

# Utilización de aceites y quitosano de insectos en la alimentación del ovino. Estudio *in vitro* de su efecto sobre la fermentación y la biohidrogenación ruminal

En las dietas utilizadas en los sistemas intensivos de producción de rumiantes es habitual añadir grasas para aumentar su contenido energético y contribuir así a cubrir las elevadas necesidades nutricionales de los animales. Entre las más utilizadas se encuentran los productos ricos en ácido palmítico y el aceite de soja. Sin embargo, su uso es polémico por el impacto ambiental de sus cultivos y por la creciente competencia entre humanos y animales por los recursos alimenticios. Como alternativa, se ha planteado la utilización de los aceites que se obtienen del desengrasado de los insectos en el proceso de producción de quitosanos o de harinas ricas en proteína.

**Y. Labbouz, Y. Boussalia, G. Hervás, A. Della Badia, P.G. Toral y P. Frutos.** Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-Universidad de León).

La cría de insectos despierta un gran interés a nivel global porque estos animales son capaces de crecer en sustratos alternativos y transformar numerosos subproductos o incluso residuos orgánicos. Por ello, existen cada vez más empresas interesadas en su cría y en la comercialización de productos derivados. Por otra parte, la producción de insectos en granjas podría ayudar a reducir la competencia por la proteína entre animales y humanos. En general, la inclusión de insectos en la dieta humana aún genera bastante rechazo en muchos países, pero parece que su uso en alimentación animal sería fácilmente aceptado por la mayor parte de la población. En este sentido, los insectos ya se han utilizado en algunos monogástricos, especialmente broilers y peces. Sin embargo, en los rumiantes apenas existen aún estudios al respecto.

En este contexto, nuestro grupo de investigación ha llevado a cabo una serie de estudios sobre la utilización de insectos en la alimentación de los rumiantes, y acabamos de publicar uno de ellos en la revista *Animal Feed Science and Technology*



(Hervás et al., 2021. *Insect oils and chitosan in sheep feeding: Effects on in vitro ruminal biohydrogenation and fermentation*. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 285, 115222).

El artículo se distribuye en abierto, lo que significa que cualquier persona interesada puede leerlo en el siguiente enlace: <https://doi.org/10.1016/j.anifeeds-2022.115222>. En cualquier caso, presentamos aquí un resumen, tratando de darle un enfoque algo más divulgativo. Es importante mencionar que, en la actuali-

dad, los aceites investigados se destinan al consumo humano, lo cual supone que sus precios serían prohibitivos en alimentación animal. Sin embargo, su producción tiene un potencial incuestionable, porque las harinas ya se están comercializando, y la investigación debe ir siempre por delante para no llegar tarde.

Pues bien, además de aportar energía, los aceites de algunos insectos, al igual que el aceite de soja (que se usó como referencia en nuestro estudio) son una



fuentes de ácidos grasos poliinsaturados, los cuales pueden modular la biohidrogenación ruminal de los lípidos de la dieta (BH) y aumentar el flujo al intestino de ciertos compuestos intermedios con carácter bioactivo. Muchos de estos ácidos grasos (AG) se transferirán después a la carne o la leche, modificando así su composición lipídica hacia un perfil más saludable para los consumidores. Sin embargo, que nosotros sepamos, no existía ninguna publicación científica sobre el efecto de los aceites de insectos en la biohidrogenación ruminal, como primer paso para analizar su influencia en la composición final de los lípidos de la carne o la leche.

Por otro lado, muchos nutricionistas tienen aún la percepción general de que los aceites son perjudiciales para la fermentación ruminal de la dieta. No obstante, su efecto dependerá del grado de insaturación y especialmente del nivel de inclusión, de manera que, según han demostrado muchos trabajos, cuando la dosis es baja o moderada, no tienen por qué resultar negativos. El problema es que, dado el carácter reciente de la propuesta de usar aceites de insectos, apenas se ha investigado aún sobre su posible acción en el rumen.

Por otra parte, los quitosanos de insectos también podrían modular la BH para tratar de mejorar el perfil lipídico de la carne o la leche, como se cree que pueden hacer los quitosanos de crustáceos. Los quitosanos son polímeros naturales que provienen de la desacetilación de la quitina y presentan numerosas propiedades bioactivas. Entre estas, cabría destacar su carácter antimicrobiano, lo que determina su interés como aditivos en la alimentación animal. En algunas investigaciones con quitosanos marinos se sugiere que estos compuestos pueden aumentar la eficiencia de la fermentación (p. ej., reduciendo el ratio acético: propiónico), lo que podría suceder también con los quitosanos derivados de otros exoesqueletos, como los de los insectos. Sin embargo, una vez más, nos encontramos con que apenas existen estudios



que hayan evaluado esta capacidad en los quitosanos de insectos, ni sobre la BH ni sobre la fermentación.

Por lo tanto, el estudio al que nos referimos se llevó a cabo para analizar el potencial de varios aceites de insectos, como alternativa al aceite de soja, y de un quitosano de insectos para modular la BH, siempre pensando en la meta final de mejorar la composición lipídica de la carne y la leche. Además, estudiamos sus efectos sobre la fermentación ruminal, para asegurar que no afectarían perjudicialmente a la utilización digestiva de la dieta.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### DISEÑO EXPERIMENTAL, ANIMALES DONANTES E INÓCULO RUMINAL

El experimento siguió un diseño factorial  $5 \times 2$  (10 tratamientos en total):

5 (1 control, sin aceite añadido, + 4 suplementos de aceite)

$\times 2$  (ausencia o presencia de quitosano).

El ensayo se llevó a cabo *in vitro* y como sustrato de incubación se usó una dieta completa mezclada (TMR), con una forraje: concentrado 55:45. A esta TMR se le añadieron 0 (es decir, ningún suplemento; tratamiento Control) o 20 g/kg MS de los siguientes aceites:

- Aceite de soja (tratamiento ASoja)
- Aceite de mosca soldado negra (*Hermetia illucens*; tratamiento AMosca)
- Aceite de grillo (*Acheta domesticus*; tratamiento AGrillo)
- Aceite de gusano de seda (*Bombyx mori*; tratamiento ASeda).

El quitosano (Qui), extraído de *H. illucens*, se agregó a los sustratos a 0 o 30 g/kg MS.

Los 10 tratamientos, por tanto, fueron los siguientes: Control, Control+Qui, ASoja, ASoja+Qui, AMosca, AMosca+Qui, AGrillo, AGrillo+Qui, ASeda, ASeda+Qui.

Como donantes del inóculo ruminal se utilizaron cuatro ovejas adultas, que se alimentaron con la misma TMR utilizada como sustrato en las incubaciones *in vitro*. Todos los procedimientos con ovejas se desarrollaron según las normativas de España y de la Unión Europea de protección animal (RD 53/2013 y Directiva 2010/63/UE, respectivamente). La digesta ruminal se recogió seis horas después de ofertar la comida y los fluidos obtenidos se transportaron inmediatamente al laboratorio en termos precalentados. A continuación, se filtraron bajo un flujo continuo de  $\text{CO}_2$ , se mezclaron proporcionalmente y se usaron como inóculo en los cultivos *in vitro*.

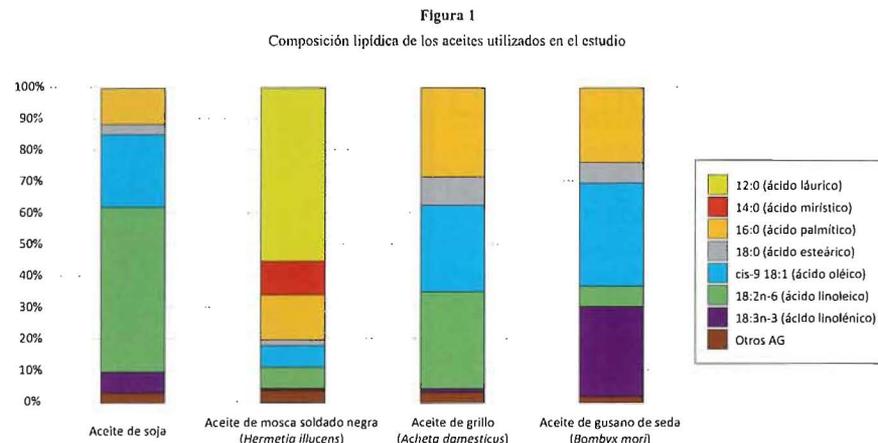
### INCUBACIONES IN VITRO Y ANÁLISIS QUÍMICOS Y ESTADÍSTICOS

Para realizar las incubaciones, utilizamos botellas de 125 ml en las que previamente pesamos 500 mg MS del sustrato (es decir, de la TMR, molida a 1 mm) y 0 o 15 mg de quitosano. Los aceites se disolvieron en etanol al 96% y se agregaron a las botellas justo antes de iniciar la incubación, para evitar problemas de rancidez. Se sabe que la cantidad total de etanol añadida (0,4% del líquido ruminal tamponado) es inocua para la fermentación.

Después, añadimos a cada botella 50 mL de una mezcla (1:4) de inóculo ruminal y tampón fosfato-bicarbonato, que simula el aporte de saliva al rumen. Las botellas se sellaron y se incubaron en condiciones anaeróbicas durante 16 horas a 39,5°C. Los tratamientos se incubaron por cuadruplicado (cuatro botellas por tratamiento) y todo el proceso se repitió tres veces (tres series, cada una un día diferente).

La presión de gas acumulada en cada botella se registró a las 4, 8 y 16 horas de incubación usando un transductor de presión, y a partir de los valores de presión se estimó el volumen de gas producido. Tras 16 horas, la incubación se detuvo metiéndolas botellas en agua con hielo. Para los análisis de AG, indicativos de la BH, se mezcló el contenido de dos botellas por tratamiento y se congeló inmediatamente para luego liofilizarse y volver a almacenarse a -80 °C hasta el análisis.

En las dos botellas restantes de cada tratamiento, se midió el pH y se recolectaron muestras para determinar la concentración de amoníaco y la producción de ácidos grasos volátiles, como principales parámetros indicativos de la fermentación ruminal. Estas muestras, una vez centrifugadas y mezcladas con los reactivos necesarios para su preservación, se almacenaron a -30 °C hasta su análisis. También se estimó la desaparición de materia seca, filtrando los residuos con bolsas Ankom y secándolos después en estufa. En cuanto a los análisis químicos, además de los necesarios para caracterizar los alimentos o la degradación



ruminal, preparamos ésteres metílicos de los AG, para poder analizar su perfil. Los AG de los alimentos y la digesta ruminal *in vitro* se separaron y cuantificaron utilizando cromatografía de gases, con detector de ionización de llama y columna capilar de sílice fundida, y con dos programas de gradiente de temperatura. La concentración de amoníaco en el fluido ruminal *in vitro* se midió espectrofotométricamente y los AGV mediante cromatografía de gases.

En lo que se refiere a los análisis estadísticos, los datos se sometieron a un ANOVA de una vía con el procedimiento Mixed del paquete SAS. El modelo incluyó el efecto fijo del tratamiento y el aleatorio de la incubación. Las medias se ajustaron para comparaciones múltiples con el tratamiento Control. Para examinar el efecto del quitosano, se utilizó un contraste ortogonal ('ausencia' frente a 'presencia' de quitosano). Las diferencias se declararon significativas con una  $P < 0,05$  y tendencia cuando  $0,05 \leq P < 0,10$ .

### RESULTADOS

Nuestros análisis confirmaron que el aceite de grillo tenía un alto contenido de ácido linoleico y el del gusano de seda de ácido linolénico omega-3 (figura 1), parecido a los aceites de soja y de linaza, respectivamente, de los cuales se sabe que pueden modular el metabolismo de los AG en el rumen. Por su parte, el aceite de mosca soldado negra se parece más a

los de laurel o coco, que son más ricos en los AG saturados 12:0 (ác. láurico) y 14:0 (ác. mirístico), lo cual a priori no permitiría modular la BH, pero podría mejorar la fermentación. En general, la mayor parte de los perfiles de AG del aceite extraído de un determinado insecto (por ejemplo, del grillo, del gusano de seda o de la mosca soldado negra) son similares, lo que sugiere que probablemente esos insectos se hayan alimentados con dietas vegetales estándar. Señalamos esto porque los insectos criados en la naturaleza o alimentados con bio-residuos presentan perfiles más variables, ya que los insectos son capaces de asimilar los AG del alimento tras períodos muy cortos con una determinada dieta, lo cual, aunque no fue objeto de este estudio, es una ventaja importante que merece más investigación.

### BIOHIDROGENACIÓN RUMINAL DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE LA DIETA

Los efectos que observamos sobre la BH parecen explicarse por el grado de insaturación de los aceites. Comenzando con los AG saturados, que se acumulan en la digesta sin más transformación, los cambios en sus concentraciones se deberían a su aporte directo con los aceites (por ejemplo, 12:0 y 14:0 en AMosca, y 16:0 en los tres aceites de insectos) o por un efecto indirecto sobre los microorganismos del rumen. Esto último explicaría, por ejemplo, el aumento de 10-oxo-18:0

o las disminuciones de AG impares y ramificados (**tabla 1**), que se consideran biomarcadores de la microbiota ruminal.

Con respecto a los AG insaturados, apenas observamos efectos del tratamiento AMosca sobre los insaturados con efectos potencialmente promotores de la salud (p. ej., el ác. ruménico o *cis-9 trans-11* CLA, que es el isómero más conocido del CLA y al que más propiedades saludables se le han atribuido, o su precursor el ác. vaccénico o *trans-11 18:1*), lo que refuerza el poco interés de las grasas ricas en 12:0 y 14:0 para modificar favorablemente la biohidrogenación y, por tanto, el perfil de AG de los productos derivados de rumiantes.

Como era de esperar debido a su mayor grado de insaturación, los otros tratamientos con suplementos lipídicos (ASoja, AGrillo y ASeda), afectaron en gran medida a las concentraciones de ciertos AG bioactivos. En concreto, ASoja y AGrillo aumentaron algunos metabolitos de la biohidrogenación de los ácidos linoleico y oleico de la dieta, y ASeda también indujo incrementos en intermediarios de la BH del ácido linoléico omega-3, pero la actividad biológica de la mayor parte de estos metabolitos es aún desconocida. Por el contrario, la concentración ruminal de *cis-9 trans-11* CLA solo mejoró con ASoja. En cualquier caso, la principal fuente de este CLA en la leche es la síntesis endógena en la glándula mamaria, gracias a la desaturación del *trans-11 18:1*, y no hay evidencias de que este proceso se viera afectado. Por otro lado, ASoja también incrementó la proporción de otros isómeros de CLA que pueden ejercer una acción antilipogénica (p. ej., el *trans-9 cis-11* CLA y el *trans-10 cis-12* CLA). Estos resultados, junto con los cambios en el contenido ruminal de *trans-10 18:1*, apoyarían una alteración en las vías de BH (p. ej., un incremento de la vía del *trans-10* en detrimento de la vía más común) con ASoja, pero no con los aceites de insectos, lo cual podría ser relevante debido a los efectos potencialmente negativos, aunque aún controvertidos, del *trans-10 18:1* en el rendimiento animal y la salud. Por ello, el aumento de *trans-11*



Toma de muestras

18:1 (precursor, como ya hemos dicho, del *cis-9 trans-11* CLA) causado por el tratamiento AGrillo, sin alterar el *trans-10 18:1*, dotaría a este aceite de un elevado interés para modular la BH.

En lo que se refiere al quitosano, al contrario de lo que esperábamos, su acción apenas fue significativa, de modo que la mayoría de los efectos de los aceites se detectaron de manera similar en ausencia o presencia de este polímero. Quizás la diferente fuente de quitosanos, derivados del caparazón de crustáceos en otros ensayos y de la mosca soldado negra en nuestro experimento, o las propias condiciones experimentales, puedan contribuir a explicar que apenas observáramos diferencias. Por ello, es necesario realizar más estudios que comparen diferentes fuentes, dosis y grados de desacetilación para comprender mejor los efectos de estos polímeros sobre el metabolismo lipídico ruminal.



Grillos de los que sea extrae el aceite

## FERMENTACIÓN RUMINAL DE LA DIETA

En lo que se refiere a la fermentación (**tabla 1**), comenzando de nuevo por el aceite más saturado, no observamos efectos negativos debidos en AMosca. Aunque se ha sugerido que este tipo de aceites ricos en 12:0 y 14:0 podrían reducir la producción de metano y de amoníaco, aún no hay suficientes trabajos para asegurarlo y nuestros resultados no permitirían respaldar tales efectos positivos.

En relación con el grado de insaturación, podría temerse un efecto más negativo de los aceites más insaturados. Sin embargo, no detectamos ninguna acción nociva, lo que posiblemente se explica por la dosis relativamente baja (20 g/kg de MS). Recientemente se ha demostrado que los aceites de insectos a un mayor nivel de inclusión (50 g/kg de MS) pueden disminuir ligeramente la producción de gas *in vitro* y la desaparición de la MS. De todas formas, ensayos *in vivo* con aceites vegetales con un grado de insaturación similar o mayor que ASeda y AGrillo (por ejemplo, aceites de soja, girasol o linaza) respaldan que nuestro nivel de adición podría usarse de forma segura en rumiantes, sin afectar a la utilización de la dieta.

En cuanto al uso de quitosanos, en algunos trabajos se han descrito aumentos en la producción de propionato e inhibición de la producción de metano con quitosanos de crustáceos, usando dosis similares o menores (5-32 g/kg dieta MS) que las empleadas en nuestro ensayo (30 g/kg dieta MS). Sin embargo, nuestro quitosano de mosca soldado negra no tuvo un impacto positivo en la fermentación *in vitro* y provocó una menor desaparición de MS (lo que, no obstante, podría corresponder en parte a una degradación incompleta del propio quitosano). Una vez más, estos efectos irregulares de los quitosanos podrían deberse, al menos en cierta medida, a su origen o a la formulación de la dieta basal (en particular, la relación forraje: concentrado), que podría tener una gran influencia en su efectividad,

tal y como demostraron nuestros colegas de Neiker (i. e., Goiri et al.).

### CONCLUSIONES

La adición a una TMR de aceites de gusano de seda, grillo y mosca soldado negra (a una concentración de 20 g/kg de MS) puede modificar la biohidrogenación de los AG en el rumen, con efectos relacionados con el grado de insaturación de los aceites. Con el fin de promover la acumulación de AG

bioactivos, el aceite de grillo representaría la alternativa más interesante al aceite de soja, ya que aumenta el *trans*-11 18:1, precursor del *cis*-9 *trans*-11 CLA potencialmente promotor de la salud, sin alterar la concentración de *trans*-10 18:1. Los resultados de nuestro estudio *in vitro* también sugieren que los tres aceites de insectos podrían sustituir al de soja sin causar efectos negativos sobre la fermentación ruminal. Por el contrario, la adición de quitosano de mosca soldado

negra a la dieta (a 30 g/kg MS) no parece ser capaz de modificar favorablemente ni la biohidrogenación ni la fermentación ruminal, al menos en nuestro ensayo *in vitro*. Este trabajo se ha publicado en la revista *Animal Feed Science and Technology* en abierto y todos los detalles, incluidos todos los resultados, perfil lipídico completo, referencias bibliográficas utilizadas, etc., están disponibles en el enlace <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2022.115222>. ■

**Tabla 1. Efecto de la suplementación con aceites sobre los parámetros de fermentación ruminal y la biohidrogenación de los ácidos grasos.**

	Tratamiento						P
	Control	ASoja	AMosca	AGrillo	ASeda	eed	
<b>Fermentación ruminal</b>							
Producción de gas (mL/g MS)	174	173	168	169	172	5.7	0.939
Desaparición de MS (g/g)	0.63	0.63	0.64	0.68	0.66	0.030	<0.001
pH	6.57	6.67	6.58	6.58	6.57	0.051	0.581
Amoníaco (mg/L)	285	282	290	285	283	17.4	1.000
AGV totales (mmol/L)	55.7	58.9	60.2	55.4	56.6	3.99	0.652
Relación acético:propiónico	3.82	3.50	3.81	3.06	3.78	0.502	0.460
<b>Biohidrogenación ruminal de los AG</b>							
AG saturados (%)							
12:0	0.22	0.16	12.40*	0.14	0.15	0.950	<0.001
14:0	1.23	0.98	4.03*	0.90	0.92	0.266	<0.001
16:0	15.2	14.6	18.8*	19.5*	18.6*	0.46	<0.001
18:0	45.9	42.0	34.4*	43.8	43.0	2.81	0.003
10-oxo-18:0	0.24	0.38*	0.45*	0.41*	0.50*	0.038	<0.001
Σ AG de cadena impar	3.62	2.85*	2.73*	2.64*	3.13t	0.168	<0.001
Σ AG ramificados	5.13	3.53*	3.53*	3.17*	3.53*	0.366	0.001
AG monoinsaturados (%)							
<i>trans</i> -10 18:1	0.32	0.52t	0.32	0.45	0.34	0.068	0.012
<i>trans</i> -11 18:1	4.64	8.68*	3.60	6.67*	5.19	0.483	<0.001
<i>cis</i> -9 18:1	2.29	4.25*	2.29	3.89*	4.18*	0.530	0.000
AG poliinsaturados (%)							
18:2n-6	3.29	4.68	3.29	3.22	2.97	0.726	0.097
<i>trans</i> -11 <i>cis</i> -15 18:2	0.22	0.31	0.39	0.23	1.12*	0.155	<0.001
<i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11 CLA	0.18	0.39*	0.15	0.19	0.18	0.038	<0.001
<i>trans</i> -9 <i>cis</i> -11 CLA	0.05	0.13*	0.04	0.07	0.04	0.014	<0.001
<i>trans</i> -10 <i>cis</i> -12 CLA	0.093	0.188*	0.085	0.122	0.086	0.0225	0.001
Σ CLA	0.978	1.979*	0.856	1.125	1.393	0.1867	<0.001
18:3n-3	1.085	0.898	0.868	0.742t	1.354	0.1229	<0.001

<sup>†</sup>No se presentan los resultados obtenidos con los tratamientos con quitosano (+Qui) porque no se detectaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ), excepto para la desaparición de MS, como se indica en el texto. \*Diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) respecto al tratamiento Control; t, tendencia a la significación ( $0.05 < P < 0.10$ ).

# MUNDO GANADERO

Enero / Febrero 2022 | AÑO XXXIII

[www.mundoganadero.es](http://www.mundoganadero.es)

## INNOVAGRI

Nueva explotación caprina en ecológico de Cantero de Letur

## ECONOMÍA CIRCULAR

Valorización para el lactosuero

ESPECIAL  
NUTRICIÓN  
ANIMAL

Nº 304