

SECRETARIA GENERAL DE PESCA

DIRECCIÓN GENERAL DE ORDENACIÓN PESQUERA Y ACUICULTURA

SUBDIRECCIÓN GENERAL DE ACUICULTURA, COMERCIALIZACIÓN PESQUERA Y ASUNTOS ESTRUCTURALES

# TÍTULO DEL PLAN

CONVOCATORIA 2021

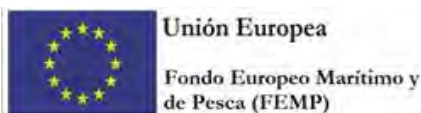
## INFORME FINAL CIENTÍFICO-TÉCNICO Y ECONOMICO

AÑO 2023

/2023

CORREO ELECTRÓNICO

comerpm@mapa.es



## Actividades

Indicar el estado de ejecución de cada una de las actividades contempladas en el proyecto a través de la siguiente tabla resumen:

ACTIVIDADES	ESTADO DE EJECUCIÓN			% EJECUCIÓN
	NO INICIADA	EN DESARROLLO	FINALIZADA	
Actividad 1....				
Actividad 2. Caracterización de las harinas de insectos producidas para su inclusión en alimentos para peces Tarea 2.1. Análisis nutricional de las harinas de insectos			x	100%
Actividad 3. Determinación del efecto de la inclusión de harina de insectos producida mediante los tratamientos estudiados en la dieta de peces  Tarea 3.2. Evaluación de las dietas con productos derivados de insectos en experiencias in vivo con lubina y dorada.			x	100%
Actividad 4. Prueba de concepto en empresa sobre la productividad y calidad de los peces cultivados en sistemas intensivos y alimentados con piensos con harina de insectos Tarea 4.1. Ensayo de engorde en empresa			x	100%
<b>TOTAL</b>				

## Subcontrataciones

### UGR

Se ha llevado a cabo la subcontratación de la empresa ANDALMAR BIOTECH S.L, para el desarrollo de la prueba de concepto en el marco de la Actividad 4 (Prueba de concepto en empresa sobre la productividad y calidad de los peces cultivados en sistemas intensivos y alimentados con piensos con harina de insectos) y en concreto para la tarea Tarea 4.1.2. Ensayo de engorde en empresa con pienso con harina de insectos La prueba de concepto se llevará a cabo en la Empresa de acuicultura Andalmar Biothech S.L, (Carchuna, Granada).

## Resultados obtenidos

### UGR

#### Actividad 2: Actividad 2. Caracterización de las harinas de insectos producidas para su inclusión en alimentos para peces

##### Tarea 2.1. Análisis nutricional de las harinas de insectos

##### Subtarea 2.1.5. Análisis de capacidad antioxidante

Tomando como partida las muestras de harina de insectos derivadas de la consecución de la Actividad 1, basadas en dos métodos de sacrificio (C: congelación, E: escaldado), dos métodos de secado (L: liofilizado, H: horno), dos métodos de desgrasado (P: prensa, S: fluido supercrítico) se establecieron un total de 8 muestras experimentales (dos réplicas de cada tipo): CHP, CHS, CLP, CLS, EHP, EHS, ELP, ELS.

- Tratamiento previo de muestras:

Las muestras se homogenizaron en tampón tris HCl 100 mM, 0.1 mM EDTA y 0.1 % triton X-100 (v/v) pH7.8 en una proporción 1:9 (p/v). Se centrifugaron durante 20 minutos a 30.000 g.

Los sobrenadantes obtenidos presentaron un color pálido con excepción de las muestras CLS (congelación, liofilizado, fluido supercrítico) que presentaron un color negro.



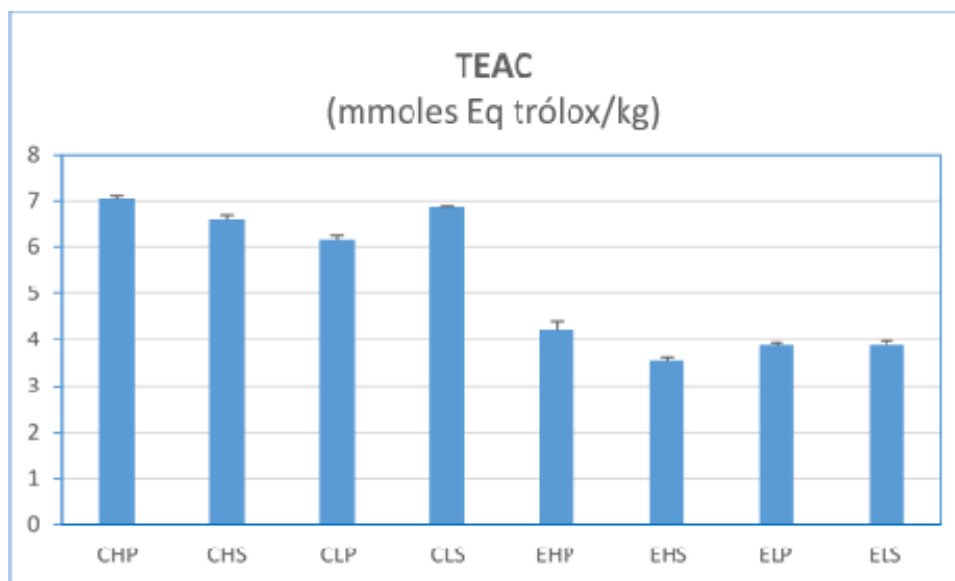
**Figura 2.1.5.1.** Izda: coloración clara de los extractos tras homogenización de muestras. Dcha: coloración del extracto en muestra CLS (congelación, liofilizado, fluido supercrítico) sometidas al mismo protocolo que las restantes.

- **Análisis de la capacidad antioxidante total**

### TEAC capacidad antioxidante total (TEAC)

La metodología se llevó a cabo según Erel O (2004) A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. Clin Biochem 37: 277–285.

Se utiliza un compuesto (ABTS) que en medio ácido se oxida por acción del peróxido de hidrógeno adquiriendo una coloración verde esmeralda (ABTS+). Cuando este compuesto se pone en presencia de un extracto con poder antioxidante el ABTS+ se vuelve a reducir produciéndose una pérdida de color proporcional a capacidad antioxidante total del extracto. La actividad antioxidante se refiere a la equivalente a un análogo hidrosoluble de la vitamina E (Trolox) que se toma como patrón.

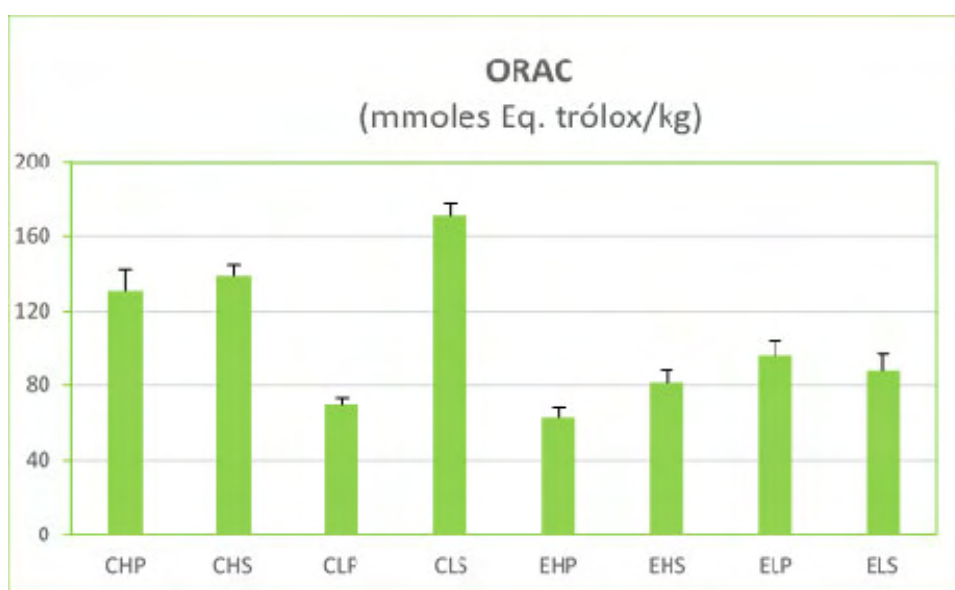


**Figura 2.1.5.2.** Capacidad antioxidante total (TEAC) en harina de larvas de mosca soldado negra (*Hermetia illucens*) producida mediante diferentes tratamientos. C: sacrificio congelación, E: sacrificio escaldado, H: secado horno, L: secado liofilizado, P: desgrasado prensa, S: desgrasado fluido supercrítico. Letras: Diferencias significativas entre los distintos tratamientos (ANOVA,  $p < 0.001$ , Tukey)

Los resultados ponen de manifiesto valores más elevados de actividad antioxidante en las muestras de harina procedentes de larvas sacrificadas por congelación.

### ÍNDICE ORAC (oxygen radical absorbance capacity)

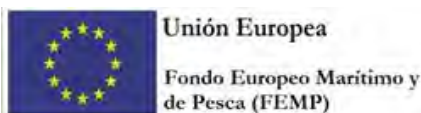
La metodología se realizó según Zapata y Zapata (2019) <http://hdl.handle.net/10946/3943E> fundamento se basa en medir la capacidad antioxidante (molecular) que tiene la muestra biológica impidiendo la oxidación de la fluoresceína sódica por un agente oxidante (AAPH). A mayor capacidad antioxidante de la muestra más emisión de fluorescencia. Se utilizará como patrón el Trolox (análogo de la vitamina E).



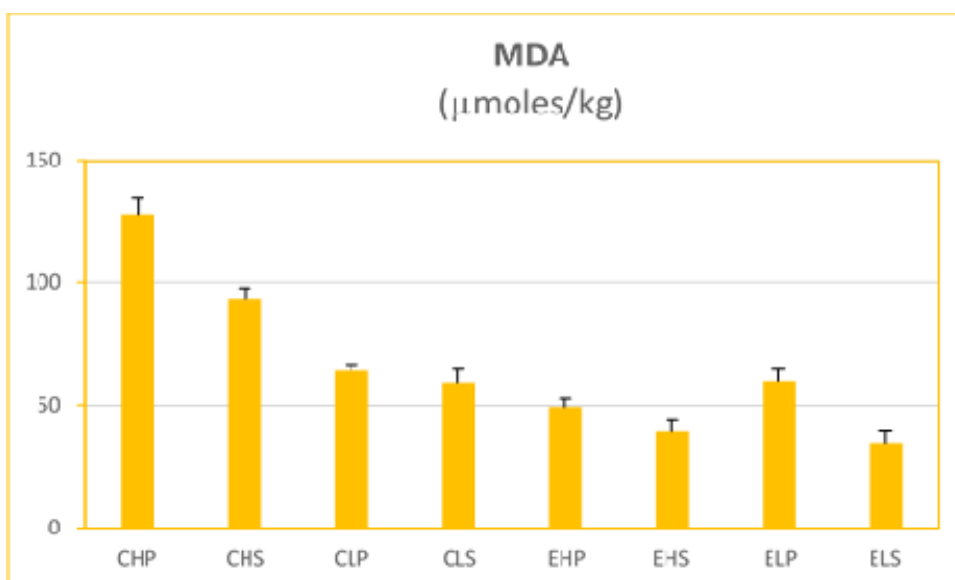
**Figura 2.1.5.3.** Índice ORAC (oxygen radical absorbance capacity) en harina de larvas de mosca soldado negra (*Hermetia illucens*) producida mediante diferentes tratamientos. C: sacrificio congelación, E: sacrificio escaldado, H: secado horno, L: secado liofilizado, P: desgrasado prensa, S: desgrasado fluido supercrítico. Letras: Diferencias significativas entre los distintos tratamientos (ANOVA,  $p < 0.001$ , Tukey)

Los resultados pusieron de manifiesto un perfil similar al observado con el análisis del TEAC si bien los valores de actividad antioxidante se mostraron en rangos muy superiores (más de 20 veces) con respecto a la metodología previa, lo que pone de manifiesto el mayor rango de detección de las diferentes moléculas antioxidantes.

Los resultados, en consonancia con lo obtenido para el TEAC, mostraron una tendencia a valores superiores en las harinas procedentes de animales sacrificados por congelación, si bien, se observó una excepción en el grupo CLP (congelación, liofilizado, prensa) que mostró valores similares a los animales sacrificados por escaldado. Cabe destacar que el grupo CLS (extracto más oscuro) mostró los valores significativamente más altos de capacidad antioxidante.



- **Análisis del grado de peroxidación lipídica**



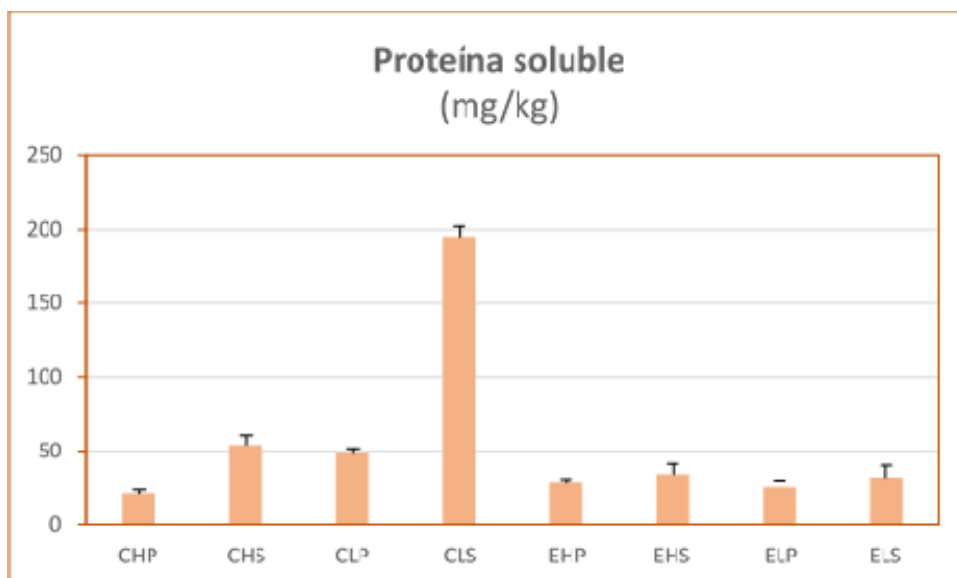
**Figura 2.1.5.4.** Peroxidación lipídica según niveles de malondialdehído (MDA) en harina de larvas de mosca soldado negra (*Hermetia illucens*) producida mediante diferentes tratamientos. C: sacrificio congelación, E: sacrificio escaldado, H: secado horno, L: secado liofilizado, P: desgrasado prensa, S: desgrasado fluido supercrítico. Letras: Diferencias significativas entre los distintos tratamientos (ANOVA,  $p:0.001$ , Tukey)

Los resultados pusieron de manifiesto valores de peroxidación superiores en los extractos de harinas procedentes de larvas sacrificadas por congelación y secado por horno con respecto a los secados por liofilizado. Los grupos sometidos a escaldado en el sacrificio presentaron valores más bajos de peroxidación siendo el desgrasado por fluido supercrítico el que mostró valores los valores más bajos con independencia del método de secado (EHS y ELS respectivamente).

- **Análisis de proteínas solubles**

La determinación se llevó a cabo por el método Bradford (1976) adaptado a microplacas. Se basa en la cuantificación de la unión de un colorante, el Azul de Coomassie G-250, a la proteína y utilizando como estándar albúmina de suero bovino.

Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of micro-gram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-254.



**Figura 2.1.5.5.** Proteína soluble en los extractos de harina de larvas de mosca soldado negra (*Hermetia illucens*) producida mediante diferentes tratamientos. C: sacrificio congelación, E: sacrificio escaldado, H: secado horno, L: secado liofilizado, P: desgrasado prensa, S: desgrasado fluido supercrítico. Letras: Diferencias significativas entre los distintos tratamientos (ANOVA,  $p < 0.001$ , Tukey)

Los resultados pusieron de manifiesto un valor claramente más elevado en el grupo CLS (congelación, liofilizado, fluido supercrítico), que previamente había mostrado un extracto muy oscuro y valores significativamente superiores de ORAC.

**Tabla 2.1.5.1.** Capacidad antioxidante, grado de peroxidación lipídica y proteína soluble en harina de larvas de mosca soldado negra (*Hermetia illucens*) producida mediante diferentes procedimientos de sacrificio, secado y desgrasado.

SACRIFICIO	SECADO	DESGRASADO	TEAC (mEq trolox/kg)	ORAC (mEq trolox/kg)	MDA (mmol/kg)	Proteína soluble (g/kg)
Congelado	Horno	Prensa	7,05 ± 0,05 <sup>e</sup>	130,75 ± 12,01 <sup>bc</sup>	128,23 ± 6,56 <sup>e</sup>	21,56 ± 2,57 <sup>a</sup>
		SF	6,62 ± 0,08 <sup>d</sup>	138,40 ± 6,61 <sup>cd</sup>	93,60 ± 4,00 <sup>d</sup>	54,38 ± 6,24 <sup>c</sup>
	Liofilizado	Prensa	6,15 ± 0,08 <sup>c</sup>	69,85 ± 3,40 <sup>a</sup>	64,73 ± 1,99 <sup>c</sup>	48,13 ± 3,84 <sup>bc</sup>
		SF	6,87 ± 0,01 <sup>de</sup>	171,62 ± 6,35 <sup>d</sup>	58,96 ± 6,27 <sup>bc</sup>	195,31 ± 7,08 <sup>d</sup>
Escaldado	Horno	Prensa	4,23 ± 0,17 <sup>b</sup>	63,26 ± 5,17 <sup>a</sup>	49,34 ± 3,43 <sup>abc</sup>	28,75 ± 1,84 <sup>abc</sup>
		SF	3,55 ± 0,07 <sup>a</sup>	81,22 ± 7,56 <sup>a</sup>	39,08 ± 5,35 <sup>ab</sup>	34,06 ± 7,06 <sup>abc</sup>
	Liofilizado	Prensa	3,87 ± 0,05 <sup>ab</sup>	96,29 ± 7,52 <sup>ab</sup>	59,60 ± 5,64 <sup>bc</sup>	25,94 ± 3,87 <sup>ab</sup>
		SF	3,87 ± 0,08 <sup>ab</sup>	88,49 ± 8,75 <sup>a</sup>	34,37 ± 4,84 <sup>a</sup>	31,88 ± 8,08 <sup>abc</sup>

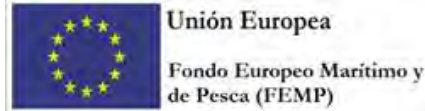
Los valores son media ± SEM (n=4/6). a,b,c,d,e: diferencias significativas para un mismo parámetro entre los diferentes tratamientos ANOVA (Tukey, P<0.001).

**Tabla 2.1.5.2** Análisis del modelo lineal general para las tres variables en el tratamiento de obtención de las harinas (sacrificio, secado y desengrasado)

SACRIFICIO	SECADO	DESGRASADO	TEAC (mEq trolox/kg)	ORAC (mEq trolox/kg)	MDA (mmol/kg)	Proteína soluble (g/kg)
Sacrificio			0,000	0,000	0,000	0,000
Secado			0,01	0,584	0,000	0,000
Desgrasado			0,120	0,000	0,000	0,000
Sacrificio*Secado			0,021	0,005	0,000	0,000
Sacrificio*Desgrasado			0,001	0,000	0,735	0,000
Secado*Desgrasado			0,000	0,005	0,334	0,000
Sacrificio*Secado*Desgrasado			0,07	0,000	0,005	0,000

El análisis estadístico mostró en general un efecto significativo sobre los parámetros analizados de las variables asociadas al tratamiento de las harinas tanto de forma individual como conjunta. Sin embargo, el método de desgrasado, que afectó de forma no parece verse influido por las variables sacrificio o secado cuando se analizó el efecto conjunto.





### Actividad 3. Determinación del efecto de la inclusión de harina de insectos producida mediante los tratamientos estudiados en la dieta de peces

#### Tarea 3.2. Evaluación de las dietas con productos derivados de insectos en experiencias in vivo con lubina y dorada.

En este ensayo se analizaron cuatro situaciones experimentales: control (100 % harina de pescado) y tres restantes con un 50 % de sustitución de la fuente proteica por harina de insecto: ELP (escaldado, liofilizado, prensa), EHP (escaldado, horno, prensa), EHS (escaldado, horno, extracción fluidos supercríticos).

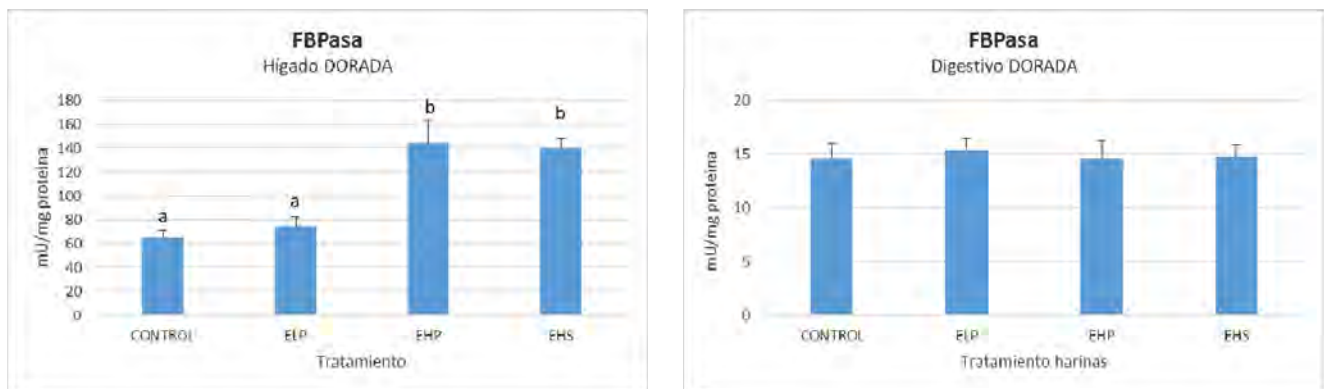
##### Subtarea 3.2.4. Estudio del metabolismo intermediario de los peces

Se analizaron las principales enzimas del metabolismo intermediario de rutas glucolíticas, pensosas fosfato, ciclo de Krebs, etc. Así se analizó la actividad fructosa bisfosfatasa (FBPasa), piruvato quinasa (PK), glutamato deshidrogenasa (GDH), glutamato oxalacetato transaminasa (GOT), glutamato piruvato transaminasa (GPT), CS (citrato sintasa) y glucosa 6P-deshidrogenasa (G6PDH).

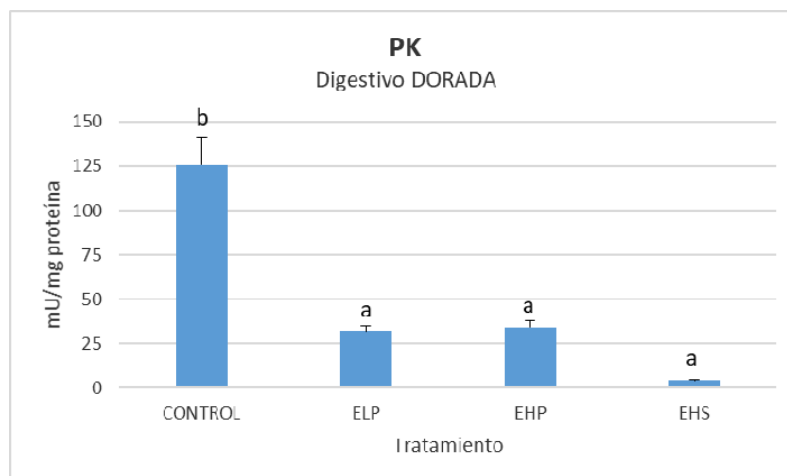
Los ensayos se llevaron a cabo en tejido hepático y en tejido digestivo de las dos especies estudiadas lubina (*Dicentrarchus labrax*) y dorada (*Sparus aurata*).

## RESULTADOS ENSAYO EN DORADA

La actividad FBPasa mostró diferencias significativas en hígado de dorada. Los valores más altos se detectaron en los grupos EHP y EHS, mostrando el grupo ELP valores significativamente más bajos y similares al grupo control. La actividad PK no se detectó en hígado de dorada. En digestivo mostró valores significativamente más elevado en el grupo control con respecto a los tres restantes. Todas las enzimas se determinarán siguiendo los métodos descritos por Pérez-Jiménez et al. (2009).

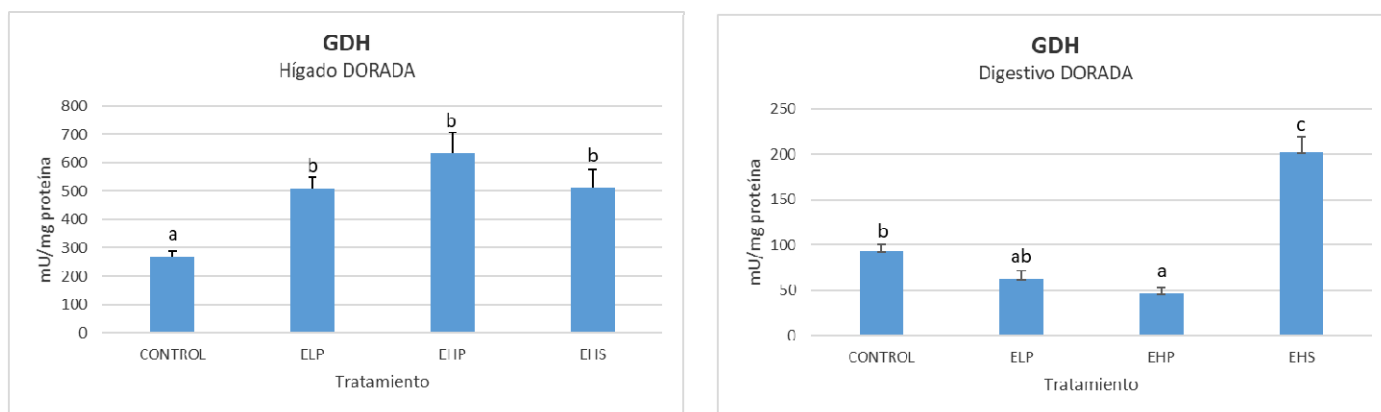


**Figura 3.2.4.1.** Actividad fructosa bisfosfatasa en dorada alimentada con diferentes piensos. Los valores son media  $\pm$  SEM (n=9). Control (100 % harina de pescado). Resto de grupos 50 % harina de insecto con diferente tratamiento previo: E (sacrificio por escaldado), L (secado por liofilizado), H (secado por horno), P (desgrasado por prensa), S (desgrasado por fluido supercrítico). a,b: diferencias significativas entre los tratamientos ANOVA (Tukey,  $P < 0.05$ ).



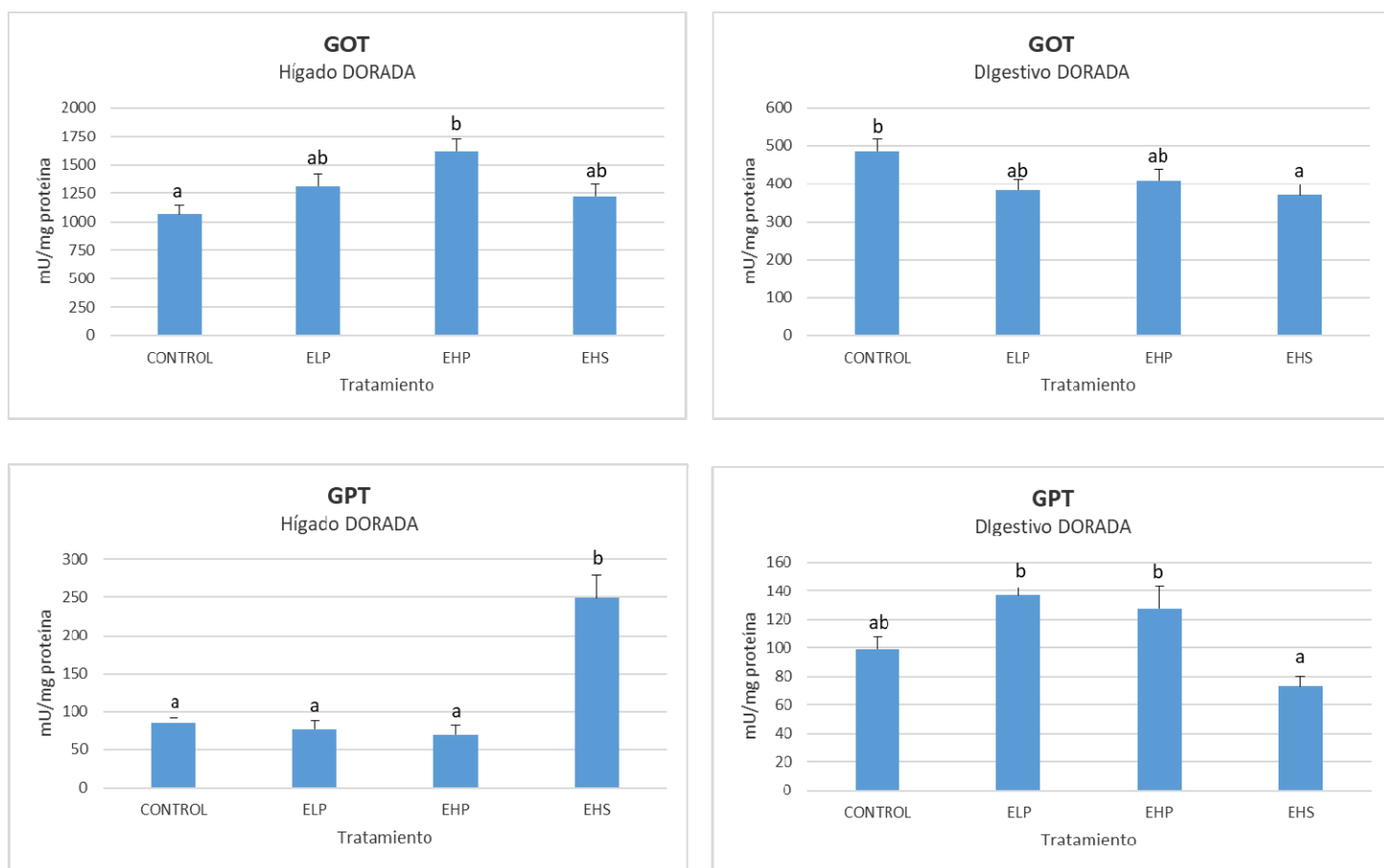
**Figura 3.2.4.2.** Actividad piruvato kinasa en dorada alimentada con diferentes piensos. Los valores son media  $\pm$  SEM (n=9). Control (100 % harina de pescado). Resto de grupos 50 % harina de insecto con diferente tratamiento previo: E (sacrificio por escaldado), L (secado por liofilizado), H (secado por horno), P (desgrasado por prensa), S (desgrasado por fluido supercrítico). a,b: diferencias significativas entre los tratamientos ANOVA (Tukey,  $P < 0.05$ ).

La enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) mostró diferencias significativas tanto en hígado como en digestivo de dorada. En el primer tejido los valores fueron significativamente superiores en las dietas que incorporaron harina de insecto. En cuanto al digestivo se observaron diferencias entre grupos siendo destacable el aumento significativo en los animales alimentados con el tratamiento EHS.



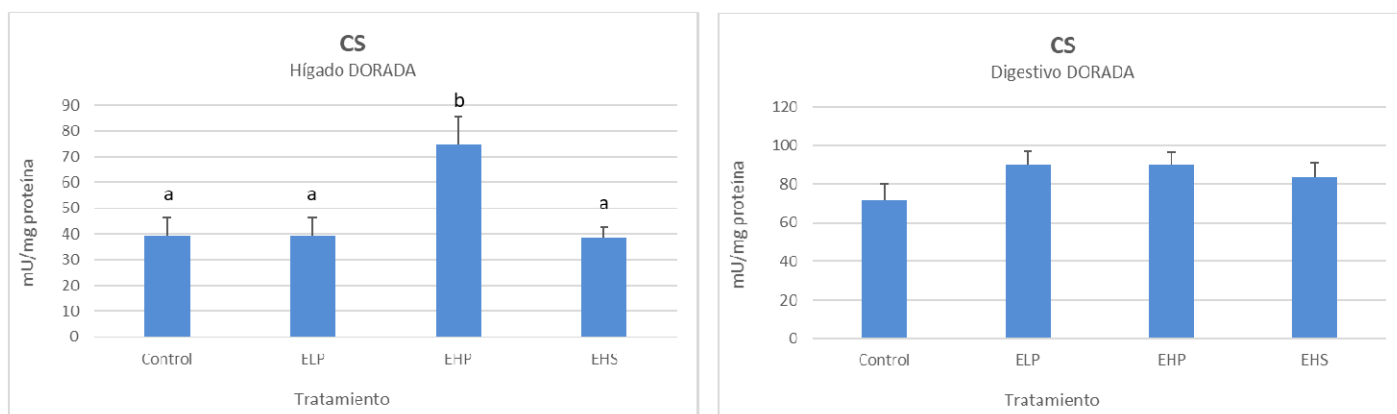
**Figura 3.2.4.3.** Actividad glutamato deshidrogenasa en dorada alimentada con diferentes piensos. Los valores son media  $\pm$  SEM (n=9). Control (100 % harina de pescado). Resto de grupos 50 % harina de insecto con diferente tratamiento previo: E (sacrificio por escaldado), L (secado por liofilizado), H (secado por horno), P (desgrasado por prensa), S (desgrasado por fluido supercrítico). a,b,c: diferencias significativas entre los tratamientos ANOVA (Tukey,  $P < 0.05$ ).

Con relación a las enzimas transaminasas GOT y GPT, ambas enzimas mostraron diferencias significativas entre grupos tanto en el hígado como el intestino. En el caso del hígado el grupo control mostró los valores más bajos de actividad, observándose valores significativamente elevados en grupo EHP con respecto al control para la GOT y de manera muy destacada en el grupo EHS con respecto al control para la GPT



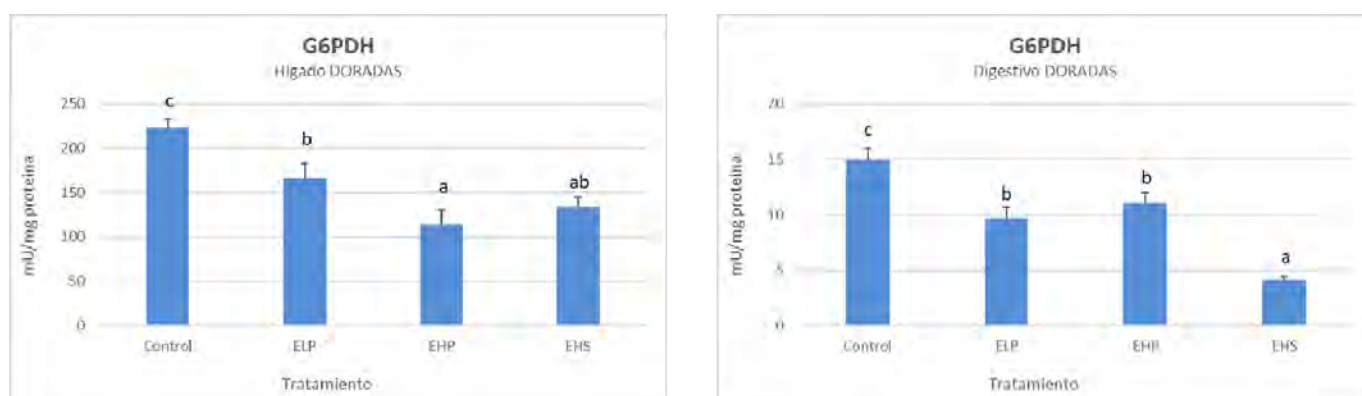
**Figura 3.2.4.4.** Actividad glutamato oxalacetato transaminasa y glutamato piruvato transaminasa en dorada alimentada con diferentes piensos. Los valores son media  $\pm$  SEM (n=9). Control (100 % harina de pescado). Resto de grupos 50 % harina de insecto con diferente tratamiento previo: E (sacrificio por escaldado), L (secado por liofilizado), H (secado por horno), P (desgrasado por prensa), S (desgrasado por fluido supercrítico). a,b: diferencias significativas entre los tratamientos ANOVA (Tukey, P<0.05).

El estudio de la actividad citrato sintasa (CS) mostró diferencias significativas tanto en hígado como en digestivo. En ambos tejidos el valor más alto se encontró en el tratamiento ELP. Los valores control fueron similares a los restantes grupos.



**Figura 3.2.4.5.** Actividad citrato sintasa en dorada alimentada con diferentes piensos. Los valores son media  $\pm$  SEM (n=9). Control (100 % harina de pescado). Resto de grupos 50 % harina de insecto con diferente tratamiento previo: E (sacrificio por escaldado), L (secado por liofilizado), H (secado por horno), P (desgrasado por prensa), S (desgrasado por fluido supercrítico). a,b: diferencias significativas entre los tratamientos ANOVA (Tukey,  $P < 0.05$ ).

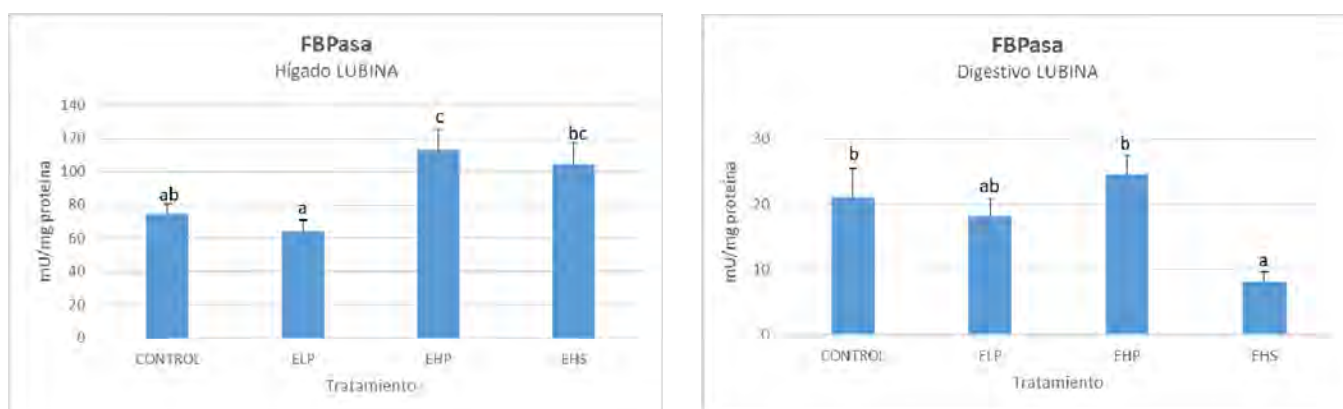
La actividad glucosa 6P deshidrogenasa (G6PDH) mostró valores significativamente más altos en el grupo control con respecto a los restantes grupos con harina de insecto. Estas diferencias se observaron tanto en hígado como en intestino de dorada.



**Figura 3.2.4.6.** Actividad glucosa 6P deshidrogenasa en dorada alimentada con diferentes piensos. Los valores son media  $\pm$  SEM (n=9). Control (100 % harina de pescado). Resto de grupos 50 % harina de insecto con diferente tratamiento previo: E (sacrificio por escaldado), L (secado por liofilizado), H (secado por horno), P (desgrasado por prensa), S (desgrasado por fluido supercrítico). a,b,c: diferencias significativas entre los tratamientos ANOVA (Tukey,  $P < 0.05$ ).

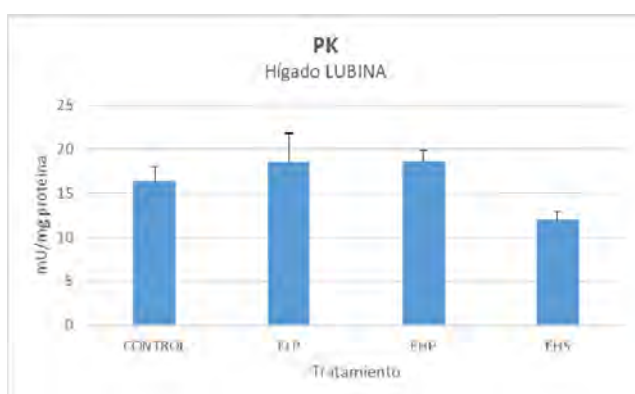
## RESULTADOS ENSAYO EN LUBINA

El estudio del metabolismo intermediario se llevó a cabo con el análisis de las principales enzimas implicadas en el mismo. La actividad fructosa bisfosfatasa mostró valores significativamente inferiores en hígado de grupo control y ELP. En digestivo sin embargo los valores más bajos se mostraron en el grupo EHS. Un dato a destacar es que en ambos tejidos los valores más altos fueron mostrados por el grupo EHP.



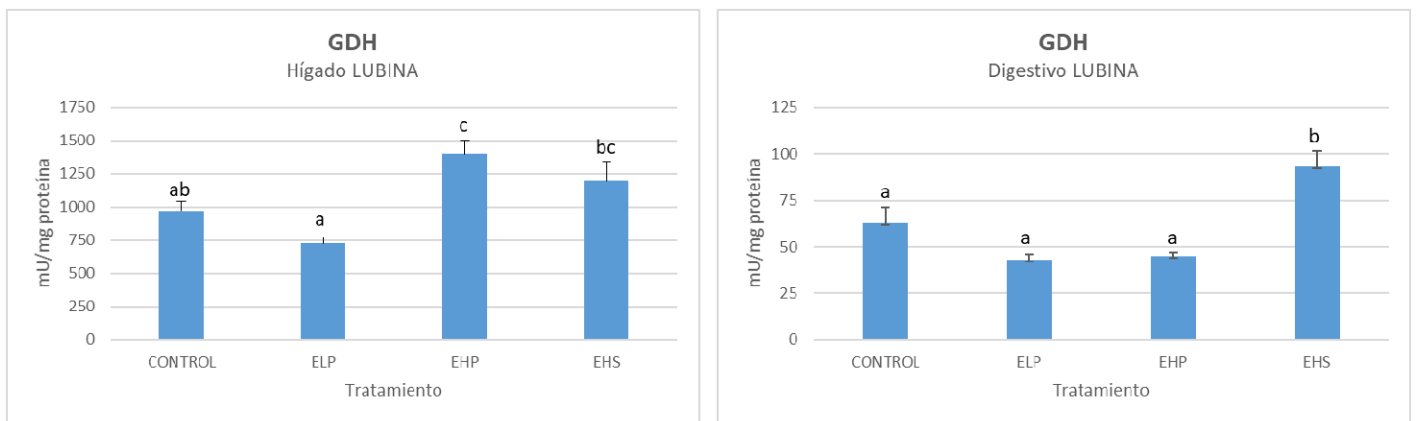
**Figura 3.2.4.7.** Actividad fructosa bisfosfatasa en lubina alimentada con diferentes piensos. Los valores son media  $\pm$  SEM (n=9). Control (100 % harina de pescado). Resto de grupos 50 % harina de insecto con diferente tratamiento previo: E (sacrificio por escaldado), L (secado por liofilizado), H (secado por horno), P (desgrasado por prensa), S (desgrasado por fluido supercrítico). a,b,c: diferencias significativas entre los tratamientos ANOVA (Tukey,  $P < 0.05$ ).

La actividad piruvato kinasa, a diferencia de lo observado en dorada, sí se detectó en hígado (aunque no en intestino). En este enzima, si bien se observaron algunas tendencias, estas no fueron significativas.



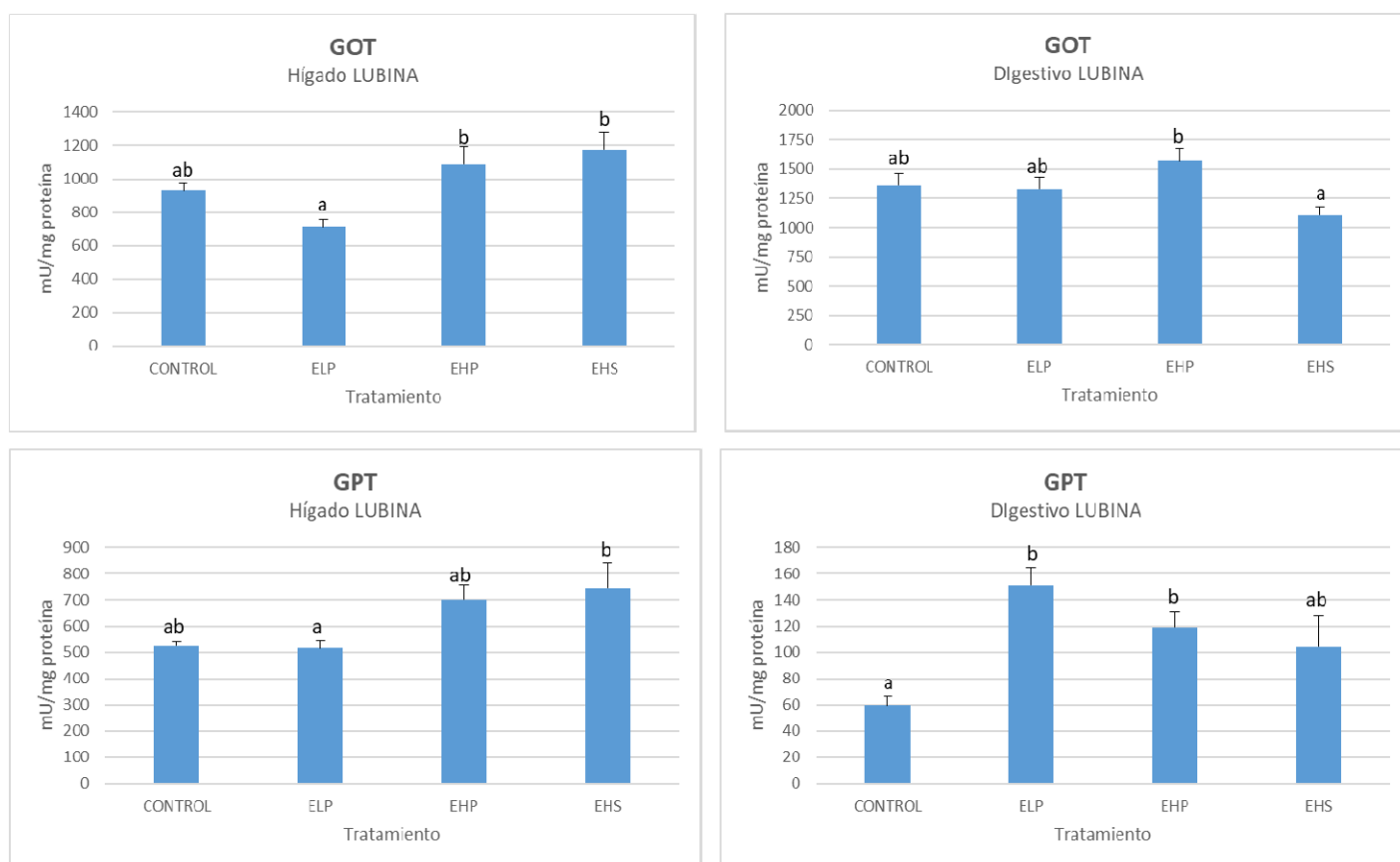
**Figura 3.2.4.8.** Actividad piruvato kinasa en lubina alimentada con diferentes piensos. Los valores son media  $\pm$  SEM (n=9). Control (100 % harina de pescado). Resto de grupos 50 % harina de insecto con diferente tratamiento previo: E (sacrificio por escaldado), L (secado por liofilizado), H (secado por horno), P (desgrasado por prensa), S (desgrasado por fluido supercrítico).

La actividad glutamato deshidrogenasa (GDH) en hígado mostró un comportamiento similar a la observado en la FBPasa, con valores inferiores en grupo control y ELP y los valores significativamente más altos en EHP. En digestivo esta enzima mostró valores similares entre grupos salvo el EHS que mostró una actividad significativamente más elevada.



**Figura 3.2.4.9.** Actividad glutamato deshidrogenasa en lubina alimentada con diferentes piensos. Los valores son media  $\pm$  SEM (n=9). Control (100 % harina de pescado). Resto de grupos 50 % harina de insecto con diferente tratamiento previo: E (sacrificio por escaldado), L (secado por liofilizado), H (secado por horno), P (desgrasado por prensa), S (desgrasado por fluido supercrítico). a,b,c: diferencias significativas entre los tratamientos ANOVA (Tukey,  $P < 0.05$ ).

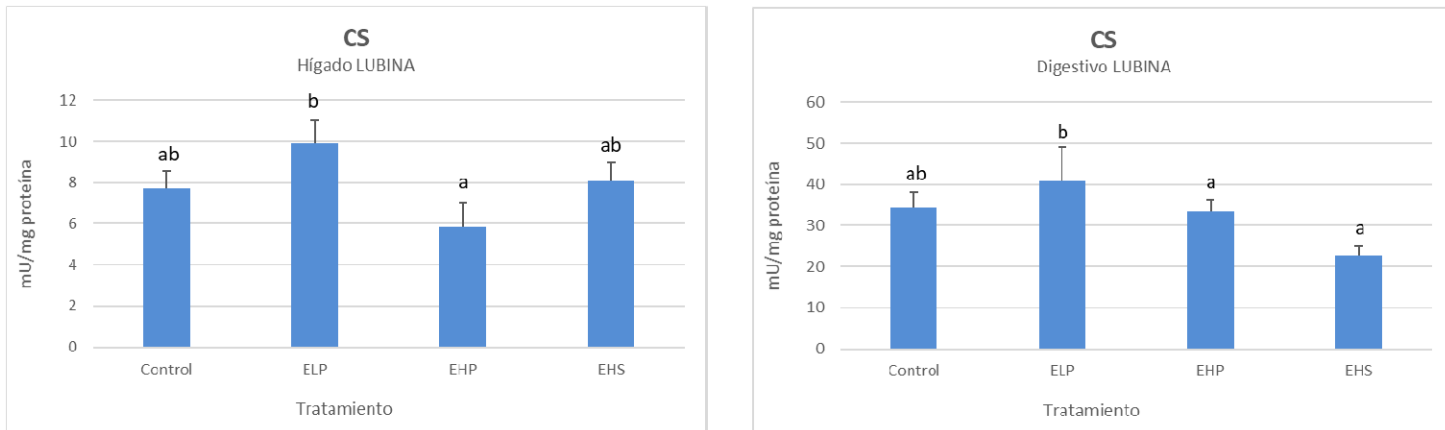
La evaluación de las enzimas transaminasas (GOT y GTP) en hígado puso de manifiesto de forma significativa una tendencia general a presentar valores inferiores en el grupo control y ELP con respecto a los grupos EHP y EHS que mostraron valores superiores. En digestivo dichos valores más elevados con respecto al control en general se mantuvieron en el grupo EHP y ELP en el caso de la GTP.



**Figura 3.2.4.10.** Actividad glutamato oxalacetato transaminasa y glutamato piruvato transaminasa en lubina alimentada con diferentes pienso. Los valores son media  $\pm$  SEM (n=9). Control (100 % harina de pescado). Resto de grupos 50 % harina de insecto con diferente tratamiento previo: E (sacrificio por escaldado), L (secado por liofilizado), H (secado por horno), P (desgrasado por prensa), S (desgrasado por fluido supercrítico). a,b: diferencias significativas entre los tratamientos ANOVA (Tukey, P<0.05).

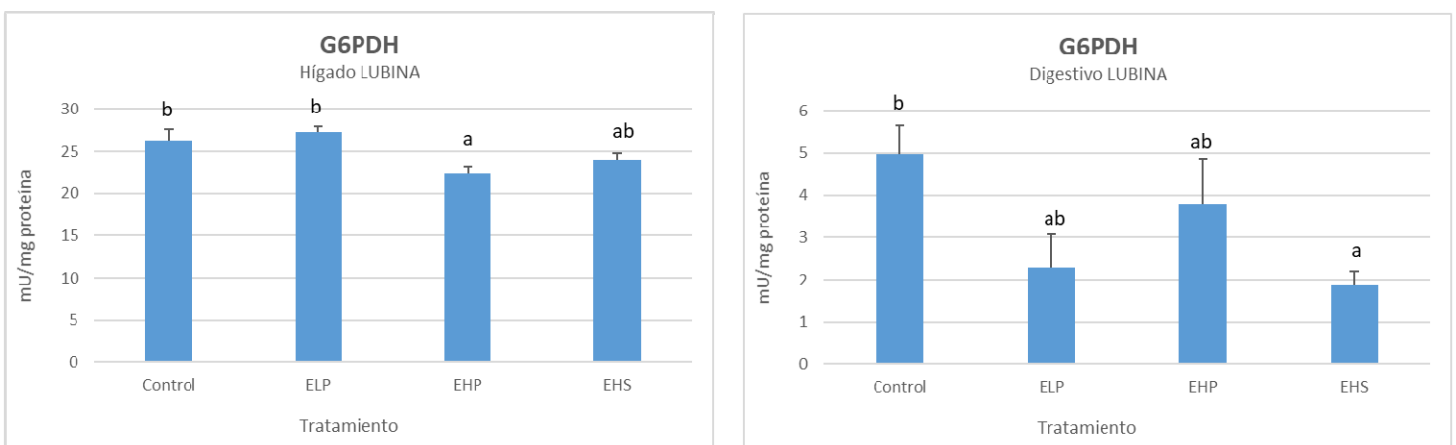


La actividad citrato sintasa (CS) mostró en general, y en ambos tejidos, valores superiores en el grupo ELP con respecto a los restantes grupos experimentales. Si bien estas tendencias no fueron significativas con respecto al grupo control. El grupo EHP en hígado mostró los valores más bajos.



**Figura 3.2.4.11.** Actividad citrato sintasa en lubina alimentada con diferentes piensos. Los valores son media  $\pm$  SEM (n=9). Control (100 % harina de pescado). Resto de grupos 50 % harina de insecto con diferente tratamiento previo: E (sacrificio por escaldado), L (secado por liofilizado), H (secado por horno), P (desgrasado por prensa), S (desgrasado por fluido supercrítico). a,b: diferencias significativas entre los tratamientos ANOVA (Tukey, P<0.05).

La actividad glucosa 6P deshidrogenasa, implicada en la ruta de las pentosas fosfato, mostró en hígado los valores más bajos de actividad en el grupo EHP y en digestivo valores significativamente superiores en el grupo control



**Figura 3.2.4.12.** Actividad glucosa 6P deshidrogenasa en lubina alimentada con diferentes piensos. Los valores son media  $\pm$  SEM (n=9). Control (100 % harina de pescado). Resto de grupos 50 % harina de insecto con diferente tratamiento previo: E (sacrificio por escaldado), L (secado por liofilizado), H (secado por horno), P (desgrasado por prensa), S (desgrasado por fluido supercrítico). a,b: diferencias significativas entre los tratamientos ANOVA (Tukey, P<0.05).

### Subtarea 3.2.5. Evaluación del estado oxidativo de los peces

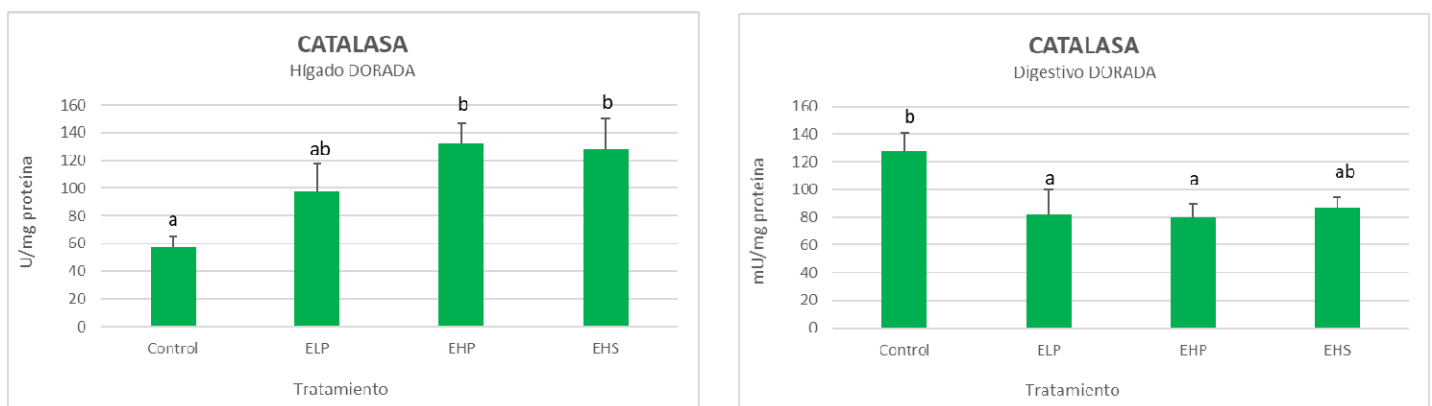
En esta subtarea se analizaron las principales enzimas antioxidantes como la catalasa, glutatión reductasa según metodología descrita en Pérez-Jiménez et al. (2009), así como la glutatión transferasa, DT-diaforasa según Sanz et al. (2013). Finalmente, como evaluación global, se determinó la capacidad antioxidante total (TEAC) medida como equivalentes de trolox (análogo de la vitamina E) según Sanz et al. (2016). La evaluación posterior del daño oxidativo (medido como concentración de MDA) supone un aspecto clave a la hora de determinar si se ha producido daño oxidativo del tejido hepático y digestivo según Trenzado et al. (2009).

Los ensayos se llevaron a cabo en tejido hepático y en tejido digestivo de las dos especies estudiadas lubina (*Dicentrarchus labrax*) y dorada (*Sparus aurata*).

### RESULTADOS ENSAYO EN DORADA

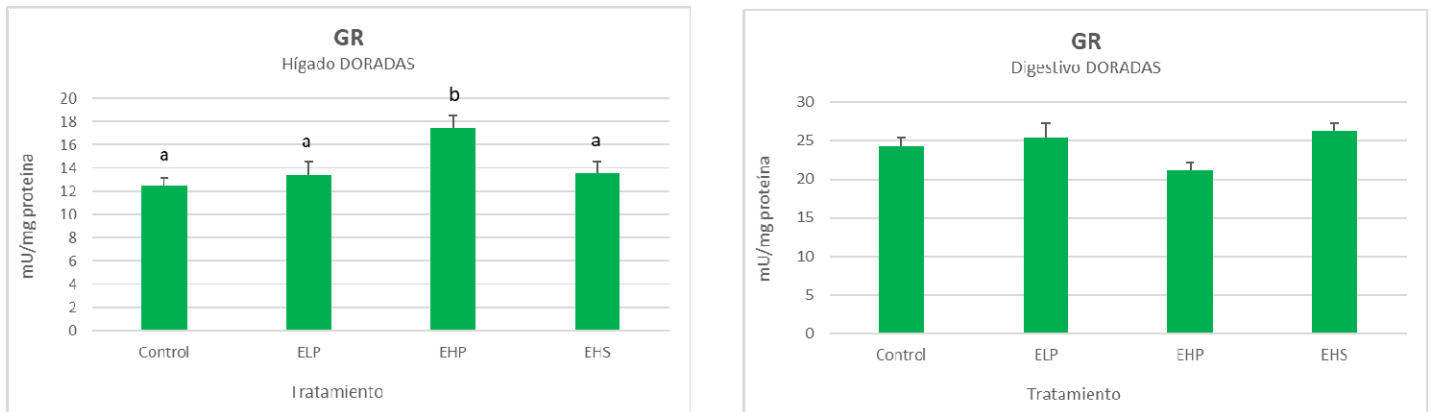
La evaluación de la actividad catalasa, enzima que interviene en la detoxificación del peróxido de hidrógeno, mostró en hígado valores significativamente superiores en las dietas que presentaban harina de insecto con respecto a la dieta control, y en concreto en los grupos en los que el secado de la larva se realizó con estufa. Por otro lado, en intestino estas diferencias mostraron valores superiores en los animales control con respecto a los restantes grupos.

La actividad catalasa en hígado mostró valores significativamente superiores en los grupos EHP y EHS siendo el grupo control el que presentó la actividad más baja. Por el contrario, en digestivo, el grupo control se mostró significativamente más elevado.



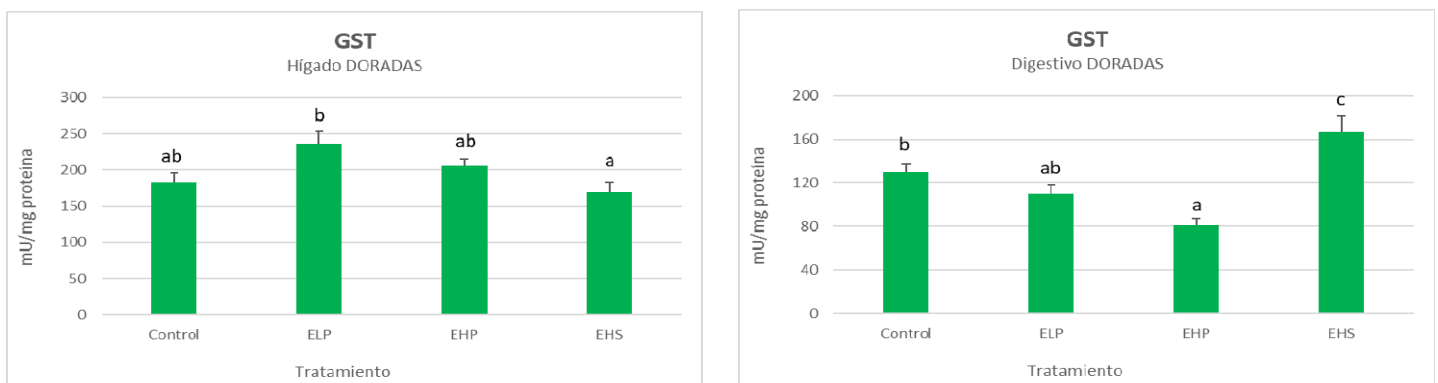
**Figura 3.2.5.1.** Actividad catalasa en dorada alimentada con diferentes piensos. Los valores son media  $\pm$  SEM (n=9). Control (100 % harina de pescado). Resto de grupos 50 % harina de insecto con diferente tratamiento previo: E (sacrificio por escaldado), L (secado por liofilizado), H (secado por horno), P (desgrasado por prensa), S (desgrasado por fluido supercrítico). a,b: diferencias significativas entre los tratamientos ANOVA (Tukey, P<0.05).

La glutatión reductasa (GR) es una enzima responsable de la regeneración del glutatión, molécula que interviene previniendo los procesos oxidativos. Los resultados mostraron que en hígado el grupo EHP mostró valores significativamente superiores a los restantes. En cuanto al intestino, no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales.



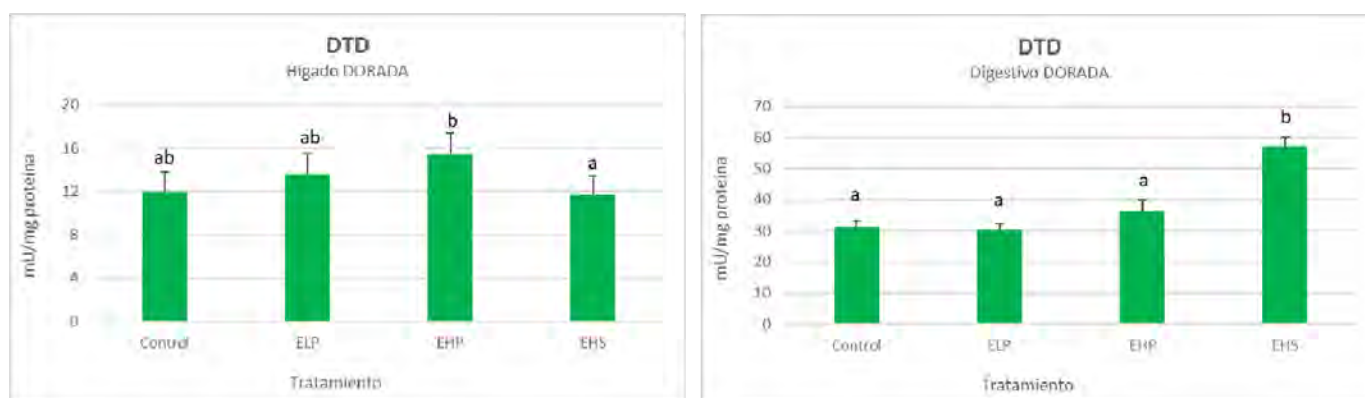
**Figura 3.2.5.2.** Actividad glutatión reductasa en dorada alimentada con diferentes piensos. Los valores son media  $\pm$  SEM (n=9). Control (100 % harina de pescado). Resto de grupos 50 % harina de insecto con diferente tratamiento previo: E (sacrificio por escaldado), L (secado por liofilizado), H (secado por horno), P (desgrasado por prensa), S (desgrasado por fluido supercrítico). a,b: diferencias significativas entre los tratamientos ANOVA (Tukey,  $P < 0.05$ ).

Otra de las enzimas implicadas en el metabolismo del glutatión es la glutatión transferasa (GST), dicha enzima suele estar implicada en procesos detoxificadores asociados al uso de glutatión. Los resultados mostraron diferencias significativas e hígado, mostrando valores superiores el grupo en el que la harina se había secado por el método del liofilizado (ELP). En intestino también se observaron diferencias entre grupos, mostrando los valores significativamente más altos el grupo EHS.



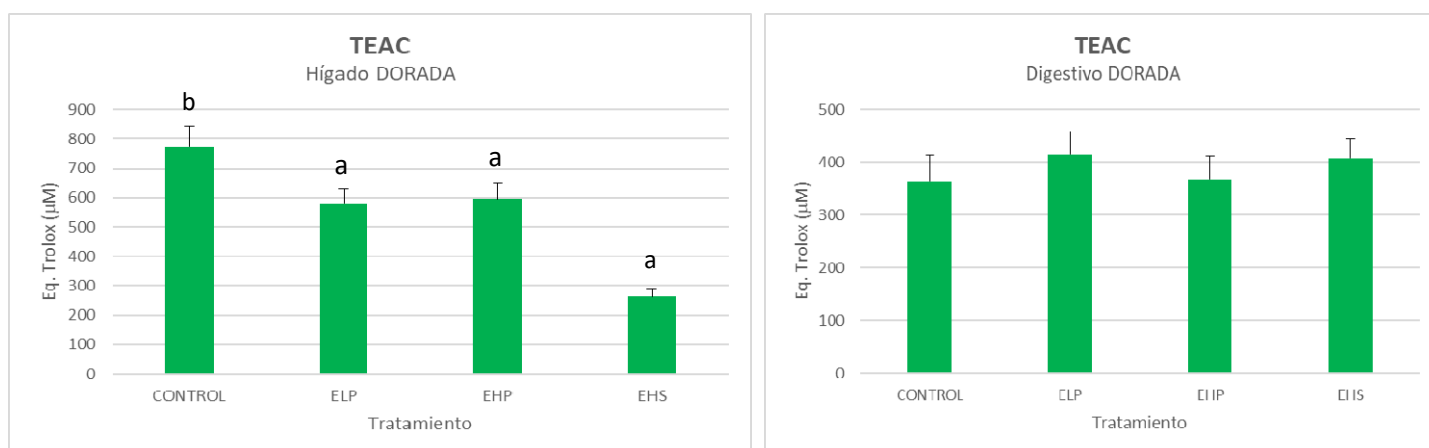
**Figura 3.2.5.3.** Actividad glutatión transferasa en dorada alimentada con diferentes piensos. Los valores son media  $\pm$  SEM (n=9). Control (100 % harina de pescado). Resto de grupos 50 % harina de insecto con diferente tratamiento previo: E (sacrificio por escaldado), L (secado por liofilizado), H (secado por horno), P (desgrasado por prensa), S (desgrasado por fluido supercrítico). a,b: diferencias significativas entre los tratamientos ANOVA (Tukey,  $P < 0.05$ ).

La otra enzima asociada a procesos de detoxificación es la DT-diaforasa. Esta enzima interviene previniendo la formación de especies de oxígeno reactivo a nivel de la cadena de transporte electrónico mitocondrial. La actividad DTD mostró en ambos tejidos diferencias significativas observándose los valores más altos en hígado en el grupo EHP. En intestino de nuevo el grupo EHS mostró valores significativamente superiores al resto tal como se observó en la GST.



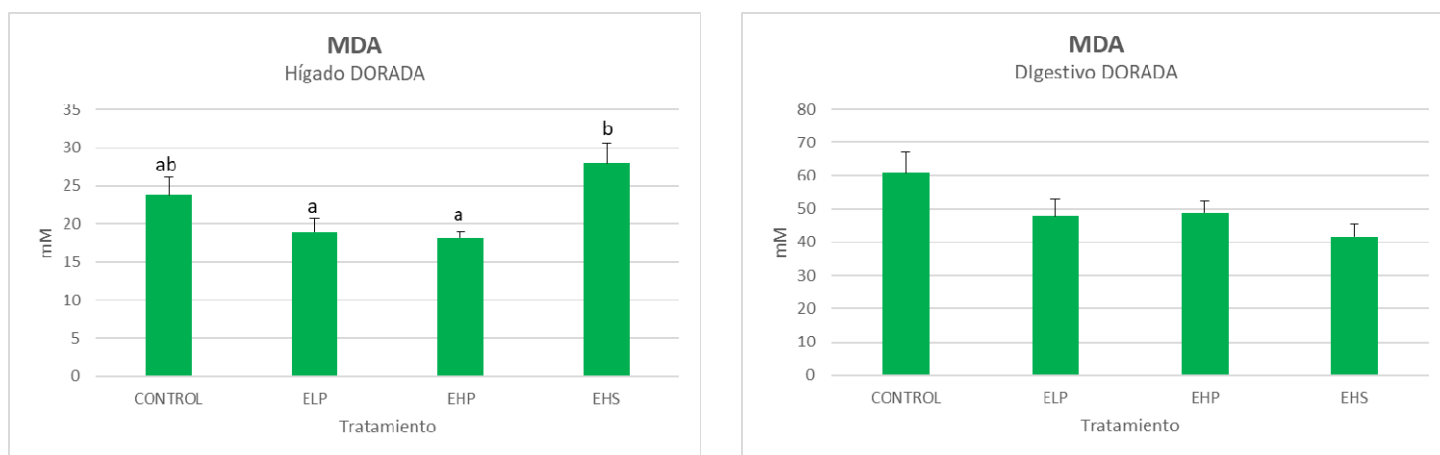
**Figura 3.2.5.4.** Actividad DT-diaforasa en dorada alimentada con diferentes piensos. Los valores son media  $\pm$  SEM (n=9). Control (100 % harina de pescado). Resto de grupos 50 % harina de insecto con diferente tratamiento previo: E (sacrificio por escaldado), L (secado por liofilizado), H (secado por horno), P (desgrasado por prensa), S (desgrasado por fluido supercrítico). a,b: diferencias significativas entre los tratamientos ANOVA (Tukey,  $P < 0.05$ ).

La evaluación de la capacidad antioxidante total (TEAC) mostró diferencias significativas en el hígado, observándose valores superiores en el grupo control con respecto a los otros grupos experimentales. Por otro lado, en intestino no se observaron diferencias.



**Figura 3.2.5.5.** Capacidad antioxidante total (TEAC) en dorada alimentada con diferentes piensos. Los valores son media  $\pm$  SEM (n=9). Control (100 % harina de pescado). Resto de grupos 50 % harina de insecto con diferente tratamiento previo: E (sacrificio por escaldado), L (secado por liofilizado), H (secado por horno), P (desgrasado por prensa), S (desgrasado por fluido supercrítico). a,b: diferencias significativas entre los tratamientos ANOVA (Tukey,  $P < 0.05$ ).

Finalmente, uno de los parámetros clave en la determinación del daño oxidativo es el grado de peroxidación lipídica evaluado como concentración de malondialdehído (MDA). De nuevo, las diferencias significativas se observaron en hígado, y curiosamente los valores más altos de peroxidación coinciden con los más bajos de capacidad antioxidante, aspecto que por otro lado muestra la correlación inversa entre ambos parámetros.

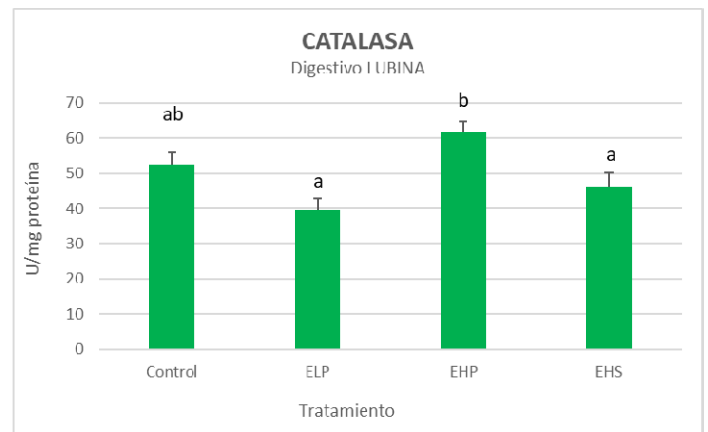
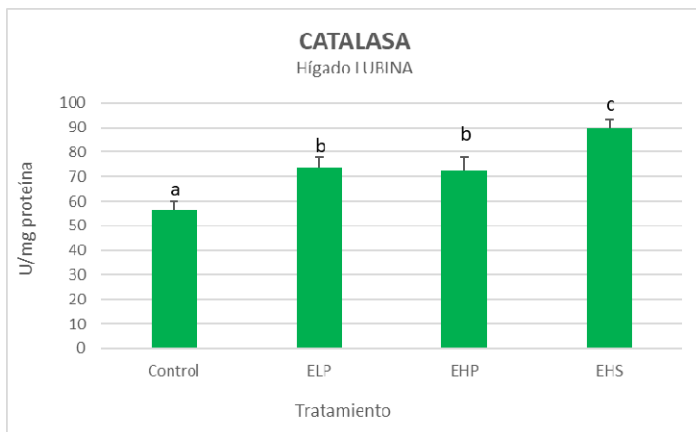


**Figura 3.2.5.6.** Peroxidación lipídica (mediada como concentración de malondialdehído) en dorada alimentada con diferentes piensos. Los valores son media  $\pm$  SEM (n=9). Control (100 % harina de pescado). Resto de grupos 50 % harina de insecto con diferente tratamiento previo: E (sacrificio por escaldado), L (secado por liofilizado), H (secado por horno), P (desgrasado por prensa), S (desgrasado por fluido supercrítico). a,b: diferencias significativas entre los tratamientos ANOVA (Tukey,  $P < 0.05$ ).

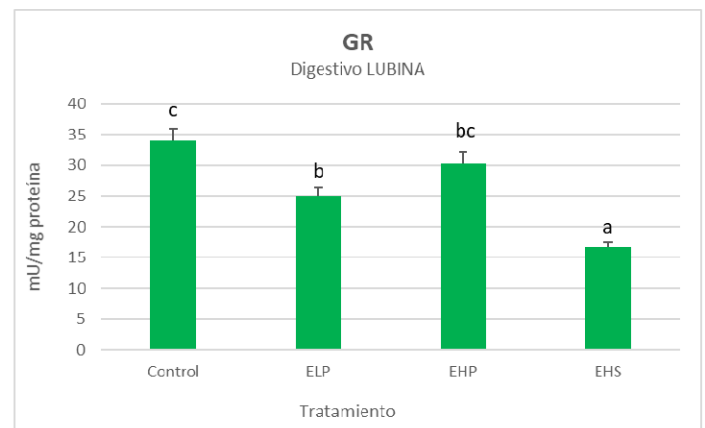
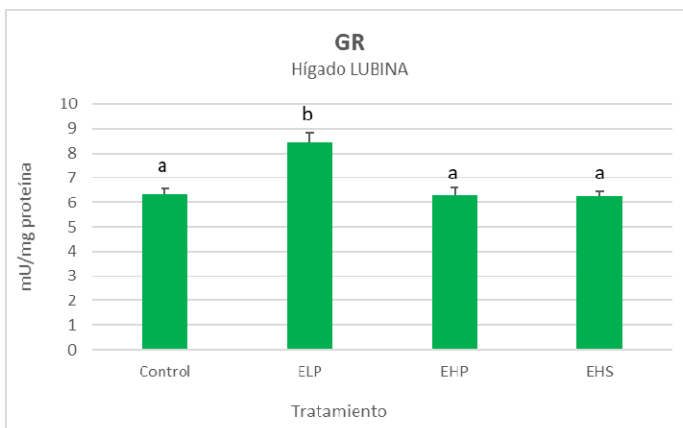
## RESULTADOS ENSAYO EN LUBINA

La evaluación de la capacidad antioxidante y daño oxidativo en lubina se llevó a cabo al igual que en la dorada, mediante el estudio de las principales enzimas antioxidantes y parámetros determinantes de daño oxidativo.

La actividad catalasa puso de manifiesto en hígado valores superiores en las dietas que incorporaron harina de insecto. En digestivo esta diferencia no fue tan patente, observándose valores elevados en el grupo EHP pero similares a los control. La actividad GR e hígado mostró valores más elevados en el grupo ELP con respecto al control, mientras que en digestivo esta relación fue opuesta, mostrando el grupo control los valores más elevados.

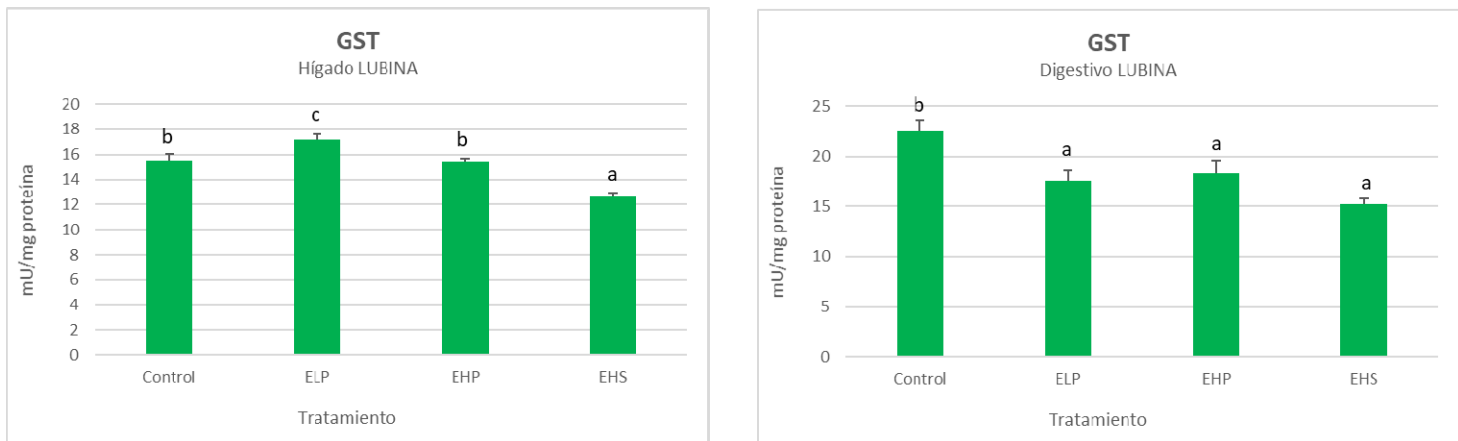


**Figura 3.2.5.7.** Actividad catalasa en lubina alimentada con diferentes piensos. Los valores son media  $\pm$  SEM (n=9). Control (100 % harina de pescado). Resto de grupos 50 % harina de insecto con diferente tratamiento previo: E (sacrificio por escaldado), L (secado por liofilizado), H (secado por horno), P (desgrasado por prensa), S (desgrasado por fluido supercrítico). a,b,c: diferencias significativas entre los tratamientos ANOVA (Tukey, P<0.05).

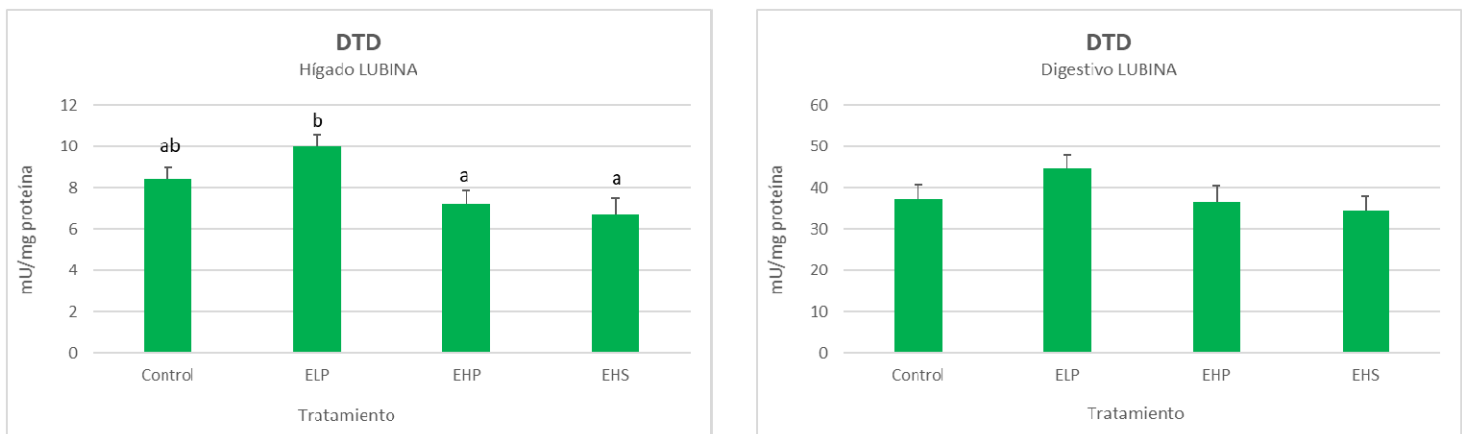


**Figura 3.2.5.8.** Actividad glutatión reductasa en lubina alimentada con diferentes piensos. Los valores son media  $\pm$  SEM (n=9). Control (100 % harina de pescado). Resto de grupos 50 % harina de insecto con diferente tratamiento previo: E (sacrificio por escaldado), L (secado por liofilizado), H (secado por horno), P (desgrasado por prensa), S (desgrasado por fluido supercrítico). a,b,c: diferencias significativas entre los tratamientos ANOVA (Tukey, P<0.05).

Con relación a la actividad detoxificadora de las enzimas glutatión transferasa y DT-diaforasa, en lubina se observó un incremento de la actividad hepática de ambas enzimas en el grupo ELP mostrando el EHS valores inferiores. En digestivo, el grupo control mostró valores de actividad GST significativamente más altos con respecto a los grupos alimentados con dietas elaboradas con harina de insecto que coinciden con el perfil observado para la GR.

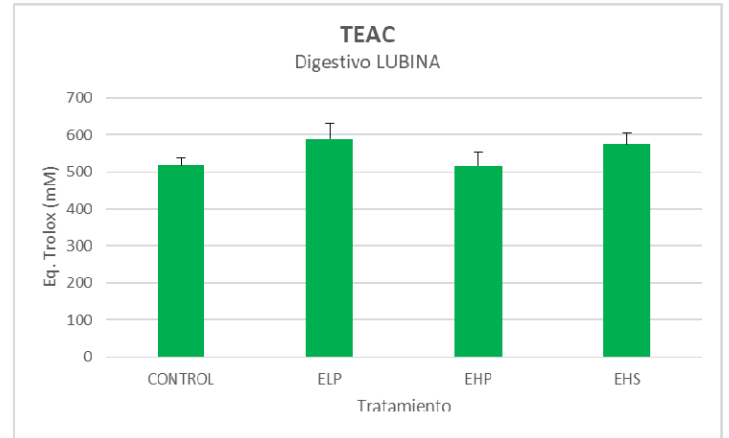
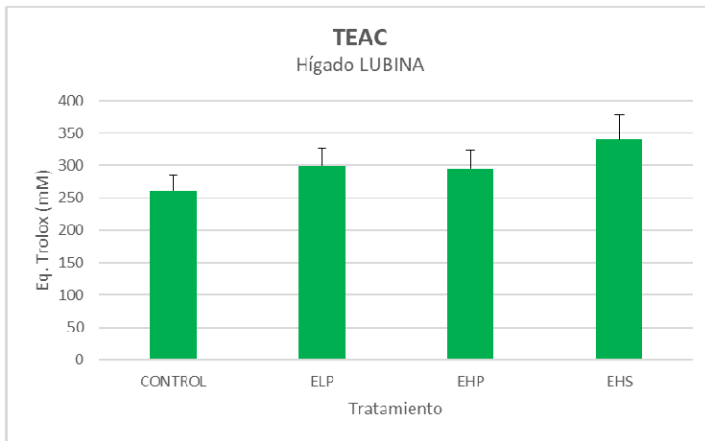


**Figura 3.2.5.9.** Actividad glutatión transferasa en lubina alimentada con diferentes piensos. Los valores son media  $\pm$  SEM (n=9). Control (100 % harina de pescado). Resto de grupos 50 % harina de insecto con diferente tratamiento previo: E (sacrificio por escaldado), L (secado por liofilizado), H (secado por horno), P (desgrasado por prensa), S (desgrasado por fluido supercrítico). a,b,c: diferencias significativas entre los tratamientos ANOVA (Tukey,  $P < 0.05$ ).



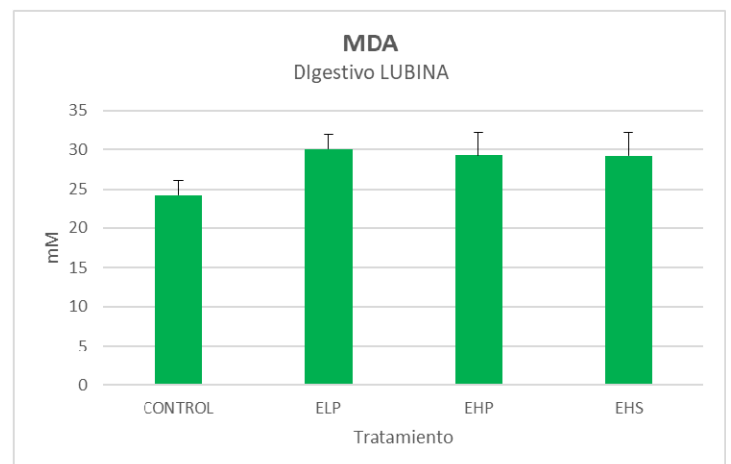
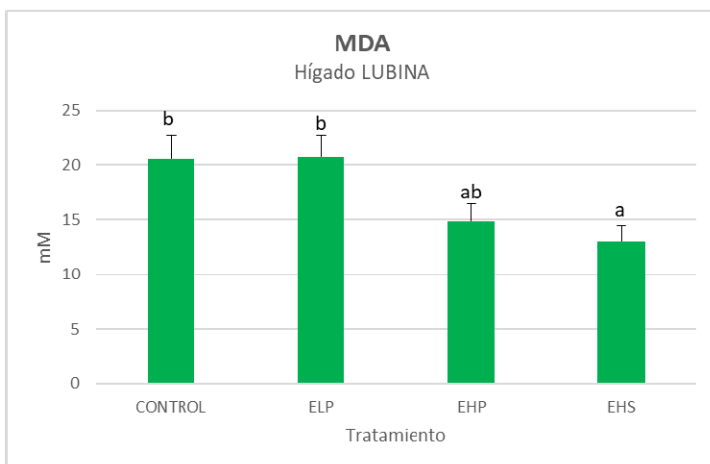
**Figura 3.2.5.10.** Actividad DT-diaforasa en lubina alimentada con diferentes piensos. Los valores son media  $\pm$  SEM (n=9). Control (100 % harina de pescado). Resto de grupos 50 % harina de insecto con diferente tratamiento previo: E (sacrificio por escaldado), L (secado por liofilizado), H (secado por horno), P (desgrasado por prensa), S (desgrasado por fluido supercrítico). a,b: diferencias significativas entre los tratamientos ANOVA (Tukey,  $P < 0.05$ ).

La capacidad antioxidante total (TEAC) mostró cierta tendencia en hígado a valores más altos en los grupos alimentados con las dietas que incorporaron harina de insecto. Este perfil, aunque no fue estadísticamente significativo, parece estar en consonancia con el observado para la catalasa.



**Figura 3.2.5.11.** Actividad antioxidante total (TEAC) en lubina alimentada con diferentes piensos. Los valores son media  $\pm$  SEM (n=9). Control (100 % harina de pescado). Resto de grupos 50 % harina de insecto con diferente tratamiento previo: E (sacrificio por escaldado), L (secado por liofilizado), H (secado por horno), P (desgrasado por prensa), S (desgrasado por fluido supercrítico).

Finalmente, los resultados de peroxidación en hígado muestran una tendencia significativa a valores más altos en el grupo control y ELP. Observándose valores más bajos en el grupo EHP y EHS. Este patrón, al igual que se observó en dorada sigue un patrón inverso con respecto al TEAC. Con relación al intestino no se observaron diferencias significativas, aunque el grupo control mostró valores más bajos a los restantes.



**Figura 3.2.5.12.** Peroxidación lipídica (medida como concentración de malondialdehído) en lubina alimentada con diferentes piensos. Los valores son media  $\pm$  SEM (n=9). Control (100 % harina de pescado). Resto de grupos 50 % harina de insecto con diferente tratamiento previo: E (sacrificio por escaldado), L (secado por liofilizado), H (secado por horno), P (desgrasado por prensa), S (desgrasado por fluido supercrítico). a,b: diferencias significativas entre los tratamientos ANOVA (Tukey, P<0.05).

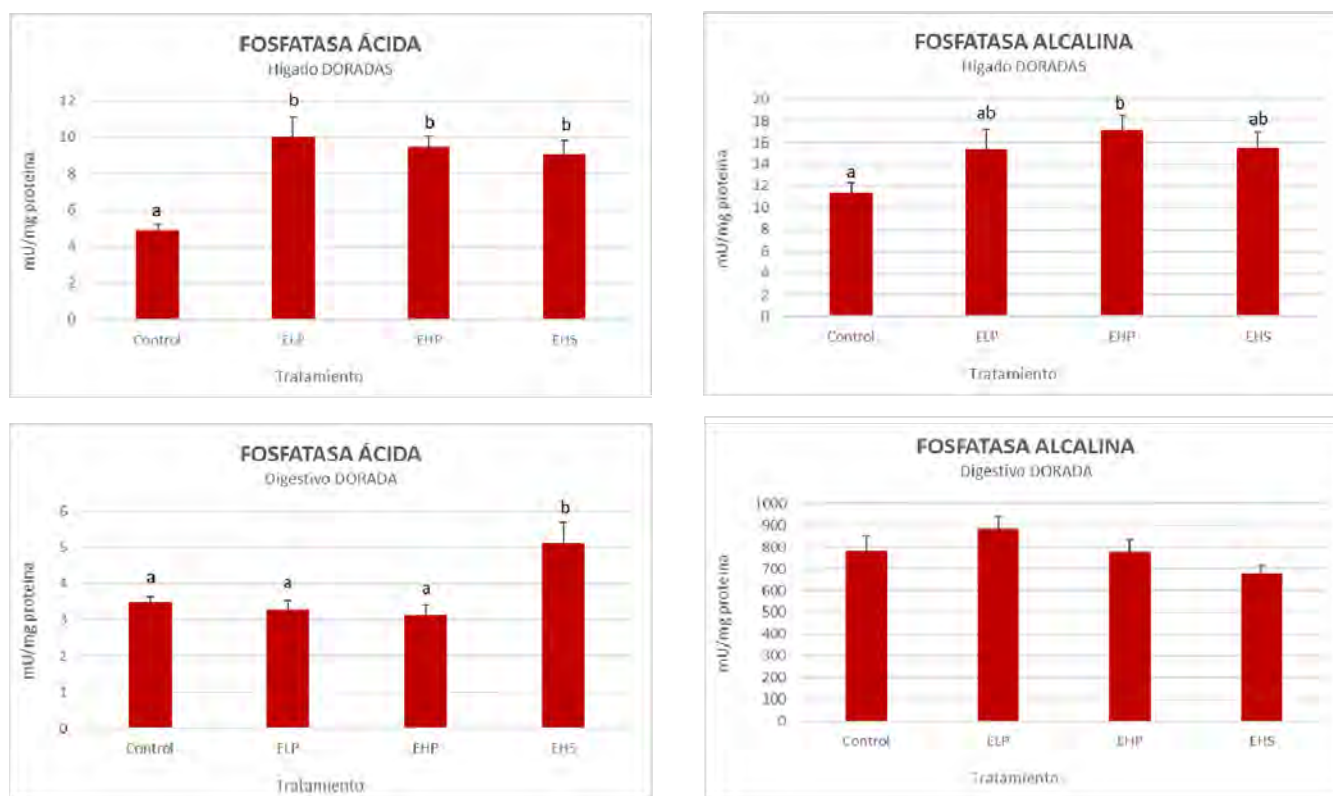


### Subtarea 3.2.6. Estudio de la respuesta inmune y parámetros inflamatorios de los peces

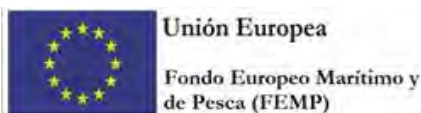
Una pérdida de bienestar puede manifestarse mediante alteraciones en los parámetros relativos a la respuesta inmune y/o procesos inflamatorios. En este sentido el análisis de las fosfatasa ácidas y alcalinas (Easy y Ross, 2010) puede ser representativo de una alteración en estos procesos. La actividad lisozima también representativa de la respuesta inmune se analizó (Swain et al., 2007) así como la enzima mieloperoxidasa (Mohanty y Sahoo, 2010). Todos los ensayos se llevaron a cabo en hígado e intestino en las dos especies ensayadas (lubina y dorada).

### RESULTADOS ENSAYO EN DORADA

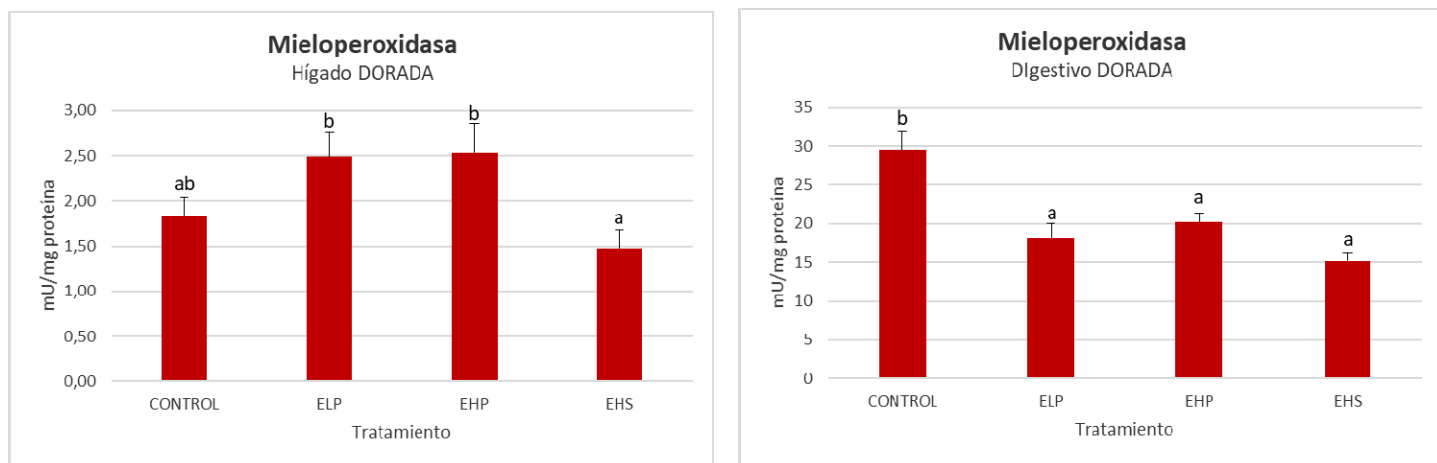
Los resultados mostraron diferencias significativas en la fosfatasa ácida y alcalina en hígado observándose en ambos parámetros valores significativamente inferiores en los grupos control. Por otro lado, en digestivo, solo se observaron diferencias significativas para la fosfatasa ácida que mostró valores significativamente más elevados en el grupo EHS.



**Figura 3.2.6.1.** Actividad fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina en dorada alimentada con diferentes piensos. Los valores son media  $\pm$  SEM (n=9). Control (100 % harina de pescado). Resto de grupos 50 % harina de insecto con diferente tratamiento previo: E (sacrificio por escaldado), L (secado por liofilizado), H (secado por horno), P (desgrasado por prensa), S (desgrasado por fluido supercrítico). a,b: diferencias significativas entre los tratamientos ANOVA (Tukey,  $P < 0.05$ ).



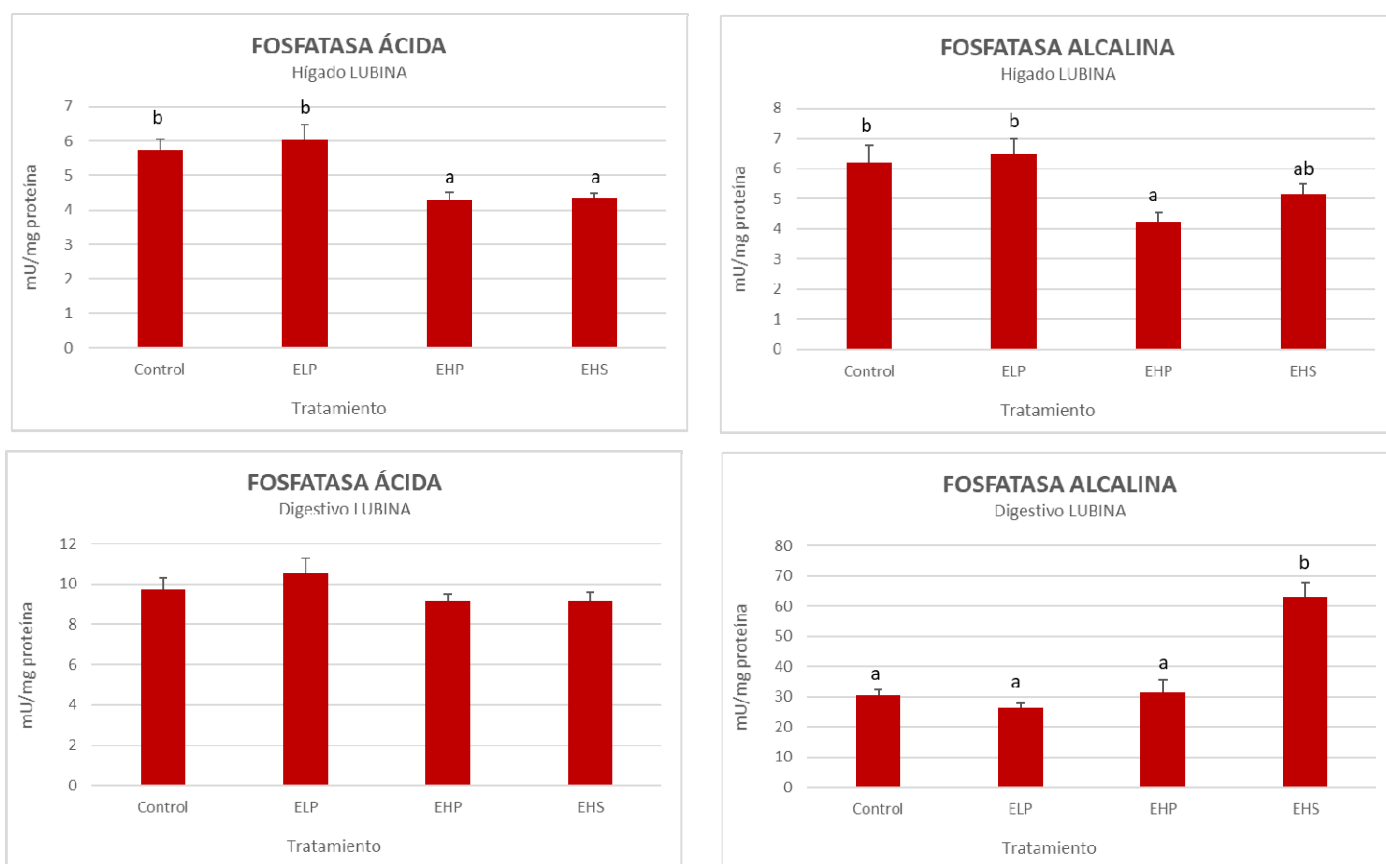
La actividad mieloperoxidasa, está relacionada con el burst respiratorio, proceso defensivo basado en una alta producción de especies de oxígeno reactivo y en el que están implicados los macrófagos. Los resultados en esta enzima mostraron diferencias significativas con independencia del tejido analizado (hígado o digestivo). En hígado los valores fueron significativamente superiores en los grupos ELP y EHP, mientras que los valores más bajos se dieron en el grupo EHS tanto en hígado como en digestivo. En este último tejido el grupo control mostró los valores más elevados. Con relación a la lisozima, no se detectó ninguna actividad ni en hígado ni en digestivo de dorada.



**Figura 3.2.6.2.** Actividad mieloperoxidasa en dorada alimentada con diferentes piensos. Los valores son media  $\pm$  SEM (n=9). Control (100 % harina de pescado). Resto de grupos 50 % harina de insecto con diferente tratamiento previo: E (sacrificio por escaldado), L (secado por liofilizado), H (secado por horno), P (desgrasado por prensa), S (desgrasado por fluido supercrítico). a,b: diferencias significativas entre los tratamientos ANOVA (Tukey,  $P < 0.05$ ).

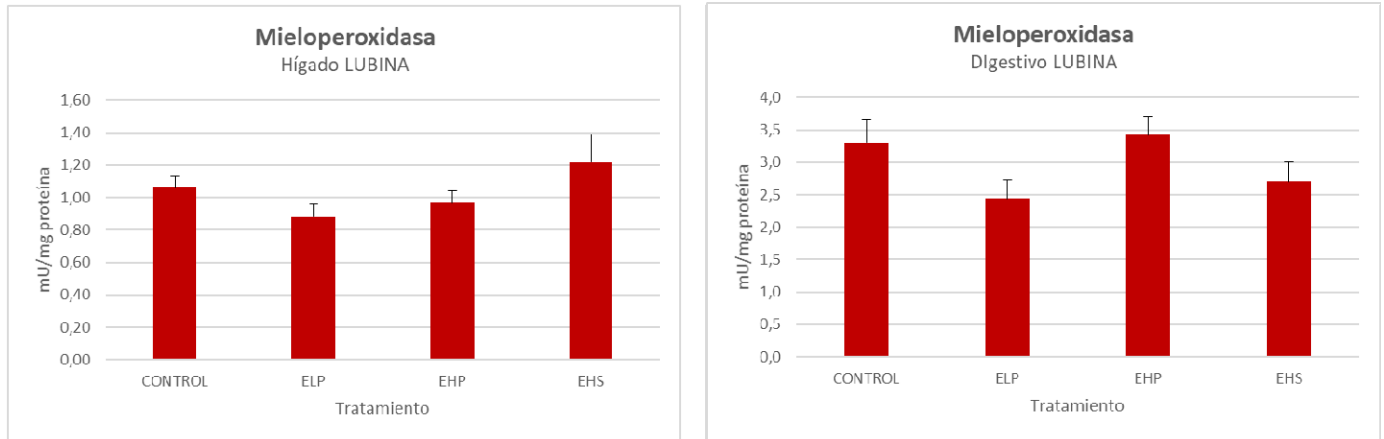
## RESULTADOS ENSAYO EN LUBINA

En cuanto a la actividad fosfatasa ácida y alcalina en hígado, a diferencia de lo observado para dorada, en lubina la actividad más alta se observó en los grupos control y ELP. Con relación al digestivo, solamente la fosfatasa alcalina mostró diferencias, observándose valores significativamente superiores en el grupo EHS.



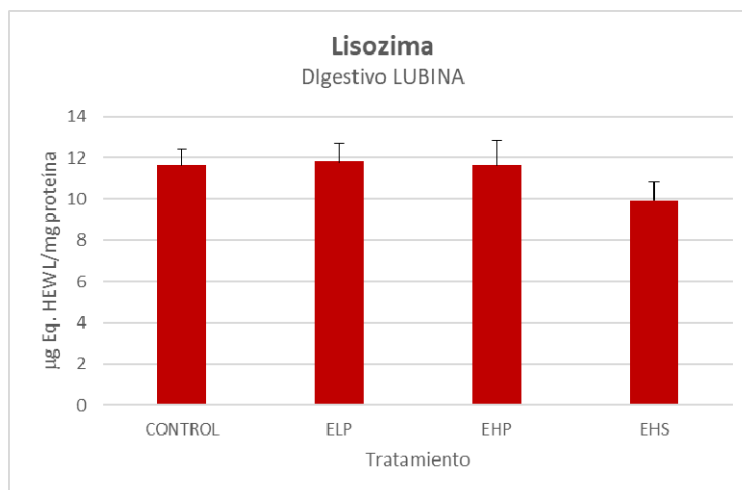
**Figura 3.2.6.3.** Actividad fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina en lubina alimentada con diferentes piensos. Los valores son media  $\pm$  SEM (n=9). Control (100 % harina de pescado). Resto de grupos 50 % harina de insecto con diferente tratamiento previo: E (sacrificio por escaldado), L (secado por liofilizado), H (secado por horno), P (desgrasado por prensa), S (desgrasado por fluido supercrítico). a,b: diferencias significativas entre los tratamientos ANOVA (Tukey, P<0.05).

La actividad mieloperoxidasa, responsable del burst respiratorio de macrófagos, en general presentó una actividad muy baja, no mostrando diferencias significativas entre tejidos.



**Figura 3.2.6.4.** Actividad mieloperoxidasa en lubina alimentada con diferentes piensos. Los valores son media  $\pm$  SEM (n=9). Control (100 % harina de pescado). Resto de grupos 50 % harina de insecto con diferente tratamiento previo: E (sacrificio por escaldado), L (secado por liofilizado), H (secado por horno), P (desgrasado por prensa), S (desgrasado por fluido supercrítico).

En cuanto a la actividad lisozima, a diferencia de lo observado en dorada, sí presentó actividad en tejido digestivo. Si bien no se observaron diferencias significativas entre grupos.



**Figura 3.2.6.5.** Actividad lisozima en lubina alimentada con diferentes piensos. Los valores son media  $\pm$  SEM (n=9). Control (100 % harina de pescado). Resto de grupos 50 % harina de insecto con diferente tratamiento previo: E (sacrificio por escaldado), L (secado por liofilizado), H (secado por horno), P (desgrasado por prensa), S (desgrasado por fluido supercrítico).

## Actividad 4. Prueba de concepto en empresa sobre la productividad y calidad de los peces cultivados en sistemas intensivos y alimentados con piensos con harina de insectos

### Tarea 4.1. Ensayo de engorde en empresa

#### Subtarea 4.1.1. Fabricación del pienso con harina de insectos para el engorde

Tras seleccionar la harina de insecto más óptima según los resultados obtenidos en las actividades previas, se procedió al diseño y fabricación del pienso para llevar a cabo la prueba de engorde.

En la prueba de concepto se decide utilizar una única especie, la dorada (*Sparus aurata*) y la harina seleccionada EHP (escaldado, horno, prensa). Con dicha harina se llevó a cabo la formulación de las dietas experimentales basadas en tres niveles de sustitución de la harina de insecto como fuente proteica alternativa (50, 75 y 100 %) y un grupo control (100 % harina de pescado). La fabricación del pienso se llevó a cabo en las instalaciones del Servicio de Piensos Experimentales de la Universidad de Almería ([http://www.ual.es/stecnicos\\_spe](http://www.ual.es/stecnicos_spe)) utilizando procedimientos estándar de fabricación de alimentos acuícolas. Los cuatro piensos se elaboraron con dos tamaños (diámetro de grano 2 mm y 3 mm) para adaptarlos a la etapa de crecimiento de los animales y con idéntica composición proximal y energética, con el fin de evitar posibles variaciones entre las misma que no fueran las relativas a los niveles de inclusión de harina de insecto.



**Figura 4.1.1.1.** Piensos experimentales utilizados en la prueba de concepto. De derecha izquierda control (100 % harina de pescado), 50, 75 y 100 % harina de insecto.

#### Subtarea 4.1.2. Ensayo de engorde en empresa con pienso con harina de insectos

La prueba de concepto se ha llevado a cabo en la Empresa de acuicultura Andalmar Biothech S.L, (Carchuna, Granada). Los animales se organizaron en 12 tanques de 500 L de capacidad situados en un circuito cerrado de agua de mar con reposición de la misma. En dichos tanques se distribuyeron ejemplares de doradas (*Sparus aurata*) a una densidad máxima 4.5 kg/m<sup>3</sup> para la realización del ensayo de pre-engorde durante 70 días.



**Figura 4.1.2.1.** Tanques experimentales (500 litros) y animales (*Sparus aurata*) durante el desarrollo de la prueba de concepto.



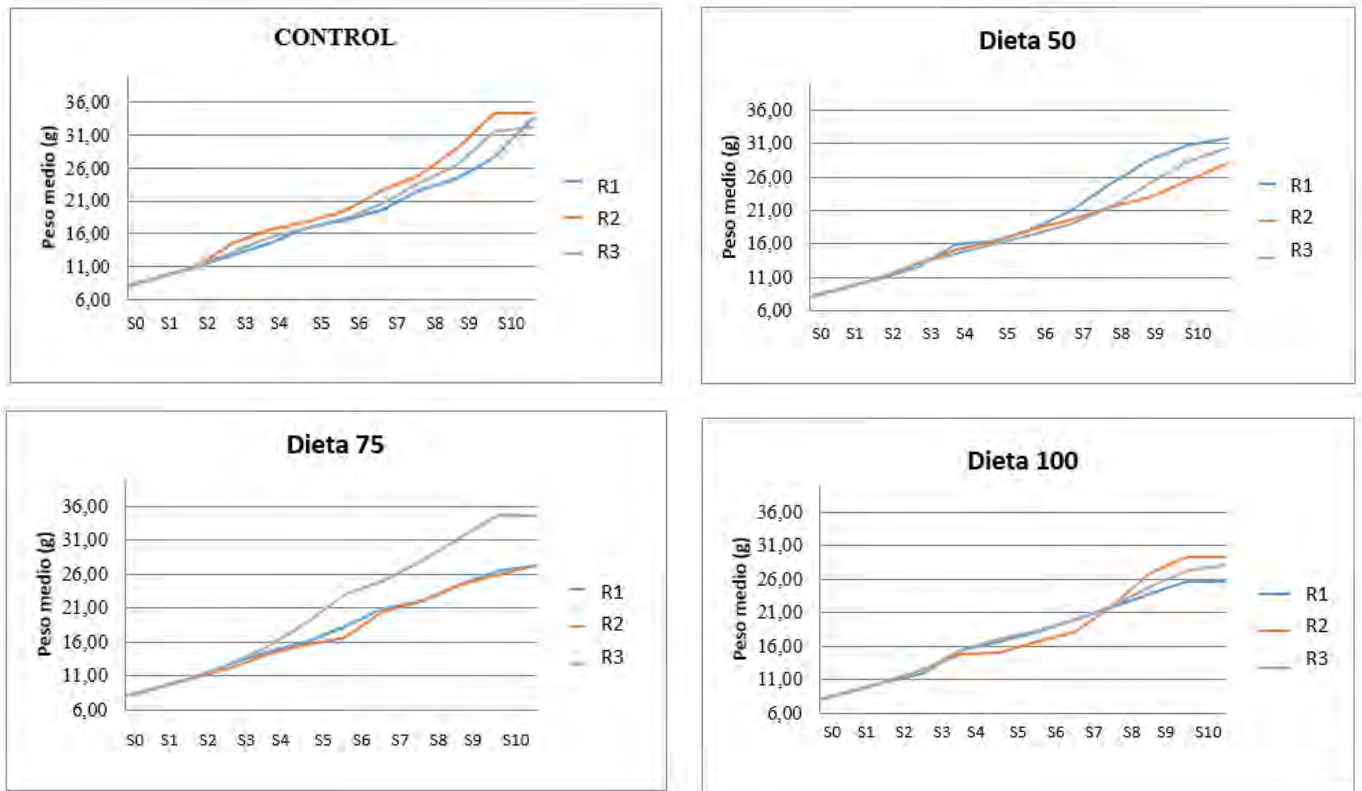
Los animales se empezaron a alimentar con sus dietas experimentales de manera transitoria durante diez días, aumentando progresivamente los piensos de insectos y reduciendo la proporción del pienso comercial que estaban ingiriendo antes de dar comienzo el ensayo. Es a partir la primera semana cuando cada situación experimental (control, 50, 75 y 100% de sustitución) ingiere ya el nuevo pienso basado en harina de insectos.

Cada situación experimental se ensayó por triplicado en tanques de 1.5 m<sup>3</sup> cada uno, de manera que la prueba de concepto se realiza en un sistema en circuito cerrado RAS con un total de 12 tanques, que suman un volumen de 18 m<sup>3</sup>. Al permanecer todos bajo el mismo circuito, todos compartían la misma calidad de agua, caudal y régimen de temperatura, por lo que no hay interferencias de otras variables que pudieran afectar al crecimiento individual de cada tríplica.

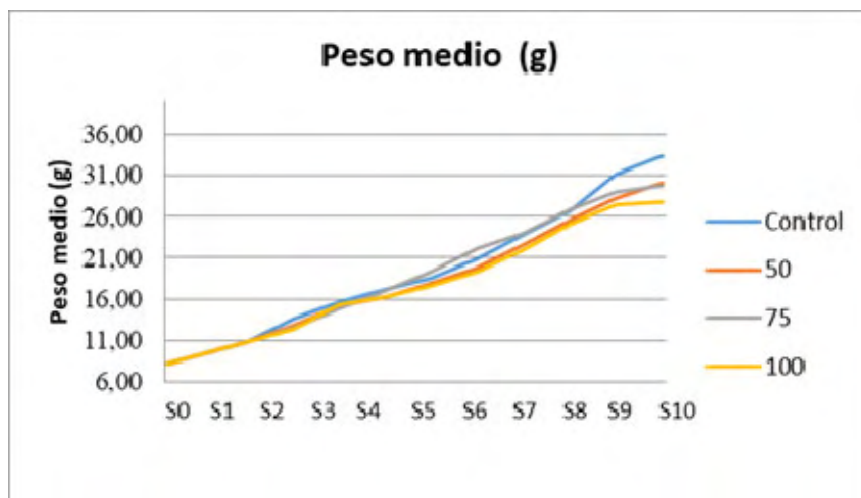
Los peces se alimentaron tres veces al día manualmente, controlando el grado de apetencia y las posibles pérdidas de pienso no ingerido. Para el cálculo de raciones diarias se tomó como referencia las tablas de alimentación teóricas que proporcionan las casas comerciales de piensos para acuicultura, adaptando a partir de ellas las cantidades, según la apetencia de los peces y los parámetros físico-químicos del circuito cerrado para no comprometer la calidad del agua. Asimismo, se realizaron muestreos de peso semanales, tanto para el ajuste de las raciones diarias, como para el seguimiento de las tendencias de crecimiento por situación experimental.

**Tabla 4.1.2.1.** Valores individuales de peso medio (g) por tanque y situación experimental.

Semana	CONTROL			50			75			100		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	8,2	8,2	8,2	8,2	8,2	8,2	8,2	8,2	8,2	8,2	8,2	8,2
1	10,86	10,86	10,86	10,86	10,86	10,86	10,86	10,86	10,86	10,86	10,86	10,86
2	12,75	14,6	13,3	12,56	13,1	13,02	12,9	12,1	12,77	12	12,55	12,59
3	14,6	16,6	15,6	16	15,17	14,5	14,7	14,2	15,5	15,5	14,8	15,5
4	16,84	17,8	16,87	16,47	16,44	16,0	16,13	15,7	19	16,7	15	17
5	18,08	19,4	18,34	18,3	18,16	17,3	18,3	16,6	22,93	18,18	16,6	18,3
6	19,6	22,7	20,6	21	19,7	18,95	21	20,57	25	19,85	18,1	20
7	22,66	25	23,7	25	21,6	21,4	22	22	28	21,8	22	22
8	24,4	29	26,6	28,5	23	25	24,4	24,4	31,4	23,8	26,8	24,8
9	27,6	34,3	31,5	30,8	25,38	28,25	26,5	25,85	34,6	25,6	29,3	27,2
10	33,7	34,3	32,15	31,71	28,13	30,24	27,29	27,33	34,6	25,66	29,3	28,11



**Figura 4.1.2.2.** Incremento de peso medio en doradas alimentadas con cada tipo de dieta mostrando cada una de las tres réplicas por situación experimental.



**Figura 4.1.2.3.** Incremento de peso medio en doradas alimentadas con cada tipo de dieta durante el periodo experimental.





**Tabla 4.1.2.2.** Incremento de peso medio, tasa específica de crecimiento, índice de conversión y tasa de supervivencia en doradas alimentadas con cada tipo de dieta,

Semana	Peso medio (g)			
	CONTROL	50	75	100
0	8,2	8,2	8,2	8,2
1	10,86	10,86	10,86	10,86
2	13,55	12,89	12,59	12,38
3	15,6	15,22	14,8	15,27
4	17,17	16,3	16,94	16,23
5	18,61	17,92	19,28	17,69
6	20,97	19,88	22,19	19,32
7	23,79	22,67	24	21,93
8	26,67	25,5	26,73	25,13
9	31,13	28,14	28,98	27,37
10	33,38	30,03	29,74	27,69
<b>SGR</b>	1,87	1,73	1,72	1,62
<b>I.C.</b>	1,00	1,10	1,10	1,20
<b>Supervivencia (%)</b>	98,6	98,4	98,5	97,9

SGR: tasa específica de crecimiento =  $100 * (\ln P_{\text{final}} - P_{\text{inicial}}) / (t_{\text{final}} - t_{\text{inicial}})$

IC: índice de conversión = pienso (g) / incremento biomasa (g)



## Transferencia de resultados al sector

Indicar las actuaciones dirigidas a la validación y transferencia de resultados a las empresas, incluyendo:

### Actividad 4. Prueba de concepto en empresa sobre la productividad y calidad de los peces cultivados en sistemas intensivos y alimentados con piensos con harina de insectos

#### Tarea 4.1. Ensayo de engorde en empresa

- *descripción de las actuaciones realizadas*

La actividad 4 se ha realizado en las instalaciones de la empresa de acuicultura Andalmar Biotech S.L (Carchuna, Granada). Para ello se realizó una subcontratación de la empresa mediante la cual se contó con las instalaciones idóneas para llevar a cabo la prueba de concepto en la etapa final de proyecto. Esta prueba requería unas condiciones de cultivo y densidad de animales a nivel de producción industrial, por lo que la participación de la empresa fue clave en el desarrollo de esta actividad.

- *resultados obtenidos,*

El control semanal del peso y de la ingesta de los diferentes piensos experimentales alimentación permitió llevar a cabo una valoración del incremento de peso e índices nutricionales relacionados durante el período experimental. De igual manera se valoró la tasa de supervivencia de los animales.

- *valoración del grado de implicación y colaboración de las empresas*

Durante la realización de la prueba de concepto pudimos contar con personal técnico que se responsabilizó de las tareas de alimentación, limpieza de tanques, control de sistema de recirculación y oxigenación, supervisión de la calidad del agua, condiciones de cultivo, etc. Esto fue clave para el buen desarrollo del ensayo y obtención de una tasa de supervivencia de prácticamente el 100 %.

- *valoración de la viabilidad de la implementación de los resultados en empresas,*

Este estudio preliminar se muestra optimista ante la posibilidad de piensos comerciales basados en la sustitución de harina de pescado por harina de insecto como fuente proteica en un sistema de producción intensiva en acuicultura.

- *aspectos a mejorar para una transferencia de resultados más efectiva*

Se requieren ensayos posteriores con el fin de adaptar la formulación de piensos a los requerimientos nutricionales de otras especies, necesidades según la etapa del ciclo de vida y las condiciones de cultivo de los animales.



## Conclusiones

*Principales conclusiones de las actividades desarrolladas.*

UGR

### Actividad 2: Actividad 2. Caracterización de las harinas de insectos producidas para su inclusión en alimentos para peces

Tarea 2.1. Análisis nutricional de las harinas de insectos

#### Subtarea 2.1.5. Análisis de capacidad antioxidante

El tratamiento por congelación con respecto al escaldado parece ser el más idóneo a la hora de preservar la capacidad antioxidante (TEAC/ORAC).

La técnica ORAC además reveló un mayor rango de actividad antioxidante con respecto al TEAC y valores muy superiores en la muestra CLS (congelación, liofilizado, fluido supercrítico) e inferiores en CLP (congelación, liofilizado, prensa).

Curiosamente, los valores más altos de peroxidación se observaron en los grupos procedentes de sacrificio por congelación, y dentro de este grupo en los de secado por horno. En contraposición, los valores fueron inferiores en el tratamiento de sacrificio por escaldado, y particularmente en los desgrasados por fluido supercrítico. E.

La muestra CLS (congelación, liofilizado, fluido supercrítico) mostró un extracto con una coloración marcadamente oscura, y unos niveles significativamente superiores de ORAC y de proteínas solubles, siendo los niveles de peroxidación los inferiores de los grupos sacrificados por congelación.

### Actividad 3. Determinación del efecto de la inclusión de harina de insectos producida mediante los tratamientos estudiados en la dieta de peces

Tarea 3.2. Evaluación de las dietas con productos derivados de insectos en experiencias in vivo con lubina y dorada.

#### Subtarea 3.2.4. Estudio del metabolismo intermediario de los peces

En general los resultados mostraron diferencias en las enzimas asociadas al metabolismo intermediario hepático. En líneas generales los grupos control mostraron valores inferiores en enzimas de la ruta glucolítica y transaminasas con respecto a los que incluían harina de insecto en la dieta.

Por otro lado, entre las dietas con harina de insecto algunos grupos mostraron un comportamiento diferente, destacando en general los grupos EHP y EHS que mostraron valores altos de actividad



hepática (y en algunas ocasiones digestiva) de las enzimas de transaminación GDH, GOT y/o GPT. Estos grupos tienen en común el tratamiento de secado de la larva por horno.

Por el contrario, con relación a la actividad hepática G6PDH, el grupo control mostró valores más altos con respecto a los grupos alimentados con dietas de harina de insecto y particularmente el EHP que mostró los valores más bajos. Esta enzima está implicada en la ruta de las pentosas fosfato, generadora de poder reductor que podría tener cierta relación con la necesidad de regeneración de moléculas antioxidantes como el glutatión. En este sentido el grupo EHP no presentaría este requerimiento tan acusado.

Estas tendencias descritas en cuanto al metabolismo intermediario en líneas generales fueron similares en ambas especies.

### [Subtarea 3.2.5. Evaluación del estado oxidativo de los peces](#)

El estudio del estado oxidativo revela diferencias entre el grupo control y los experimentales.

La actividad catalasa e hígado mostró valores más bajos de actividad en el grupo control con respecto al resto. En principio esto nos puede sugerir un menor requerimiento antioxidante en los animales que consumieron una dieta clásica con harina de pescado. Este comportamiento fue similar en lubina y en dorada. Curiosamente en tejido intestinal de dorada la tendencia fue opuesta.

En cuanto al resto de enzimas evaluadas, se observó un aumento de la actividad hepática GR, GST y DTD en los grupos cuya extracción grasa fue realizada mediante prensa (EHP y ELP). Esto en principio podría tener cierta relación con una mayor oxidación lipídica asociada al calor generado en la presión mecánica, pero los valores de MDA nos indican lo contrario o que bien que la actividad de dichas enzimas ha sido efectiva previniendo la oxidación, ya que estos grupos tenían unos niveles de peróxidos bajos similares al control.

A este respecto, cabe destacar los elevados valores de actividad glutatión reductasa hepática en el grupo EHP podría ser clave en la regeneración del glutatión, molécula clave en la eliminación de peróxidos orgánicos por acción de enzimas peroxidasas. Explicando así los bajos niveles de peroxidación lipídica.

Finalmente, destacar la correlación existente en el grupo ESH (tratamiento con disolventes para la eliminación de lípidos) y los altos niveles de enzimas GST y DTD digestivas. De alguna manera, el tratamiento de extracción de grasas podría haber activado estas enzimas que normalmente se asocian a efectos de contaminantes. Esto, unido a la baja disponibilidad de moléculas antioxidantes no enzimáticas (TEAC significativamente inferior) en hígado, habría propiciado una mayor oxidación a nivel hepático manifestada por un incremento significativo de MDA. En este sentido, este grupo podría haber tenido una mayor afectación con respecto a los restantes que presentaron niveles de peróxidos similares o incluso inferiores al grupo control.

En lubina curiosamente el grupo con menos daño oxidativo fue el ESH, posiblemente debido a la acción de la catalasa que mostró valores significativamente elevados en hígado. Esto podría explicar cómo el grupo control, con valores significativamente bajos de esta actividad, presentara unos



niveles muy marcados de peroxidación lipídica que ni con la acción de otras enzimas como la GR, DTD o GST podría haber sido prevenido. En este sentido, el grupo ELP podría haber tenido un comportamiento similar al control, ya que valores significativos de actividad GR, GST y DTD, fueron también insuficiente para prevenir el daño oxidativo en hígado. Esto parece indicar que el tipo de tratamiento afecta de manera diferente según la especie.

### Subtarea 3.2.6. Estudio de la respuesta inmune y parámetros inflamatorios de los peces

Los resultados relativos a parámetros inflamatorios muestran el caso de la dorada un incremento de la actividad fosfatasa ácida y alcalina en el hígado de los animales que consumieron las dietas elaboradas con harina de insecto con respecto al control. Por otro lado, el incremento de actividad fosfatasa ácida en digestivo del grupo (EHS) apoyaría lo anteriormente relativo como relación a la posible mayor afectación del este grupo.

En lubina, el comportamiento observado tendría una justificación similar, los grupos control y ELP, más afectados desde el punto de vista del daño oxidativo hepático, presentaron los valores significativamente mayores de actividad fosfatasa ácida y básica, lo que podría ser indicativo de un proceso inflamatorio vinculado a un estado de estrés oxidativo.

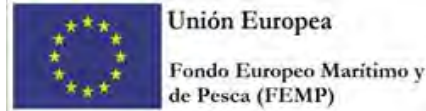
## **Actividad 4. Prueba de concepto en empresa sobre la productividad y calidad de los peces cultivados en sistemas intensivos y alimentados con piensos con harina de insectos**

### **Tarea 4.1. Ensayo de engorde en empresa**

Durante los dos primeros meses de cultivo las cuatro situaciones experimentales han mostrado una tendencia muy similar, aunque desde el principio la situación control se ha mostrado ligeramente superior en crecimiento, seguido de la dieta con 75% de sustitución. A partir de los 60 días de cultivo, se va mostrando con mayor evidencia una ligera tasa de crecimiento inferior conforme se incrementa el porcentaje de sustitución en la dieta. Por otro lado, la tasa de supervivencia de prácticamente el 100 % en todos los grupos es un indicador a tener en cuenta.

## **CONCLUSIONES GENERALES RELATIVAS A LAS ACTIVIDADES DESCRITAS PREVIAMENTE**

Basándonos en una valoración preliminar de los parámetros y marcadores de bienestar analizados, como conclusión general se podría indicar que, la inclusión de harina de insecto en dieta, siempre que el tratamiento previo para la obtención de la misma sea el idóneo, no solo puede ser una buena opción como sustituto parcial de la harina de pescado sin que se afecte el crecimiento del cultivo, sino que incluso podría tener un efecto positivo potenciando la respuesta metabólica y antioxidante de los animales en pro de su bienestar.



SECRETARIA GENERAL DE PESCA

DIRECCIÓN GENERAL DE ORDENACIÓN PESQUERA Y ACUICULTURA  
SUBDIRECCIÓN GENERAL DE ACUICULTURA, COMERCIALIZACIÓN PESQUERA Y ASUNTOS ESTRUCTURALES

A la vista de los resultados, todo parece indicar que la sustitución de harina de pescado por harina de insecto como fuente proteica se muestra como una opción optimista en piensos para acuicultura. Una evaluación más a largo plazo del estado de crecimiento, parámetros de bienestar y calidad de la carne serán claves a la hora de determinar el grado de sustitución óptimo para cada especie según su etapa de desarrollo y condiciones de cultivo.