenzymen (α -amylase, protease en amyloglucosidase) om verteerbare van onverteerbare voedselfracties te scheiden. Hierna wordt oplosbare vezel geprecipiteerd met ethanol en wordt het gefilterd residu gewassen met alcohol en aceton. Tot slot wordt op het gedroogde residu een Kjeldahl-analyse en asbepaling uitgevoerd om te corrigeren voor onverteerbare eiwitten aanwezig in het residu. De TDF-fractie kan vervolgens berekend worden als het gewicht van het residu verminderd met het gewicht van eiwit en as (Prosky *et al.*, 1985). Het corrigeren voor stikstof blijkt

echter enkel juist voor plantaardige vezels gezien deze geen stikstof bevatten. Dierlijke vezels zoals keratine, kraakbeencomponenten en chitine daarentegen bezitten een aanzienlijke hoeveelheid stikstof en het toepassen van een correctie voor stikstof brengt hierbij niet enkel stikstof van enzymes, maar ook stikstof van vezels in vermindering. Dit heeft tot gevolg dat lagere vezelgehaltes gedetecteerd worden dan in werkelijkheid het geval is (Cools *et al.*, 2014). Cools *et al.* (2014) brachten enkele wijzigingen aan in de klassieke TDF-methode zodat deze meer geschikt werd voor bepaling van het vezelgehalte in dierlijk afgeleide producten en nauwkeurigere TDF-waarden gerapporteerd werden. Met de nieuwe analysemethode werden bijvoorbeeld hogere vezelgehaltes voor collageen, kippenkraakbeen, konijnenhuid en konijnenhaar gedetecteerd dan met de klassieke TDF-bepaling die gebruikt werd in de studie van Depauw (2013). In tegenstelling tot de klassieke TDF-bepaling werd in de nieuwe methode geopteerd voor het nabootsen van het verteringsproces in carnivoren via een twee uur durende incubatie met pepsine en een vier uur durende incubatie met pancreatine in plaats van met zetmeelafbrekende enzymes. Een tweede belangrijk verschilpunt is dat na ethanolprecipitatie en drogen van het residu geen Kjeldahl-analyse volgt, maar enkel verassing van het residu. Bij de vernieuwde analyse werd tevens een blanco meegenomen wat toelaat te corrigeren voor de toegevoegde stikstof via de enzymes. Het percentage dierlijke vezels werd berekend als (gewicht residu na vertering – gewicht residu na verassing – gewicht blanco) / gewicht initiële staal (Cools *et al.*, 2014).

Naast het gebruik van de klassieke methoden voor vezelbepaling kan chitine ook bepaald worden op basis van zijn afbraakproducten. In de studie van Manzi *et al.* (2004) werd N-glucosamine gehanteerd als maat voor chitine. Bepaling van N-glucosamine gebeurde volgens de methode van Ride en Drysdale (1972) waarbij eerst een zure hydrolyse met HCl plaatsvond, gevolgd door een colorimetrische reactie (Manzi *et al.*, 2004).

Verschillende onderzoekers (Lubitz *et al.*, 1943; Black en Schwartz, 1950; Lovell *et al.*, 1968) bedachten methoden om chitine in schaaldieren te bepalen, maar geen enkele werd universeel aanvaard. Lovell *et al.* (1968) vergeleken drie methoden voor chitinebepaling en concludeerden dat methoden gebaseerd op enzymatische afbraak van stikstof in chitine minder efficiënt zijn dan methoden bestaande uit decalcificatie met zuur en hydrolyse met alkali van niet-chitine organische stof (Lovell *et al.*, 1968). De methode van Black en Schwartz (1950) vertoont sterke gelijkenissen met de ruwe vezel methode gebruikt voor plantaardige producten. De methode laat toe chitine te isoleren uit schaaldieren door middel van een behandeling met HCl om mineralen op te lossen, gevolgd door een aantal behandelingen met natriumbicarbonaat/kaliumhydroxide om niet-chitine materiaal te verwijderen. Het residu dat bestaat uit chitine en silica kan vervolgens geëxtraheerd worden met ether of alcohol (Black en Schwartz, 1950). Ook Lubitz *et al.* (1943) hanteerden ruwe vezel als maat voor chitine. Verschillende methoden werden uitgetest om een onderscheid te kunnen maken tussen beschikbaar stikstof in eiwit en onbeschikbaar stikstof in chitine, waaronder een *in vivo* studie met ratten, een *in vitro* studie waarbij stikstof bepaald werd in het ruwe vezel residu, berekeningen gebaseerd op ruwe vezel bepaling en een enzymatische methode. In tegenstelling tot de traditionele methoden (Lubitz *et al.*, 1943; Black en Schwartz, 1950; Lovell *et al.*, 1968) die gericht zijn op

bepaling van chitine in verse weefsels en schaalpartikels, bedachten Stelmock *et al.* (1985) een methode voor bepaling van chitine in schaaldiermeel. De methode is gebaseerd op de ADF-methode van Van Soest (1973) waarbij op het ADF-residu ook stikstof en as bepaald werd om stikstof in chitine in vermindering te kunnen brengen. Wanneer chitine aanwezig was in het ADF-residu van het schaaldiermeel, werd iets minder dan 7% zuur detergent onoplosbaar stikstof (ADIN; Acid-Detergent Insoluble Nitrogen) gedetecteerd. Wanneer chitosan, de gedeacetyleerde vorm van chitine, aanwezig was in het ADF-residu bedroeg ADIN meer dan 7%. Wanneer geen chitine aanwezig was in het ADF-residu, maar enkel vezel (zoals voor cellulose) werd een ADIN-waarde van nul gemeten (Stelmock *et al.*, 1985). De methode bleek minder tijdrovend te zijn dan de methode van Welinder (Welinder, 1974) die ook gebruikt wordt voor bepaling van chitine in schaaldiermeel. De methode van Welinder bestaat uit het gravimetrisch bepalen van chitine na decalcificatie met ethyleendiaminetetra-azijnzuur en proteolyse met natriumhydroxide (Welinder, 1974).

In tegenstelling tot schaaldieren, zijn data over chitinegehaltes en methoden voor de bepaling van chitine in insecten schaars. De meeste studies die het chitinegehalte in insecten onderzoeken, gebruiken methoden die succesvol bleken voor chitinebepaling in schaaldieren (Finke, 2007). Liu *et al.* (2012) werkten een methode uit voor chitinebepaling in insecten waarbij chitine geëxtraheerd werd door middel van een behandeling met zuur en alkali. De zuurbehandeling had tot doel catecholen te verwijderen en met de basebehandeling werden cuticulaeiwitten verwijderd. Een belangrijk verschilpunt met extractie van chitine uit schaaldieren is dat voor insecten een mildere zuurbehandeling gebruikt kan worden. Gehaltes van anorganische stof in de cuticula zijn immers lager bij insecten dan in schaaldieren (10% bij insecten versus 20 - 40% bij schaaldieren). Een 30 minuten durende demineralisatie met 1 M HCl bleek reeds voldoende om het asgehalte in chitine aanzienlijk te verlagen.

1.2.4. Invloed van chitine op ruw eiwitbepaling

Het ruw eiwitgehalte wordt gewoonlijk berekend op basis van het stikstofgehalte dat bepaald wordt met de Kjeldahl-analyse. De Kjeldahl-analyse meet echter het totaal percentage stikstof en niet enkel stikstof aanwezig in eiwit, waardoor conversiefactoren in rekening moeten worden gebracht. De meest gebruikte conversiefactor om vanuit het stikstofgehalte het ruw eiwitgehalte te berekenen is 6,25. Deze conversiefactor veronderstelt dat eiwit voor 16% uit stikstof bestaat en wordt berekend als $100/16$ (McDonald *et al.*, 2011). Verschillende onderzoekers (Tassoni, 1957; Bernard *et al.*, 1997; Barker *et al.*, 1998; Bauer-Petrovska, 2001; Kalač, 2009) zijn echter van mening dat het gebruik van deze algemene conversiefactor voor insecten geen goede zaak is. Voor substraten met een hoog gehalte niet-eiwit stikstof geïncorporeerd in chitinepolymeren (zoals paddenstoelen en insecten) blijkt deze berekeningsmethode namelijk een overschatting van het eiwitgehalte en onderschatting van het koolhydraatgehalte te geven (Bauer-Petrovska, 2001; Kalač, 2009). Het gebruik van conversiefactor 6,25 gaat uit van twee foutieve veronderstellingen, namelijk dat al het stikstof eiwit-stikstof is en dat 6,25 een correcte conversiefactor is (Tassoni, 1957). Om een juistere schatting van het eiwitgehalte te bekomen, kunnen bijgevolg beter substraatspecifieke conversiefactoren gebruikt worden (Tassoni, 1957; Bernard *et al.*, 1997; Barker *et al.*, 1998; Bauer-Petrovska, 2001; Kalač, 2009). Idealiter worden

voor insecten zelfs conversiefactoren gebruikt die rekening houden met het stadium en de voedingstoestand van het insect. Tijdens de metamorfose van larve naar pop en van pop naar adult neemt het stikstofgehalte af. Uitgevaste insecten bezitten lagere stikstofgehaltes waardoor de conversiefactoren doorgaans iets hoger liggen dan voor niet-uitgevaste insecten (Tassoni, 1957). Ondanks het bestaan van substraatspecifieke conversiefactoren is interpretatie en vergelijking van eiwitgehaltes tussen verschillende studies niet altijd eenvoudig. Niet alle onderzoekers gebruiken immers dezelfde conversiefactor voor eenzelfde substraat. Voor paddenstoelen werden bijvoorbeeld volgende conversiefactoren gerapporteerd: 4,16 (Bauer-Petrovska, 2001; Kalač, 2009), 4,38 (Barros *et al.*, 2007) en 6,25 (Ouzouni *et al.*, 2009). Ook voor andere voedingsmiddelen worden conversiefactoren gerapporteerd die afwijken van de algemene conversiefactor. Voor melk wordt bijvoorbeeld een conversiefactor van 6,38 gebruikt (Verdi *et al.*, 1987).

Naast het gebruik van een specifieke conversiefactor, zou ook kwantitatieve bepaling van stikstof in chitine waardevol zijn om een correctere eiwitschatting in insecten te verkrijgen. Stikstof in chitine kan immers door het dier niet worden aangesproken als eiwitbron (Lovell *et al.*, 1968). Barker *et al.* (1998) corrigeerden voor stikstof aanwezig in de ADF-fractie alvorens met de conversiefactor 6,25 te vermenigvuldigen. Zonder correctie bedroeg het eiwitgehalte in meelwormen 51,9% en met correctie 48,8%. Dit wijst erop dat ondanks dat een deel van het stikstof geïncorporeerd zit in het exoskelet, insecten toch rijk zijn aan eiwit (Barker *et al.*, 1998). Finke (2007) volgde deze gedachtegang en concludeerde dat ruw eiwit (berekend als procent stikstof \times 6,25) een goede schatting is voor het ware eiwitgehalte in insecten, vermits slechts een kleine fractie van het totaal stikstof afkomstig is van chitine. Ook andere onderzoekers corrigeerden voor stikstof aanwezig in chitine om een betere schatting van het eiwitgehalte te kunnen maken (Black en Schwartz, 1950; Lovell *et al.*, 1968; Watkins *et al.*, 1982; Ozimek *et al.*, 1985; Stelmock *et al.*, 1985). In tegenstelling tot Barker *et al.* (1998) vonden Ozimek *et al.* (1985) wel een groot verschil in eiwitgehaltes berekend met en zonder correctie voor stikstof in chitine. Het gecorrigeerde eiwitgehalte voor honingbijen bleek 8,5% lager te liggen dan het ruw eiwit gehalte. Ozimek *et al.* (1985) suggereerden dat wanneer chitine met een enzymatische analyse wordt gemeten ook aminozuren worden opgepikt. De som van de aminozuren (exclusief tryptofaan, methionine en cystine) bedroeg namelijk 106% van het gecorrigeerde eiwitgehalte (Ozimek *et al.*, 1985).

1.3. CHITINASEN

1.3.1. Voorkomen, indeling, werking en toepassingen

De laatste jaren werd heel wat onderzoek uitgevoerd naar de activiteit en moleculaire structuur van chitinolytische enzymen of chitinasen (Adrangi en Faramarzi, 2013). Chitinasen zijn enzymen die instaan voor de biologische degradatie van chitine. Ze worden zowel door chitinebevattende organismen (insecten, schaaldieren, fungi) als door organismen die geen chitine bevatten (bacteriën, planten, zoogdieren, mens) geproduceerd en zijn betrokken bij tal van processen zoals groeiregulatie, pathogenese, morfogenese, immuniteit, voeding en parasitisme (Adrangi *et al.*, 2010). Chitinasen

kennen een grote diversiteit en talrijke toepassingen in de biotechnologie, geneeskunde, agricultuur, industrie en afvalbeheer (Zhang *et al.*, 2011).

Chitinasen behoren tot verschillende families van glycosylhydrolasen (GH) (Guillen *et al.*, 2010). De twee grootste chitinasefamilies zijn GH18 en GH19 (Zhang *et al.*, 2011). Chitinasen worden ingedeeld op basis van hun hydrolyserende activiteit, aminozuursequentie, organisatie van de functionele domeinen en vouwing van de eiwitten. Ze beschikken over één of meerdere glycosylhydrolase domeinen van superfamilies 18, 19, 20, 48 die depolymerisatie van chitine mogelijk maken (Chandler *et al.*, 2011). Het katalytisch domein is verantwoordelijk voor de driedimensionale structuur van het eiwit. Één of meerdere hulpdomeinen zoals de koolhydraatbindende module verhogen de activiteit van het enzyme tegenover onoplosbare polysacchariden en maken degradatie van het substraat mogelijk (Guillen *et al.*, 2010). Sommige chitinolytische enzymen beschikken nog over een ander mechanisme om te interageren met substraten, zoals een diepe, smalle substraatbindende gleuf. Klieving vindt plaats wanneer het substraat door de gleuf glijdt (Horn *et al.*, 2006). Degradatie van chitine door chitinasen resulteert in de vorming van chito-oligosacchariden welke op hun beurt omgezet kunnen worden naar N-acetylglucosaminemonomeren door N-acetylglucosaminidases. Afhankelijk van de graad van acetylatie kunnen chitinasen ook chitosan degraderen (Hartl *et al.*, 2012).

1.3.2. Chitinasen van vertebraten

In tegenstelling tot chitinasen van bacteriën, schimmels, insecten en planten is de kennis over chitinasen van het gastro-intestinaal stelsel van vertebraten (met uitzondering van vissen) eerder beperkt (Han *et al.*, 2000). De lage gehalten N-acetylglucosaminidase in het spijsverteringsstelsel van vertebraten bemoeilijken immers het meten van chitinaseactiviteit (Han *et al.*, 1997).

Chitine vormt een belangrijke energiebron voor vissen. Chitinasen in de maag van de vis breken chitine in het exoskelet van de prooi af waardoor inwendig gelegen weefsels toegankelijker worden (Gutowska *et al.*, 2004). In een experiment van Gutowska *et al.* (2004) werd de chitinaseactiviteit gemeten in maag- en darmweefsel van vissen en werd een verband aangetoond tussen de graad van chitinolytische activiteit en de lokalisatie in het maag-darmstelsel. In de maag werd een hogere chitinolytische activiteit gemeten dan in de darmen. Daarnaast werd in de weefselstalen van een leeg maagdarmstelsel een hoge chitinaseactiviteit gemeten, wat erop wijst dat chitinasen niet geïnduceerd worden door bacteriële flora in het verteringsstelsel, maar endogene, constitutieve enzymen zijn die geproduceerd worden door de maag en de intestinale mucosa. Dit sluit echter niet uit dat extracellulaire bacteriële chitinasen niet bijdragen tot de vertering van chitine (Gutowska *et al.*, 2004).

Zoogdierchitinasen behoren tot de GH18-familie (Adrangi en Faramarzi, 2013). Chitinasen en chitinase-achtige eiwitten geproduceerd door zoogdieren vertonen een verhoogde expressie bij infecties, allergieën, astma en fibrose (Muzzarelli, 2010). Het eerste zoogdierchitinase dat geïdentificeerd werd, was het zogenaamde chitotriosidase dat tot expressie wordt gebracht in macrofagen en bijgevolg betrokken is bij de verdediging tegen chitinebevattende micro-organismen (Boot *et al.*, 1995). Boot *et al.* (2001) toonden de aanwezigheid aan van een tweede zoogdierchitinase, het acidic mammalian chitinase (AMCase), in de maag van muizen en mensen. Het

AMCase is betrokken bij de vertering van chitinebevattende dieren en planten en in mindere mate bij de verdediging tegen chitinebevattende micro-organismen (Boot *et al.*, 2001). Bij koeien werd in het serum een sterk gelijkaardig chitinase (CBPb04; chitin-binding protein b04) aangetroffen dat echter enkel geproduceerd wordt door de lever (Suzuki *et al.*, 2001). Of een bepaalde diersoort al dan niet chitinase zal synthetiseren is afhankelijk van de voedingsgewoonten van het dier. In tegenstelling tot niet-strikt carnivoren zoals de hond en de vos secreteren strikt carnivoren zoals katachtigen, wezels, fretten en marters geen chitinase. Adaptatie aan een dieet uitsluitend bestaande uit vlees, leidde tot het verlies van het vermogen om chitinase te synthetiseren bij strikt carnivoren. Ook bij reptielen en amfibieën werd een verband gevonden tussen aanwezigheid van chitinaseactiviteit en het eetpatroon (Cornelius *et al.*, 1975).

Ook bij bepaalde vogelsoorten zoals de mus, Japanse nachtegaal, volwassen kip en kerkuil kon chitinolytische activiteit aangetoond worden. Bij de Japanse nachtegaal en de adulte kip wordt chitine voor 20 - 50% verteerd. Bij de bosduif en de Afrikaanse grijze papegaai werd er geen chitinolytische activiteit gemeten (Jeuniaux en Cornelius, 1978). Volgens Hirano *et al.* (1990) is de chitinaseactiviteit bij kippen hoger en wordt chitine voor 67 - 92% verteerd. Han *et al.* (1997) onderzochten bij vleeskippen de chitinolytische activiteit in de spiermaag, kliermaag en chymus (i.e. voedselbrij afkomstig uit de maag) en vonden de grootste chitinaseactiviteit terug in de kliermaag na verwijdering van de mucusaflijnende cellen. De endochitinaseactiviteit was beduidend hoger dan die van N-acetylglucosaminidase en bleef stabiel tijdens vries- en ontdooiprocessen (Han *et al.*, 1997). Suzuki *et al.* (2002) onderzochten in een *in situ* hybridisatiestudie met muizen en kippen de cellulaire expressie van het AMCase in het gastro-intestinaal stelsel en andere viscerale organen zoals lever, long en pancreas. Chitinasen werden bij de muis enkel in de maag (hoofdcellen), parotispeekseldklier en van Ebner's klier (linguale klier) aangetroffen. Dit zijn allen weefsels met sereus type secretoire cellen. Chitinase mRNA kwam reeds tot expressie na 12 dagen (parotisklier) of 16 dagen (maag) (Suzuki *et al.*, 2002). Boot *et al.* (2001) vonden ook in de long geringe AMCaseactiviteit terug. Er werd geen AMCase mRNA teruggevonden in de dunne darmen van de muis. Het caecum, de tong en de pancreas van de muis waren ook betrokken bij het genereren van AMCase (Boot *et al.*, 2001). Via RT-PCR en *in situ* hybridisatie werd darmchitinase mRNA aangetoond in de lever (hepatocyten) en in de kliermaag (pariëtale- en hoofdcellen) van kippen. Analyse via Northern blotting gaf enkel positief resultaat in de kliermaag, wat er op wijst dat de expressie van darmchitinase bij kippen minder uitgesproken is in de lever dan in de kliermaag. Er werd reeds chitinaseactiviteit vastgesteld in de kliermaag van zeven dagen oude kippenembryo's en deze bleek na het uitbroeden verder toe te nemen. Het kippendarmchitinase vertoont op basis van aminozuursequentie 75,8% gelijkenis met dat van mensen, 72,7% gelijkenis met dat van muizen en 70,2% gelijkenis met dat van runderen. De mogelijke rol van darmchitinasen in de organogenese en differentiatie van de maag van kippenembryo's, de exacte oorsprong van intestinale chitinaseactiviteit, evenals mogelijke gelijkenissen in expressiepatroon tussen darmchitinase en andere zoogdierchitinasen (bv. Ym1/Ym2) zijn domeinen waar nog verder onderzoek verricht kan worden (Suzuki *et al.*, 2002). Ym1 is een chitinase-achtig eiwit dat gesecreteerd wordt door alveolaire en alternatief geactiveerde macrofagen

en bindt aan de extracellulaire matrix. Bijgevolg is Ym1 betrokken bij inflammatie en weefselherstel (Muzzarelli, 2010).

1.3.3. Bacteriële chitinasen

Bacteriële chitinasen behoren tot de families GH18 (meerderheid), GH19 en GH23. Bacteriële chitinasen spelen een rol bij de voedselvoorziening en virulentie van bacteriën en schakelen concurrerende organismen zoals fungi uit (Adrangi en Faramarzi, 2013). Sommige bacteriën zoals *Yersinia entomophaga* produceren toxinecomplexen met chitinasesubunits die insecten afdoden (Busby *et al.*, 2012). Kumar en Rao (2010) en Suzuki *et al.* (2008) ontdekten dat bepaalde bacteriën zoals *Bacillus licheniformis* en *Streptomyces* chitinase-inhibitoren produceren. Aan chitinase-inhibitoren werden anti-inflammatoire, insecticidale en fungicidale eigenschappen toegekend (Kumar en Rao, 2010). Sakuda *et al.* (1987) isoleerden allosamidin, een chitinase-inhibitor, uit het mycelium van *Streptomyces* spp. *In vitro* inhibeerde allosamidin chitinasen van de zijdegworm en *in vivo* remde het de vervelling (Sakuda *et al.*, 1987).

1.3.4. Fungale chitinasen

Fungale chitinasen behoren allen tot de GH18-familie en spelen een rol bij de degradatie en reorganisatie van de celwand van fungi en zorgen voor ontbinding van exogeen chitine (Hartl *et al.*, 2012). Bepaalde fungale stammen die chitinasen produceren, worden gebruikt als bestrijdingsmiddel tegen insecten in biocontroleprogramma's voor insectenplagen. Fungale en bacteriële chitinasen kunnen ook rechtstreeks als biopesticide gebruikt worden (Adrangi en Faramarzi, 2013).

1.3.5. Insect chitinasen

Bijna alle insect chitinasen behoren tot de GH18-familie. Gedurende de verschillende stadia van metamorfose worden chitinasen geproduceerd die een rol spelen bij de turnover van chitine (Zhang *et al.*, 2011). Blootstelling aan N-acetylglucosaminidase en chitinase buiten de larvale vervellingsperiode kan tot groeivertraging of zelfs sterfte van het insect leiden (Wang *et al.*, 1996).

1.3.6. Plant chitinasen

Plant chitinasen behoren tot de GH18- of GH19-familie en fungeren als verdedigingsmechanisme tegen fungi, bacteriën, insecten, nematoden en virussen (Adrangi en Faramarzi, 2013). Sommige plant chitinasen beschikken over de capaciteit om de morfologie en groei van ijskristallen te wijzigen waardoor de plant weerstand kan bieden tegen koude (Hassas-Roudsari en Goff, 2012).

1.4. VERTEERBAARHEID VAN CHITINE

Het bestuderen van de verteerbaarheid van chitine is noodzakelijk om inzicht te verschaffen in de biobeschikbaarheid van chitine en andere nutriënten, alsook om de energetische en nutritionele waarde van chitine voor het dier en het effect op gezondheidsparameters in te schatten. Chitine vormt de belangrijkste koolhydraatbron in het dieet van mariene carnivoren en studies omtrent verteerbaarheid van chitine en chitinolytische activiteit zijn dan ook het talrijkst bij deze dieren

(Jackson *et al.*, 1992). Er zijn slechts enkele studies die de verteerbaarheid van chitine bij zoogdieren onderzochten. Bij muskusratten werd chitine voor 1,8% verteerd, bij muizen voor $19,4 \pm 27,6\%$ en bij de kleine egeltenrek voor 19,8% (Jeuniaux en Cornelius, 1978; Allen, 1989). Ook studies over chitineverteerbaarheid bij de kip zijn schaars en bijgevolg is men voornamelijk aangewezen op informatie uit studies met wilde insectivore vogels (Hossain en Blair, 2007). Uit Tabel 4 blijkt dat de mate waarin vogels chitine kunnen verteren sterk speciesafhankelijk is (Akaki en Duke, 1999).

Tabel 4: Schijnbare verteerbaarheid van chitine (%) voor verschillende vertebraten (berekend als 1 - geëxcreteerd chitine (g) / opgenomen chitine (g)) (uit: Akaki en Duke, 1999)

Species	Apparent chitin digestibilities (%)	Reference
Fish		
Rainbow trout (<i>Salmo gairdneri</i>)	2.9 ± 6.1	Lindsay et al. ('84)
Bird		
Sooty albatross (<i>Phoebastria fusca</i>)	46.5 ± 13.1	Jackson et al. ('92)
White-chinned petrel (<i>Procellaria aequinoctialis</i>)	39.1 ± 4.9	
Rockhopper penguin (<i>Eudyptes chrysocome</i>)	52.8 ± 37.6	
Gentoo penguin (<i>Pygoscelis papua</i>)	45.3 ± 5.6	
King penguin (<i>Aptenodytes patagonicus</i>)	84.8 ± 11.7	
Leach's storm-petrel (<i>Oceanodroma leucorhoa</i>)	35.0 ± 12.2	
Japanese nightingale (<i>Liothrix lutea</i>)	56.8	Jeuniaux and Cornelius ('78)
Chicken (<i>Gallus domesticus</i>)	27.6 ± 5.8	
	78 ~ 92	Hirano et al. ('84)
Northern bobwhite (<i>Colinus virginianus</i>)	6.7 ± 0.2	Weiser et al. ('97)
American robin (<i>Turdus migratorius</i>)	$7.8 \pm 2.1 \sim 13.6 \pm 2.0$	
Mammal		
Musk shrew (<i>Suncus murinus</i>)	1.8	Allen ('89)
Pygmy hedgehog tenrec (<i>Echinops telfairi</i>)	19.8	
House mouse (<i>Mus musculus</i>)	38.8 ± 28.0	Jeuniaux and Cornelius ('78)

Een mogelijke verklaring voor de hoge verteerbaarheid van chitine bij zeevogels is de aanwezigheid van chitinolytische enzymen in het krill (i.e. garnaalachtige ongewervelden die behoren tot de orde Euphausiacea) dat gevoederd werd (Akaki en Duke, 1999). Voor koningspinguïnkuike en zwarte albatroskuike werden hogere chitineverteerbaarheidsgraden teruggevonden dan voor andere zeevogels (Jackson *et al.*, 1992). Dit zou kunnen wijzen op een normaal verschijnsel vermits ook bij adulte kippen gevoederd met krabschaalchitine hoge waarden werden teruggevonden (Hirano *et al.*, 1984). Vermoedelijk zijn de hoge waarden overschattingen tengevolge van een verlengde retentietijd van schaaldiercuticula's in de maag. Het materiaal van het exoskelet blijft dan achter in de darm wanneer de feces reeds gecollecteerd worden. Dit leidt tot een onderschatting van het chitinegehalte in de feces en bijgevolg een overschatting van de verteerbaarheid (Jackson *et al.*, 1992). Bijgevolg wordt de verteerbaarheid van chitine best weergegeven als schijnbare verteerbaarheid (Akaki en Duke, 1999). Akaki en Duke (1999) wezen er op dat ook een onderschatting van de verteerbaarheid van chitine kan voorkomen. Wanneer chitinepellets gevoederd worden of insecten in hun geheel, bestaat immers de kans dat de pellets of dikkere delen van het exoskelet oraal geëlimineerd worden. Hierdoor wordt minder chitine opgenomen en de chitineverteerbaarheid verkeerdelijk lager ingeschat (Akaki en Duke, 1999).

Het is nog niet helemaal duidelijk of consumptie van chitine voor het dier voordelige effecten oplevert. Mogelijks zou N-acetylglucosamine (NAG), het afbraakproduct van chitine, fungeren als metabole brandstof of een rol spelen bij de celwandsynthese in de darm via stimulatie van de microflora

(Jackson *et al.*, 1992). Spreen *et al.* (1984) stelden vast dat chitine en zijn afbraakproducten de groei van lactaseproducerende *Bifidobacteria* spp. in zeevogels bevorderen waardoor melkwei beter benut kan worden wanneer het gebruikt wordt als eiwit-supplement. Andere onderzoekers beweren dan weer dat chitine de absorptie en vertering van vetten bij vleeskippen, vissen en muizen afremt (Razdan en Pettersson, 1994; Han *et al.*, 1999; Kroeckel *et al.*, 2012). Daarnaast zou stikstof dat vrijkomt bij vertering van chitine niet kunnen worden aangesproken als eiwitbron en de absorptie-efficiëntie van de afbraakproducten van chitine laag zijn (Lubitz *et al.*, 1943; Lovell *et al.*, 1968; Finke *et al.*, 1989; Jackson *et al.*, 1992; Bernard *et al.*, 1997). Zowel voor roodborstjes en boomkwartels die een lage chitineverteerbaarheid hebben (Weiser *et al.*, 1997) als voor zeevogels die een hogere chitineverteerbaarheid hebben (Jackson *et al.*, 1992), blijkt chitine weinig potentieel te hebben als energiebron. Het chitinegehalte in arthropoden is namelijk zo klein dat de energie vrijgesteld door chitine slechts een zeer gering percentage van de totaal metaboliseerbare energie vertegenwoordigt (Weiser *et al.*, 1997). Chitinaseactiviteit zou wel inwendige delen van prooien meer toegankelijk maken voor vertering en de vrijzetting van eiwitten uit de cuticula bevorderen. In welke mate deze eiwitten bijdragen tot de energie- en stikstofvoorziening voor het dier moet nog onderzocht worden (Weiser *et al.*, 1997; Akaki en Duke, 1999; Hossain en Blair, 2007).

Er bestaat heel wat variatie in metaboliseerbare energie van insecten voor vogels. Weiser *et al.* (1997) konden zowel binnen als tussen vogelspecies geen verband aantonen tussen de graad van chitineverteerbaarheid en metaboliseerbare energiecoëfficiënten (MEC's). Vermoedelijk waren verschillen in MEC's bij boomkwartels en roodborstjes niet te wijten aan verschillen in chitineverteerbaarheid, maar aan verschillen in schijnbare vet- en eiwitvertering tussen beide species (Weiser *et al.*, 1997). Akaki en Duke (1999) vonden bij inclusie van 2 tot 5% krabschaalchitine in het voeder een chitineverteerbaarheid terug van 11 tot 30% voor de Oostelijke schreeuwuil en 16 tot 26% voor de Amerikaanse torenvalk. Ze concludeerden dat langdurige supplementatie (3-6 weken) met chitine geen toename in chitineverteerbaarheid veroorzaakt bij roofvogels. Hogere vertebraten zouden immers de chitinasynthese in de maag niet kunnen stimuleren en gewenning aan chitinerijk materiaal zou het aantal en de chitinolytische capaciteit van bacteriën niet beïnvloeden (Akaki en Duke, 1999).

Er is nog maar weinig onderzoek verricht naar chitineverteerbaarheid bij kippen en in welke mate kippen gebruik kunnen maken van nutriënten aanwezig in insecten. Van wilde insectivore vogels is geweten dat ze een groot deel van hun nutriënten halen uit insecten (Hossain en Blair, 2007). Hossain en Blair (2007) onderzochten of dit ook het geval is voor kippen. Tijdens een drie weken durende proef werd bij mannelijke vleeskuikens bestudeerd of het consumeren van zuiver schaaldierchitine een effect had op de lichaamssamenstelling en metaboliëten in het bloed. Inclusie van chitine in het dieet bleek geen effect te hebben op het gewicht, de karkaskwaliteit en voederefficiëntie, maar triglycerideconcentraties in de lever en het borstvlees schenen wel af te nemen. Tevens werden lagere serum triglycerol- en glycerolwaarden gedetecteerd bij inclusie van 5% chitine in het dieet. Ook Razdan en Pettersson (1994) meenden dat chitine en chitosan hypolipidemische en hypocholesterolemische effecten hebben. Het geven van chitosanbevattende voeders aan

opgroeïende vleeskippen zou totaal plasma cholesterol en high-density lipoprotein (HDL) cholesterol doen afnemen, alsook de ileale vetverteerbaarheid (Razdan en Pettersson, 1994). Hossain en Blair (2007) noteerden ook een afname van eiwitverteerbaarheid wanneer chitinerijke voeders geconsumeerd werden. Inclusie van 2,5% chitine in het voeder ging gepaard met een schijnbare eiwitverteerbaarheid van chitine van 48%. Wanneer 7,5% van het voeder bestond uit chitine was de schijnbare verteerbaarheid 45%. De ware eiwitverteerbaarheid van chitine bedroeg 86,8%. Hossain en Blair (2007) besloten op basis van hun bevindingen dat kippen deels in staat zijn chitine te verteren, maar dat nutriënten uit het exoskelet niet benut kunnen worden door het dier (Hossain en Blair, 2007).

Hoewel de aanzet reeds werd gemaakt, is er nog heel wat onderzoek nodig naar de mate waarin het schijnbare verteerde chitine geabsorbeerd en gemetaboliseerd wordt, alsook naar de factoren die mogelijks de chitineverteerbaarheid beïnvloeden. De mate van chitinaseactiviteit, aanwezigheid van darmmicrobiota, digestieretentietijd en autokatalysecapaciteit van de prooi zijn slechts enkele van de factoren die de chitineverteringsefficiëntie van een bepaalde species beïnvloeden (Weiser *et al.*, 1997).

2. MATERIAAL EN METHODEN

2.1. EXPERIMENT 1: CHITINEVERTEERBAARHEID BIJ SCHARRELKIPPEN

2.1.1. Dieren en huisvesting

Zestien pasgeboren Boschveldkuikens, afkomstig uit Bela Bela (Limpopo, Zuid-Afrika), werden willekeurig verdeeld in twee gelijke groepen en gehuisvest in een goed geventileerde en tochtvrije ruimte (Figuur 4). Op elk hok werd een infraroodlamp geplaatst om een temperatuur van ongeveer 30°C te handhaven. Als bodemstrooisel werden houtkrullen gebruikt. De kuikens kregen *ad libitum* gepelleteerd groeivoeder voor vleeskippen (Driehoek, Vaalwater, Zuid-Afrika) en schoon drinkwater ter beschikking. De samenstelling van het groeivoeder was als volgt: 200 g / kg eiwit (min.), 120 g / kg vocht (max.), 25 g / kg vet (min.), 5,5 g / kg fosfor (min.), 60 g / kg vezel (max.), 7-10 g / kg calcium, 11,5 g / kg lysine (min.). Vanaf dat de kuikens één week oud waren, werd één van beide groepen overdag buiten gehuisvest (Figuur 5). De ondergrond van de buitenkooi bestond uit gras en als kooiverrijking was er een zitstok aanwezig. De kooi was gedeeltelijk overdekt zodat de kuikens schaduw konden opzoeken wanneer nodig. De kuikens hadden *ad libitum* water en groeivoeder ter beschikking en hadden daarnaast ook toegang tot insecten die zich in de vrije natuur bevonden.



Figuur 4: Binnengehuisveste kuikens (10 dagen oud)



Figuur 5: *Buitengehuisveste kuikens (14 dagen oud)*

2.1.2. Verteringsproef

Wanneer de kuikens twee weken oud waren, werd gestart met verteringstesten gedurende vier opeenvolgende weken. Hiervoor werden de kuikens van eenzelfde groep gepaard aan de hand van een kleurcode en per twee gehuisvest in een verteringskooi (Figuur 6). Deze kooien hadden een geperforeerde bodem met daaronder een mestplaat. De kuikens werden gewogen (Radwag PS 4500/C/2, Radom, Polen) en 's nachts uitgevast. De kuikens hadden wel nog vrije beschikking over schoon drinkwater. De tweede dag kregen ze *ad libitum* (ongeveer 50 gram) stukjes gedroogde mopanewormen (supermarkt Spar, Polokwane, Zuid-Afrika) ter beschikking. Op dag drie werden resterende mopanewormen weggenomen en werden de kuikens weer naar hun hok gebracht. De overgebleven mopanewormen werden gewogen (Radwag PS 4500/C/2) om de opgenomen hoeveelheid te berekenen en de feces werden verzameld. De feces werden gewogen (Kern EMB 500-1, Balingen, Duistland) en gedroogd in een vacuümoven (Figuur 7) bij 100°C (MRC 1408-2, Hampstead, London, UK). Hierna werd de mest opnieuw gewogen (Kern EMB 500-1) en fijn gemalen (Bodum Bistro 11160, New York, USA) om celmembranen te verbreken en vetextractie te vergemakkelijken. Van elk meststaal werd één gram afgewogen en in een nylon filterzakje (F57, 5,0 cm × 5,5 cm, poriegrootte: 25 µm; Ankom Technology Corporation, Fairport, USA) gestopt dat verzegeld werd met een vacuümverpakker (Krups Vacupack Plus, Fleurus, België). Het filterzakje met inhoud werd gewogen.



Figuur 6: *Verteringskooien*



Figuur 7: *Drogen van de meststalen (MRC 1408-2, Hampstead, London)*

2.1.3 Analytische methoden

2.1.3.1. Chitineanalyse en bepaling van de gestandaardiseerde chitineverteerbaarheid

Na drogen van de fecesstalen werd een chitineanalyse uitgevoerd gebaseerd op het protocol van Liu *et al.* (2012). Eerst werd op het filterzakje met fecesstaal een Soxhlet-vetextractie uitgevoerd gevolgd door een één uur durende zuurbehandeling en 24 uur durende alkalibehandeling. Hierna werd het chitine uit het filterzakje verwijderd en afgewogen. Voor een meer gedetailleerde beschrijving van de vetextractie en de chitineanalyse wordt verwezen naar hoofdstuk '2.2.2.1 Chitineanalyse'.

Na bepaling van het chitinegehalte in de feces- en de voederstalen, werd de schijnbare chitineverteerbaarheid als volgt berekend:

$$\% \text{ verteerd chitine} = 100 - \frac{C_2}{C_1} \times 100 = \frac{C_1 - C_2}{C_1} \times 100$$

Hierin is C_1 : chitine in voeder (g)

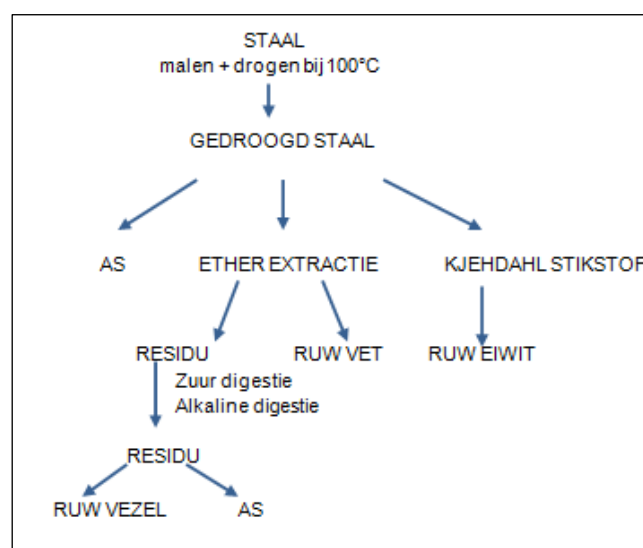
C_2 : chitine in mest (g)

Aangezien het voederopnameniveau laag was, traden basale (forfitaire) endogene verliezen op. Forfitaire verliezen bestaan onder andere uit excreties afkomstig van afgeschilferde darmcellen en urine. Hoe minder voeder (en dus hoe minder chitine) wordt opgenomen, hoe zwaarder deze verliezen zullen doorwegen en des te lager de schijnbare verteerbaarheid van chitine zal uitvallen. Grafisch uit zich dit in een hyperboolfiguur. Wanneer zeer lage hoeveelheden chitine worden opgenomen, zal ook de schijnbare verteerbaarheid zeer laag zijn. Naarmate meer chitine wordt opgenomen, zal de

schijnbare verteerbaarheid geleidelijk toenemen en uiteindelijk afvlakken en naar 100% evolueren. De forfaitaire verliezen zijn dan verwaarloosbaar. Hiervan werd gebruik gemaakt om de gestandaardiseerde verteerbaarheid van chitine te berekenen. Om een goede 'curve fitting' te garanderen, werden de data van de vier weken samengenomen. De gestandaardiseerde verteerbaarheid van chitine werd geschat via twee benaderingen: via een invers regressiemodel of via een lineair regressiemodel. In het eerste geval wordt de schijnbare verteerbaarheid van chitine (i.e. afhankelijke variabele) uitgezet in functie van de chitineopname (i.e. onafhankelijke variabele). In het tweede geval wordt de onafhankelijke variabele geïnverteerd en wordt de schijnbare verteerbaarheid van chitine uitgezet ten op zichte van $(\text{chitineopname})^{-1}$. Als invers regressiemodel werd functie $y = b_0 + b_1 / x$ gehanteerd; als lineair regressiemodel functie $y = b_0 + b \times x$. Voor het invers model geldt dat wanneer de variabele x (i.e. chitineopname) naar oneindig evolueert, de gestandaardiseerde verteerbaarheid gelijk wordt aan de constante b_0 . Voor het lineair regressiemodel geldt dat voor de limiet van x gaande naar nul, de gestandaardiseerde verteerbaarheid van chitine gelijk zal zijn aan b_0 .

2.1.3.2. Weende-analyse

Om een idee te krijgen van de nutritionele samenstelling van de mopaneworm werd een Weende-analyse (ruwe as (anorganische mineralen), ruw eiwit, ruw vet en ruwe celstof) uitgevoerd. Deze componenten werden bepaald op gedroogde stalen. De analyses werden uitgevoerd volgens de methoden van de Leatherhead Food Research Association beschreven in de Analytical Methods Manual (1996). Twee verschillende stalen mopanewormen werden telkens in drievoud geanalyseerd. De wormen werden vooraf gemalen om een zo homogeen mogelijk mengsel te verkrijgen. De stalen werden tot op 0,0001 g nauwkeurig gewogen (Sartorius 2001 MP2, Data Weighing systems, Elk Grove, Illinois, USA). Het werkschema van de Weende-analyse is weergegeven in Figuur 8. De analyses van ruwe as en ruwe celstof worden hieronder besproken. Voor de procedures van ruw vet- en ruw eiwitbepaling wordt respectievelijk verwezen naar hoofdstuk '2.2.2.1. Chitineanalyse' en hoofdstuk '2.2.2.2. Kjeldahl-analyse'.



Figuur 8: Werkschema van de Weende-analyse

2.1.3.2.1. As

As (of geoxideerde metalen) wordt gedefinieerd als het residu dat achterblijft na verbranding. Tijdens het verbrandingsproces treedt oxidatie op waardoor organisch materiaal afgebroken wordt, maar mineralen en anorganische zouten onaangetast blijven. Vermits bepaalde mineralen volatiel zijn (bv. ijzer, lood, kwik) zal een kleine fractie van de mineralen verloren gaan en geeft as slechts een benadering van het mineralengehalte weer. Fruit en groenten bestaan gewoonlijk uit alkalische as (kaliumcarbonaten, oxiden) en granen en vleesproducten uit zure as (fosfaten). Een abnormaal hoog asgehalte wijst op aanwezigheid van anorganische contaminanten (bv. vuil, zand) of bijmengingen (bv. zout) (Leatherhead Food Research Association, 1996).

Van elk staal gemalen mopanewormen werd 2,5 g afgewogen en in een vooraf gewogen porseleinen kroesje (MTC Haldenwanger, Technical Ceramics, Morgan Advanced Materials, Berkshire, UK) gebracht. De kroesjes werden gedurende vier uur in een droogoven (Bekso, Leuven, België) geplaatst bij 100°C. Voor het verassen werden de kroesjes in een moffeloven (Controller P320, Nabertherm, Lilienthal, Duitsland) geplaatst. Vermits insecten veel vet en eiwit bevatten, werd een aangepaste procedure gevolgd om spatten of overdadig schuimen te voorkomen. De temperatuur werd geleidelijk opgedreven. De eerste twee uur werden de kroesjes blootgesteld aan 100°C, de volgende twee uur aan 300°C, daarna drie uur aan 500°C en vervolgens veertien uur aan 550°C. De kroesjes werden na afloop gewogen en het asgehalte werd berekend met onderstaande formule.

$$\text{Totaal as \%} \left(\frac{\text{g}}{100 \text{ g}} \right) = \frac{M_3 - M_1}{M_2 - M_1} \times 100$$

Hierin is M_1 : leeg kroesje (g)

M_2 : staal + kroesje (g)

M_3 : kroesje + as (g)

2.1.3.2.2. Ruwe celstof

Van elk staal mopanewormen werd in drievoud ongeveer één gram afgewogen en in filterzakjes gestopt. De filterzakjes werden verzegeld (Krups Vacupack Plus, Fleurus, België) en gewogen. Om het gehalte ruwe celstof te kunnen bepalen mag het vetgehalte niet meer dan 8% bedragen. Uit de literatuur bleek dat mopanewormen rijk zijn aan vet (16%), daarom werden de stalen eerst gedeeltelijk ontvet door de filterzakjes gedurende vijftien minuten in plastic potjes te brengen met ether. Hierna werden de stalen gedroogd bij 60°C. Na de vetextractie werden de stalen onderworpen aan een zuurdigestie (om het zure milieu van de maag na te bootsen), gevolgd door een digestie met alkali (om het alkalisch milieu van de dunne darm na te bootsen). Koolhydraten en eiwitten werden op deze manier gehydrolyseerd. De filterzakjes werden in een erlenmeyer (Duran, Mainz, Duitsland) gebracht waaraan 100 ml zwavelzuur werd toegevoegd en daarna gedurende één uur aan de kook gebracht. Hierna werd het zwavelzuur weggegoten en werd aan elke erlenmeyer 100 ml 1,25% natriumhydroxide toegevoegd en vervolgens weer één uur aan de kook gebracht. Hierna werden de stalen gewassen. De achtergebleven fractie in het filterzakje was nu vrij van vetten, koolhydraten en eiwit en werd als onverteerbare ruwe celstof beschouwd. In de filterzakjes was echter niet alleen ruwe

celstof, maar ook as aanwezig waarvoor gecorrigeerd moest worden. De zakjes werden gewogen, in kroesjes gestopt en in de moffeloven geplaatst om ze te verassen. Hierbij werd hetzelfde temperatuursprogramma gebruikt als in hoofdstuk '2.1.3.2.1. As'. De formules om het ruwe celstofgehalte te berekenen (met en zonder correctie) worden hieronder weergegeven.

$$\text{Percentage ruwe celstof (zonder correctie)} = \frac{(M_2 - M_1) \times 100}{(M_1 + M_0) - M_1}$$

$$\text{Percentage ruwe celstof (met correctie)} = \frac{(M_2 - M_1) - (M_4 - M_3) \times 100}{(M_1 + M_0) - M_1}$$

Hierin is M_0 : staal (g)

M_1 : filterzakje leeg (g)

M_2 : filterzakje eind (g)

M_3 : kroesje leeg (g)

M_4 : kroesje eind (g)

2.2. EXPERIMENT 2: EVALUATIE VAN EEN NIEUWE CHITINE ANALYSEMETHODE

2.2.1. Staalvoorbereiding

Vierentwintig stalen van zowel plantaardige als dierlijke origine werden verzameld voor analyse. Er werd geopteerd voor inclusie van volgende voedingsmiddelen: (1) insectenspecies: larvale/adulte/popstadia van meelwormen op een dieet van tarwezemelen (*Tenebrio molitor*, Versele-Laga, Deinze & Ecology Projects, Borgerhout), larven van meelwormen op een dieet van tarwezemelen en haver (*Tenebrio molitor*, Versele-Laga, Deinze & Ecology Projects, Borgerhout), zwarte soldaatvliegen (*Hermetia illucens*, Versele-Laga, Deinze), poppen van zwarte soldaatvliegen (Versele-Laga, Deinze), larven van de buffaloworm/tarweschimmelkever (*Alphitobius diaperinus*, Ecology Projects, Borgerhout), geblancheerde rupsen van de wasmot (*Galleria mellonella*, Ecology Projects, Borgerhout), adulte en instar 5-6 (i.e. stadium tussen vervelling 5 en 6) Afrikaanse treksprinkhanen (*Locusta migratoria migratorioides*, Ecology Projects, Borgerhout); (2) schaaldierspecies: zoetwatervlokreeften (*Gammarus pulex*, Versele-Laga, Deinze), garnalen (*Macrobrachium nipponense*, Versele-Laga, Deinze); (3) afgeleide producten: chitinevlokken afkomstig van garnaalschelp (C9213, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), boviene melk caseïne (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), cellulosepoeder van een dennenboom (Fluka, Buchs, Zwitserland), varkenscollageen (Vepro-gel 95 PCP-I, Veos NV, Zwevezele) en rundercollageen (Federal Laboratories Corporation, New York, USA); (4) standaard voedingsingrediënten: tarwezemelen (Lannoo paardenvoeders, Hansbeke-Nevele), sojahullen (Lannoo paardenvoeders, Hansbeke-Nevele) en droge gist (Algist Bruggeman, Gent); (5) eekhoortjesbrood (*Boletus edulis*, le Montagnard, Saugues, Frankrijk); (6) zaagsel (Roose, Oudenburg); (7) verenmeel. Elk staal werd in tweevoud geanalyseerd voor ruw vet, ruw eiwit, stikstof (N-totaal, N-chitine) en chitine. Ruw vet, ruw eiwit, stikstof en chitine werden bepaald in het laboratorium van de vakgroep Voeding, Genetica en

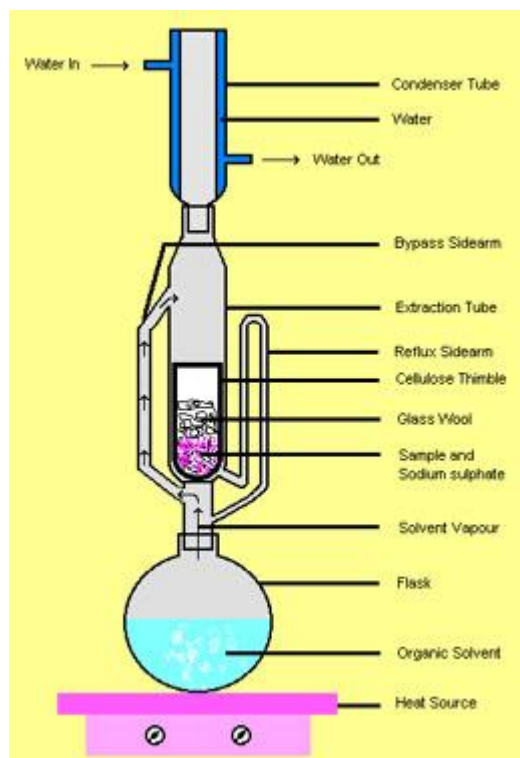
Ethologie van de Universiteit Gent. Voorafgaand aan de analyses werden de stalen 's nachts gedroogd bij 60°C en vermalen (Bodum Bistro 11160, New York, USA).

2.2.2. Analytische methoden

De hoeveelheid chitine werd bepaald volgens Liu *et al.* (2012), gevolgd door een stikstofanalyse (Kjeldahl-analyse) op het residu (Leatherhead Food Research Association, 1996). Totaal stikstof werd bepaald volgens de Kjeldahl-analyse op het originele staal. Het eiwitgehalte werd enerzijds berekend op basis van het totaal stikstofgehalte in het staal en anderzijds als het verschil tussen N-totaal en N-chitine vermenigvuldigd met conversiefactor 6,25. De analyses werden tevens uitgevoerd op blanco filterzakjes.

2.2.2.1. Chitineanalyse

Voorafgaand aan de analyse werd een vetextractie uitgevoerd met behulp van de Soxhlet-methode (Leatherhead Food Research Association, 1996). Per staal werden twee kolfjes gevuld met enkele puimsteentjes, tien minuten in een droogstoof (Bekso, Leuven) bij 100°C geplaatst en vervolgens gewogen. Van elk staal werd ongeveer vier gram afgewogen en in een extractiehuls (33 mm × 80 mm × 1,5 mm; Whatman, Maidstone, UK) gebracht. Van de insectenstalen afkomstig van Ecology Projects (i.e. larvale/adulte/popstadia van meelwormen op een dieet van tarwezemelen, larven van meelwormen op een dieet van tarwezemelen en haver, larven van de buffaloworm/tarweschimmelkever, geblancheerde rupsen van de wasmot, adulte en *instar* 5-6 Afrikaanse treksprinkhanen) werd slechts twee gram afgewogen en pas na vetextractie gemalen omdat hoge vetgehaltes verwacht werden. De extractiehulzen werden afgedekt met watten en in het Soxhlet-apparaat geplaatst. De extractiehuls werd in de cilinder boven de kolf van het Soxhlet-apparaat (EV6 All/16, Gerhardt Analytical Systems, Königswinter, Duitsland) gestopt. Hierna werd gedestilleerd petroleumether (kookpunt 60-80°C, VWR International S.A.S, Fontenay-Sous-Bois, Frankrijk) aan de cilinder toegevoegd (ongeveer 200 ml) tot deze overhevelde en de kolf ongeveer voor de helft met ether gevuld was. De ether lost vetten aanwezig in het staal op. De kolfjes werden op warmteplaten geplaatst en ether werd zes tot acht uur aan de kook gebracht om het vet te extraheren. De temperatuur van de warmteplaat werd zo ingesteld dat er zich acht tot tien refluxen per uur voordeden. De werking van het Soxhlet-apparaat wordt weergegeven in Figuur 9.



Figuur 9: Werking Soxhlet-apparaat. Zodra het water begint te koken, verdampt de ether. De ether komt in contact met het koude oppervlak van de condensorbuis, condenseert, slaat neer en vult geleidelijk de cilinder. Zodra een constante kooktemperatuur bereikt is volgen cycli van refluxen zich op. Een reflux of omwenteling treedt op wanneer zich in de cilinder genoeg ether heeft verzameld zodat deze overloopt. De ether wordt via een sifon teruggestuurd naar de kolf. Het vet dat zich verzameld heeft onder de extractiehuls loopt samen met de ether naar de kolf. Het vet blijft achter, terwijl de ether opnieuw verdampt, neerslaat en de cilinder vult tot er opnieuw een reflux plaatsvindt (uit: Bergeron en Benning, 2015)

Na zes tot acht uur extraheren werd de kolf met het vetextract afgenomen en werd de ether verwijderd. Het verkregen vetrestant werd gedroogd in een droogstoof bij 100°C waarna de kolfjes opnieuw werden afgewogen.

Het vetgehalte werd berekend als volgt:

$$\text{Vet} \left(\frac{\text{g}}{100 \text{ g}} \right) = \frac{(X - Y)}{M} \times 100$$

Hierin is X: 250 ml kolf + vet (g)

Y: 250 ml kolf (g)

M: staal (g)

De ontvette stalen werden gedroogd bij 60°C en uit de extractiehulzen verwijderd. Van elk staal werd in tweevoud één gram afgewogen en in een nylon filterzakje (F57, 5,0 cm × 5,5 cm, poriegrootte: 25 µm; Ankom Technology Corporation, Fairport, USA) gestopt voor chitinebepaling. Van de

chitinevlokken werd slechts een halve gram afgewogen. Het gewicht van de lege filterzakjes werd genoteerd. De filterzakjes werden in erlenmeyers (Duran Group, Mainz, Duitsland) gestopt waaraan 100 ml 1 M HCl (VWR International, Fontenay-sous-Bois, Frankrijk) werd toegevoegd. De erlenmeyers werden vervolgens één uur verhit op een warmteplaat (Gerhardt) bij 100°C. Hierna volgde een wasstap met gedestilleerd water tot de pH neutraal was. Vervolgens werden de gewassen filterzakjes in erlenmeyers gestoken waaraan 100 ml 1 M NaOH werd toegevoegd en 24 uur in een schuddend warmwaterbad (80°C, J.P. Selecta S.A., Abrera, Spanje) geplaatst. Hierna volgde een was- en droogstap. Vervolgens werd de hoeveelheid chitine aanwezig in elk staal bepaald. Hiervoor werd de inhoud niet uit de zakjes gehaald omdat dit tot grote variatie in metingen leidt. Het chitine kan immers nooit volledig verwijderd worden uit de zakjes. De zakjes met chitine werden daarom in hun geheel afgewogen (Sartorius 2001 MP2, Data Weighing systems, Elk Grove, Illinois, USA) waarna het gewicht van het leeg filterzakje telkens werd afgetrokken om zo nauwkeurig mogelijk de hoeveelheid chitine aanwezig in elk zakje te bepalen. Vermits de blanco zakjes na zuur- en alkalibehandeling gemiddeld 0,3081 g in gewicht verloren hadden, werd hiervoor gecorrigeerd bij het berekenen van het chitinegehalte. De formule voor berekening van het chitinegehalte was als volgt:

$$\% \text{ afgewogen chitine} = \frac{Y - (X \times 0,44)}{M} \times 100$$

Hierin is M: staal (g)

X: leeg zakje (g)

Y: zakje na zuur- en alkalibehandeling (g)

0,44: gemiddelde gewicht (g) van vier blanco zakjes na zuur- en alkalibehandeling gedeeld door gemiddelde gewicht (g) van vier lege blanco zakjes

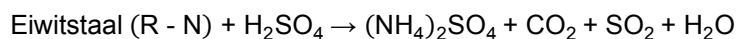
2.2.2.2. Kjeldahl-analyse

Het ruw eiwitgehalte werd bepaald met de Kjeldahl-methode (Leatherhead Food Research Association, 1996). Met deze methode wordt stikstof aanwezig in organische verbindingen en ammoniak gemeten. Deze methode geeft niet het exacte eiwitgehalte weer, maar wel een goede benadering waarbij ammoniak een maat is voor het eiwitgehalte. Het staal wordt eerst verteerd waarbij gebonden organisch stikstof (uitgezonderd nitraat en nitriet) omgezet wordt tot ammoniumionen. Toevoeging van natriumhydroxide aan het verteerde staal resulteert in vrijstelling van ammoniak. Ammoniak wordt vervolgens gedestilleerd (Figuur 10) en verzameld in een standaardzuur waarna de hoeveelheid vrijgesteld ammoniak titrimetrisch bepaald kan worden (Leatherhead Food Research Association, 1996).

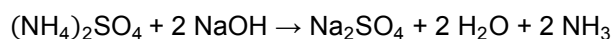


Figuur 10: Destillator

Van elk staal werd eerst in tweevoud één gram afgewogen en in een destructiebuis (Behrotest SR 3i, Behr Labor Technik, Düsseldorf, Duitsland) gebracht. Van de insectenstalen afkomstig van Ecology Projects werd slechts een halve gram afgewogen omdat hoge stikstofgehalten verwacht werden. Vervolgens werden de verschillende stappen van de Kjeldahl-methode doorlopen: het vrijmaken van de organische stikstof, een destillatiestap en een titratiestap. Aan elke buis werd 15 ml 95% zwavelzuur (VWR International, Fontenay-sous-Bois, Frankrijk) toegevoegd om organische verbindingen te verbreken en een Kjeldahl-tablet (Missouri katalysator 5 g/tablet, Merck KGaA, Darmstadt, Duitsland). Deze tabletten bevatten katalysatoren (5,0 g K_2SO_4 en 0,5 g $CuSO_4$). Kopersulfaat ($CuSO_4$) is een katalysator die de reactie versnelt. Kaliumsulfaat (K_2SO_4) verhoogt het kookpunt van de zwavelzuuroplossing en versnelt hierdoor het afbraakproces waardoor ammoniumverlies beperkt wordt. De buizen werden 230 minuten in het destructieblok van een digestieapparaat (Behr Labortechnik GmbH, Düsseldorf, Duitsland; Tecator Digestion System 20, Foss, North Ride, Australië) geplaatst waarbij de temperatuur geleidelijk opgedreven werd tot $390^\circ C$. Tijdens deze verteringsstap komt stikstof vrij waardoor ammoniumionen gevormd worden zoals weergegeven in onderstaande reactie.



Na afkoelen werden de buizen met alkalische oplossing in een stoomdestillatieapparaat (Gerhardt Analytical Systems, Königswinter, Duitsland) geplaatst om ammoniak (NH_3) aanwezig in het staal te verdrijven. Met een pompsysteem werd eerst water en vervolgens natriumhydroxide toegevoegd.



Tijdens een zes minuten durende stoomdestillatie werd ammoniak overgeheveld naar een erlenmeyer gevuld met 25 ml 0,1 M zwavelzuur (H_2SO_4) en enkele druppels methylrood (kleurindicator, rood in het zuur gebied, omslaggebied: 4,4 - 6,2). De hoeveelheid organische stikstof aanwezig in het staal kon berekend worden vanuit de hoeveelheid ammoniak die geproduceerd werd. Om na te gaan hoeveel NH_3 (en dus hoeveel eiwit) zich in de erlenmeyer bevond, werd een terugtitratie uitgevoerd. Wanneer veel eiwit in het staal aanwezig was, werd een gele kleuromslag waargenomen. Dit wijst erop dat er zich meer ammoniak dan zwavelzuur in de oplossing bevindt en bijgevolg werd er teruggetitreerd met 0,1 M zwavelzuur. Er werd gemeten hoeveel zwavelzuur (uitgedrukt in ml) moest toegevoegd worden om het eindpunt van de titratie te bereiken. Het eindpunt werd visueel bepaald (i.e. terug omslag naar rood gebied). Wanneer geen tot weinig eiwit in het staal aanwezig was, hield zwavelzuur de overhand en vond er geen kleuromslag plaats (de oplossing bleef roze). In dit geval werd er teruggetitreerd met 0,1 M natriumhydroxide. Het percentage eiwit werd berekend met volgende formules:

$$\% \text{ eiwit} = \frac{\text{N in staal} \times 0,875}{\text{staal (g)}}$$

$$\% \text{ eiwit} = \frac{(25 + \text{aantal ml toegevoegd } \text{H}_2\text{SO}_4) \times 0,875}{\text{staal (g)}}$$

$$\% \text{ eiwit} = \frac{(25 - \text{aantal ml toegevoegd NaOH}) \times 0,875}{\text{staal (g)}}$$

De waarde 0,875 werd verkregen door de moleculaire massa van stikstof (14 g / mol) te vermenigvuldigen met correctiefactor (F) 6,25. Deze factor wordt gebruikt voor voedingswaren en drukt de massa van het eiwit uit ten op zichte van de massa van stikstof (McDonald *et al.*, 2011). De hoeveelheid organisch stikstof (N) van een staal werd berekend door het eiwitgehalte te delen door 6,25 vermits het eiwitgehalte bij benadering gelijk is aan $\text{N} \times \text{F}$. Alternatief kan de hoeveelheid organische stikstof ook berekend worden met volgende formule (Leatherhead Food Research Association, 1996):

$$\text{Stikstof} \left(\frac{\text{g}}{100 \text{ g}} \right) = \frac{(25 + \text{T})}{\text{W}} \times 0,14$$

Hierin is T: aantal ml 0,1 M H_2SO_4 vereist voor de terugtitratie

W: staal (g)

Zoals hoger vermeld, werd niet alleen rechtstreeks op de stalen, maar ook op de zakjes met de chitineresidu's een Kjeldahl-analyse uitgevoerd. Voor chitine werd gedestilleerd met 0,1 M zwavelzuur. Voor de andere substraten werd een lagere concentratie (0,05 M) zwavelzuur gebruikt om ook stikstof te kunnen detecteren in stalen die weinig tot geen chitine bevatten. De hoeveelheid zwavelzuur die werd toegevoegd, werd bepaald door de hoeveelheid residu in de zakjes. Voor chitine werd 25 ml gebruikt. Voor de andere stalen werd afhankelijk van de hoeveelheid afgewogen chitine 5 ml, 10 ml of

15 ml zwavelzuur toegevoegd. Na destillatie werden zure oplossingen teruggetitreerd met 0,1 M natriumhydroxide. Wanneer een basische oplossing werd verkregen, werd voor terugtitratie met natriumhydroxide eerst 0,05 M zwavelzuur toegevoegd.

De hoeveelheid stikstof in chitine werd berekend met volgende formule:

$$\% \text{ N-chitine} = \frac{\text{ml H}_2\text{SO}_4 \text{ netto} \times 0,14}{\text{staal (g)}}$$

Hierin is: $\text{ml H}_2\text{SO}_4 \text{ netto} = \text{ml 0,1 N H}_2\text{SO}_4 \text{ bruto} - \text{ml NaOH} - \text{blanco (g)}$

Vanuit N-chitine kan het chitinegehalte berekend worden met volgende formule:

$$\% \text{ chitine} = \frac{\% \text{ N-chitine} \times 203}{14}$$

Hierin is: 203 g / mol de molaire massa van chitine

2.2.2.3. As- en onoplosbare asanalyse

Na chitineanalyse gaven een aantal substraten die verondersteld werden chitinevrij te zijn een vals positief resultaat. Aangezien voor deze substraten onoplosbare as mogelijks interfereerde met het afgewogen chitine werd het afgewogen chitine gecorrigeerd voor onoplosbare as. Voor het verassen werd van elk staal in tweevoud drie gram afgewogen. De procedure voor asbepaling verliep analoog aan deze uit hoofdstuk '2.1.3.2.1. As'. De as werd vervolgens volledig overgebracht in een erlenmeyer met geslepen stop met 100 ml 4 M verdund HCl en gekookt gedurende 30 minuten onder reflux. Hierna werd de resulterende oplossing gefilterd op een asvrije filter, nagespoeld tot er geen chloriden meer aanwezig waren en gedroogd. De onoplosbare as werd bepaald door het filterpapier te verassen volgens de asprocedure en nadien gewogen.

$$\text{Totaal onoplosbare as \%} \left(\frac{\text{g}}{100 \text{ g}} \right) = \frac{M_4 - M_1}{M_2 - M_1} \times 100$$

Hierin is M_1 : leeg kroesje (g)

M_2 : staal + kroesje (g)

M_4 : onoplosbare as (g)

2.3. STATISTISCHE DATAVERWERKING

Statistische analyse van chitineverteerbaarheidsdata en resultaten van de Weende-analyse werd uitgevoerd met behulp van het programma 'SPSS Statistics 22' (SPSS Inc., Chicago, US). De gestandaardiseerde verteerbaarheid werd geschat met behulp van inverse en lineaire regressiemodellen waarbij grafieken gemaakt werden met 'Matlab 8_4' (The Mathworks B.V., Eindhoven). Het gewichtsverloop van de binnengehuisveste en buitengehuisveste kippen werd vergeleken met een ongepaarde t-test. De relatie tussen de verschillende variabelen (eiwit, vet, as, onoplosbare as, chitine, gecorrigeerd chitine) werd bestudeerd met simple scatterplots. Via lineaire

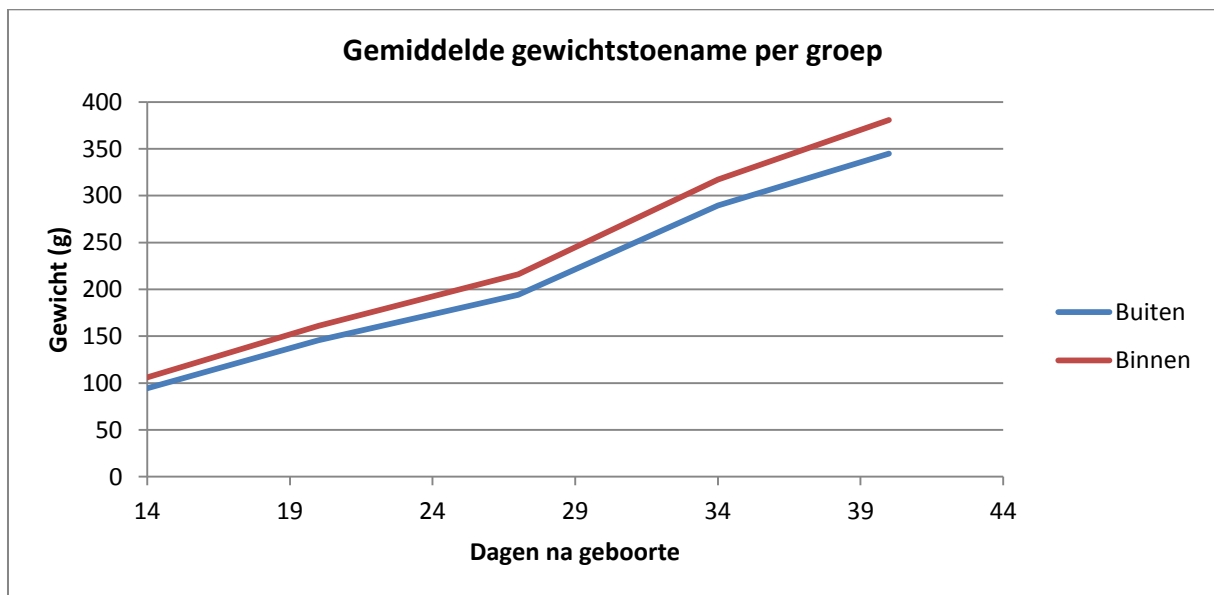
regressiemodellen werd nagegaan of er een significant lineair verband bestond tussen de verschillende parameters. Gemiddelden van de variabelen eiwit en chitine werden enerzijds tussen dierlijke en plantaardige substraten, en anderzijds tussen insecten en dierlijke niet-insect producten vergeleken met een variantieanalyse (one-way ANOVA) waarbij verschillen als significant werden beschouwd bij een P -waarde $< 0,05$. De samenhang tussen de variabelen vet, eiwit, chitine, as en onoplosbare as werd onderzocht met bivariate correlatieanalyses (Pearson's correlatie test).

3. RESULTATEN

3.1. CHITINEVERTEERBAARHEIDSTUDIE BIJ KIPPEN

3.1.1. Gewichtsverloop

Het gewicht van de binnen- en buitengehuisveste kippen werd gemeten op dag 14, 20, 27, 34 en 40 (Figuur 11). Er werd geen significant verschil in gewicht gevonden tussen beide groepen ($P > 0,05$). Voor meetdagen 14, 20, 27 en 34 werden P -waarden van respectievelijk 0,826, 0,864, 0,686, 0,843 en 0,844 gevonden.

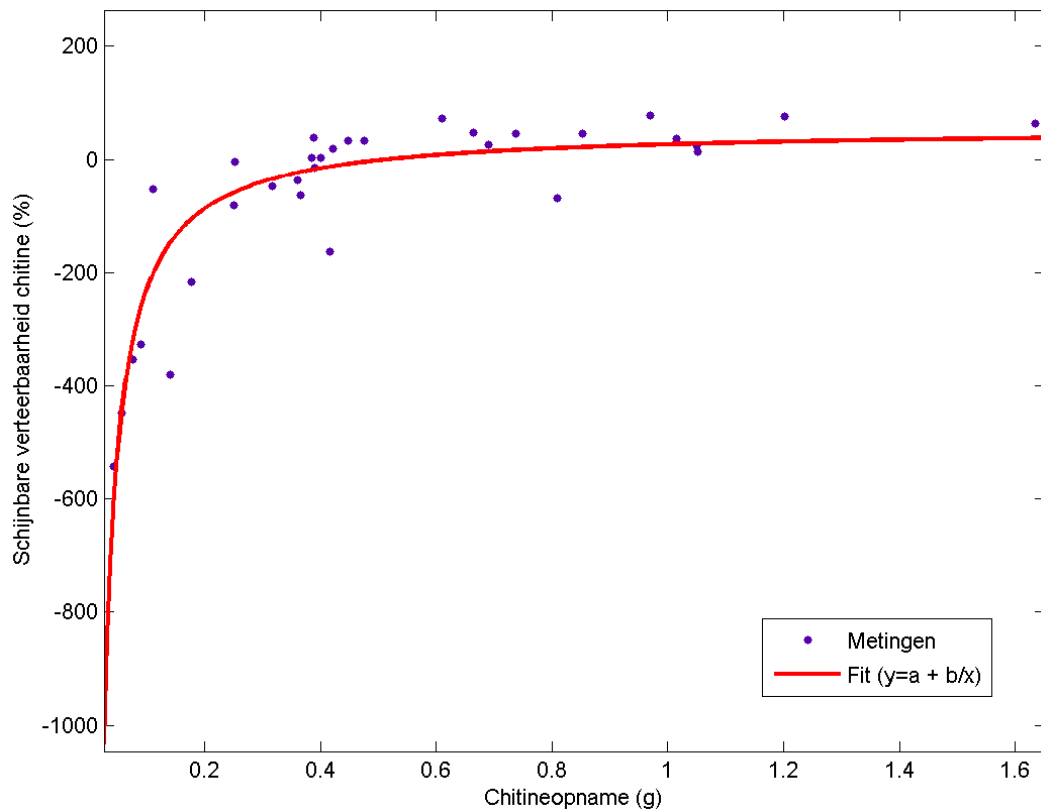


Figuur 11: Gemiddelde gewichtstoename (g) per groep ($n = 8$) uitgezet in functie van de tijd

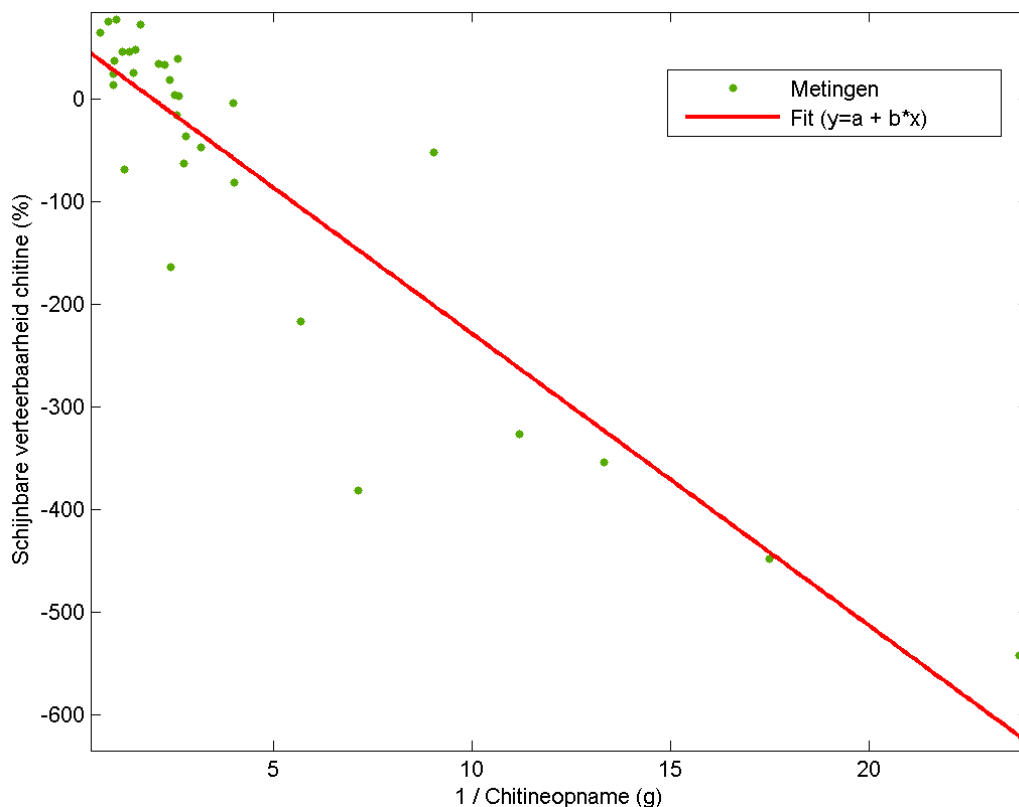
3.1.2. Chitineverteerbaarheid

Gedurende vier opeenvolgende weken werden de voederopname en fecesuitscheiding van de kuikens opgevolgd om een schatting van de chitineverteerbaarheid te maken. In eerste instantie werd de schijnbare chitineverteerbaarheid berekend volgens de formule uit hoofdstuk '2.1.3.1. Chitineanalyse en bepaling van de gestandaardiseerde chitineverteerbaarheid'. Voor een aantal observaties leverde dit echter negatieve waarden op. Daarnaast bleek uit analyse van de data dat de droge stofopname (en bijgevolg ook chitineopname) en fecesuitscheiding niet altijd positief gecorreleerd waren. Concreet betekent dit dat soms meer feces werden uitgescheiden dan er voeder werd opgenomen. Dit kan verklaard worden door het optreden van basale (forfaitaire) endogene verliezen, welke voornamelijk van belang zijn bij een laag voederopnameniveau. De gestandaardiseerde verteerbaarheid van chitine over vier weken werd geschat via een invers regressiemodel (Figuur 12) en via een lineair regressiemodel (Figuur 13). Uit de hoge determinatiecoëfficiënt ($R^2 = 0,817$) blijkt dat de relatie tussen schijnbare verteerbaarheid van chitine en de chitineopname sterk is. Variatie in de ene variabele kan bijgevolg verklaard worden door variatie in de andere variabele. De gestandaardiseerde verteerbaarheid bedroeg hier voor beide modellen

55,1 ± 16,6 %. De gestandaardiseerde verteerbaarheid van chitine werd ook afzonderlijk voor de buiten- en binnengehuisveste kippen bekeken en bedroeg respectievelijk 60,6% en 59,0%.



Figuur 12: Schijnbare verteerbaarheid van chitine (%) (y-as) in functie van chitineopname (g) (x-as) volgens het invers regressiemodel ($y = 55,11 - 28,42 / x$) met $N = 32$, $R^2 = 0,817$, $SD = 16,564$. Hoe minder voeder (en dus hoe minder chitine) wordt opgenomen, hoe zwaarder basale (forfaitaire) endogene verliezen doorwegen en des te lager de schijnbare verteerbaarheid van chitine uitvalt. Naarmate meer chitine wordt opgenomen, zal de schijnbare verteerbaarheid geleidelijk toenemen en uiteindelijk afvlakken en naar 100% evolueren. De forfaitaire endogene verliezen zijn dan verwaarloosbaar.



Figuur 13: Schijnbare verteerbaarheid van chitine (%) (y-as) in functie van $\text{chitineopname}^{-1}$ (g) (x-as) volgens het lineair regressiemodel ($y = 55,11 - 28,42 \times x$) met $N = 32$, $R^2 = 0,817$, $SD = 16,564$

3.1.3. Chemische samenstelling van de mopaneworm

Voor het uitvoeren van de verteerbaarheidsproeven bij de kuikens werd een chitinerijk substraat gevoederd. Omwille van de commerciële beschikbaarheid werd geopteerd voor de Zuid-Afrikaanse mopaneworm. Twee stalen mopanewormen werden telkens in drievoud geanalyseerd voor as, vet, eiwit, ruwe celstof en chitine. De gemiddelde waarden met hun standaarddeviatie (SD) worden weergegeven in Tabel 5. De meetwaarden voor ruw eiwit, ruw vet, as en ruwe celstof stemmen overeen met wat gerapporteerd werd in eerdere studies (Bukkens, 1997; van Huis *et al.*, 2013). De gevonden waarden voor ruw eiwit en ruw vet liggen iets lager dan de waarden van Moreki *et al.* (2012). Deze onderzoekers vonden een ruw eiwitgehalte van 55% en een ruw vetgehalte van 16,7%. De aswaarde die in deze studie gevonden werd (12%), was beduidend hoger dan degene uit de studie van Moreki *et al.* (5,8%). Een mogelijke verklaring hiervoor is dat het maag-darmstelsel van de mopanewormen in deze studie niet volledig leeg was, maar nog een aanzienlijke hoeveelheid bladeren of hout van de mopaneboom bevatte. Moreki *et al.* (2012) bekwamen een ADF van 16%, waarvan 0,9% onoplosbare stikstof. Dit is bijna het dubbele van het chitinegehalte gevonden in deze onderzoeksthesis (8,9%). Dit doet vermoeden dat met de ADF-bepaling zowel vezels als chitine worden opgepikt. Madibela *et al.* (2007) rapporteerden voor mopanewormen een chitinegehalte dat drie keer zo hoog was als de waarde gevonden in deze onderzoeksthesis. Ook hier kan het gebruik van de ADF-bepaling als maat voor chitine het grote verschil in waarde verklaren.

Tabel 5: Chemische samenstelling en chitinegehalte (gemiddelde \pm SD) van de mopaneworm^a

Nutriënt	Mopaneworm
Ruw eiwit ^a	53,3 \pm 0,70
Chitine	8,9 \pm 1,6
Ruw vet	13,7 \pm 0,82
As	12,0 \pm 0,86
Ruwe celstof	9,4 \pm 0,73
Ruwe celstof met correctie ^b	7,2 \pm 0,20

^aDroge stof basis (g / 100 g)^bRuw eiwit = Totaal percentage stikstof \times 6,25^cCorrectie voor as

3.2. UITWERKEN VAN EEN BETROUWBARE CHITINE ANALYSEMETHODE

3.2.1. Chemische samenstelling van de verschillende substraten

De chemische samenstelling, het chitinegehalte en het stikstofgehalte in het chitineresidu van de substraten worden weergegeven in Tabel 6 als gemiddelden met hun standaarddeviatie.

Tabel 6: Chemische samenstelling, chitinegehalte en N-chitine (gemiddelde \pm SD) van de substraten^a

	Ruw eiwit ^b	Chitine	Gecorr. chitine ^c	N-chitine	As	Onopl. as	Ruw vet
Zaagsel	4,41 \pm 1,3	57,55 \pm 0,57	57,51 \pm 0,58	0,32 \pm 0,40	0,03 \pm 0,02	0,04 \pm 0,00	0,19 \pm 0,54
Cellulose	4,38 \pm 0,74	-0,13 \pm 0,30	-0,17 \pm 0,31	0,00 \pm 0,05	7,21 \pm 0,06	0,01 \pm 0,01	0,25 \pm 0,46
Sojahullen	14,51 \pm 0,13	22,48 \pm 1,6	22,14 \pm 1,6	0,38 \pm 0,04	4,64 \pm 0,00	0,34 \pm 0,01	1,26 \pm 0,04
Tarwezemelen	19,4 \pm 0,94	5,0 \pm 2,2	5,0 \pm 2,2	-0,03 \pm 0,03	0,61 \pm 0,01	0,04 \pm 0,00	1,3 \pm 0,02
Collageen rund	99,1 \pm 1,1	0,51 \pm 0,76	0,42 \pm 0,76	-0,08 \pm 0,02	2,0 \pm 0,01	0,08 \pm 0,00	0,59 \pm 0,21
Collageen varken	90,8 \pm 0,09	23,0 \pm 0,18	23,0 \pm 0,18	0,14 \pm 0,20	0,49 \pm 0,13	0,23 \pm 0,00	0,90 \pm 0,03
Verenmeel	89,6 \pm 0,78	-0,55 \pm 2,3	-0,63 \pm 2,3	0,04 \pm 0,06	3,7 \pm 0,22	0,08 \pm 0,04	1,0 \pm 0,06
Caseïne	87,4 \pm 1,4	-0,60 \pm 0,38	-0,82 \pm 0,37	-0,04 \pm 0,00	5,9 \pm 0,04	0,01 \pm 0,01	3,1 \pm 0,10
Paddenstoel	32,8 \pm 0,10	9,4 \pm 0,99	8,4 \pm 0,98	0,46 \pm 0,14	7,2 \pm 0,00	0,92 \pm 0,00	3,1 \pm 0,03
Gist	44,8 \pm 0,65	5,0 \pm 0,77	4,9 \pm 0,77	0,17 \pm 0,09	5,3 \pm 0,14	0,02 \pm 0,00	1,4 \pm 0,11
Chitine	38,5 \pm 0,32	97,3 \pm 0,71	97,3 \pm 0,71	5,5 \pm 0,24	1,6 \pm 0,02	0,02 \pm 0,00	10,1 \pm 0,11
Garnaal	62,7 \pm 0,67	2,6 \pm 4,3	1,5 \pm 4,3	0,16 \pm 0,09	18,2 \pm 0,03	1,2 \pm 0,00	3,1 \pm 0,00
Zoetwatervlo- kreeft	49,5 \pm 0,14	4,4 \pm 0,66	3,9 \pm 0,66	0,29 \pm 0,02	21,7 \pm 0,00	0,48 \pm 0,00	7,0 \pm 0,14
Meelworm ^{d1}	73,4 \pm 0,15	16,3 \pm 0,42	16,3 \pm 0,42	0,83 \pm 0,01	3,5 \pm 0,03	0,04 \pm 0,00	12,0 \pm 0,10
Meelworm ^{d2}	51,0 \pm 0,54	11,7 \pm 0,09	11,7 \pm 0,10	0,23 \pm 0,42	3,3 \pm 0,06	0,03 \pm 0,01	16,1 \pm 4,5
Meelworm ^{d3}	61,2 \pm 3,6	8,9 \pm 0,54	8,8 \pm 0,55	0,52 \pm 0,09	4,0 \pm 0,04	0,04 \pm 0,00	20,8 \pm 7,7
Meelworm ^{d4}	49,3 \pm 4,0	7,7 \pm 1,8	7,7 \pm 1,7	0,43 \pm 0,08	3,1 \pm 0,08	0,01 \pm 0,01	31,8 \pm 3,4

	Ruw eiwit ^b	Chitine	Gecorr. chitine ^c	N-chitine	As	Onopl. as	Ruw vet
Meelworm ^{d5}	60,7 ± 0,28	6,9 ± 0,65	6,9 ± 0,65	1,0 ± 0,05	3,4 ± 0,03	0,01 ± 0,00	26,9 ± 1,8
Afrikaanse treksprinkhaan ^{e1}	61,4 ± 2,3	13,5 ± 0,21	13,4 ± 0,22	0,70 ± 0,06	3,6 ± 0,09	0,05 ± 0,01	23,4 ± 1,2
Afrikaanse treksprinkhaan ^{e2}	60,5 ± 0,67	15,8 ± 0,30	15,7 ± 0,31	0,87 ± 0,12	2,9 ± 0,03	0,03 ± 0,01	30,9 ± 4,4
Zwarte soldaatvlieg	52,8 ± 0,13	8,7 ± 0,14	8,7 ± 0,14	0,51 ± 0,06	3,2 ± 0,02	0,01 ± 0,00	31,7 ± 4,9
Poppen zwarte soldaatvlieg	47,6 ± 0,25	24,2 ± 1,6	23,9 ± 1,6	1,8 ± 0,48	24,1 ± 0,07	0,28 ± 0,00	7,1 ± 0,03
Wasmot (rups) geblancheerd	37,4 ± 0,93	5,3 ± 0,75	5,3 ± 0,74	0,30 ± 0,10	2,2 ± 0,09	0,04 ± 0,01	47,3 ± 0,96
Buffaloworm (larve)	53,1 ± 0,48	9,7 ± 0,70	9,6 ± 0,71	0,68 ± 0,12	3,4 ± 0,16	0,11 ± 0,02	9,7 ± 0,07

^aDroge stof basis (g / 100 g)

^bRuw eiwit = Totaal percentage stikstof × 6,25

^cChitine gecorrigeerd voor as

^{d1}Meelworm (adult, enkel tarwezemelen), ^{d2}Meelworm (larve, enkel tarwezemelen, 10 dagen uitgevast), ^{d3}Meelworm (larve, tarwezemelen+haver, niet-uitgevast), ^{d4}Meelworm (larve), ^{d5}Meelworm (pop, enkel tarwezemelen)

^{e1}Afrikaanse treksprinkhaan (*instar* 5-6), ^{e2}Afrikaanse treksprinkhaan (adult)

De gevonden waarden voor eiwit en vet komen over het algemeen goed overeen met de referentiewaarden uit de literatuur (Bijlage I). Lichte variatie in eiwit- en vetgehaltes binnen eenzelfde insectspecies is mogelijk door individuele verschillen (voeding, geslacht, groeistadium) en/of omgevingsverschillen (bodemsamenstelling, seizoen, locatie). Ook tussen de species bestaat een grote variatie in nutriëtsamenstelling, die grotendeels kan toegeschreven worden aan verschillen in voeding en groeistadium (Bukkens, 1997; Pieterse en Pretorius, 2014). Het vetgehalte van de insecten varieerde in deze studie van 7 tot 47%. De variatie in vetgehalte binnen eenzelfde insectspecies was opvallend groter bij insecten die voorafgaand aan de vetextractie niet gemalen werden. Dit wijst erop dat voorafgaande homogenisatie van een staal noodzakelijk is om de standaardfout te minimaliseren. Omwille van praktische redenen was dit echter niet haalbaar. Net zoals in andere studies (Bernard *et al.*, 1997; Barker *et al.*, 1998) werden voor de larvale stadia hogere vetgehaltes en lagere eiwitgehaltes gevonden dan voor de adulte stadia. Voor poppen werden hogere vetgehaltes en lagere eiwitgehaltes gevonden dan voor larven. Binnen de larvale stadia van de meelworm werden lagere eiwit- en vetgehaltes gevonden voor de uitgevaste wormen in vergelijking met de niet-uitgevaste wormen. Tussen de volwassen stadia en de *instar*stadia van de Afrikaanse treksprinkhaan werden geen grote verschillen in eiwit- en vetgehaltes waargenomen omdat het hier om het laatste *instar*stadium ging.

Zoals Xiaoming *et al.* (2010) reeds aangaven, bestaat er veel variatie (13 - 77%) in eiwitgehalte tussen en binnen verschillende insectspecies. Naast voeding en ontwikkelingsstadium beïnvloedt ook de droogmethode en het al dan niet in rekening brengen van niet-eiwit stikstof het eiwitgehalte (Bernard *et al.*, 1997; Aniebo en Owen, 2010; Oonincx en Dierenfeld, 2012). Voor insecten werden in deze studie over het algemeen zeer hoge eiwitwaarden gevonden met de hoogste waarde (73%) voor

adulte meelwormen en de laagste waarde voor de wasmotrups (37%). Ook voor de niet-insecten kwamen de gevonden waarden voor vet en eiwit goed overeen met de referentiewaarden uit de literatuur. Kleine verschillen tussen verschillende bronnen zijn toe te schrijven aan variatie in analysemethoden tussen de verschillende laboratoria. Daarnaast werd door gebrek aan bestaande literatuur de chemische samenstelling van de zoetwatervlokreeft (*Gammarus pulex*) en de garnaal (*Macrobrachium nipponense*) vergeleken met andere species. In deze studie werden voor schaaldieren hoge eiwitwaarden (49,50 - 62,67%) en lage vetwaarden (3,1 - 7,0%) waargenomen. Voor sojahu en tarwezemelen werden iets hogere eiwitgehalten (14,5 - 19,4%) en lagere vetgehalten (1,26 - 1,28%) waargenomen dan beschreven in de literatuur. De variatie in eiwit- en vetgehalte in sojahu en tarwezemelen kan verklaard worden doordat het geen zuivere producten, maar afgeleide producten van respectievelijk sojabonen en tarwegraan zijn.

Gegevens over het chitinegehalte en het stikstofgehalte in chitine zijn schaarser dan data over vet- en eiwitgehalten. Bijgevolg konden de chitinegehalten slechts voor enkele species vergeleken worden met de literatuur. De gevonden chitinegehalten verschillen soms sterk van waarden uit de literatuur doordat andere studies hoofdzakelijk chitine bepalen via methoden voor plantaardige vezels (Lovell *et al.*, 1968; Watkins *et al.*, 1982; Stelmock *et al.*, 1985; Jackson *et al.*, 1992; Weiser *et al.*, 1997; Akaki en Duke, 1999). Finke (2007) berekende het chitinegehalte van insecten als de ADF-fractie gecorrigeerd voor het aandeel aminozuren in de ADF-fractie. Hierbij werd voor adulte gele meelwormen een chitinegehalte van 13,7% gevonden. Dit is lager dan de waarde die in deze studie gevonden werd voor de volwassen meelworm (16,3%). De chitinegehalten waren lager voor de poppen (6,9%) en de larven (7,7 - 11,7%) van de meelworm. Uit de resultaten bleek dat ook de adulte Afrikaanse treksprinkhaan (15,8%) meer chitine bevatte dan de *instar*stadia (13,5%). Voor uitgevaste meelwormlarven werden hogere chitinegehalten (11,7%) gevonden dan voor de niet-uitgevaste larven (7,7 - 8,9%). Vermoedelijk creëert de aanwezigheid van materiaal in het spijsverteringsstelsel een verdunningseffect waardoor minder chitine wordt gemeten. Het chitinegehalte van de buffalowormlarve bedroeg 9,7%. Finke (2007) vond voor wasmotlarven een chitinegehalte van 3,8%, wat 1,5% lager is dan de waarde die in deze studie voor de geblancheerde wasmotrups (5,3%) werd gevonden. Kroeckel *et al.* (2012) gebruikten het protocol van Lovell *et al.* (1968) en bekwamen voor *prepupa*meel van de zwarte soldaatvlieg een chitinegehalte van 9,6%. Dit is in lijn met het chitinegehalte dat in deze onderzoeksthesis voor de adulte zwarte soldaatvlieg (8,7%) werd gevonden, maar lager dan het chitinegehalte gevonden voor de poppen (24,2%).

Voor schaaldieren werden in deze studie lagere chitinegehalten (2,64 - 4,40%) teruggevonden dan voor insecten (5,32 - 16,29%). Lovell *et al.* (1968) gebruikten voor bepaling van het chitinegehalte in zoetwaterkreeftmeel een behandeling met zuur (HCl) en alkali (NaOH). Met deze methode werd in zoetwaterkreeftmeel 14,1% chitine gedetecteerd. Lubitz *et al.* (1943) bepaalden ruwe vezel (CF) als maat voor chitine in krabbenmeel en vonden een gehalte van 12,9%. Watkins *et al.* (1982) gingen het chitinegehalte na via demineralisatie met mierenzuur en eiwitextractie met natriumhydroxide. Voor garnaalafval, garnaalmeel en gezeefd garnaalmeel werden chitinegehalten van respectievelijk 19,3%, 17,6% en 10,6% teruggevonden. Stelmock *et al.* (1985) gebruikten de ADF-methode van Van Soest

om chitine te bepalen in krabmeel en vonden een chitinegehalte van 17,8%. Hieruit kan geconcludeerd worden dat eerder gerapporteerde chitinegehaltenes voor schaaldieren en afgeleide producten beduidend hoger liggen dan de waarden die in deze onderzoeksthesis met het protocol van Liu *et al.* (2012) werden gevonden (4,4% voor de zoetwatervlokreeft en 2,6% voor de garnaal). Voor zuiver schaaldierchitine werd in deze studie een chitinegehalte van 97,3% gevonden. Uit de resultaten bleek dat ook paddenstoelen (9,3%) en gisten (5,0%) een aanzienlijke hoeveelheid chitine bevatten. Manzi *et al.* (2004) vonden een gelijkaardig chitinegehalte voor de fungus *Boletus* spp. (6,8 – 10,2%). Ook het chitinegehalte voor bakkersgist was in lijn met wat eerder gerapporteerd werd voor gisten (2,1 – 7,7%) (Nguyen *et al.*, 1998). Voor de substraten die geen chitine bevatten, werden de hoogste chitinegehaltenes gevonden voor zaagsel (57,6%), sojahullen (22,5%) en varkenscollageen (23%). Lagere waarden werden gevonden voor tarwezemelen (5%), rundercollageen (0,51%), cellulose (-0,13%), verenmeel (-0,55%) en caseïne (-0,60%).

Asgehaltenes varieerden in deze studie van 0,03% (zaagsel) tot 24,1% (poppen van de zwarte soldaatvlieg). Ook voor de garnaal (18%) en zoetwatervlokreeft (22%) werden hoge aswaarden gevonden. De onoplosbare asgehaltenes waren in deze studie over het algemeen zeer laag. Voor de garnaal werd de hoogste onoplosbare aswaarde vastgesteld (1,1%). Ook voor de paddenstoel (0,92%) en zoetwatervlokreeft (0,48%) werden hoge waarden gemeten.

Verschillende onderzoekers rapporteerden voor schaaldieren (Watkins *et al.*, 1982; Stelmock *et al.*, 1985) en insecten (Kroeckel *et al.*, 2012) eiwitgehaltenes gecorrigeerd voor chitine. Het gecorrigeerde ruw eiwitgehalte werd in deze studies berekend als (totaal stikstof – stikstof in chitine) \times 6,25. Ook in deze onderzoeksthesis werden de gecorrigeerde ruw eiwitgehaltenes (Tabel 7) berekend en vergeleken met de ruw eiwitgehaltenes. Voor 22 van de 24 substraten (exclusief poppen van de zwarte soldaatvlieg en chitine) stemden de waarden goed tot heel goed overeen. Dit betekent dat voor het merendeel van de substraten (ook voor insecten) de formule stikstof \times 6,25 een goede benadering van het eiwitgehalte geeft en geen overschatting is (Finke, 2007). Wanneer het percentage N-chitine gekend is, kan het chitinegehalte berekend worden als % N-chitine vermenigvuldigd met factor 14,6 (gebaseerd op 6,8% stikstof in chitine). De chitinewaarden berekend op basis van N-chitine (Tabel 7) stemden voor de meeste substraten (exclusief zaagsel, varkenscollageen, sojahullen, zemelen, chitine, uitgevaste meelwormlarve en meelwormpop) overeen met de afgewogen chitinegehaltenes uit Tabel 6.

Tabel 7: Chitine berekend uit N-chitine en gecorrigeerd eiwit (%) voor de verschillende substraten

	Chitine berekend uit N-chitine ^a	Gecorrigeerd eiwit ^b
Zaagsel	4,7	2,4
Cellulose	0,03	4,4
Sojahullen	5,6	12,1
Zemelen	-0,46	19,6
Collageen rund	-1,1	99,6
Collageen varken	2,1	89,9
Verenmeel	0,61	89,3
Caseïne	-0,55	87,7
Paddenstoel	6,8	29,9
Gist	2,5	43,7
Chitine	80,7	4,0
Garnaal	2,3	61,7
Zoetwatervlokreeft	4,3	47,7
Meelworm ^{c1}	12,1	68,2
Meelworm ^{c2}	3,4	49,5
Meelworm ^{c3}	7,6	58,0
Meelworm ^{c4}	6,3	46,6
Meelworm ^{c5}	14,6	54,5
Afrikaanse treksprinkhaan ^{d1}	10,3	57,0
Afrikaanse treksprinkhaan ^{d2}	12,6	55,1
Zwarte soldaatvlieg	7,4	49,6
Poppen	26,1	36,4
Wasmot (rups) geblancheerd	4,4	35,5
Buffaloworm (larve)	9,9	48,9

^aChitine berekend uit N-chitine = $14,6 \times \text{N-chitine}$

^bGecorrigeerd eiwit = $(\text{N-totaal} - \text{N-chitine}) \times 6,25$

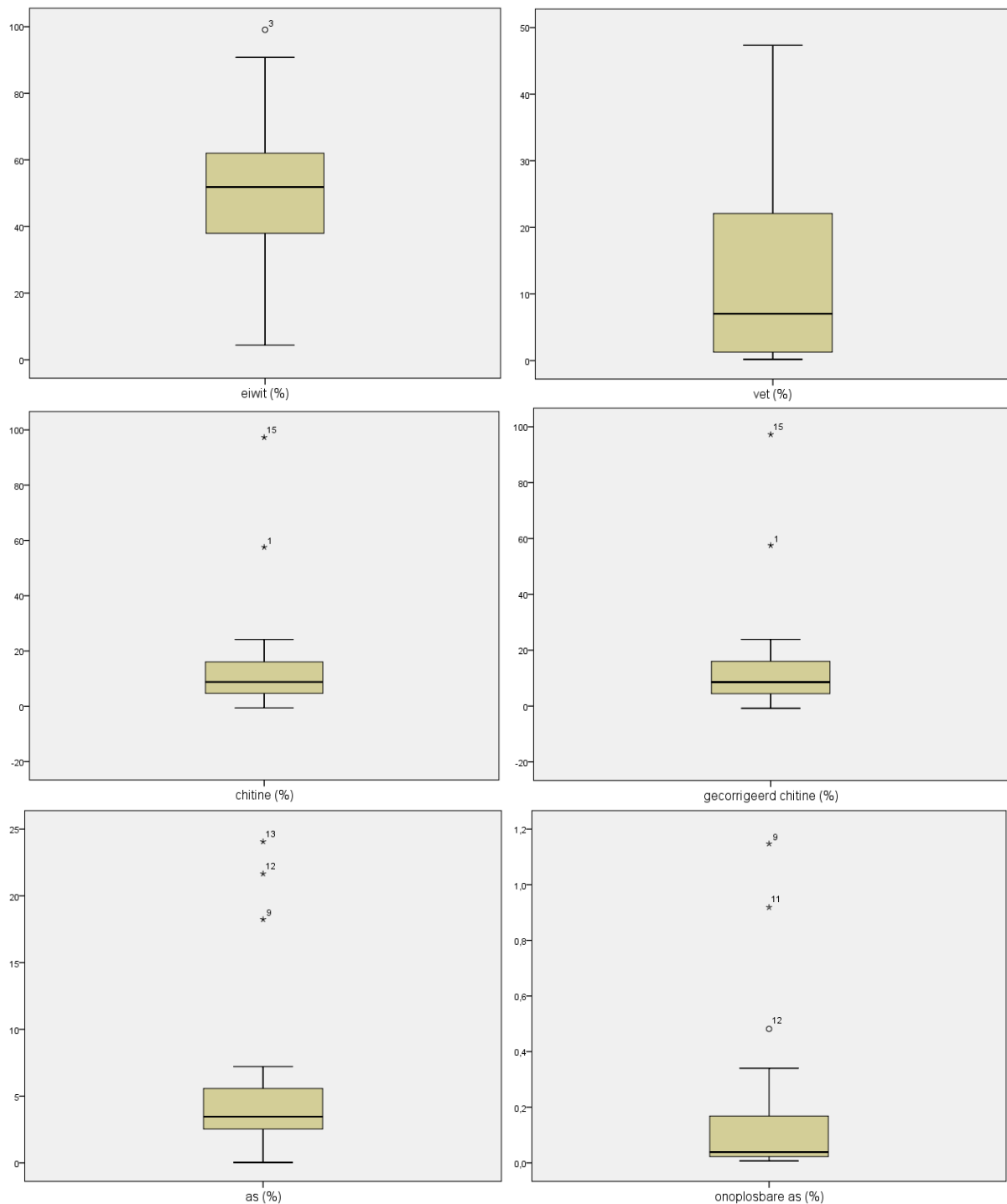
^{c1}Meelworm (adult, enkel tarwezemelen), ^{c2}Meelworm (larve, enkel tarwezemelen, 10 dagen uitgevast), ^{c3}Meelworm (larve, tarwezemelen+haver, niet-uitgevast), ^{c4}Meelworm (larve), ^{c5}Meelworm (pop, enkel tarwezemelen)

^{d1}Afrikaanse treksprinkhaan (*instar* 5-6), ^{d2}Afrikaanse treksprinkhaan (adult)

3.2.2. Statistische dataverwerking

De data van de verschillende variabelen werden een voor een grafisch bekeken via boxplots om een beeld te krijgen van de normaalverdeling van de data en mogelijke uitschieters (Figuur 14). Met uitzondering van de vetgehaltes waren de variabelen normaal verdeeld. De niet-normaalverdeling van de vetgehaltes en scheeftrekking van de boxplot moeten echter kritisch geïnterpreteerd worden. Het valt op dat voor een aantal substraten zeer hoge vetgehaltes werden gevonden. Het vetgehalte van bijvoorbeeld de wasmot bedroeg bijna de helft van de totale samenstelling van het insect. Ook voor andere insecten zoals de meelworm en Afrikaanse treksprinkhaan werden hoge vetgehaltes gemeten. Gezien variantieanalyse een zeer robuuste methode is, is het mogelijk dat extreem hoge waarden nog tot de normale populatie werden gerekend en niet als uitschieter bestempeld werden. Voor de variabele 'eiwit' werd één uitschieter (rundercollageen: 99% eiwit) gevonden. Voor de variabelen

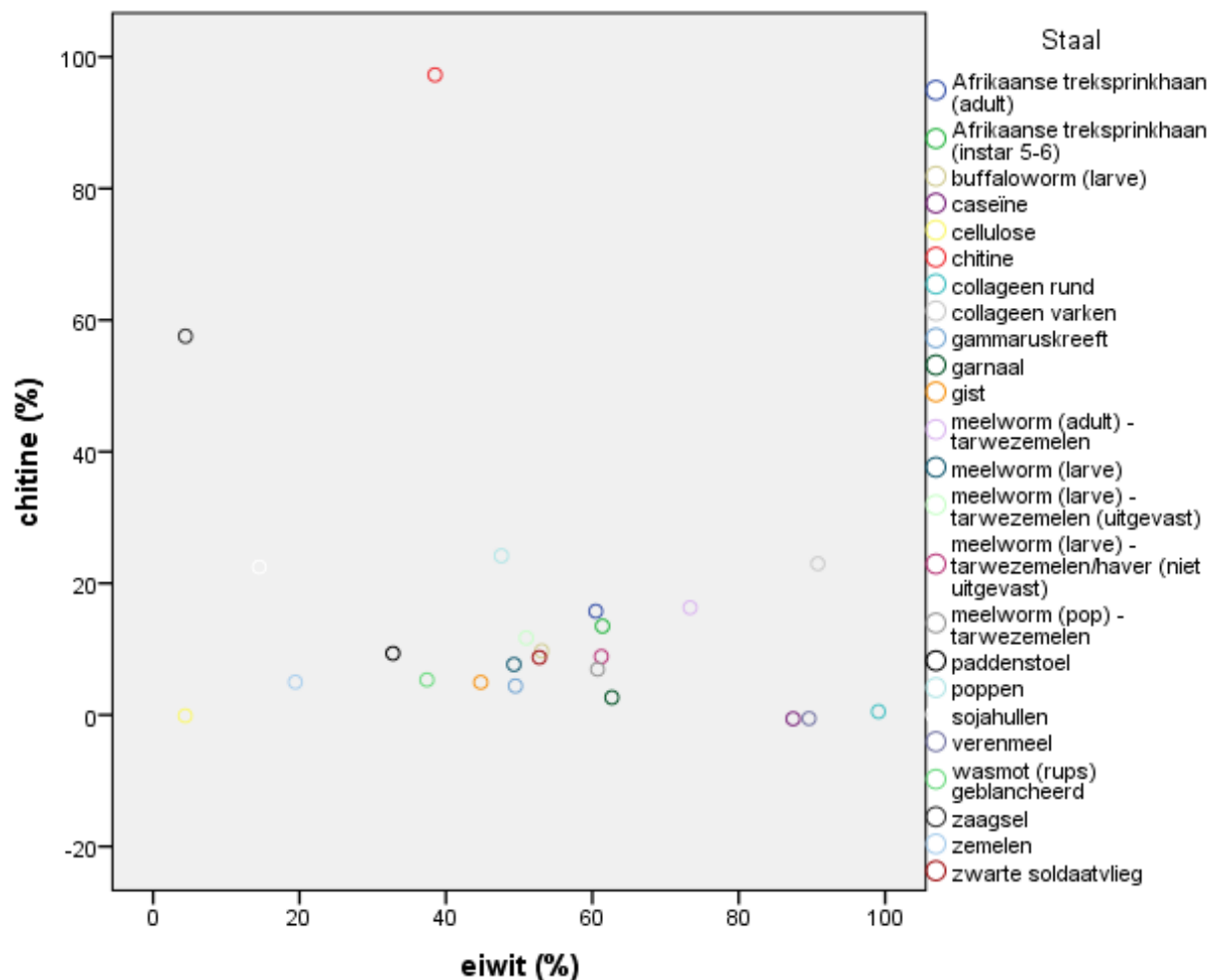
'chitine' en 'gecorrigeerd chitine' werden twee extreme uitschieters (zaagsel: 58%, chitine: 97%) gevonden.



Figuur 14: Boxplots van de variabelen 'eiwit' (%) (links boven), 'vet' (%) (rechts boven), 'chitine' (%) (links midden), 'gecorrigeerd chitine' (%) (rechts midden), 'as' (%) (links onder) en 'onoplosbare as' (%) (rechts onder). De gemiddelden met SD voor de verschillende variabelen bedragen $51,9 \pm 25,7\%$ ('eiwit'), $12,1 \pm 13,4\%$ ('vet'), $14,8 \pm 21,4\%$ ('chitine'), $14,6 \pm 21,5\%$ ('gecorrigeerd chitine'), $5,6 \pm 6,4\%$ ('as'), $0,17 \pm 0,29\%$ ('onoplosbare as').

Voor de variabele 'as' werden drie extreme uitschieters (garnaal: 18%, zoetwatervlokreeft: 22%, poppen van de zwarte soldaatvlieg: 24%) gedetecteerd. Uit de onoplosbare asgehaltenes bleek onoplosbare as amper een bijdrage te leveren aan het totale asgehalte van de poppen. Slechts 1% van het totale asgehalte was onoplosbare as. Ook voor de garnaal (1,15%) en zoetwatervlokreeft (0,48%) werden opvallend hoge aswaarden gevonden, al bleek er wel een verschil te bestaan tussen beide species. De waarde voor de zoetwatervlokreeft was een kleinere uitschieter dan die voor de garnaal. Dit impliceert dat de hoeveelheid onoplosbare as in de zoetwatervlokreeft relatief laag was ten op zichte van het totaal asgehalte. Onoplosbare as bedroeg slechts 2% van het totale asgehalte voor de zoetwatervlokreeft in tegenstelling tot 6% bij de garnaal. Ook voor paddenstoelen werden zeer hoge onoplosbare asgehaltenes teruggevonden, hoewel hiervoor geen abnormaal hoge totale aswaarden werden gevonden. Dit impliceert dat onoplosbare as in belangrijke mate bijdroeg tot het totale asgehalte van de paddenstoelen. De onoplosbare as maakte 13% uit van het totale asgehalte van de paddenstoel.

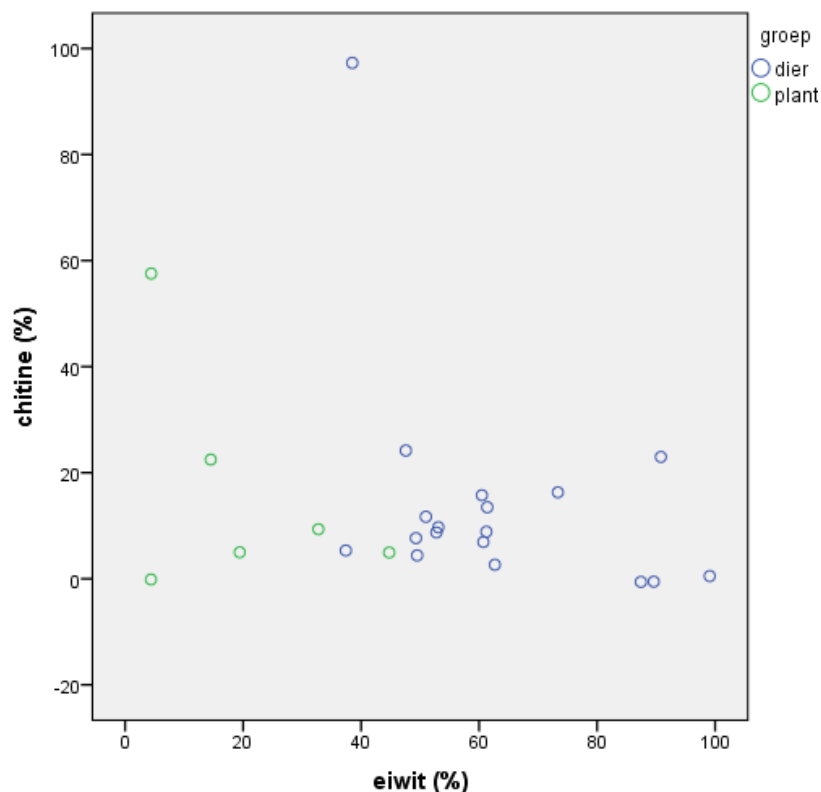
In tweede instantie werd gekeken naar een mogelijke relatie tussen de variabelen 'eiwit' en 'chitine'. Er werd een scatterdiagram gemaakt met 'chitine' als afhankelijke variabele en 'eiwit' als onafhankelijke variabele (Figuur 15).



Figuur 15: Chitinegehalte (%) uitgezet in functie van het eiwitgehalte (%) per staal

Twee substraten hadden extreme waarden: zaagsel (laag eiwitgehalte, hoog chitinegehalte) en chitine (gemiddeld eiwitgehalte, zeer hoog chitinegehalte). Visueel kon geen duidelijke relatie tussen eiwit en chitine waargenomen worden. Dit impliceert dat de variaties in eiwit en in chitine niet noodzakelijk met elkaar verband houden. Om dit vermoeden te bevestigen, werd een lineair regressiemodel gebruikt met 'chitine' als afhankelijke variabele en 'eiwit' als onafhankelijke variabele. De functie van de lineaire regressie was $y = 27,80 - 0,25 \times x$ ($R = 0,301$). De variantieanalyse (ANOVA) bevestigde dat er geen significant verband bestaat tussen het chitine- en eiwitgehalte ($P = 0,153$).

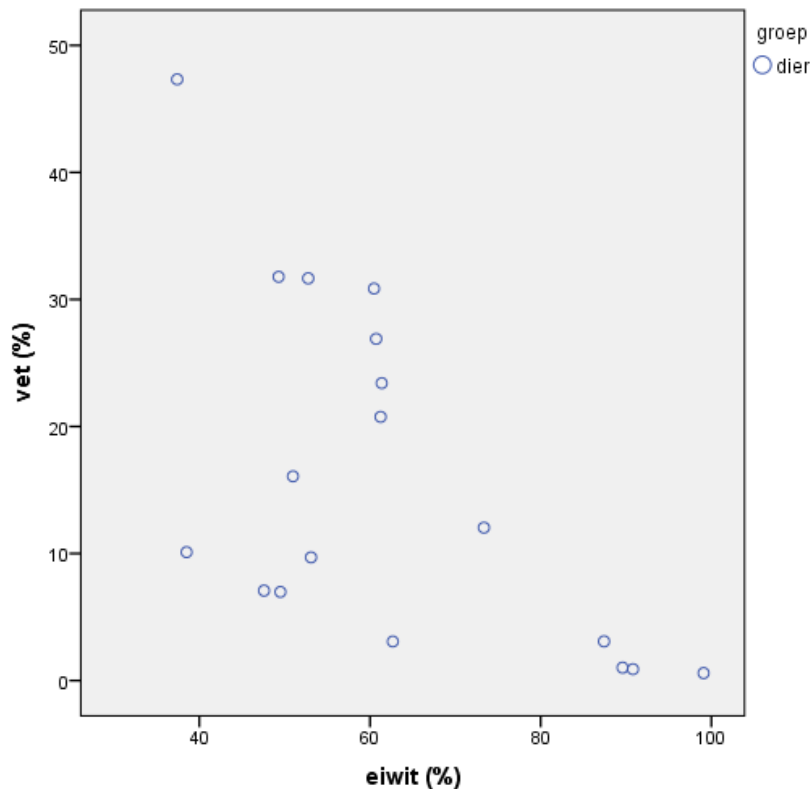
De relatie tussen eiwit en chitine werd ook bestudeerd in functie van de aard van het substraat (Figuur 16). Hiervoor werden de substraten ingedeeld in twee categorieën: plantaardige en dierlijke producten. Tot de plantaardige producten behoorden zaagsel, cellulose, sojahuilen, zemelen en paddenstoel. Gist werd bij de plantaardige producten ingedeeld, maar behoort in principe tot het rijk van de Fungi. Tot de dierlijke producten werden rundercollageen, varkenscollageen, verenmeel, caseïne, schaaldieren (garnaal, zoetwatervlokreeft), chitine en alle insecten gerekend. Plantaardige substanties groeperen zich links in het scatterdiagram omdat ze minder eiwit dan dierlijke producten bevatten en geen chitine bezitten (met uitzondering van de paddenstoel). Gist bevindt zich intermediair tussen de plantaardige producten en dierlijke organismen aangezien het kenmerken van beiden vertoont.



Figuur 16: Chitinegehalte (%) uitgezet in functie van het eiwitgehalte (%) per groep (plantaardig product of dierlijk product)

Om de samenhang tussen de paramaters 'vet', 'eiwit', 'chitine', 'as' en 'onoplosbare as' te vergelijken en lineaire verbanden op te sporen, werd een bivariate correlatieanalyse uitgevoerd. Zowel de plantaardige als de dierlijke producten werden opgenomen in deze analyse. Er werden geen

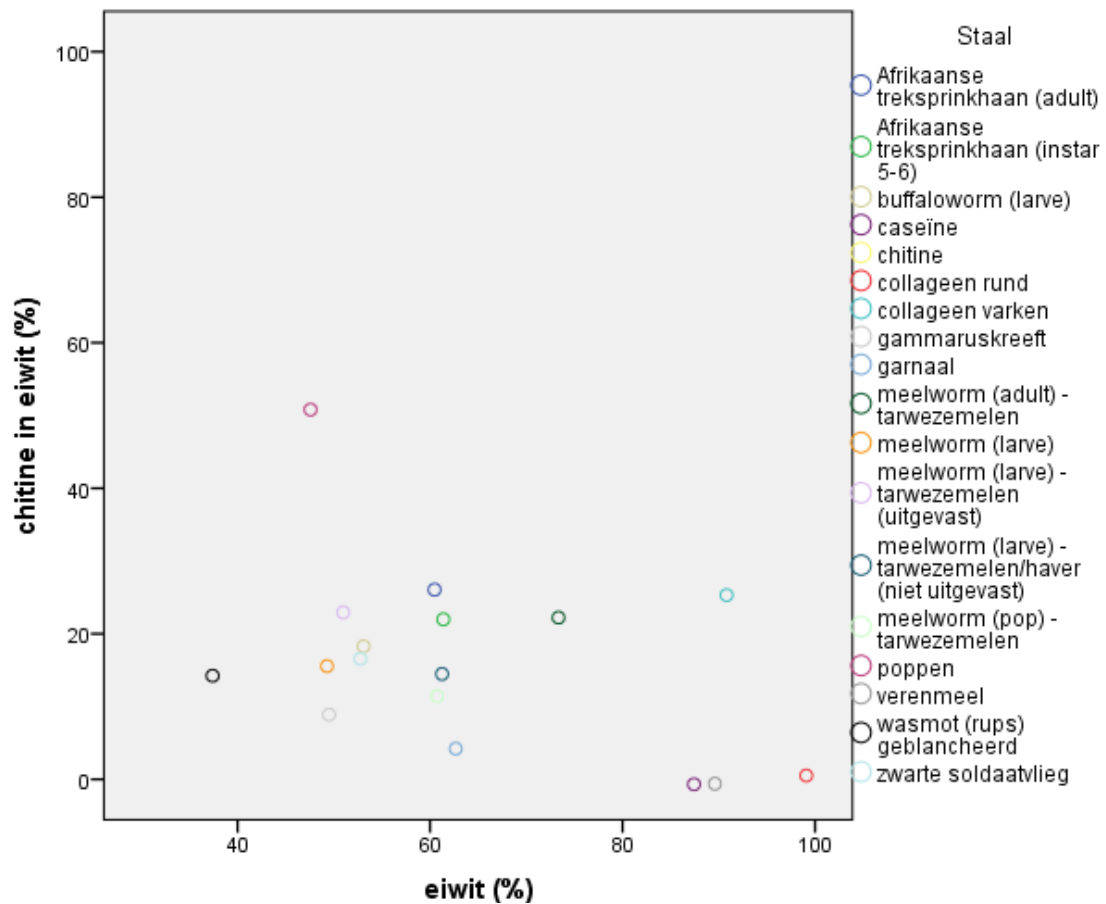
correlaties tussen de parameters gevonden. De samenhang van de verschillende parameters werd ook binnen de groep van de dierlijke producten afzonderlijk bekeken. Binnen de dierlijke producten (N = 18) werd een significante negatieve correlatie tussen eiwit en vet ($R = -0,594$, $P = 0,009$) en tussen as en onoplosbare as ($R = -0,696$, $P = 0,001$) gevonden. De correlatie tussen eiwit en vet wordt grafisch weergegeven in Figuur 17.



Figuur 17: Vetgehalte (%) uitgezet in functie van het eiwitgehalte (%) binnen de dierlijke producten

Het exoskelet van insecten bestaat uit microfibrillen opgebouwd uit aangrenzende chitineketens ingebed in een eiwitmatrix (Madibela *et al.*, 2007). Hierdoor zijn eiwit en chitine nauw geassocieerd met elkaar. Bijgevolg is het interessant om voor de dierlijke producten de variabele 'chitine in eiwit' uit te zetten ten op zichte van het eiwitgehalte (Figuur 18). Hierbij worden andere parameters zoals 'vet' buiten beschouwing gelaten en kan de zuivere relatie tussen 'chitine in eiwit' en 'eiwit' bekeken worden. Voor insecten met een hoog vetgehalte zoals de wasmot (47%) kon met deze scatterplots de invloed van een hoog vetgehalte op het chitinegehalte nagegaan worden. Uit de scatterplot blijkt dat de wasmot het minste eiwit bevat, maar nog een matig chitinegehalte heeft. Dit suggereert dat een hoog vetgehalte niets verandert aan het chitinegehalte in het exoskelet. 'Chitine in eiwit' was het laagst voor dierlijke niet-insectproducten (collageen, verenmeel, caseïne) en schaaldieren. Voor gisten werd een intermediaire waarde vastgesteld. Hogere waarden werden in toenemende grootteorde gevonden voor insecten, paddenstoelen, poppen van de zwarte soldaatvlieg en zuiver schaaldierchitine. Voor de poppen van de zwarte soldaatvlieg werden opvallend hogere 'chitine in eiwit'-waarden gemeten dan voor de poppen van de meelworm. Dit verschil kan verklaard worden doordat in de poppen van de meelworm nog redelijk wat larven aanwezig waren die het eiwitgehalte van de poppen deden toenemen. Hierdoor werd een verdunningseffect gecreëerd met lagere 'chitine

in eiwit'-waarden tot gevolg. In de poppen van de zwarte soldaatvlieg werden slechts zeer sporadisch larven teruggevonden waardoor voornamelijk chitine werd gedetecteerd en de 'chitine in eiwit'-waarden hoger lagen. Voor de plantaardige vezels werden zowel lage (cellulose) als hoge (sojahullen, zemelen) waarden waargenomen. Dit suggereert dat plantaardige vezels artefacten geven in de chitineanalyse.



Figuur 18: Chitine in eiwit (%) uitgezet in functie van het eiwitgehalte (%) in dierlijke producten

Binnen de dierlijke producten werd vervolgens een opdeling gemaakt in insecten en niet-insecten om groepsgemiddelden voor 'chitine' en 'chitine in eiwit' tussen beide groepen te vergelijken. Het substraat zuiver schaaldierchitine werd niet opgenomen in de vergelijking. Voor 'chitine in eiwit' werd een significant verschil ($P = 0,013$) gevonden tussen beide groepen. Voor 'chitine' werd geen significant verschil gedetecteerd tussen beide groepen ($P = 0,07$). Voor 'chitine' in de niet-insectengroep werd een gemiddelde met SD van $4,9 \pm 9,1\%$ gevonden en voor de groep van de insecten $11,7 \pm 5,5\%$. Het gemiddelde met SD van 'chitine in eiwit' bedroeg voor de niet-insectengroep $6,3 \pm 10,0\%$ en voor de insectengroep $21,3 \pm 10,8\%$.

4. DISCUSSIE

4.1. CHITINEVERTEERBAARHEIDSSSTUDIE BIJ KIPPEN

Na correctie voor basale endogene verliezen (via het uitzetten van de schijnbare verteerbaarheid van chitine ten op zichte van de chitineopname), werd voor kuikens van twee tot zes weken oud een gestandaardiseerde chitineverteerbaarheid van gemiddeld $55 \pm 16\%$ gevonden. Deze waarde stemt overeen met wat andere onderzoekers voor zeevogels ($56,8 \pm 23,2\%$; Jackson *et al.*, 1992) en de Japanse nachtegaal ($56,8\%$; Jeuniaux en Cornelius, 1978) vonden, maar is beduidend hoger dan wat Jeuniaux en Cornelius (1978) voor twee weken oude vleeskuikens ($23,5 - 31,7\%$) vonden. Een eerste reden om dit verschil te verklaren, is de oorsprong van het chitine. Jeuniaux en Cornelius (1978) gebruikten in hun studie zuiver garnaalchitine, terwijl in deze studie intacte insecten werden gebruikt. De lagere chitineverteerbaarheid voor schaaldierchitine doet vermoeden dat schaaldierchitine en insectchitine structureel gezien niet 100% identiek zijn en dit heeft zijn weerslag op de verteerbaarheidsefficiëntie. Een tweede reden is dat in deze studie enkel de gemiddelde verteerbaarheid over de totale vier weken werd bekeken en mogelijke piekeffecten in chitinaseactiviteit over het hoofd werden gezien. Het is mogelijk dat de chitineverteerbaarheid voor twee weken oude kippen in deze studie gelijkaardig was aan degene gevonden door Jeuniaux en Cornelius (1978), maar dat vanaf de tweede levensweek de chitinaseactiviteit sterk toenam. Bijgevolg neemt ook de gemiddelde chitineverteerbaarheid over vier weken toe. Ook Suzuki *et al.* (2002) meenden dat chitinaseactiviteit progressief toeneemt met de leeftijd. Chitinaseactiviteit was reeds aanwezig bij zeven dagen oude kippenembryo's en ontwikkelde zich verder na het uitbroeden. Dit suggereert dat de chitineverteerbaarheid van $55 \pm 16\%$ die in deze studie gevonden werd voor twee tot zes weken oude kuikens waarschijnlijk hoger is voor volwassen kippen. Hirano *et al.* (1990) vonden voor volwassen kippen een chitineverteerbaarheid van $67 - 92\%$.

Hossain en Blair (2007) onderzochten gedurende drie weken het effect van supplementatie met verschillende concentraties commercieel schaaldierchitine op de lichaamssamenstelling van eendagskuikens. In hun studie werd een ware chitineverteerbaarheid van 87% gerapporteerd. Ook hier kan opgemerkt worden dat een verschil in soort chitine mogelijks aan de basis ligt van het verschil in verteerbaarheid. In tegenstelling tot in de studie van Jeuniaux en Cornelius (1978) werd in de studie van Hossain en Blair (2007) een hogere chitineverteerbaarheid gerapporteerd voor schaaldierchitine. Verder onderzoek moet uitwijzen of er structurele verschillen bestaan tussen insect- en schaaldierchitine en of dit gevolgen heeft voor de verteerbaarheid. Momenteel zijn er slechts enkele studies gekend die chitine uit insecten hebben geïsoleerd, gekarakteriseerd en vergeleken met schaaldierchitine (Zhang *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2012). Liu *et al.* (2012) analyseerden de structuur van chitine geïsoleerd uit de kever *Holotrichia parallela* met X-stralen kristallografie, scanning elektronenmicroscopie (SEM) en nucleaire magnetische resonantie (NMR). Deze onderzoekers kwamen tot de conclusie dat de chemische structuur en fysico-chemische eigenschappen van insectchitine en garnaalchitine gelijkaardig zijn. Zhang *et al.* (2000) gebruikten dezelfde analysemethoden om de structuur van chitine geïsoleerd uit zijdwormpoppen en keverlarven te

identificeren en vergeleken deze met garnaalchitine. Aanwezigheid van catecholcomponenten in de cuticula van insecten leidde tot snellere afbraak en N-deacetylering van chitine door HCl en chitinase. Daarenboven beïnvloedden de catecholcomponenten de semi-kristallijne morfologie en de grootte van de kristallamellen. Dit resulteerde in een lagere kristalliniteit voor insectchitine. Uit deze twee studies blijkt dat mogelijke structurele verschillen tussen insect- en schaaldierchitine nog verder onderzocht moeten worden.

Ondanks grote verschillen in chitineverteerbaarheid tussen de kuikens onderling (cf. hoge standaarddeviatie), kan geconcludeerd worden dat kippen reeds op jonge leeftijd een groot deel van het chitine uit insecten kunnen verwerken. De kuikens waren in staat een aanzienlijk deel van het met de voeding opgenomen chitine af te breken en konden meer dan de helft van het chitine weerhouden. Mogelijks kan het includeren van een adaptatieperiode met insectenvoeder de verteerbaarheidsefficiëntie nog doen toenemen omdat de microflora in de darm zich dan kunnen aanpassen aan het nieuwe voeder. Chitine wordt door verschillende onderzoekers (Razdan en Pettersson, 1994; Barker *et al.*, 1998; Finke, 2007) als vezel bestempeld. Als deze hypothese gevolgd wordt, heeft het gevonden verteerbaarheidscijfer een aanvaardbare waarde. Vezels zijn namelijk over het algemeen slecht verteerbaar en een verteerbaarheid van 55% voor vezelachtige substanties is hoog. In vergelijking met hemicellulose, een andere onoplosbare vezel, ligt de verteerbaarheid van chitine zelfs hoger. Jamroz *et al.* (2001) vonden voor hemicellulose bij zes weken oude kippen een schijnbare verteerbaarheid van 50%.

Welke mechanismen instaan voor de afbraak van chitine en hoe deze afbraakproducten van nut kunnen zijn voor het dier is nog niet volledig opgehelderd. Vermoedelijk spelen zowel endogene (kliermaag) als exogene (voedsel) chitinasen een rol bij de afbraak van chitine (Jackson *et al.*, 1992; Akaki en Duke, 1999; Suzuki *et al.*, 2002). Bij kippen situeert de endogene chitinaseactiviteit zich hoofdzakelijk in de kliermaag (Han *et al.*, 1997; Suzuki *et al.*, 2002; Koh en Iwamae, 2013). Er wordt verondersteld dat chitinasen endogene, constitutieve enzymen zijn die zich reeds in de embryonale fase manifesteren (Suzuki *et al.*, 2002). Bijgevolg kan synthese van chitinolytische enzymen beschouwd worden als een primair kenmerk dat niet verworven of verloren kan worden door het eten van respectievelijk chitinerijk of chitinearm voedsel (Jeuniaux en Cornelius, 1978; Jackson *et al.*, 1992; Koh en Iwamai, 2013). Dit werd in deze onderzoeksthesis bevestigd aangezien de jonge kuikens uit de binnengroep nooit eerder in contact waren gekomen met insecten en toch in staat waren chitine gedeeltelijk te verteren. Er werd bovendien geen significant verschil in chitinaseactiviteit tussen binnen- en buitengehuisveste kippen vastgesteld.

Aanwezigheid van chitinaseactiviteit heeft tot gevolg dat afbraakproducten van chitine mogelijks kunnen aangesproken worden als energiebron. Endogene chitinasen breken het chitine af tot chito-oligosacchariden waarna deze componenten door N-acetylglucosaminidases (NAGase) omgezet worden tot N-acetylglucosaminemonomeren (Hartl *et al.*, 2012; Koh en Iwamai, 2013). Jackson *et al.* (1992) suggereerden reeds dat NAG, het afbraakproduct van chitine, kan fungeren als metabole brandstof of betrokken is bij de celwandsynthese in de darm via stimulatie van de microflora. N-acetylglucosamine kan namelijk afgebroken worden tot acetyl-CoA en glucosamine. Acetyl-CoA vormt

de grondstof van de citroenzuurcyclus waarbij het een CoA-groep overdraagt naar oxaalazijnzuur. Hierbij wordt citroenzuur gevormd en worden energierijke metabolieten zoals ATP en NADH geproduceerd (Nelson en Cox, 2008). Om bij te dragen tot de energievoorziening van het dier moet voldoende NAGase-activiteit aanwezig zijn opdat dimeren en trimeren van NAG omgezet worden tot absorbeerbare NAG-monomeren. Verschillende onderzoekers (Jackson *et al.*, 1992; Han *et al.*, 1997; Weiser *et al.*, 1997; Koh en Iwamai, 2013) beweren echter dat de NAGase-activiteit en de hoeveelheid NAG-monomeren die gevormd, geabsorbeerd en verwerkt kunnen worden, te gering zijn om grote hoeveelheden energie te produceren. Bovendien vonden Jeuniaux en Cornelius (1978) enkel hoge NAGase-activiteit in het caecum van de kip.

Jackson *et al.* (1992) haalden twee belangrijke argumenten aan om te veronderstellen dat chitine weinig waardevol is als energiebron voor vogels. Een eerste argument is dat absorptiewaarden van de eindproducten van de chitinolyse laag zijn (44% voor NAG en 11% voor glucosamine). Een tweede argument is dat chitine te beperkt aanwezig is in het exoskelet van arthropoden. Hierdoor bedraagt de energie vrijgesteld door chitine slechts een gering percentage van de totale metaboliseerbare energie. Er dient echter opgemerkt te worden dat de studie van Jackson *et al.* (1992) gebruik maakte van schaaldierchitine. Bovenstaande argumenten kunnen dus mogelijks weerlegd of afgezwakt worden voor insectchitine. In deze onderzoeksthesis werden namelijk aanzienlijk hogere chitinegehalten gevonden voor insecten (5 - 24%) dan voor schaaldieren (2 - 4%). Dit impliceert dat de absorptie-efficiëntie van NAG en glucosamine waarschijnlijk hoger ligt voor insecten dan voor schaaldieren en bijgevolg grotere hoeveelheden koolstof en stikstof uit chitine verwerkt kunnen worden. Insecten hebben dus mogelijks een grotere energiewaarde voor kippen dan schaaldieren. Om deze hypothese te bevestigen, dienen studies opgezet te worden die de gastro-intestinale absorptie van chitinolytische eindproducten van insectchitine onderzoeken.

Verschillende onderzoekers die de verteerbaarheid van chitine nagingen (Jackson *et al.*, 1992; Gutowska *et al.*, 2004), meenden dat niet zozeer chitine zelf, maar wel de chitinaseactiviteit energetisch gunstig is voor het dier. Chitinolytische activiteit bevordert namelijk de afbraak van chitine in het exoskelet van prooien waardoor inwendig gelegen weefsels en eiwitten uit de cuticula beter toegankelijk worden voor enzymatische vertering (Jackson *et al.*, 1992; Weiser *et al.*, 1997). Verder onderzoek moet uitwijzen of chitine, hetzij direct, hetzij indirect (door het bevorderen van de vrijstelling van andere nutriënten), kan bijdragen tot de energievoorziening van het dier, en in welke mate de vrijgekomen eiwitten bijdragen tot de energie- en stikstofvoorziening van het dier. Gezien de geringe activiteit van NAGase in het spijsverteringsstelsel van de kip, moet ook gezocht worden naar manieren om de chitinolytische activiteit te stimuleren. Sommige planten die gebruikt worden in kippenvoeders (maïs, gerst en sojahuillen) bezitten chitinolytische enzymen. Exogene chitinasen zouden samen kunnen functioneren met endogene chitinasen om zo de chitinolytische activiteit te doen toenemen (Koh en Iwamai, 2013). Als deze hypothese bevestigd kan worden, kunnen chitinolysebevorderende plantaardige producten geïncorporeerd worden in kippenvoeders om de afbraak van chitine te stimuleren.

Aangezien in deze onderzoeksthesis kon aangetoond worden dat kippen in staat zijn een groot deel van het chitine in insecten te verteren, is verder onderzoek naar de meerwaarde hiervan voor het dier noodzakelijk. Dit kan bijvoorbeeld gedaan worden door het effect van consumptie van chitinerijke insecten op gezondheidsparameters te bestuderen. In een eerdere studie werd reeds gesuggereerd dat insectchitine groeibevorderende eigenschappen heeft (Ojewola *et al.*, 2005). Hiervoor zijn twee verklaringen mogelijk. Enerzijds wordt na afbraak van chitine door intestinale bacteriële chitinasen glucosamine gevormd, wat de groei bevordert. Anderzijds zou chitinerijk materiaal de groei van bifidobacteriën stimuleren wat resulteert in gewichtstoename (Ojewola *et al.*, 2005). Koh en Iwamai (2013) beweerden echter dat vervanging van eiwitbronnen door chitinebevattende bronnen zoals garnalenmeel het prestatievermogen van kippen doet afnemen omwille van de slechte verteerbaarheid van chitine. In deze onderzoeksthesis werd voor insecten echter een hoge chitineverteerbaarheid gevonden, waardoor verwacht kan worden dat consumptie van insectchitine het prestatievermogen van kippen minder zal beïnvloeden.

4.2. UITWERKING VAN EEN BETROUWBARE CHITINE ANALYSEMETHODE

In het tweede luik van deze onderzoeksthesis werd nagegaan of de gebruikte methode voor het bepalen van chitine in de verteerbaarheidsproef betrouwbaar en reproduceerbaar was. Een goede methode is in staat het onderscheid te maken tussen echte chitine en andere componenten. Voor dierlijke producten (met uitzondering van varkenscollageen) bleek de methode zeer efficiënt. De methode was namelijk in staat een onderscheid te maken tussen chitinebevattende substraten (schaaldieren en insecten) en dierlijk afgeleide producten (caseïne, collageen, verenmeel). Voor insecten werden hoge chitinewaarden gemeten, terwijl bij dierlijke niet-insecten geen chitine werd gevonden. Voor schaaldieren werd een lager chitinegehalte gemeten dan voor insecten. Hiervoor zijn verschillende verklaringen mogelijk. Een eerste doch minst waarschijnlijke verklaring is dat het percentage exoskelet in vergelijking met de rest van het lichaam laag is. Een tweede verklaring is dat schaaldieren een ander soort chitine dan insecten bevatten en dat dit analytisch niet wordt opgepikt. Nog een andere verklaring is dat een hoger asgehalte (ten gevolge van een calciumrijk exoskelet) gepaard gaat met een lager chitinegehalte. Deze negatieve correlatie kon echter niet bevestigd worden. In zowel gehydrolyseerd verenmeel als rundercollageen, beiden rijk aan dierlijke vezels, werd geen chitine gedetecteerd. In varkenscollageen werd daarentegen een significante hoeveelheid chitine (23%) gemeten. Vermoedelijk was het varkenscollageen een rauw product dat niet verhit werd en heeft dit de meting beïnvloed. Ook in gisten werd chitine teruggevonden, wat door hun verwantschap met zwammen kan verklaard worden. Een andere mogelijkheid is dat mannosepolymeren foutief werden gemeten als chitine.

Voor plantaardige producten bleek de methode minder standvastig te zijn en was er veel variatie in chitinegehalte. In een aantal plantaardige substraten die geen chitine bevatten (zemelen, sojahullen en zaagsel), werd toch chitine gedetecteerd. Vermoedelijk interfereerde de aanwezigheid van ligninemateriaal hier met de detectie van chitine en werd lignine/lignocellulose verkeerdelijk opgepikt als chitine. Op basis van structurele gelijkenissen van chitine met cellulose werd verwacht dat ook cellulose verkeerdelijk door de methode zou opgepikt worden. Voor cellulose werd echter geen chitine

gemeten, wat doet vermoeden dat de methode wel betrouwbaar is voor zuiver cellulosebevattende plantaardige producten. Een mogelijke verklaring dat lignine en lignocellulose wel worden opgepikt, is dat deze net zoals chitine stikstof bevatten. Dit geldt echter enkel voor lignine aanwezig in plantaardige producten en niet voor zuiver lignine, aangezien deze laatste geen stikstof bevat.

In deze studie werd ook getracht op basis van de N-chitinewaarden een onderscheid te maken tussen echt chitine en ruwe celstof. Wanneer in plantaardige producten zeer lage N-chitinewaarden worden gevonden (waarden dicht tegen nul), wijst dit erop dat het gaat om ruwe celstof en niet om chitine. Ruwe celstof bevat namelijk geen stikstof. Slechts voor een aantal plantaardige producten (zemelen en cellulose) werden ook effectief N-chitinewaarden gevonden die de waarde nul benaderden. Uit de resultaten bleek dat het stikstofgehalte vermenigvuldigd met conversiefactor 6,25 een goede benadering van het eiwitgehalte geeft. Volgens Finke (2007) is dit te wijten aan het feit dat N-chitine slechts een kleine fractie uitmaakt van het totale stikstofgehalte in insecten en het grootste aandeel stikstof als aminozuren voorkomt. Om deze hypothese te bevestigen, wordt idealiter het gecorrigeerd eiwitgehalte vergeleken met het ware eiwitgehalte (i.e. som van de aminozuren van elk substraat). Op basis van het aandeel aminozuren kan eveneens een schatting gemaakt worden van de eiwitverteerbaarheid van insecten. In deze onderzoeksthesis werd vanuit het % N-chitine ook het chitinegehalte berekend als % N-chitine vermenigvuldigd met factor 14,6 (gebaseerd op 6,8% N in chitine). De chitinewaarden berekend op basis van N-chitine bleken voor de meeste substraten (exclusief zaagsel, varkenscollageen, sojahullen, zemelen, chitine, uitgevaste meelwormlarve en meelwormpop) ongeveer overeen te komen met de afgewogen chitinewaarden. De methode moet echter nog verder geëvalueerd en verfijnd worden om tot betere resultaten te komen.

De as- en onoplosbare aswaarden lagen binnen de verwachtingen, al waren er enkele opvallende waarden. Voor varkenscollageen werd een hoger asgehalte gevonden dan voor rundercollageen. Dit kan verklaard worden doordat het varkenscollageen waarschijnlijk een rauw product met onzuiverheden was, terwijl het rundercollageen als opgezuiverd product werd geleverd. Voor de garnaal, zoetwatervlokreeft en poppen van de zwarte soldaatvlieg werden opvallend hoge aswaarden teruggevonden (respectievelijk 18%, 22% en 24%). Voor de eerste twee werd dit voornamelijk veroorzaakt door hoge onoplosbare asgehaltes ten gevolge van de aanwezigheid van mineralen die niet door de maag kunnen opgelost worden of onzuiverheden zoals zandpartikels en silica. Vermoedelijk bevond er zich nog anorganisch materiaal van de zeebodem in het spijsverteringsstelsel van de garnalen en zoetwatervlokreeften en werd dit gedetecteerd als onoplosbare as. Ook bij paddenstoelen kan aanwezigheid van anorganisch materiaal (waarschijnlijk zandpartikels) het hoge onoplosbare asgehalte verklaren. Een andere mogelijkheid bij de schaaldieren is hun calciumcarbonaatrijk exoskelet, dat fungeert als opslagreservoir tijdens de vervellingsperiodes (Raz *et al.*, 2002). Ook het hoge asgehalte in de poppen van de zwarte soldaatvlieg kan hierdoor verklaard worden. Makkar *et al.* (2014) vonden voor larven van de zwarte soldaatvliegen zeer hoge calciumgehalten (7,56%) terug. Kroeckel *et al.* (2012) vonden ook voor zwarte soldaatvlieg *prepupae* hoge calciumwaarden (6,5%). Voor huisvliegmaden, meelwormen, sprinkhanen, huiskrekels, mormonenkrekels, zijdewormpoppen en mopanewormen bedraagt het calciumgehalte amper 0,5%

(Moreki *et al.*, 2012; Makkar *et al.*, 2014). Aangezien ook in deze onderzoeksthesis hoge calciumwaarden voor poppen van de zwarte soldaatvlieg verwacht werden, werden de stalen ter bevestiging opgestuurd naar het Klinisch Laboratorium Maenhout voor atomaire absorptiespectroscopie. De lage aswaarden voor de poppen van de meelworm doen vermoeden dat meelwormen armer aan calcium zijn. Dit werd ook in eerdere studies aangegeven (Anderson, 2000; Ramos-Elorduy *et al.*, 2002; Makkar *et al.*, 2014) en kan verklaard worden door verschillen in voedingspatroon en biotoop. De larven van de zwarte soldaatvlieg voeden zich met organisch materiaal en beschikken over een breed gamma aan verteringsenzymen (amylase, lipase, protease, leucine arylamidase, α -galactosidase, β -galactosidase, α -mannosidase en α -fucosidase) om dit efficiënt te kunnen afbreken (Kim *et al.*, 2011). De consumptie van calciumrijk materiaal zoals rottende bladeren kan de accumulatie van calcium in de poppen verklaren. Aanwezigheid van bladeren in het maag-darmstelsel verhoogt ook bij mopanewormen as- en calciumgehaltes (Madibela *et al.*, 2007; Madibela *et al.*, 2009). Meelwormlarven daarentegen eten voornamelijk granen zoals tarwezemelen en minder cellulosebevattende plantsubstanties (Murray, 1960). Aangezien het calciumgehalte in granen veel lager ligt dan in plantsubstanties, werden lagere calciumwaarden gevonden voor de poppen van de meelworm (CVB, 2007). Vermoedelijk gaat na elk vervellingsstadium calcium verloren, waardoor bij de adulte stadia van de zwarte soldaatvlieg lagere aswaarden werden gevonden dan bij de poppen. Ook Oonincx en Dierenfeld (2012) kwamen tot de vaststelling dat binnen eenzelfde species calciumconcentraties hoger waren in jongere stadia dan in adulte of grote nymfestadia.

Algemeen kan besloten worden dat de methode voor chitinebepaling enkel een onderscheid kan maken tussen chitinebevattende en niet-chitinebevattende dierlijke producten. Voor plantaardige producten moet de methode nog verder op punt gesteld worden zodat een onderscheid gemaakt kan worden tussen lignocellulose/lignine en chitine. Vermits het protocol van Liu *et al.* (2012) in staat was om nauwkeurig het chitinegehalte in insecten te bepalen, kan geconcludeerd worden dat de methode zeer geschikt is voor gebruik in chitineverteerbaarheidsstudies. Na correctie voor basale endogene verliezen bedroeg de chitineverteerbaarheid in deze studie 55%, wat impliceert dat kippen reeds op jonge leeftijd in staat zijn een wezenlijk deel van het opgenomen chitine te weerhouden en te verwerken.

5. REFERENTIELIJST

- Aam B.B., Heggset E.B., Norberg A.L., Sorlie M., Varum K.M., Eijsink V.G. (2010). Production of chitooligosaccharides and their potential applications in medicine. *Marine Drugs* 8, 1482-1517.
- ACV (1992). Grondstoffenlijst. 10e uitgave. ACV-Controle, Rijswijk. Geciteerd door Feed2Gain (2010).
- ADAS (1990). Tables of nutritive value and chemical composition of Feedingstuffs. Rowett Research Services, Aberdeen. Geciteerd door Feed2Gain (2010).
- Adrangi S., Faramarzi M.A. (2013). From bacteria to human: A journey into the world of chitinases. *Biotechnology Advances* 31, 1786-1795.
- Adrangi S., Faramarzi M.A., Shahverdi A.R., Sepehrizadeh Z. (2010). Purification and characterization of two extracellular endochitinases from *Massilia timonae*. *Carbohydrate Research* 345, 402-407.
- Agunbiade J.A., Adeyemi O.A., Ashiru O.M., Awojobi H.A., Taiwo A.A., Oke D.B., Adekunmisi A.A. (2007). Replacement of fishmeal with maggot meal incassava-based layers' diets. *The Journal of Poultry Science* 44, 278-282.
- Akaki C., Duke G.E. (1999). Apparent chitin digestibilities in the Eastern Screech Owl (*Otus asio*) and the American Kestrel (*Falco sparverius*). *Journal of Experimental Zoology* 283 (4-5), 387-393.
- Allen M.E. (1989). Nutritional aspects of insectivory. Ph.D. thesis, Michigan State University, East Lansing. Geciteerd door Jackson *et al.* (1992).
- Allen M.E., Oftedal O.T. (1989). Dietary manipulation of the calcium content of feed crickets. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 20, 26-33.
- Anderson S.J. (2000). Increasing calcium levels in cultured insects. *Zoo Biology* 19, 1-9.
- Aniebo A.O., Owen O.J. (2010). Effects of age and method of drying on the proximate composition of housefly larvae (*Musca domestica* Linnaeus) Meal (HFLM). *Pakistan Journal of Nutrition* 9, 485-487.
- Asia (1987). The tables of Feed Composition. Taiwan Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Taiwan. Geciteerd door Feed2Gain (2010).
- Awoniyi T.A., Aletor V.A., Aina J.M. (2003). Performance of broiler-chickens fed on maggot meal in place of fishmeal. *International Journal of Poultry Science* 2, 271-274.
- Azuma K., Osaki T., Wakuda T., Ifuku S., Saimoto H., Tsuka T., Imagawa T., Okamoto Y., Minami S. (2012). Beneficial and preventive effect of chitin nanofibrils in a dextran sulfate sodium-induced acute ulcerative colitis model. *Carbohydrate Polymers* 87, 1399-1403.
- Ballard B.M., Thompson J.E., Petrie M.J., Chekett M., Hewitt D.G. (2004). Diet and nutrition of northern pintails wintering along the southern coast of Texas. *Journal of Wildlife Management* 68, 371-382.
- Balogun A.M., Akegbejo-Samsons Y. (1992). Waste yield, proximate and mineral composition of shrimp resources of Nigeria's Coastal Waters. *Bioresource technology* 40, 157-161.
- Barker D., Fitzpatrick M.P., Dierenfeld E.S. (1998). Nutrient composition of selected whole invertebrates. *Zoo biology* 17, 123-134.
- Barros L., Baptista P., Correia D.M., Casa S., Oliveira B., Ferreira I.C.F.R. (2007). Fatty acid and sugar compositions, and nutritional value of five wild edible mushrooms from Northeast Portugal. *Food Chemistry* 105, 140-145.
- Bartnicki-Garcia S. (1968). Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Annual Review of Microbiology* 22, 87-108. Geciteerd door Wan en Tai (2013).

Bauer-Petrovska B. (2001). Protein fractions in edible Macedonian mushrooms. *European Food Research and Technology* 212, 469-472.

Belluco S., Losasso C., Maggioletti M., Alonzi C.C., Paoletti M.G., Ricci A. (2013). Edible insects in a food safety and nutritional perspective: a critical review. *Comprehensive reviews in food science and food safety* 12, 296-313.

Bergeron F., Benning M. (2015). Comparison of two fat extraction methods. Internetreferentie: <http://web2.slc.qc.ca/jmc/www/Chemweb/oldchemweb/extractionmethods.htm> (geconsulteerd op 3 maart 2015).

Bernard J.B., Allen M.E., Ullrey D.E. (1997). Feeding captive insectivorous animals: Nutritional aspects of insects as food. *Nutrition Advisory Group Handbook, Fact Sheet* 3, 1-7.

BIOBIB (2015). A Database for biofuels. Internetreferentie: <http://cdmaster2.vt.tuwien.ac.at/biobib/biobib.html> (geconsulteerd op 9 juli 2015).

Black M.M., Schwartz H.M. (1950). The estimation of chitin and chitin nitrogen in crawfish waste and derived products. *Analyst* 75, 185-189.

Bligh E.G., Dyer W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology* 37, 911-917. Geciteerd door Balogun en Akegbejo-Samsons (1992).

Boot R.G., Blommaart E.F.C., Swart E., Ghauharali-van der Vlugt K., Bijl N., Moe C., Place A., Aerts J.M.F.G. (2001). Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase. *Journal of Biological Chemistry* 276, 6770-6778.

Boot R.G., Renkema G.H., Strijland A., van Zonneveld A.J., Aerts J.M.F.G. (1995). Cloning of a cDNA encoding chitotriosidase, a human chitinase produced by macrophages. *Journal of Biological Chemistry* 270, 26252-26256.

Bukkens S.G.F. (1997). The nutritional value of edible insects. *Ecology of Food and Nutrition* 36, 287-319.

Bukkens S.G.F. (2005). Insects in the human diet: nutritional aspects. In: Paoletti M.G. (Editor) *Ecological implications of minilivestock; role of rodents, frogs, snails, and insects for sustainable development*, Science Publishers, New Hampshire, p. 545-577. Geciteerd door Oonincx en van der Poel (2011) en van Huis *et al.* (2013).

Busby J.N., Landsberg M.J., Simpson R.M., Jones S.A., Hankamer B., Hurst M.R.H., Lott J.S. (2012). Structural analysis of Chi1 chitinase from *Yen-Tc*: the multisubunit insecticidal ABC toxin complex of *Yersinia entomophaga*. *Journal of Molecular Biology* 415, 359-371.

Cauchie H.M. (2002). Chitin production by arthropods in the hydrosphere. *Hydrobiologia* 470, 63-96. Geciteerd door Finke (2007).

Chandler J.C., Molins C.R., Petersen J.M., Belisle J.T. (2011). Differential chitinase activity and production within *Francisella* species, subspecies, and subpopulations. *Journal of Bacteriology* 193, 3265-3275.

Cho Y.W., Jang J., Park C.R., Ko S.W. (2000). Preparation and solubility in acid and water of partially deacetylated chitins. *Biomacromolecules* 1, 609-614.

Conconi J.R.E. (1987). Los insectos como fuente de proteínas en el futuro. In: Malaisse F. (Editor) *Se nourrir en forêt claire africaine; Approche écologique et nutritionnelle* Tableau 2112 P240, Centre Technique de Coopération Agricole et Rurale, Wageningen. Geciteerd door Oonincx en van der Poel (2011).

Cools A., De Cuyper A., Pauwels J., Janssens G.P.J. (2014). Animal fiber: a key nutrient to carnivores, but how to determine this dietary fraction analytically? Proceedings of the tenth symposia of the comparative nutrition society, Flat Rock, NC, p. 69-71.

Cornelius C., Dandrifosse G., Jeuniaux C. (1975). Biosynthesis of chitinases by mammals of the order Carnivora. *Biochemical Systematics and Ecology* 3, 121-122.

CVB (2007). Tabellenboek veevoeding. 7e editie. Productschap Diervoeder, Lelystad, Den Haag, p. 71-114.

Dale N. (1992). True metabolizable energy of feather meal. *The Journal of Applied Poultry Research* 1, 331-334.

Dankwa D., Nelson F.S., Oddoye E.O.K., Duncan J.L. (2002). Housefly larvae as a feed supplement for rural poultry. *The Ghana Journal of Agricultural Science* 35, 185-187.

DeFoliart G.R., Finke M.D., Sunde M.L. (1982). Potential value of the Mormon cricket (Orthoptera: Tettigoniidae) harvested as a high-protein feed for poultry. *Journal of Economic Entomology* 75, 848-852.

Depauw S. (2013). Animal Fibre: A key factor for gastrointestinal health in an obligate carnivore: the cheetah. Doctoraatsthesis Faculteit Diergeneeskunde, Gent, p. 78-104.

Despins J.L., Axtell R.C. (1995). Feeding behavior and growth of broiler chicks fed larvae of the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*. *Poultry science* 74, 331-336.

De Vries J.W. (2003). On defining dietary fibre. *Proceedings of the Nutrition Society* 62, 37-43.

DLG (1976). Aminsosauergehalte in Futter, Futter für Wiederkäuer, Futter für Schweine, Mineralstoffgehalte in Futtermitteln. DLG Verlags GmbH, Frankfurt. Geciteerd door Feed2Gain (2010).

El Boushy A.R. (1991). House-fly pupae as poultry manure converters for animal feed: A review. *Bioresource technology* 38, 45-49.

Erba P., Adini A., Demcheva M., Valeri C.R., Orgill D.P. (2011). Poly-N-acetyl glucosamine fibers are synergistic with vacuum-assisted closure in augmenting the healing response of diabetic mice. *The Journal of Trauma Injury Infection and Critical Care* 71, S187-S193.

FAO (2009). How to feed the world in 2050. Paper presented at the High Level Expert Forum, Rome, Italy, 12-13 October. Internetreferentie: www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf (geconsulteerd op 3 maart 2015).

FAO (2011). World Livestock 2011 – Livestock in Food Security. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome. Internetreferentie: <http://www.fao.org/docrep/014/i2373e/i2373e.pdf> (geconsulteerd op 3 maart 2015).

Feed2Gain (2010). Consulting Services for the Animal Industry Nutritional Optimization Based on World Wide Experience and Leading Edge Analysis of Current Results and Future Needs. Internetreferentie: <http://www.feed2gain.com/> (geconsulteerd op 7 juli 2015).

Feedstuffs (1992). Feedstuffs reference issue. Miller Publishing Company, Minnetonka, Minnesota, p. 38-42. Geciteerd door Feed2Gain (2010).

Finke M.D. (2002). Complete nutrient composition of commercially raised invertebrates used as food for insectivores. *Zoo Biology* 21, 269-285.

Finke M.D. (2007). Estimate of chitin in raw whole insects. *Zoo biology* 26, 105-115.

Finke M.D., DeFoliart G.R., Benevenga N.J. (1989). Use of a four-parameter logistic model to evaluate the quality of the protein from three insect species when fed to rats. *The Journal of nutrition* 119, 864-871.

Finke M.D., Sunde M.L., DeFoliart G.R. (1985). An evaluation of the protein quality of Mormon crickets (*Anabrus simplex* Haldeman) when used as a highprotein feedstuff for poultry. *Poultry Science* 64, 708-712.

Fischer T.H., Hays W.E., Valeri C.R. (2011). Poly-N-acetyl glucosamine fibers accelerate hemostasis in patients treated with antiplatelet drugs. *The Journal of Trauma Injury Infection and Critical Care* 71, S176-S182.

Fredrickson L.H., Reid F.A. (1988). 13.1.1. Nutritional Values of Waterfowl Foods. In: Fredrickson L.H., Reid F.A. (Editors) *Waterfowl Management Handbook*, US Fish and Wildlife Service, Washington, D.C, p. 1-6.

Frye F.L., Calvert C.C. (1989). Preliminary information on the nutritional content of mulberry silk moth (*Bombyx mori*) larvae. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 20, 73-75.

Gerber P.J., Steinfeld H., Henderson B., Mottet A., Opio C., Dijkman J., Falcucci A., Tempio G. (2013). *Tackling Climate Change Through Livestock – A Global Assessment of Emissions and Mitigation Opportunities*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome. Internetreferentie: <http://www.fao.org/docrep/018/i3437e/i3437e.pdf> (geconsulteerd op 10 maart 2015).

Ghazoul J. (2006). *Mopani woodlands and the mopane worm: enhancing rural livelihoods and resource sustainability*. Forest Research Programme Report 7822, London. Geciteerd door van Huis *et al.* (2013).

Gillard J. (2009). *The pennate diatom life cycle : a genetic, physiological and biochemical study using seminavis robusta as a new experimental model*. Doctoraatsthesis Faculteit Wetenschappen, Department Biologie, Gent, p. 3.

Glew R.H., Jackson D., Sena L., VanderJagt D.J., Pastuszyn A., Millson M. (1999). *Gonimbrasia belina* (Lepidoptera: Saturniidae): a nutritional food source rich in protein, fatty acids, and minerals. *American Entomologist* 45, 250-253.

Goulart C.D.C., Costa F.G.P., Silva J.H.V., Souza J.G., Rodrigues V.P., Oliveira C.F.S. (2011). Requirements of digestible methionine + cystine for broiler chickens at 1 to 42 days of age. *Revista Brasileira de Zootecnia* 40, 797-803.

Guan S.P., Mok Y.K., Koo K.N., Chu K.L., Wong W.S. (2009). Chitinases: biomarkers for human diseases. *Protein & Peptide Letters* 16, 490-498.

Guillen D., Sanchez S., Rodriguez-Sanoja R. (2010). Carbohydrate-binding domains: multiplicity of biological roles. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85, 1241-1249.

Gutowska M.A., Drazen J.C., Robison B.H. (2004). Digestive chitinolytic activity in marine fishes of Monterey Bay, California. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 139, 351-358.

Hale O.M. (1973). Dried *Hermetia illucens* larvae (Diptera: Stratiomyidae) as a feed additive for poultry. *Journal of the Georgia Entomological Society* 8, 16-20. Geciteerd door Newton *et al.* (2005).

Han B.K., Lee W.J., Jo D.H. (1997). Chitinolytic enzymes from the gizzard and the chyme of the broiler (*Gallus gallus* L.). *Biotechnology letters* 19, 981-984.

Han B.K., Moon J.K., Ryu Y.W., Park Y.H., Jo D.H. (2000). Purification and characterization of acidic chitinases from gizzards of broiler (*Gallus gallus* L.). *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 33, 326-331.

- Han L.K., Kimura Y., Okuda H. (1999). Reduction in fat storage during chitin-chitosan treatment in mice fed a high-fat diet. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 23, 174-179.
- Hartl L., Zach S., Seidl-Seiboth V. (2012). Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* 93, 533-543.
- Hassas-Roudsari M., Goff H.D. (2012). Ice structuring proteins from plants: mechanism of action and food application. *Food Research International* 46, 425-436.
- Hickling D., Guenter W., Jackson M.E. (1990). The effects of dietary methionine and lysine on broiler chicken performance and breast meat yield. *Canadian Journal of Animal Science* 70, 673-678.
- Hirano S., Itakura C., Seino H., Akiyama Y., Nonaka I., Kanbara N., Kawakami T. (1990). Chitosan as an ingredient for domestic animal feeds. *Journal of agricultural and food chemistry* 38, 1214-1217. Geciteerd door Han *et al.* (1997).
- Hirano S., Senda H., Yamamoto Y., Watanabe A. (1984). Several novel attempts for the use of the potential functions of chitin and chitosan. In: Zikakis J.P. (Editor) *Chitin, chitosan and related enzymes*, Academic Press, Orlando, FL, p. 77-95. Geciteerd door Akaki en Duke (1999).
- Horn S.J., Sikorski P., Cederkvist J.B., Vaaje-Kolstad G., Sorlie M., Synstad B., Vriend G., Varum K.J., Eijsink G.H. (2006). Costs and benefits of processivity in enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 18089-18094.
- Hossain S.M., Blair R. (2007). Chitin utilisation by broilers and its effect on body composition and blood metabolites. *British poultry science* 48, 33-38.
- Hwangbo J., Hong E.C., Jang A., Kang H.K., Oh J.S., Kim B.W., Park B.S. (2009). Utilization of house fly-maggots, a feed supplement in the production of broiler chickens. *Journal of Environmental Biology* 30, 609-614.
- INRA (1989). *L'alimentation des animaux monogastriques; Tables de l'alimentation des bovins, ovins et caprins; L'Alimentations de Chevaux*. 2e edition. Editions INRA, Paris. Geciteerd door Feed2Gain (2010).
- Jackson S., Place A.R., Seiderer L.J. (1992). Chitin digestion and assimilation by seabirds. *The Auk* 109, 758-770.
- Jamroz D., Jakobsen K., Orda J., Skorupinska J., Wiliczekiewicz A. (2001). Development of the gastrointestinal tract and digestibility of dietary fibre and amino acids in young chickens, ducks and geese fed diets with high amounts of barley. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 130, 643-652.
- Jeuniaux C., Cornelius C. (1978). Distribution and activity of chitinolytic enzymes in the digestion tract of birds and mammals. In: Muzzarelli R.A.A. and Pariser E.R. (Editors) *Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan*, MIT Press, Cambridge, p. 542-549. Geciteerd door Jackson *et al.* (1992), Han *et al.* (2000) en Koh en Iwamai (2013).
- Jones J.M. (2000). Update on defining dietary fiber. *Cereal Foods World* 45, 219-220. Geciteerd door De Vries J.W. (2003).
- Kalač P. (2009). Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food chemistry* 113, 9-16.
- Kavishree S., Hemavathy J., Lokesh B.R., Shashirekha M.N., Rajarathnam S. (2008). Fat and fatty acids in Indian edible mushrooms. *Food Chemistry* 106, 597-602.
- Kim W., Bae S., Park K., Lee S., Choi Y., Han S., Koh Y. (2011). Biochemical characterization of digestive enzymes in the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology* 14, 11-14.

Koh K., Iwamae S. (2013). Chitinolytic activity of mucosal enzymes in the different parts of the digestive tract in broilers. *The Journal of Poultry Science* 50, 65-67.

Kroeckel S., Harjes A.G., Roth I., Katz H., Wuertz S., Susenbeth A., Schulz C. (2012). When a turbot catches a fly: Evaluation of a pre-pupae meal of the Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) as fish meal substitute—Growth performance and chitin degradation in juvenile turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* 364, 345-352.

Kumar A., Rao M. (2010). A novel bifunctional peptidic aspartic protease inhibitor inhibits chitinase A from *Serratia marcescens*: kinetic analysis of inhibition and binding affinity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1800, 526-536.

Latam (1974). Tabelas de Composicao de Alimentos da America Latina. In: McDowell L.R., Conrad J.H., Thomas J.E., Harris L.E. (Editors) Feed Composition Project, University of Florida, Department of Animal Science, Gainesville. Geciteerd door Feed2Gain (2010).

Leatherhead Food Research Association (1996). Moisture, Crude Fiber, Fat, Protein and Ash Content. In: Slack P. (Editor) Analytical Methods Manual, 3th edition, Food Chemistry Department, Surey, p. 1-30.

Lindner H.B., Zhang A.G., Eldridge J., Demcheva M., Tschilis P., Seth A., Vournakis J., Muise-Helmericks R.C. (2011). Anti-bacterial effects of poly-N-acetyl-glucosamine nanofibers in cutaneous wound healing: Requirement for Akt1. *PLoS One* 6, 556-569.

Liu S., Sun J., Yu L., Zhang C., Bi J., Zhu F., Qu M., Jiang C., Yang Q. (2012). Extraction and characterization of chitin from the beetle *Holotrichia parallela motschulsky*. *Molecules* 17, 4604-4611.

Lovell R.T., Lafleur J.R., Hoskins F.H. (1968). Nutritional value of freshwater crayfish waste meal. *Journal of agricultural and food chemistry* 16, 204-207.

Lubitz J.A., Fellers C.R., Parkhurst R.T. (1943). Crab Meal in Poultry Rations I. Nutritive Properties. *Poultry Science* 22, 307-313.

Madibela O.R., Mokwena K.K., Nsoso S.J., Thema T.F. (2009). Chemical composition of Mopane worm sampled at three sites in Botswana and subjected to different processing. *Tropical animal health and production* 41, 935-942.

Madibela O.R., Seitiso T.K., Thema T.F., Letso M. (2007). Effect of traditional processing methods on chemical composition and in vitro true dry matter digestibility of the Mopane worm (*Imbrasia belina*). *Journal of arid environments* 68, 492-500.

Mahanta J.D., Sapkota D., Islam R. (2004). Effect of dietary muga silk worm pupae meal on the breeding performance of White Leghorn males. *Indian Journal of Poultry Science* 39, 272-275.

Marounek M., Suchorska O., Savka O. (1999). Effect of substrate and feed antibiotics on in vitro production of volatile fatty acids and methane in caecal contents of chickens. *Animal feed science and technology* 80, 223-230.

Makkar H.P., 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.

Manzi P., Marconi S., Aguzzi A., Pizzoferrato L. (2004). Commercial mushrooms: nutritional quality and effect of cooking. *Food chemistry* 84, 201-206.

McDonald P., Edwards R.A., Greenhalgh J.F.D., Morgan C.A., Sinclair L.A., Wilkinson R.G. (2011). The animal and its food. In: McDonald P. *et al.* (Editors) *Animal Nutrition*, Seventh Edition, Pearson Education, Harlow, p. 3-15.

Meuwissen P. (2011). Insecten als nieuwe eiwitbron. Een scenarioverkenning van de marktkansen. ZLTO-projecten, 's Hertogenbosch, Nederland. Geciteerd door Veldkamp *et al.* (2012).

- Moreki J.C., Tiroesele B., Chiripasi S.C. (2012). Prospects of utilizing insects as alternative sources of protein in poultry diets in Botswana: a review. *Journal of Animal Science Advance* 2, 649-658.
- Motshegwe S.M., Holmback J., Yeboah S.O. (1998). General properties and the fatty acid composition of the oil from the mophane caterpillar, *Imbrasia belina*. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 75, 725-728.
- Muise-Helmericks R.C., Demcheva M., Vournakis J.N., Seth A. (2011). Poly-N-acetyl glucosamine fibers activate bone regeneration in a rabbit femur injury model. *The Journal of Trauma Injury Infection and Critical Care* 71, S194-S196.
- Murray D.R.P. (1960). The stimulus to feeding in larvae of *Tenebrio molitor* L. *Journal of Insect Physiology* 4, 80-91.
- Muzzarelli R.A.A. (1993). Biochemical significance of exogenous chitins and chitosans in animals and patients. *Carbohydrate Polymers* 20, 7-16.
- Muzzarelli R.A.A. (2010). Chitins and chitosans as immunoadjuvants and non-allergenic drug carriers. *Marine Drugs* 8, 292-312.
- Muzzarelli R.A.A., El Mehtedi M., Mattioli-Belmonte M. (2014). Emerging Biomedical Applications of Nano-Chitins and Nano-Chitosans Obtained via Advanced Eco-Friendly Technologies from Marine Resources. *Marine Drugs* 12, 5468-5502.
- Nation J.L. (2002). *Insect physiology and biochemistry*. 1th edition. CRC Press, Boca Raton. Geciteerd door Finke (2007).
- Nehring B. (1969). *Handbuch der Futtermittel*. 1th edition. Verlag Paul Parey, Hamburg. Geciteerd door Feed2Gain (2010).
- Nelson D.L., Cox M.M. (2008). *Principles of biochemistry*. 5th edition. W.H. Freeman and Company, New York, p. 615-646.
- Newton L., Sheppard C., Watson D.W., Burtle G., Dove R. (2005). Using the black soldier fly, *Hermetia illucens*, as a value-added tool for the management of swine manure. In: Report for Mike Williams, Director of the Animal and Poultry Waste Management Center. North Carolina State University, Raleigh, NC, p. 1-17.
- Nguyen T.H., Fleet G.H., Rogers P.L. (1998). Composition of the cell walls of several yeast species. *Applied microbiology and biotechnology* 50, 206-212.
- NRC (1982). *United States - Canadian Tables of Feed Composition*. 3th edition. National Academy Press, Washington DC. Geciteerd door Feed2Gain (2010).
- Ocio E., Viñaras R., Rey J.M. (1979). House fly larvae meal grown on municipal organic waste as a source of protein in poultry diets. *Animal Feed Science and Technology* 4, 227-231.
- Ogawa Y., Hori R., Kim U.-J., Wada M. (2011). Elastic modulus in the crystalline region and the thermal expansion coefficients of α -chitin determined using synchrotron radiated X-ray diffraction. *Carbohydrate Polymers* 83, 1213-1217.
- Ohiokepehai O., Bulawayo B.T., Mpotokwane S., Sekwati B., Bertinuson A. (1996). Expanding the use of phane, a nutritionally rich local food. *Proceedings of the first multidisciplinary symposium on phane* 18, p. 84-103. Geciteerd door Moreki *et al.* (2012).
- Ojewola G.S., Okoye F.C., Ukoha O.A. (2005). Comparative utilization of three animal protein sources by broiler chickens. *International Journal of Poultry Science* 4, 462-467.
- Oonincx D.G.A.B., Dierenfeld E.S. (2012). An investigation into the chemical composition of alternative invertebrate prey. *Zoo biology* 31, 40-54.

- Oonincx D.G.A.B., Van der Poel A.F.B. (2011). Effects of diet on the chemical composition of migratory locusts (*Locusta migratoria*). *Zoo biology* 30, 9-16.
- Ouzouni P.K., Petridis D., Koller W.D., Riganakos K.A. (2009). Nutritional value and metal content of wild edible mushrooms collected from West Macedonia and Epirus, Greece. *Food Chemistry* 115, 1575-1580.
- Ouzouni P.K., Riganakos K.A. (2007). Nutritional value and metal content of Greek wild edible fungi. *Acta Alimentaria* 36, 99-110.
- Ozimek L., Sauer W.C., Kozikowski V., Ryan J.K., Jørgensen H., Jelen P. (1985). Nutritive value of protein extracted from honey bees. *Journal of Food Science* 50, 1327-1329.
- Pedneault K., Angers P., Avis T.J., Gosselin A., Tweddel R.J. (2007). Fatty acid profiles of polar and non-polar lipids of *Pleurotus ostreatus* and *P. cornucopiae* var. *citrino-pileatus* grown at different temperatures. *Mycological Research* 111, 1128-1234.
- Pharithi M.T., Suping S.M., Yeboah S.O. (2004). Variations of the fatty acid composition in the oil from the larval stages of the emperor moth caterpillar, *Imbrasia belina*. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia* 18, 67-72.
- Phyllis (2015). A database for biomass and waste. Internetreferentie: <https://www.ecn.nl/phyllis2/Browse/Standard/ECN-Phyllis#sawdust> (geconsulteerd op 9 juli 2015).
- Pieterse E., Pretorius Q. (2014). Nutritional evaluation of dried larvae and pupae meal of the housefly (*Musca domestica*) using chemical-and broiler-based biological assays. *Animal Production Science* 54, 347-355.
- Pretorius Q. (2011). The evaluation of larvae of *Musca domestica* (common house fly) as protein source for broiler production. Doctoraatsthesis, Department of Animal Sciences, Faculty of AgriSciences, Stellenbosch, p. 58-84.
- Prosky L., Asp N.G., Furda I., DeVries J.W., Schweizer T.F., Harland B.F. (1984). Determination of total dietary fiber in foods and food products: collaborative study. *Journal-Association of Official Analytical Chemists* 68, 677-679.
- Protector (1980). Tables de composition des matières premières destinées à l'alimentation animale. Comité d'Etude International Protector, Bruxelles. Geciteerd door Feed2Gain (2010).
- Qualifeed (2015). Nutritioneel informatieplatform. DSM Nutritional Products NV, Deinze. Internetreferentie: www.qualifeed.be (geconsulteerd op 10 juli 2015).
- Ramos-Elorduy J. (1998). Creepy crawly cuisine: the gourmet guide to edible insects. 1th edition. Park Street Press, Rochester VT, USA, p. 150. Geciteerd door Xiaoming *et al.* (2010).
- Ramos-Elorduy J., González E.A., Hernández A.R., Pino J.M. (2002). Use of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) to recycle organic wastes and as feed for broiler chickens. *Journal of economic entomology* 95, 214-220.
- Ravindran V., Blair R. (1993). Feed resources for poultry production in Asia and the Pacific. *World's Poultry Science Journal* 49, 219-235. Geciteerd door van Huis *et al.* (2013).
- Raz S., Testeniere O., Hecker A., Weiner S., Luquet G. (2002). Stable amorphous calcium carbonate is the main component of the calcium storage structures of the crustacean *Orchestia cavimana*. *The Biological Bulletin* 203, 269-274.
- Razdan A., Pettersson D. (1994). Effect of chitin and chitosan on nutrient digestibility and plasma lipid concentrations in broiler chickens. *British Journal of Nutrition* 72, 277-288.

Ride J.P., Drysdale R.B. (1972). A rapid method for the estimation of filamentous fungi in plant tissue. *Physiology of Plant Pathology* 2, 7-15.

Rozin P., Fallon A.E. (1987). A perspective on disgust. *Psychological review* 94, 23.

Rumpold B.A., Schlüter O.K. (2013). Potential and challenges of insects as an innovative source for food and feed production. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 17, 1-11.

Sakuda S., Isogai A., Matsumoto S., Suzuki A. (1987). Search for microbial insect growth regulators. II. Allosamidin, a novel insect chitinase inhibitor. *The Journal of antibiotics* 40, 296-300.

Sekhwela M.B.M. (1989). The Nutritive Value of Mophane Bread-Mophane Insect Secretion (Mophote or Maboti). *Botswana Notes and Records* 20, 151-154. Geciteerd door Motshegwe *et al.* (1998).

SETNA (1991). Composicion de materias primas. SETNA, Spain. Geciteerd door Feed2Gain (2010).

Sheppard D.C., Newton G.L., Thompson S.A., Savage S. (1994). A value added manure management system using the black soldier fly. *Bioresource Technology* 50, 275-279.

Spreen K.A., Zikakis J.A., Austin P.R. (1984). The effect of chitinous materials on the intestinal microflora and the utilization of whey in monogastric animals. In: Zikakis J.A. (Editor) *Chitin, chitosan and related enzymes*, Academic Press, Orlando, p. 57-75. Geciteerd door Jackson *et al.* (1992).

Stack J., Dorward A., Gondo T., Frost P., Taylor F., Kurebgaseka N. (2003). Mopane worm utilisation and rural livelihoods in Southern Africa. Paper presented at the International Conference on Rural Livelihoods, Forests and Biodiversity, Bonn, Germany, 19-23 May 2003, p. 1-38.

Steinfeld H., Opio C. (2010). The availability of feeds for livestock: Competition with human consumption in present world. *Advances in Animal Biosciences* 1, 421-421.

Stelmock R.L., Husby F.M., Brundage A.L. (1985). Application of Van Soest acid detergent fiber method for analysis of shellfish chitin. *Journal of Dairy Science* 68, 1502-1506.

Subasinghe R. (2005). Aquaculture topics and activities. State of world aquaculture. In: *FAO Fisheries and Aquaculture Department, Rome*. Internetreferentie: <http://www.fao.org/fishery/topic/13540/en> (geconsulteerd op 27 februari, 2015).

Subcommittee on Poultry Nutrition & National Research Council (1994). *Nutrient requirements of poultry*. 9th edition. National academy press, Washington, p. 3-34.

Suzuki K., Mikami T., Okawa Y., Tokoro A., Suzuki S., Suzuki M. (1986). Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose. *Carbohydrate Research* 151, 403-408.

Suzuki M., Fujimoto W., Goto M., Morimatsu M., Syuto B., Iwanaga T. (2002). Cellular Expression of Gut Chitinase mRNA in the Gastrointestinal Tract of Mice and Chickens *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 50, 1081-1089.

Suzuki M., Morimatsu M., Yamashita T., Iwanaga T., Syuto B. (2001). A novel serum chitinase that is expressed in bovine liver. *FEBS Letters* 506, 127-130.

Suzuki S., Nakanishi E., Furihata K., Miyamoto K., Tsujibo H., Watanabe T., Ohnishi Y., Horinouchi S., Nagasawa H., Sakuda S. (2008). Chitinase inhibitor allosamidin promotes chitinase production of *Streptomyces* generally. *International Journal of Biological Macromolecules* 43, 13-19.

Tassoni J.P. (1957). Studies on the Nitrogen and Phosphorus Content of Insect Protein. *Physiological Zoology* 30, 128-132.

Tomihata K., Ikada Y. (1997). In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. *Biomaterials* 18, 567-575.

Trowell H., Godding E., Spiller G., Briggs G. (1978). Fibre bibliographies and terminology. *American Journal of Clinical Nutrition* 31, 1489-1490.

UK-MAFF (1986). *Poultry Nutrition*. 4th impression. HMSO London, UK. Geciteerd door Feed2Gain (2010).

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*. FAO Forestry Paper 171, 1-158.

Van Soest P.J. (1973). Collaborative study of acid-detergent fiber and lignin. *Association of Official Analytical Chemists Journal* 56, 781-784.

Veldkamp T., van Duinkerken G., van Huis A., Lakemond C.M.M., Ottevanger E., Bosch G., van Boekel M.A.J.S. (2012). Insects as a sustainable feedingredient in pig and poultry diets – a feasibility study. In: *Rapport 638* (2012). Wageningen UR Livestock Research, Lelystad, p.1-62.

Verdi R.J., Barbano D.M., Dellavalle M.E., Senyk G.F. (1987). Variability in true protein, casein, nonprotein nitrogen, and proteolysis in high and low somatic cell milks. *Journal of Dairy Science* 70, 230-242.

Wan A.C.A., Tai B.C.U. (2013). CHITIN — A promising biomaterial for tissue engineering and stem cell Technologies. *Biotechnology Advances* 31, 1776-1785.

Wang X.R., Ding X.F., Gopalakrishnan B., Morgan T.D., Johnson L., White F.F., Muthukrishnan S., Kramer K.J. (1996). Characterization of a 46 kDa insect chitinase from transgenic tobacco. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 10, 1055-1064.

Watkins B.E., Adair J., Oldfield J.E. (1982). Evaluation of shrimp and king crab processing by products as feed supplements for mink. *Journal of Animal Science* 55, 578-589.

Weiser J.I., Porth A., Mertens D., Karasov W.H. (1997). Digestion of chitin by northern bobwhites and American robins. *The Condor* 99, 554-556.

Welinder B.S. (1974). The crustacean cuticle—I. Studies on the composition of the cuticle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 47, 779-787.

Womeni H.M., Linder M., Tiencheu B., Mbiapo F.T., Villeneuve P., Fanni J., Parmentier M. (2009). Oils of insects and larvae consumed in Africa: potential sources of polyunsaturated fatty acids. *Oléagineux corps gras lipides* 16, 230-235.

WPSA (1989). *European Table of energy values for Poultry feedstuffs*. 3rd edition. Working Group No 2 (Nutrition) of the European Federation of branches of WPSA. Geciteerd door Feed2Gain (2010).

Xiaoming C., Ying F., Hong Z., Zhiyong C. (2010). Review of the nutritive value of edible insects. In: *Durst P.B., Johnson D.V., Leslie R.L., Shono K. (Editors) Forest insects as food: humans bite back, proceedings of a workshop on Asia-Pacific resources and their potential for development*, FAO Regional Office for Asia and the Pacific, Bangkok, p. 85-92.

Yen A.L. (2009). Edible insects: Traditional knowledge or western phobia? *Entomological Research* 39, 289-298.

Zhang H., Liu M., Tian Y., Hu X. (2011). Comparative characterization of chitinases from silkworm (*Bombyx mori*) and bollworm (*Helicoverpa armigera*). *Cell Biochemistry and Biophysics* 61, 267-275.

Zhang M., Haga A., Sekiguchi H., Hirano S. (2000). Structure of insect chitin isolated from beetle larva cuticle and silkworm (*Bombyx mori*) pupa exuvia. *International Journal of Biological Macromolecules*, 27, 99-105.

6. BIJLAGEN

BIJLAGE I: RUW VET-, RUW EIWIT- EN STIKSTOFGEHALTES VAN VERSCHILLENDE SUBSTRATEN

Ingrediënt	Ruw vet %	Ruw eiwit %	Stikstof %	Analysemethode				Referentie
				vet		eiwit		
				Soxhlet-extractie	Andere	Kjeldahl-analyse	Andere	
zwarte soldaatvlieg <i>Hermetia illucens</i> (prepupae), dieet: kippenmest	34,80	42,10	-		niet bekend		niet bekend	Newton <i>et al.</i> (2005)
zwarte soldaatvlieg <i>Hermetia illucens</i> (prepupae), dieet: varkensmest	28,00	43,20	-		niet bekend		niet bekend	Newton <i>et al.</i> (2005)
zwarte soldaatvliegmeel (prepupae)	11,80	47,60	-	✓		N × 6,25 (incl. correctie voor chitine)		Kroeckel <i>et al.</i> (2012)
meelworm <i>Tenebrio molitor</i> (larve)	-	47,76	-				niet bekend	Ramos-Elorduy (1998)
	32,80	52,70	8,43	✓		N × 6,25		Bernard <i>et al.</i> (1997)
meelworm <i>Tenebrio molitor</i> (pop)	30,80	54,60	8,74	✓		N × 6,25		Bernard <i>et al.</i> (1997)
meelworm <i>Tenebrio molitor</i> (adult)	18,40	63,70	10,19	✓		N × 6,25		Bernard <i>et al.</i> (1997)
	14,88	65,29	10,45	✓		N × 6,25		Finke (2007)
wasmot <i>Galleria mellonella</i> (larve)	51,40	41,25	6,60	✓		N × 6,25		Barker <i>et al.</i> (1998)
	58,55	38,80	6,21	✓		N × 6,25		Finke (2007)
	46,40	42,40	6,78	✓		N × 6,25		Bernard <i>et al.</i> (1997)
buffaloworm <i>Alphitobius diaperinus</i> (larve)	20,68	67,85	-		niet bekend		niet bekend	Despins & Axtell (1995)
treksprinkhaan <i>Locusta migratoria</i>	10,10	61,10	-		niet bekend		niet bekend	Conconi (1987)
	4,30	85,60	-		niet bekend		niet bekend	Bukkens (2005)
treksprinkhaan <i>Locusta migratoria</i> (instar 4-5), dieet: gras	17,90	61,70	9,87	✓		N × 6,25		Oonincx & van der Poel (2011)

treksprinkhaan <i>Locusta migratoria</i> (instar 4-5), dieet: gras en tarwezemelen	23,50	58,20	9,31	✓		N × 6,25		Oonincx & van der Poel (2011)
treksprinkhaan <i>Locusta migratoria</i> (instar 4-5), dieet: gras, tarwezemelen en wortelen	24,70	55,50	8,88	✓		N × 6,25		Oonincx & van der Poel (2011)
treksprinkhaan <i>Locusta migratoria</i> (adult), dieet: gras	18,60	64,90	10,38	✓		N × 6,25		Oonincx & van der Poel (2011)
treksprinkhaan <i>Locusta migratoria</i> (adult), dieet: gras en tarwezemelen	22,70	58,30	9,33	✓		N × 6,25		Oonincx & van der Poel (2011)
treksprinkhaan <i>Locusta migratoria</i> (adult), dieet: gras, tarwezemelen en wortelen	29,60	55,50	8,88	✓		N × 6,25		Oonincx & van der Poel (2011)
<i>Gammarus</i> spp.	-	47,00	-		niet bekend		niet bekend	Fredrickson & Reid (1988)
	3,60	47,00	7,52	✓		N × 6,25		Ballard <i>et al.</i> (2004)
blauwschaar reuzengarnaal <i>Macrobrachium</i> <i>rosenbergii</i>	3,20	70,40	-		Bligh & Dyer (1959)	N × 6,25		Balogun & Akegbejo- Samsons (1992)
zaagsel (dennenboom)	-	-	0,15				niet bekend	Biobib (2015)
zaagsel (eik)	-	-	0,03			X		Phyllis (2015)
zaagsel (elzeboom en spar)	-	-	0,46			X		Phyllis (2015)
sojahullen	1,90	11,00	-		niet bekend		niet bekend	NRC (1982)
	2,00	12,70	-		niet bekend		niet bekend	INRA (1989)
	2,80	12,10	-		niet bekend		niet bekend	Protector (1980)
	1,98	12,24	-		niet bekend		niet bekend	DLG (1976)
	1,90	11,70	-		niet bekend		niet bekend	ACV (1992)
	3,64	11,01	-		niet bekend		niet bekend	Feedstuffs (1992)
	2,10	15,81	-		niet bekend		niet bekend	WPSA (1989)
	2,60	12,30	-		niet bekend		niet bekend	Latam (1974)
	1,90	29,70	-		niet bekend		niet bekend	Asia (1987)
	2,00	10,30	1,65	✓		N × 6,25		Qualifeed (2015)
	1,90	11,10	1,78	✓		N × 6,25		CVB (2007)

gemiddelde	<u>2,25</u>	<u>13,63</u>	<u>1,71</u>				
tarwezemelen	3,00	15,50	2,48	✓		N × 6,25	Qualifeed (2015)
	3,50	15,60	2,50	✓		N × 6,25	CVB (2007)
verenmeel	7,70	84,50	13,52	✓		N × 6,25	Dale (1992)
	9,10	83,00	13,28	✓		N × 6,25	CVB (2007)
	2,90	84,90	-		niet bekend	niet bekend	NRC (1982)
	3,50	85,80	-		niet bekend	niet bekend	INRA (1989)
	2,60	87,20	-		niet bekend	niet bekend	UK-MAFF (1986)
	2,50	86,00	-		niet bekend	niet bekend	Protector (1980)
	3,44	84,10	-		niet bekend	niet bekend	DLG (1976)
	7,50	82,50	-		niet bekend	niet bekend	ACV (1992)
	4,20	83,50	-		niet bekend	niet bekend	Nehring (1969)
	2,50	85,00	-		niet bekend	niet bekend	Feedstuffs (1992)
	5,80	80,79	-		niet bekend	niet bekend	ADAS (1990)
	5,44	78,37	-		niet bekend	niet bekend	WPSA (1989)
	3,10	84,70	-		niet bekend	niet bekend	Latam (1974)
	7,40	87,10	-		niet bekend	niet bekend	Asia (1987)
	3,00	85,00	-		niet bekend	niet bekend	Setna (1991)
gemiddelde	<u>4,71</u>	<u>84,16</u>	<u>13,40</u>				
caseïne	0,00	80,30	12,85		Berntrop methode	N × 6,25	Depauw (2013)
	1,10	86,80	13,89	✓		N × 6,25	CVB (2007)
	1,40	83,00	-		niet bekend	niet bekend	INRA (1989)
gemiddelde	<u>0,83</u>	<u>83,37</u>	<u>13,37</u>				
cellulose	0,10	0,00	0,00		Berntrop methode	N × 6,25	Depauw (2013)
collageen rund	0,20	99,60	15,94		Berntrop methode	N × 6,25	Depauw (2013)
collageen varken	11,78	82,51	17,87		Gerber methode	N × 5,55	informatie fabrikant
eekhoorntjesbrood <i>Boletus Aureus</i>	4,47	27,17	4,35	✓		N × 6,25	Ouzouni & Riganakos (2007)
eekhoorntjesbrood <i>Boletus Edulis</i>	2,60	-	-	✓			Pedneault <i>et al.</i> (2007)
	3,30	-	-	✓			Kavishree <i>et al.</i> (2008)

	3,40	28,20	-		niet bekend	niet bekend	verpakking product
gemiddelde	<u>3,10</u>	<u>28,20</u>	-				
Instant bakkersgist	4,45	45,60	-		niet bekend	niet bekend	DLG (1976)
	4,10	43,60	-		niet bekend	niet bekend	Nehring (1969)
	5,17	46,42	-		niet bekend	niet bekend	WPSA (1989)
	1,30	40,90	-		niet bekend	niet bekend	Asia (1987)
	1,50	40,60	6,50	✓		N × 6,25	Qualifeed (2015)
gemiddelde	<u>3,30</u>	<u>43,42</u>	<u>6,50</u>				
chitine	2,45	38,95	6,23	✓		N × 6,25	Hossain en Blair (2007)