



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE BIOLOGICHE FARMACEUTICHE
ED AMBIENTALI

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA APPLICATA E
MEDICINA SPERIMENTALE

XXXVI CICLO

Coordinatore Prof.ssa Nunziacarla SPANÒ

SSD BIO/06

**Una nuova biotecnologia basata sull'insetto
Hermetia illucens per produrre fonti nutrizionali
sostenibili e molecole bioattive con proprietà
citoprotettive**

Dottorando

Dott. Kristian RIOLO

Tutor

Prof.ssa Alessia GIANNETTO

Anno Accademico 2022/2023

Sommaro

Riassunto	5
1 Introduzione	9
1.1 Aumento demografico e sprechi alimentari.....	9
1.1.1 <i>Food waste</i> in Europa e in Italia	13
1.1.2 Impatto ambientale del <i>food waste</i>	14
1.2 Produzione ittica, pesca e acquacoltura	15
1.2.1 Acquacoltura in Europa	19
1.2.2 Acquacoltura in Italia.....	20
1.1.3 Acquacoltura e farina di pesce	22
1.3 Nuove sfide per il prossimo futuro	24
1.4 Gli insetti come fonte nutrizionale alternativa.....	25
1.5 La mosca soldato <i>Hermetia illucens</i>	28
1.6 La farina di <i>H. illucens</i> come fonte proteica in <i>aquafeed</i>	32
1.7 Il modello zebrafish per lo studio di diete a base di <i>H. illucens</i>	38
1.8 Fonti nutrizionali alternative e regolazione epigenetica.....	41
1.9 Attività biologica di molecole estratte da <i>H. illucens</i>	42
1.10 Food waste per l'allevamento di <i>H.illucens</i>	45
1.11 Utilizzo delle farine d'insetto e normativa Europea	47
2 Obiettivi del progetto	50
3 Capitolo 1.....	54
<i>Hermetia illucens</i> come fonte nutrizionale alternativa. Valutazioni delle risposte cellulari <i>in vivo</i> sull'organismo modello zebrafish	54
3.1 Background	54
3.2 Materiali e Metodi.....	55
3.2.1 Allevamento degli insetti	55
3.2.2 Formulazione delle diete sperimentali	56
3.2.3 Alimentazione dei pesci con le diete sperimentali.....	58

3.2.4	Analisi dei parametri di crescita.....	59
3.2.5	Analisi delle risposte cellulari alle diete	60
	Estrazione dell'RNA e sintesi del cDNA.....	60
	Real time PCR.....	60
	Analisi statistiche	62
3.2.6	Valutazione dell'influenza delle diete sperimentali sulle variazioni epigenetiche di zebrafish.....	62
	<i>Reduced Representation Bisulphite Sequencing (RRBS)</i>	63
3.3	Risultati	64
3.3.1	Effetti delle diete sulle performance di crescita.....	64
3.3.2	Effetti delle diete sulla modulazione dei <i>pathways</i> correlati alla crescita e al benessere	67
	Miogenesi	67
	Risposta immunitaria	70
	Risposta allo stress	72
	Idrolisi enzimatica della chitina	73
3.4	Discussioni	74
4	Capitolo 2.....	80
	Molecole con attività biologica estratte da <i>Hermetia illucens</i> . Valutazione in vitro dell'attività antiossidante in un modello cellulare di stress ossidativo	80
4.1	Background	80
4.2	Materiali e metodi	81
4.2.1	Allevamento degli insetti	81
4.2.2	Produzione degli idrolizzati proteici di BSF (BPH)	81
	Laboratory scale	81
	Scale-up del processo di produzione degli idrolizzati proteici	82
	Resa degli idrolizzati BPH	82
4.2.3	Caratterizzazione dei BPH	83
	Elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE)	83
	Analisi spettroscopica mediante NMR	84
4.2.4	Attività biologica dei BPH su modelli cellulari in vitro	84
	Colture cellulari.....	84

Saggio di vitalità cellulare.....	85
Determinazione dei ROS intracellulari	85
Saggio di localizzazione intracellulare del fattore Nrf2.....	86
Livelli di mRNA di nrf2.....	86
Analisi statistiche	87
4.3 Risultati	87
4.3.1 Caratterizzazione di idrolizzati proteici estratti da larve di BSF	87
Distribuzione del peso molecolare dei BPH	88
Analisi dei metaboliti mediante Risonanza Magnetica Nucleare (NMR).....	89
4.3.2 Effetti dei BPH su un modello cellulare di stress ossidativo in vitro.....	90
Valutazione della citotossicità di BPH in fibroblasti L-929	90
Effetti dei BPH sulla produzione di ROS nelle cellule L-929	92
Effetti degli idrolizzati proteici BPH sull'attivazione del fattore Nrf2.....	93
4.4 Discussioni	96
5 Capitolo 3.....	103
Valutazione della sicurezza microbiologica delle larve di <i>H. illucens</i> allevate su scarti alimentari.....	103
5.1 Background	103
5.2 Materiali e metodi	103
5.2.1 Preparazione dei substrati di crescita S1 e S2.....	103
5.2.2 Allevamento delle larve e trattamento termico	104
5.3 Analisi chimiche.....	105
5.4 Analisi microbiologiche	105
5.3 Risultati	107
5.3.1 Substrato S1: profili microbiologici.....	107
5.3.2 Substrato S1: effetti della pastorizzazione	108
5.3.3 Substrato S2: profili microbiologici.....	112
5.3.4 Substrato S2: effetti della pastorizzazione	114
5.4 Discussioni	117
6 Conclusioni.....	120
7 Bibliografia.....	123

<i>8 Sitografia</i>	<i>140</i>
<i>9 Ringraziamenti</i>	<i>141</i>

Riassunto

In un contesto globale di crescita demografica e incremento della domanda di fonti nutrizionali alternative e sostenibili, l'allevamento degli insetti ed in particolare della mosca soldato (BSF), *Hermetia illucens*, caratterizzato da ridotti impatti ambientali ed economici e da elevate prospettive di industrializzazione, si configura come una promettente soluzione per soddisfare le richieste di proteine ad elevato valore nutrizionale, riducendo al contempo gli scarti della filiera agroalimentare in un contesto di economia circolare. Il processo di bioconversione degli scarti mediato dalle larve di BSF è uno strumento valido ed estremamente efficiente per la riduzione del volume degli scarti e la simultanea produzione di biomassa larvale di alto valore aggiunto ricca di proteine, lipidi e chitina, che può essere utilizzata sia nel settore della mangimistica che per diverse applicazioni industriali, incluse la produzione di biodiesel, bioplastiche e nutraceutici, con un residuo organico che presenta delle buone caratteristiche come ammendante per l'agricoltura.

Il presente progetto si propone di valutare il potenziale applicativo di *H. illucens*, quale nuova biotecnologia sostenibile per la valorizzazione di scarti organici e la produzione di fonti nutrizionali alternative e molecole bioattive.

L'obiettivo generale del progetto è lo studio, attraverso un approccio multidisciplinare, delle risposte cellulari a diversi derivati di BSF sia *in vitro* che *in vivo*.

Una prima parte del progetto si focalizza sul potenziale nutritivo di farine ottenute dalla biomassa larvale di BSF allevata su scarti organici, come fonti proteiche alternative in acquacoltura.

Larve di *H. illucens* sono state allevate su una matrice di scarti agroalimentari fino al raggiungimento del V stadio e dello stadio di prepupa. Entrambi gli stadi di sviluppo sono poi stati utilizzati per produrre farine da testare come ingredienti alternativi alle farine e olio di pesce, fonti proteiche convenzionali dell'acquacoltura, nell'alimentazione di zebrafish in un *feeding trial* di 60 giorni. Le risposte cellulari valutate sull'organismo modello zebrafish, che condivide diversi parametri fisiologici, morfologici e meccanismi di sviluppo con molte specie ittiche di acquacoltura, hanno dimostrato che le farine di BSF rappresentano delle valide alternative sostenibili per

garantire le performance di crescita, salute e benessere delle specie acquatiche. La valutazione dei specifici *pathways* correlati alla miogenesi, alla risposta immunitaria e allo stress ha evidenziato, infatti, che i derivati proteici delle farine rappresentano degli ingredienti innovativi per la crescita sostenibile del settore dell'acquacoltura, sia in termini ecologici che economici e, sottolineano la prospettiva di formulare diete specie-specifiche per soddisfare le richieste nutrizionali delle specie di interesse commerciale riducendo notevolmente l'impatto ambientale della produzione ittica con un approccio di economia circolare.

I dati relativi all'influenza delle diete sperimentali sulle eventuali modificazioni epigenetiche del genoma di zebrafish, in particolare la metilazione del DNA, permetteranno di chiarire i meccanismi di regolazione implicati nelle risposte cellulari alle diete a base di BSF.

La biomassa larvale di BSF, caratterizzata da proteine ad elevato valore nutrizionale, oltre che un ingrediente innovativo e sostenibile per la formulazione di mangimi per animali e acquacoltura, rappresenta una valida fonte di molecole con potenziale attività biologica. Pertanto, l'attività di ricerca è stata orientata anche verso la produzione di idrolizzati (BPH) dalla frazione proteica delle larve, mediante estrazione e idrolisi enzimatica, che sono stati successivamente valutati per la loro potenziale attività biologica *in vitro*. I BPH sono stati caratterizzati tramite spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) ed elettroforesi su gel (SDS-PAGE) e quindi è stata investigata la loro possibile attività antiossidante (BPH nel range 0.1-1.5 mg/mL) in un modello cellulare di stress ossidativo costituito da fibroblasti L-929 trattati con H₂O₂. I risultati ottenuti hanno dimostrato che i BPH possono avere un ruolo citoprotettivo, in modo dose-dipendente, contro lo stress ossidativo cellulare indotto da H₂O₂ e che l'attività antiossidante è dovuta alla riduzione dei livelli di ROS, rilevata tramite citofluorimetria e microscopia a fluorescenza, e all'induzione della traslocazione nucleare di Nrf2, un regolatore chiave della risposta antiossidante nelle cellule, valutata sia mediante analisi quantitativa dell'espressione genica (qPCR) che mediante analisi di immunofluorescenza indiretta. Questi risultati evidenziano la possibilità di produrre, in un processo su larga scala, preziosi idrolizzati proteici di BSF contenenti molecole con attività biologica e proprietà citoprotettive che possono

essere applicate come nuovi ingredienti promotori della salute in diversi settori industriali.

L'utilizzo di insetti, ed in particolare di *H. illucens*, fornisce la concreta possibilità di trasformare i sottoprodotti della filiera agroalimentare in materiale proteico dalle elevate proprietà nutrizionali.

Nell'ambito delle potenzialità della mosca soldato come biotecnologia per la risoluzione di due sfide globali quali gestione degli scarti e produzioni di fonti proteiche alternative, l'utilizzo delle larve nel settore mangimistico non può prescindere dalla valutazione della sicurezza microbiologica delle larve allevate su substrati di crescita catalogati come scarti alimentari. Tali scarti sono infatti soggetti alla proliferazione di microrganismi quali batteri, lieviti e muffe che trovano un ambiente favorevole alla loro crescita per la presenza di acqua e nutrienti. I dati attualmente disponibili sulla sicurezza igienico-sanitaria nell'utilizzo di scarti organici per l'allevamento di *H. illucens* mirato alla produzione di proteine, sono ancora del tutto insufficienti per rendere tale biotecnologia applicabile al mercato attuale.

Il terzo filone di ricerca di questo progetto è stato quindi orientato alla valutazione della sicurezza microbiologica sull'utilizzo di scarti alimentari come substrato organico per la crescita delle larve di BSF destinate all'alimentazione animale e alla valutazione dell'efficacia di trattamenti post-raccolta delle larve, come la pastorizzazione, sulla sicurezza microbiologica. I substrati di crescita delle larve sono stati formulati per ottenere un campione rappresentativo del rifiuto umido urbano prodotto nelle abitazioni domestiche.

I risultati ottenuti rivelano che la presenza di diverse popolazioni microbiche nei substrati di crescita di origine animale e vegetale è correlata ai profili microbiologici, così come le cariche, nelle larve di BSF. È stato anche dimostrato che la carica microbica può essere efficacemente ridotta attraverso trattamenti post-raccolta di pastorizzazione delle larve con un effetto tempo-dipendente sulla riduzione delle popolazioni costituite da batteri lattici, muffe, lieviti, *E. coli*, enterobatteri. L'assenza di microrganismi patogeni come *Salmonella spp.* e *Listeria monocytogenes* nei profili microbiologici delle larve di BSF, insieme alla riduzione della carica microbica in seguito al trattamento di pastorizzazione per 3 minuti (e una maggiore efficacia se la

durata del trattamento si prolunga per 5 minuti), in combinazione alla successiva disidratazione che abbassa l'acqua libera (A_w) necessaria alla sopravvivenza e moltiplicazione dei microrganismi, supporta il potenziale applicativo delle larve allevate su scarti alimentari e costituisce un elemento cruciale per sperimentare metodologie alternative ed efficaci per garantire la sicurezza microbiologica delle larve. Ulteriori studi saranno necessari per verificare l'eventuale influenza dei trattamenti post-raccolta sulle proprietà nutrizionali e le caratteristiche delle molecole con attività biologica estratte dalla biomassa di BSF.

Saranno necessarie ulteriori ricerche in questa direzione che potranno indirizzare le scelte politiche e legislative verso allevamenti sostenibili di insetti che riducendo gli impatti negativi permettano una significativa e valida produzione di nutrienti nel prossimo futuro.

1 Introduzione

1.1 Aumento demografico e sprechi alimentari

Una delle più grandi sfide da dover affrontare nel prossimo futuro sarà quella di soddisfare i fabbisogni alimentari della popolazione mondiale in continuo aumento che, secondo le stime, raggiungerà i 10 miliardi di individui nel 2050 (Figura 1) (FAO 2011).

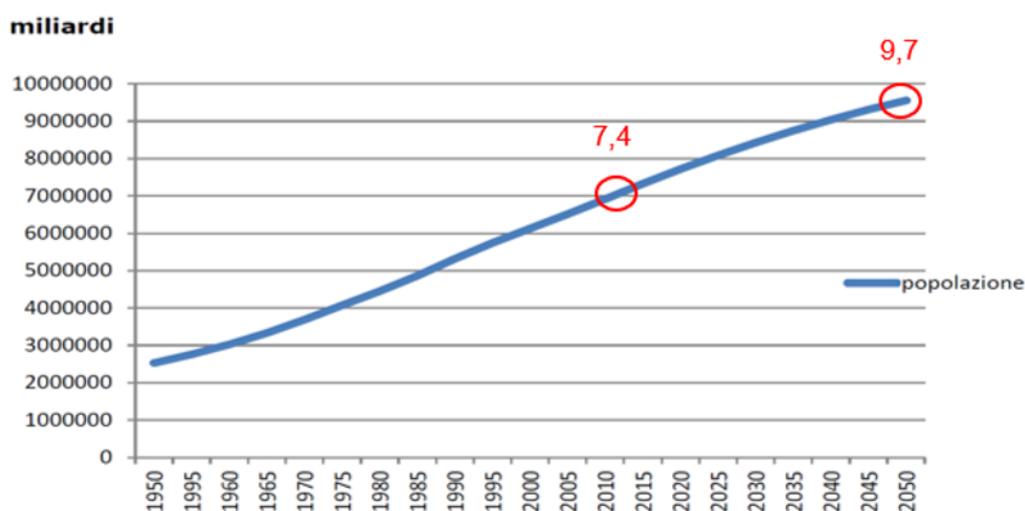


Figura 1 Grafico della crescita demografica stimata fino al 2050 (FAO, 2011).

Un aumento della popolazione implica necessariamente una maggiore richiesta di cibo, quindi maggiori risorse da sfruttare quali acqua e terreni da dedicare all'agricoltura e all'allevamento di bestiame e acquacoltura con un conseguente incremento degli impatti ambientali. È stato stimato che con l'aumento demografico aumenteranno anche le richieste di fonti nutrizionali e della produzione di cibo, ma in parallelo, aumenterà lo spreco alimentare, cioè il cibo non consumato che si trasforma in rifiuto o in dispersione di risorse. Il tema dello spreco alimentare è globale ed estremamente attuale ed è un fondamento delle politiche internazionali ed europee in materia di sostenibilità e modelli produttivi. La Commissione europea definisce lo spreco alimentare come "l'insieme dei prodotti scartati dalla catena agroalimentare, che per ragioni economiche, estetiche o per la prossimità della scadenza di consumo, seppure ancora commestibili e quindi potenzialmente destinati al consumo umano

sono destinati ad essere eliminati o smaltiti” (EUROPEAN COMMISSION DIRECTORATE-GENERAL FOR HEALTH AND FOOD SAFETY).

Secondo i dati della FAO (FAO, 2011) ogni anno, circa un terzo del cibo che viene prodotto e che è destinato al consumo umano viene sprecato, ciò significa che oltre allo spreco del cibo stesso si ha anche uno spreco di risorse come acqua, suolo ed energia impiegati nella produzione. Il quantitativo di cibo sprecato ammonta a circa 1.3 miliardi di tonnellate all’anno, una quantità utile a sfamare 2 miliardi di persone nello stesso arco temporale.

Tale spreco non avviene solo a tavola o nei ristoranti ma avviene lungo tutta la filiera di produzione degli alimenti, quindi dalla produzione fino al consumo (Tabella 1). Le principali fasi durante le quali avviene lo spreco alimentare sono:

- 1. Produzione:** è la prima fase della filiera alimentare dove il cibo viene prodotto e spedito; gli sprechi prodotti durante questa fase sono principalmente attribuiti ad una cattiva gestione degli impianti o dei terreni agricoli che porta ad uno spreco annuo di circa 510 milioni di tonnellate al quale vanno sommati anche gli sprechi che avvengono durante lo stoccaggio e la spedizione degli alimenti che corrispondono a circa 355 tonnellate di cibo.
- 2. Lavorazione e distribuzione:** in questa fase i prodotti alimentari provenienti dalla produzione vengono lavorati per poi essere distribuiti. Le cause dello spreco in questa fase sono attribuibili a fattori di tipo estetico in quanto spesso un alimento viene scartato perché esteticamente non apprezzato da chi lo dovrebbe acquistare nonostante sia in buono stato da un punto di vista alimentare e quindi del tutto adatto al consumo umano. In alcuni casi vi è un’eccedenza di produzione per cui la quantità di prodotto non venduta contribuisce allo spreco. In questa fase vengono sprecate 180 milioni di tonnellate di cibo in un anno alle quali vanno aggiunte 200 milioni di tonnellate che vengono sprecate durante la distribuzione.
- 3. Consumo:** è l’ultima fase della filiera alimentare e include sia il consumo domestico che quello del settore della ristorazione. In questa fase gli sprechi di cibo possono essere attribuiti a diversi fattori, quali un acquisto eccessivo di cibo che non si riesce a consumare e quindi si spreca, una conservazione non

corretta degli alimenti oppure una preparazione di porzioni troppo abbondanti. Si stima che la quantità di cibo sprecato in questa fase che coinvolge tutta la popolazione è di circa 345 milioni di tonnellate.

Fasi della filiera di produzione in cui avviene lo spreco	Quantità di cibo sprecato <i>(Milioni di tonnellate)</i>	Percentuale di spreco <i>%</i>
Produzione agricola	510	32%
Raccolta prodotti e fasi successive	355	22%
Trasformazione industriale	180	11%
Distribuzione	200	13%
Consumo domestico e ristorazione	345	22%

Tabella 1 Rappresentazione delle fasi in cui avvengono gli sprechi alimentari lungo la filiera di produzione (FAO, 2013)

Negli anni successivi, questi alimenti sono stati ulteriormente suddivisi in alimenti persi e sprecati. Nella prima categoria rientrano tutte le quantità di prodotti commestibili per l'uomo derivate da agricoltura, allevamento e pesca che direttamente o indirettamente escono dalla catena di approvvigionamento, come post-raccolta, macellazione o cattura, perché scartati, inceneriti o smaltiti senza avere nessun altro utilizzo. L'alimento perso può derivare dalle fasi di post-raccolta, stoccaggio, lavorazione, trasporto fino alla vendita al dettaglio, escludendo quest'ultima. Secondo le prime stime della FAO (FAO 2019) l'indice di perdita alimentare si aggira intorno al 14%. Con alimento sprecato si intende, invece, l'insieme dei prodotti commestibili che viene sprecato nelle fasi di vendita al dettaglio e consumo (FAO 2019).

La distribuzione degli sprechi alimentari nel nostro pianeta non è uniforme nelle diverse aree geografiche in quanto influenzata dallo sviluppo industriale e dalla densità demografica. Infatti, nei paesi industrializzati ed in via di sviluppo si è osservato una percentuale maggiore di spreco alimentare rispetto a paesi sottosviluppati e si ha un ulteriore incremento nelle zone più densamente popolate. Nei paesi asiatici caratterizzati da elevati tassi demografici e di sviluppo si ha la più alta percentuale di

spreco alimentare al mondo con valori pari al 27%, che si riduce al 23% nel Sud-Est asiatico e al 14% sia in Europa che nel Nord America ed Oceania. Gli sprechi alimentari sono notevolmente inferiori nelle aree dell’Africa sub-sahariana con il 9%, Asia centrale ed occidentale e Nord Africa con il 7% (Figura 2) (World Resources Institute, 2013).

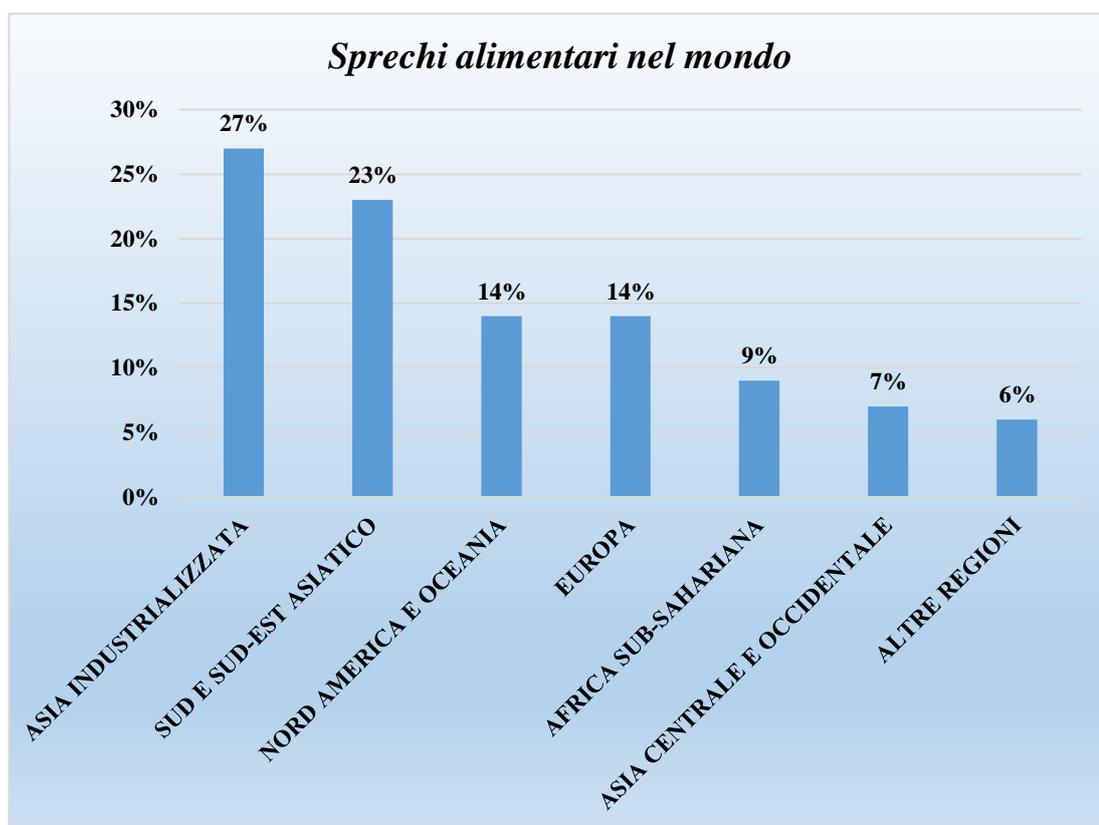


Figura 2 Percentuali di sprechi alimentari globali nelle regioni del mondo (World Resources Institute, 2013).

La percentuale di spreco alimentare è anche in funzione della categoria degli alimenti. Ogni alimento, infatti, in base alla propria natura ha una filiera di produzione caratteristica; per esempio, nei prodotti lattiero-caseari (latte, formaggi ecc.) le fasi di produzione, distribuzione e consumo sono ben diverse rispetto ad altre tipologie di alimenti come i cereali. Tali alimenti vengono processati in maniera diversa e di conseguenza gli sprechi avvengono in momenti diversi; la maggior parte dei prodotti caseari non può essere conservata per lunghi periodi e quindi raggiunge la scadenza in

tempi più brevi rispetto a prodotti come legumi o cereali, quindi, anche queste caratteristiche degli alimenti influiscono sulla loro percentuale di spreco. La figura 3 mette in relazione la percentuale di alimento utilizzato e sprecato, per categoria: lo spreco più alto riguarda frutta e verdura dove quasi la metà dell'intera produzione, il 45% circa, viene sprecata. La stessa percentuale si osserva per alimenti come radici e tuberi; a seguire si hanno le categorie dei cereali, pesce e derivati del pesce con circa il 30% di spreco, e le altre categorie come carne, prodotti caseari e olii con il 20% di spreco (FAO 2011).

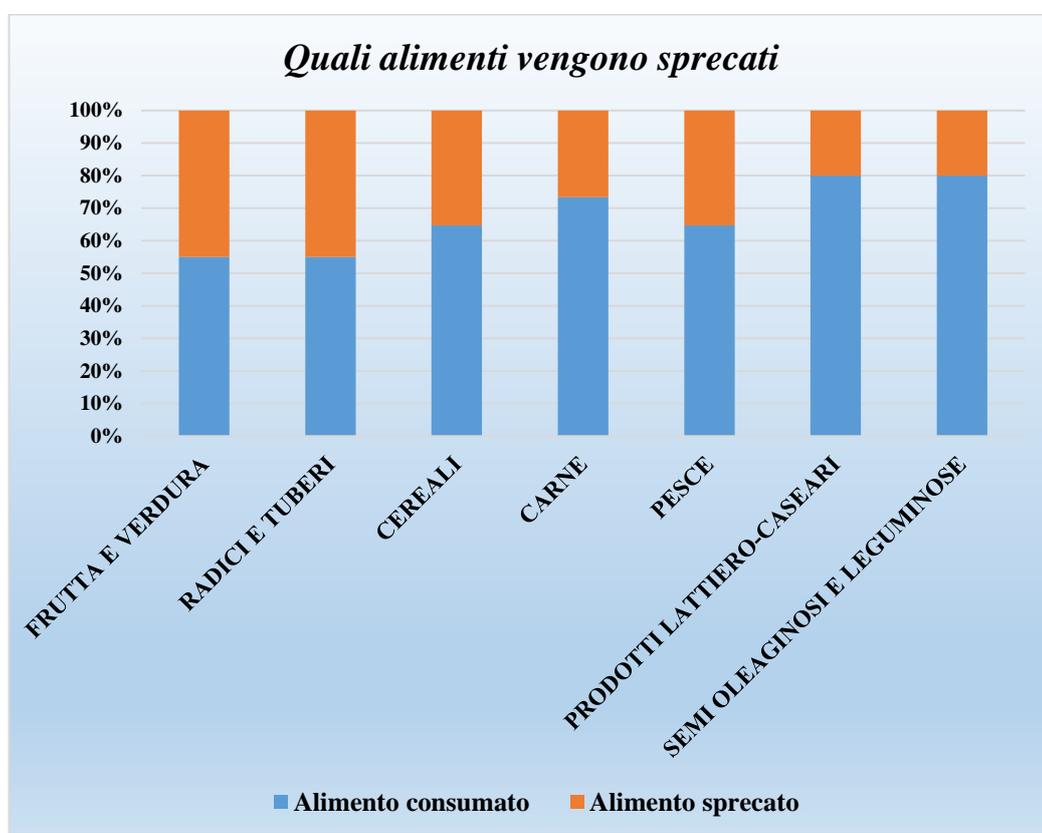


Figura 3 Percentuali di spreco nelle varie categorie di alimenti

1.1.1 Food waste in Europa e in Italia

La quantità di *food waste* che viene prodotta ogni anno in Europa equivale al 14% del *food waste* prodotto al livello mondiale (World Resources Institute, 2013) che corrisponde a circa 100 milioni di tonnellate di cibo sprecato: il 39% di spreco deriva

dalla trasformazione industriale, il 5% dalla distribuzione mentre il valore più alto si ha nella fase di consumo domestico con il 42%. Nel settore della ristorazione lo spreco alimentare si aggira intorno al 15%. Sulla base di questi dati è possibile stimare che lo spreco alimentare pro capite di ogni singolo cittadino europeo si aggira intorno ai 76 kg/anno. In Italia prendendo come riferimento l'anno 2013, sono stati sprecati circa 1.4 milioni di tonnellate di prodotti agricoli che sono rimasti a marcire nei campi perché non raccolti; questo valore corrisponde al 3% dell'intera produzione agricola che viene realizzata ogni anno in tutta Italia. Agli sprechi alimentari della fase di produzione vanno aggiunti quelli che derivano dalla fase di trasformazione industriale, dove sono stati registrati circa 2 milioni di tonnellate di cibo sprecato e dalla fase di distribuzione dove sono stati sprecati 300 mila tonnellate di cibo. Ne deriva che lo spreco alimentare ha delle rilevanti conseguenze economiche; considerando gli sprechi che si hanno durante il consumo domestico italiano il valore economico è di circa 8.1 miliardi di euro l'anno (Osservatorio Waste Watcher, 2014).

1.1.2 Impatto ambientale del food waste

Lo spreco alimentare porta con sé gli impatti ambientali legati al consumo inutile di risorse quali acqua, suolo ed energia lungo i diversi anelli della filiera. A questo va sommato l'impatto ambientale della gestione dei relativi rifiuti. Risorse fondamentali come acqua e terreni sono di necessaria importanza affinché pratiche come l'agricoltura e l'acquacoltura si possano avviare. L'acqua è una fonte necessaria per l'irrigazione dei campi e per il settore dell'acquacoltura risultando quindi fondamentale per la produzione di tutti gli alimenti. Il quantitativo di acqua utilizzata per la produzione di quegli alimenti che vengono sprecati nel mondo è pari a circa 250.000 miliardi di litri all'anno; con questo quantitativo sarebbe possibile soddisfare i consumi domestici di acqua della città di New York per 120 anni. Anche il suolo utilizzato per la produzione di cibo è una risorsa di fondamentale importanza. L'estensione di suolo agricolo utilizzato per produrre il cibo che poi viene sprecato è pari a 1.4 miliardi di ettari all'anno che corrisponde circa al 30% della superficie agricola disponibile a livello globale. Altro impatto ambientale che riguarda lo spreco di cibo riguarda l'emissione in atmosfera di CO₂ che agisce sui cambiamenti climatici. Il cibo sprecato ogni anno a livello globale è responsabile dell'immissione

nell'atmosfera di 3.3 miliardi di tonnellate di CO₂ equivalente, una quantità seconda solo alla CO₂ immessa nell'atmosfera da USA e Cina (FAO, 2013).

L'incremento della produzione di *food waste*, quale inevitabile conseguenza dell'incremento demografico e di modelli di produzione e consumo poco responsabili, impone la necessità di trovare soluzioni alternative e sostenibili per promuovere un migliore utilizzo delle risorse naturali ed una migliore gestione degli scarti alimentari per sviluppare modelli sostenibili di produzione (di risorse nutrizionali) in grado di soddisfare le richieste nutrizionali della popolazione mondiale.

Le dimensioni di questa sfida sono globali come si evidenzia dagli Obiettivi per lo Sviluppo Sostenibile - *Sustainable Development Goals*, SDGs – dell'Agenda 2030, un programma d'azione per le persone, il pianeta e la prosperità, sottoscritto nel 2015 dai governi dei 193 Paesi membri delle Nazioni Unite, e approvato dall'Assemblea Generale dell'ONU. Il Goal 12 dell'Agenda 2030 “Garantire modelli sostenibili di produzione e di consumo”, infatti, è una delle questioni importanti per lo sviluppo ed è uno dei 17 obiettivi per costruire un mondo sostenibile dal punto di vista ambientale, sociale ed economico.

1.2 Produzione ittica, pesca e acquacoltura

L'acquacoltura e la pesca costituiscono attualmente le principali fonti di alimenti preziosi per il notevole contenuto di proteine ad elevato valore nutrizionale. Queste due pratiche contribuiscano diversamente alla produzione ittica, e recentemente l'acquacoltura ha preso il sopravvento in quanto è un metodo efficiente e sostenibile per produrre proteine di alta qualità.

La pesca, agisce sugli stock selvatici e può essere divisa in pesca sportiva e pesca commerciale: la sportiva viene considerata un'occupazione diversa dal lavoro, come un hobby da svolgere durante il tempo libero, mentre la pesca commerciale è considerata un lavoro a tutti gli effetti.

L'acquacoltura a differenza della pesca consiste in una pratica di allevamento di specie acquatiche, che possono essere sia di acqua dolce che di acqua salata e possono appartenere a diversi taxa come pesci, molluschi, crostacei e alghe. Come nella pesca, dove in base alla specie si utilizzano tecniche ed attrezzature diverse, anche

nell'acquacoltura in base alla specie che si vuole allevare, o coltivare come nel caso delle alghe, vengono utilizzate tecniche diverse. I prodotti ittici di acquacoltura provengono da tre tipologie principali di allevamento:

1. **Allevamenti estensivi:** gli allevamenti estensivi sono una tipologia di allevamento dove i pesci vengono rilasciati in un bacino d'acqua; poiché, in questa tipologia di allevamento non è prevista la somministrazione di mangimi, l'unica fonte di cibo sarà quella disponibile nella rete trofica del bacino stesso. Questi tipi di allevamento hanno bassi costi di gestione ma la biomassa prodotta è inferiore rispetto le altre tipologie.
2. **Allevamenti semi intensivi:** a differenza della precedente tipologia, i pesci oltre a nutrirsi da ciò che trovano nell'ambiente vengono in parte alimentati con i mangimi. L'integrazione dell'alimentazione naturale con una dieta artificiale rende possibile incrementare la biomassa prodotta rispetto alla precedente tipologia di allevamento, ma di conseguenza i costi vengono incrementati.
3. **Allevamenti intensivi:** sono quelli più comuni nel settore dell'acquacoltura e sono quelli dove si ha la maggior produzione di biomassa. In questi allevamenti, l'alimentazione dei pesci è esclusivamente artificiale tramite l'utilizzo di mangimi. Se questi allevamenti si occupano della produzione e dell'ingrasso, allora posseggono delle vasche con i riproduttori e i nuovi pesci vengono allevati fin dalla nascita. Altri allevamenti, invece, acquistano direttamente gli avannotti e si occupano solo della fase di ingrasso fino al raggiungimento della taglia commerciale. Gli allevamenti intensivi possono essere realizzati a terra (*in shore*), posizionando delle vasche dove allevare i pesci in una determinata area; in questo caso è necessario fornire l'acqua oltre che al cibo, quindi bisogna attingere o delle falde acquifere non contaminate o direttamente dal mare, a seconda che si allevino specie di acqua dolce o salata. In questa tipologia di allevamento è importante monitorare costantemente tutti i parametri chimico fisici dell'acqua, quali O₂, temperatura, presenza di nitrati poiché uno squilibrio di uno di questi parametri potrebbe causare una notevole mortalità delle specie allevate e quindi una perdita economica per l'impianto. Altri tipi di allevamento intensivo prevedono l'utilizzo di gabbie posizionate

in acqua (*off shore*), mantenute a galla grazie ad una serie di galleggianti e bloccate sul fondo grazie all'ausilio di blocchi di cemento, in modo che la gabbia non possa essere trasportata dalla corrente. Tali gabbie devono essere posizionate in luoghi opportuni caratterizzati dalla presenza di correnti che non siano troppo forti da causare danni alle gabbie stesse ma siano moderate in modo da permettere la dispersione dei prodotti di scarto dei pesci. A differenza delle vasche, nelle gabbie in acqua non bisogna monitorare le condizioni fisico-chimiche per mantenere le condizioni ottimali per la specie allevata, ma, di contro, le cattive condizioni climatiche dovute per esempio a venti forti o mareggiate, possono impedire l'accesso alle gabbie o peggio ancora causare danni alle strutture con conseguente perdite economiche.

La crescita demografica ha determinato un incremento della domanda di prodotti ittici per soddisfare il fabbisogno nutrizionale della popolazione mondiale. Negli ultimi 50 anni, un notevole sviluppo degli impianti di acquacoltura da una parte, e l'applicazione di nuove tecnologie nel settore della pesca che hanno incrementato i successi delle catture dall'altra, hanno consentito di incrementare significativamente la produzione di prodotti ittici. Grazie all'utilizzo di imbarcazioni più grandi, nuove tipologie di reti e l'utilizzo di apparecchiature elettroniche come GPS ed ecoscandagli, la pesca ha potuto incrementare la quantità di prodotto ittico. Nel 2020 la pesca e l'acquacoltura sono riuscite a fornire circa 177.8 milioni di tonnellate di prodotto ittico, di cui il 50.79% proveniente dalla pesca mentre il 49.21% proveniente dall'acquacoltura. Se si osserva l'andamento della produzione mondiale dei prodotti ittici proveniente dalla pesca e dall'acquacoltura negli ultimi anni (Figura 4), si può osservare come la produzione da parte dell'acquacoltura sia cresciuta sempre di più, e si stima che, con il passare del tempo continuerà a crescere ulteriormente (FAO 2022).

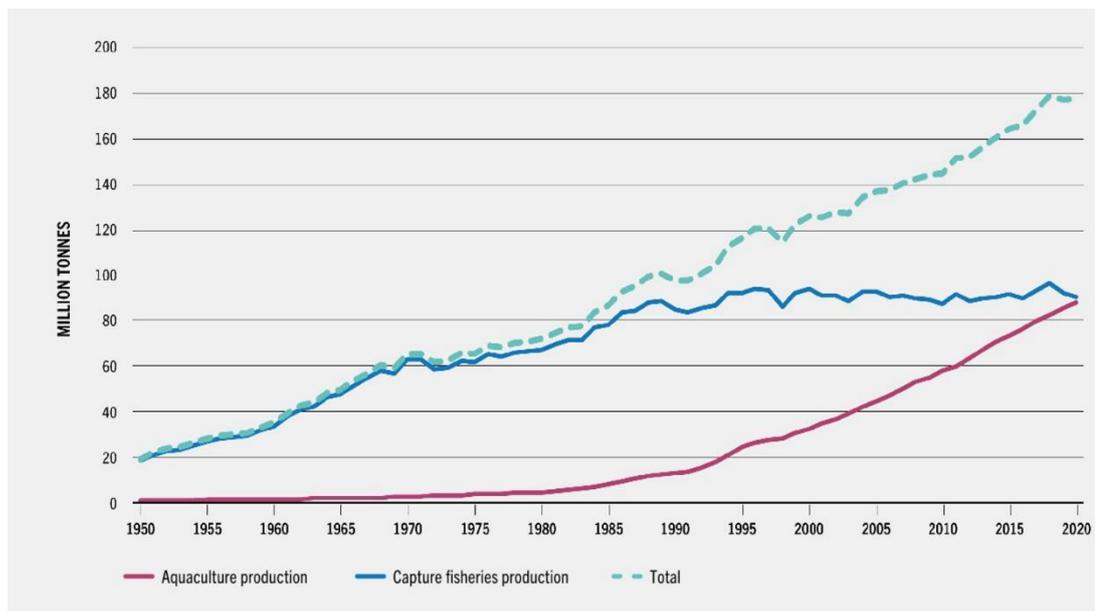


Figura 4 Produzione mondiale derivante da pesca e acquacoltura negli ultimi 70 anni (FAO, 2022).

Per soddisfare la richiesta del mercato in un pianeta più densamente popolato, infatti, saranno necessari non soltanto una maggiore produzione derivante dagli allevamenti di acquacoltura, ma anche una intensificazione della pesca. Le nuove tecnologie nel settore della pesca hanno portato ad un maggiore successo delle catture che, associato all' aumento della domanda di prodotti ittici, ha portato ad una sovrapesca che ha causato una forte riduzione degli stock ittici. Attualmente, a livello globale, il 61% degli stock ittici è pienamente sfruttato e il 29% è sovrasfruttato (<https://www.fishforward.eu/it/facts-figures/>) (Figura 5).

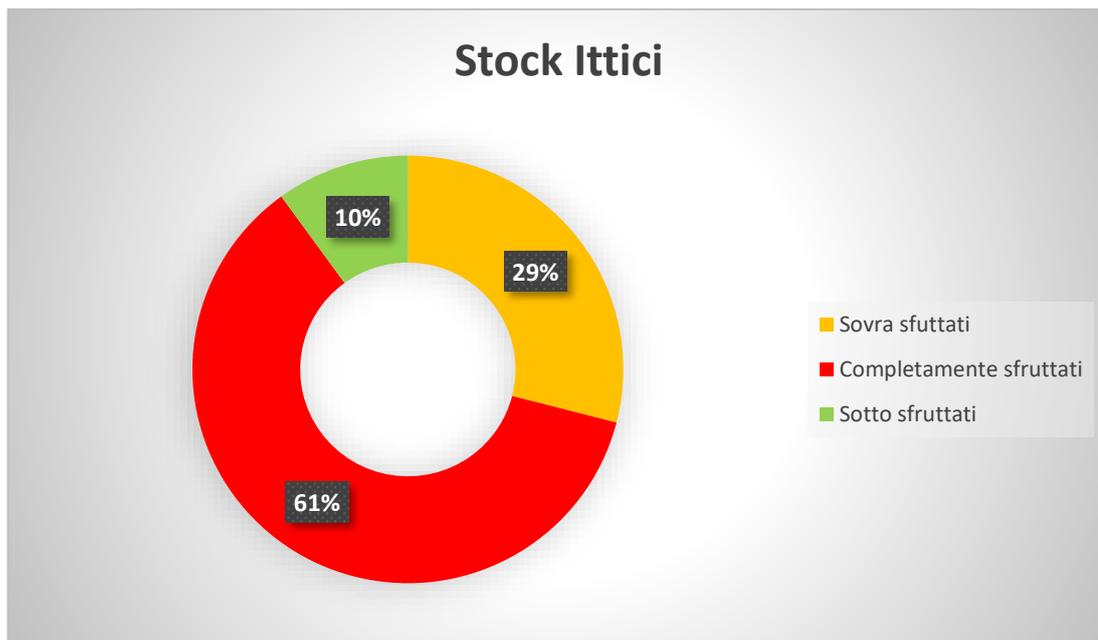


Figura 5 Rappresentazione dello sfruttamento degli stock ittici selvatici a livello globale (<https://www.fishforward.eu/it/facts-figures/>).

1.2.1 Acquacoltura in Europa

Come l'agricoltura e l'allevamento, l'acquacoltura in Europa è un settore che costituisce una importante attività economica, sia nelle zone costiere che nelle zone continentali. La principale produzione degli impianti di acquacoltura riguarda le specie ittiche; generalmente, le specie allevate sono quelle tipiche dell'area costiera e più richieste dal mercato. Nell'area del Mar Mediterraneo, le specie più frequentemente allevate sono la spigola e l'orata, mentre nei paesi dell'est Europa, lontani dal mare, la produzione prevede l'allevamento di specie di acqua dolce come carpe e trote. Un'altra buona parte della produzione derivante dall'acquacoltura riguarda i molluschi; anche in questo caso, le specie allevate variano in base alle zone; tra le più comuni troviamo i mitili, come le cozze, e altri molluschi, come vongole ed ostriche. Gli impianti di acquacoltura sono maggiormente sviluppati in Francia, Italia, Grecia, Regno Unito, Norvegia e Spagna. In Europa questa attività fornisce circa il 20% dell'intera produzione e da un punto di vista economico svolge un importante ruolo dando occupazione a circa 94.000 persone. La produzione mondiale nel settore dell'acquacoltura ha registrato un incremento medio annuo pari al 6.7%, caratterizzato da rilevanti differenze nella distribuzione geografica della produzione globale (Figura

6). A differenza del resto del Pianeta nel quale si è registrato un progressivo incremento della produzione ittica, in Europa, ad esclusione della Norvegia, la produzione è rimasta pressoché invariata dal 2000 (FAO 2022).



Figura 6 Produzione ittica dei settori acquacoltura e pesca nel mondo (FAO, 2022. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2022*).

1.2.2 Acquacoltura in Italia

L'acquacoltura in Italia è un'attività economica di grande rilevanza; infatti, nel 2012 pesca e acquacoltura coprivano circa lo 0.1% del PIL italiano e offrivano occupazione

a circa 27.800 persone. Nella realtà italiana, come in altri paesi esteri, le specie allevate, siano esse di acqua salata, salmastra o dolce, possono essere diverse per caratteristiche ecologiche e richiedere differenti tipologie e modalità di allevamento. Le specie ittiche di acqua dolce comunemente allevate sono trote, persici e storioni che possono essere allevate attraverso l'utilizzo di vasche o col sistema delle *raceway*. Le specie ittiche di acqua salata principalmente allevate sono quelle di interesse commerciale nel mercato italiano che sono naturalmente presenti nel bacino del Mediterraneo; tra queste le principali sono spigole (*Dicentrarchus labrax*) e orate (*Sparus aurata*). Queste specie possono essere allevate grazie all'utilizzo di vasche poste a terra oppure attraverso l'utilizzo di gabbie disposte a mare ed ancorate al fondale. Oltre all'allevamento di specie ittiche, anche l'allevamento di molluschi è una pratica estremamente diffusa nel territorio italiano e le specie variano per fattori geografici e culturali. Nella molluschicoltura vengono allevate principalmente vongole e cozze come i mitili della specie *Mytilus galloprovincialis*, attraverso una tecnica di allevamento che prevede l'utilizzo di reti tubolari, comunemente chiamate calze.

La produzione ittica italiana comprende una quota di pesce proveniente dalla pesca e una quota proveniente dall'acquacoltura; quest'ultima corrisponde a quasi la metà e si aggira intorno al 48% (Figura 7). Per avere un'idea quantitativa basti pensare che nel 2013 la produzione totale di pesce proveniente dal settore dell'acquacoltura ammontava a 162.600 tonnellate di cui 38.800 tonnellate derivavano da allevamenti di specie di acqua dolce, pari al 24% dell'intera produzione. Il restante 76% è rappresentato da prodotti ittici provenienti da allevamenti di acqua salata e salmastra, per un quantitativo in peso pari a 123.800 tonnellate. La produzione maggiore è sicuramente quella proveniente dalla molluschicoltura, che ammonta a circa l'89%, mentre la produzione ittica corrisponde solo all'11% indicando un minore sviluppo di questo settore dell'acquacoltura, già fortemente in difficoltà per la concorrenza con altri Stati come la Grecia o paesi in via di sviluppo (Italy - Fishery and Aquaculture Country Profiles (fao.org)) che hanno investito importanti risorse in questo settore economico.

Total capture and aquaculture production for the Republic of Italy (tonnes)
Source: FAO FishStat

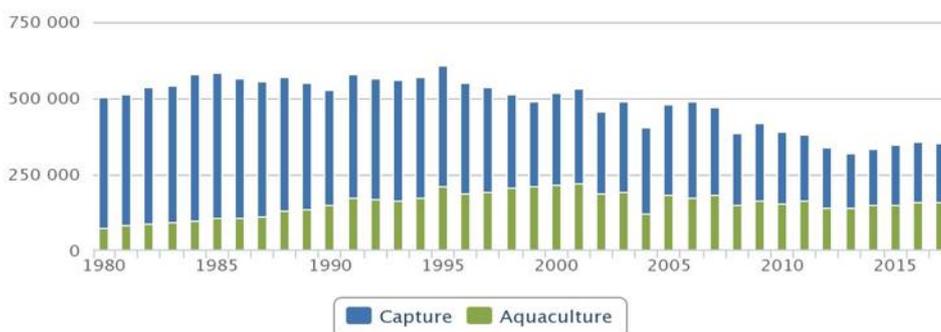


Figura 7 Produzione ittica italiana proveniente da pesca e acquacoltura (<https://www.fao.org/fishery/en/facp/ita?lang=en>).

1.1.3 Acquacoltura e farina di pesce

Nel settore dell'acquacoltura la produzione è incrementata di anno in anno, in linea con l'aumento demografico e la necessità di soddisfare la maggiore domanda di cibo della popolazione globale; richiesta che la pesca non è in grado di esaudire a causa dello sfruttamento degli stock ittici. Tuttavia, gli attuali sistemi di produzione dell'acquacoltura non consentono una risposta efficace all'incremento della domanda di cibo, e in particolare di pesce e prodotti ittici considerati tra gli alimenti più sani del pianeta, di una popolazione mondiale in costante crescita nel prossimo futuro. Una delle principali limitazioni ad un ulteriore sviluppo dell'acquacoltura è strettamente correlata all'utilizzo delle risorse che includono non soltanto acqua, spazi ed energia ma anche l'impiego di farine di pesce per la formulazione dei mangimi. La rapida espansione della produzione delle farine e oli di pesce per i mangimi utilizzati negli allevamenti intensivi negli ultimi anni, costituisce una reale minaccia per il depauperamento degli stock ittici e la riduzione del cibo disponibile per il consumo umano. Le farine di pesce e gli oli di pesce sono le principali fonti proteiche nei mangimi impiegati nel settore dell'acquacoltura poiché presentano diverse caratteristiche proficue: infatti si distinguono per i rilevanti valori nutrizionali, l'elevata digeribilità per i pesci ed inoltre costituiscono delle ottime fonti di proteine, acidi grassi, vitamine e minerali. Per produrre queste farine di pesce vengono principalmente utilizzati piccoli pesci pelagici come sardine e acciughe che,

naturalmente provengono dalla pesca e, solo marginalmente anche gli scarti della pesca che sono sottoposti ad una ulteriore lavorazione prima del loro impiego nei mangimi (Miles e Chapman, 2015). Attualmente, le farine e gli oli di pesce vengono ampiamente utilizzati in tutto il settore della mangimistica nella formulazione dei mangimi per acquacoltura e per diverse specie terrestri, incluse le specie avicole.

Per comprendere la stretta dipendenza della crescita dell'acquacoltura dalla pesca basti pensare che, partendo da 100 kg di pesce è possibile produrre soltanto 22.5 kg di farina di pesce e 5 kg di olio di pesce. Se poi si considera che le necessità nutrizionali relative al fabbisogno di farine e olio di pesce, quali ingredienti fondamentali nei mangimi, sono specie-specifiche e possono variare di diversi ordini di grandezza a seconda della specie, diventa ancora più evidente che gli attuali sistemi di produzione ittica dell'acquacoltura hanno un impatto notevole sulle risorse del nostro pianeta. A titolo esemplificativo, pesci come le carpe o i cefali hanno un fabbisogno nutrizionale diverso rispetto ai salmoni o alle spigole che sono specie prettamente predatorie e che in natura si nutrono principalmente di altri pesci; di conseguenza i mangimi per i salmoni o per le spigole necessitano di maggiori quantità di farine e olii di pesce. Nel settore dell'acquacoltura, uno dei parametri fondamentali per la formulazione dei mangimi specie-specifici è il cosiddetto tasso FIFO (*Fish-In Fish-Out*), che tiene conto di quante unità di faina di pesce o olio sono necessarie per produrre un'unità di pesce allevato (Tacon e Metian, 2008). Il tasso FIFO, essendo specie-specifico, è strettamente dipendente dal fabbisogno nutrizionale della specie allevata e dal valore specifico FCR (*Feed conversion ratio*), ovvero la capacità di convertire gli alimenti forniti nella dieta in biomassa corporea del prodotto ittico. Generalmente, la dieta di specie ittiche diverse nel loro ambiente naturale si riflette sui tassi FIFO; per esempio, la carpa che è un pesce erbivoro ha un tasso FIFO di 0.2:1, che sta a significare che per produrre una carpa di 1 kg sono necessari solo 200g di pesce pescato; il salmone, invece, essendo un pesce prettamente carnivoro ha un tasso FIFO molto più alto che attualmente, a seguito di miglioramenti nella formulazione dei mangimi, è pari a 4.9:1; ciò vuol dire che per produrre un salmone di 1 kg sono necessari 4.9 kg di pesce pescato. Questi dati dimostrano chiaramente che, nonostante i progressi nei sistemi di allevamento e i miglioramenti dei tassi FIFO ottenuti negli ultimi anni, ad oggi allevare specie come i salmoni non è più sostenibile perché richiede un eccessivo sfruttamento

delle risorse visto che servono quasi 5 kg di pesce pescato per ottenere 1 kg di salmone (Tacon e Metian, 2008). Il nuovo impulso alla produzione di farine e oli di pesce derivato dall'utilizzo degli scarti della pesca ha avuto un effetto positivo limitato sullo sfruttamento delle risorse ittiche in quanto il pressoché contemporaneo aumento del numero di impianti di allevamento e della produzione ittica dell'acquacoltura hanno determinato una maggiore domanda di farina di pesce. L'incremento della produzione di pesce e prodotti ittici come alimenti sani e ad elevato valore nutrizionale, non può prescindere dalla ricerca di nuove soluzioni alternative e sostenibili per superare le limitazioni derivanti dall'utilizzo delle farine di pesce nei mangimi dell'acquacoltura e per rispondere efficacemente all'aumento della domanda di cibo globale determinato dall'incremento demografico previsto nel prossimo futuro.

1.3 Nuove sfide per il prossimo futuro

Nei prossimi decenni, una delle più grandi sfide da affrontare sarà, come già accennato, quella di soddisfare il fabbisogno alimentare della popolazione mondiale in continua crescita. Per rispondere efficacemente alle esigenze nutrizionali legate all'incremento demografico previsto, con una popolazione di circa 10 miliardi di abitanti nel 2050, si dovrà necessariamente incrementare la produzione di cibo del 70%; ciò significa che la produzione di carne dovrà aumentare del 27%, mentre quella di pesce dovrà aumentare del 50%. È facilmente intuibile che per aumentare la produzione di carne e pesce serviranno più terreni per i pascoli e per la coltivazione dei mangimi da destinare a questi animali. L'80% dei terreni agricoli, attualmente è dedicato ai pascoli ed alla produzione agricola di monocolture per la realizzazione di mangimi. Si stima che nel 2030 (FAO, 2011) la richiesta di carne sarà così alta che gli spazi attualmente utilizzati non basteranno più per far pascolare e per allevare tutti questi animali. Per affrontare le sfide globali è quindi necessario trovare nuove fonti nutrizionali alternative e sostenibili a basso impatto ambientale. Una delle soluzioni più promettenti è rappresentata dall'allevamento degli insetti. Gli insetti, infatti, vengono comunemente consumati nei paesi orientali del Sud-est asiatico e in Africa dove l'entomofagia ha origine antiche e fa parte delle tradizioni culturali delle popolazioni che vivono in queste regioni del mondo. Inoltre, gli insetti sono facili da allevare, non necessitano di grandi spazi, e rispetto agli animali tradizionalmente allevati come bovini, suini ed

ovini necessitano di una quantità inferiore di risorse e soprattutto sono responsabili di emissioni estremamente ridotte di CO₂.

1.4 Gli insetti come fonte nutrizionale alternativa

La sostenibilità dei sistemi di allevamento degli insetti ha orientato la ricerca scientifica verso la valutazione degli insetti come nuova fonte alimentare alternativa nell'ultimo decennio. Recenti studi, infatti, hanno dimostrato che l'allevamento di insetti richiede costi di produzione più bassi e meno risorse; se si considera la risorsa "acqua", o meglio la cosiddetta "acqua virtuale", ovvero la quantità di acqua necessaria per produrre un prodotto, saranno necessari per 1 kg di pollo, maiale o manzo rispettivamente di 1.498, 2.819 e 9.678 litri di acqua (Chapagain e Hoekstra, 2003). Al contrario, se si volesse produrre 1 kg di vermi della farina (*Tenebrio molitor*) il contenuto di acqua virtuale sarebbe di 25 litri (Oonincx e De Boer 2012). I vantaggi della produzione degli insetti a scopi alimentari non sono limitati al ridotto impatto ambientale in quanto diverse specie di insetti sono caratterizzati da elevati valori nutrizionali. Attualmente le specie edibili di insetti sono circa 2000 ed alcune hanno notevoli proprietà nutrizionali, in termini di contenuto di proteine, acidi grassi mono e polinsaturi, vitamine e minerali paragonabili ai cibi tradizionali, specialmente nei loro stadi larvali.

La comunità scientifica ha ampiamente riconosciuto le potenzialità degli insetti come *food* e *feed* e l'organizzazione delle Nazioni Unite che si occupa di cibo e agricoltura li ha definiti "una fonte di cibo sana e altamente nutriente, ricca di grassi, proteine, vitamine, fibre e minerali" (FAO). A partire dal 2020, l'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA) ha approvato la commercializzazione di prodotti a base di insetti e il mercato è cresciuto sotto la spinta dei comprovati vantaggi ambientali, alimentari ed economici rispetto alle fonti tradizionali di proteine animali. Permangono, tuttavia, degli ostacoli di carattere culturale nell'accettazione degli insetti come tali o in formula nel cibo destinato al consumo umano, da una parte e, la mancanza di una regolamentazione chiara sull'utilizzo degli insetti e derivati e sulla sicurezza alimentare, specialmente correlata al rischio di allergie alimentari connesse alle proteine. Il ruolo degli insetti come fonte nutrizionale alternativa per l'alimentazione di diverse specie di allevamento, in particolare dei pesci, è stato

ampiamente esplorato nell'ultimo decennio e gli studi su diverse specie di insetti impiegati come fonti proteiche principali (o in sostituzione parziale) nelle diete animali hanno dimostrato le enormi potenzialità degli insetti. Le larve di *Tenebrio molitor* sono state utilizzate come ingrediente nell'alimentazione del pagello (*Pagellus bogaraveo*) per sostituire parzialmente la farina di pesce con livelli di inclusione del 25% e 50%; tali diete non hanno influenzato negativamente né i parametri di crescita, né i tassi di mortalità dei pesci (Iaconisi et al., 2017). Questo stesso insetto, oltre che per l'alimentazione di specie acquatiche, è stato incluso anche nella dieta di specie terrestri come polli (Biasiato et al., 2018) e suini (Yoo et al., 2019, Cho et al., 2020) mostrandosi una valida fonte proteica da poter utilizzare nei mangimi attraverso inclusioni parziali. La farina di grillo (*Acheta domesticus*) è stata inclusa a differenti livelli (0%, 25%, 50%, 75% e 100%) in sostituzione della farina di pesce nella dieta dei pesci gatto del canale (*Ictalurus punctatus*) per un periodo di 10 settimane (Fan et al., 2023). I risultati hanno mostrato che la farina di grillo può influire positivamente sulla crescita e sulla salute del pesce gatto del canale confermando quindi questa fonte proteica come una valida alternativa alla farina di pesce. Le larve della mosca domestica (*Musca domestica*), allevate su un substrato caratterizzato dalla presenza scarti organici, sono state essiccate ed introdotte nell'alimentazione della tilapia (*Oreochromis niloticus*) dimostrando la loro validità quali fonti proteiche alternative (Cheng et al., 2021).

Tra gli insetti, la mosca soldato, *Hermetia illucens* (Linnaeus, 1758), comunemente nota come Black Soldier Fly (BSF), è attualmente considerata come una valida soluzione per affrontare contemporaneamente due sfide globali: la produzione di fonti nutrizionali sostenibili e la gestione degli scarti organici. Durante le fasi larvali, infatti, BSF è capace di crescere su qualsiasi matrice organica operando un processo di bioconversione degli scarti che produce una biomassa larvale ad alto valore nutrizionale che può essere utilizzata come mangime animale o in acquacoltura, nonché per diverse applicazioni industriali, valorizzando contemporaneamente i rifiuti in un sistema di economia circolare. Recenti normative europee (Regolamento CE 2017/893) hanno consentito l'utilizzo di BSF in acquacoltura come fonte nutrizionale alternativa alle costose e scarsamente sostenibili farine di pesce che costituiscono, ad oggi, le principali risorse proteiche negli allevamenti ittici.

1.4.1 Biotecnologie alternative nel trattamento del food waste

Come discusso in precedenza, il fenomeno del *food waste* rappresenta un problema globale con una tendenza in forte aumento, e in Europa, secondo le stime, si raggiungerà uno spreco alimentare di circa 126 milioni di tonnellate di cibo edibile l'anno (European Commission, 2010). Ad oggi, le principali strategie per risolvere questo problema sono orientate verso la riduzione degli sprechi attraverso sistemi di prevenzione, che includono miglioramenti nelle fasi di produzione e campagne per sensibilizzare la popolazione sullo spreco domestico. Nonostante ciò, la quantità di cibo sprecata continua ad essere enorme, e diventa quanto mai necessario considerare nuove strategie orientate alla valorizzazione dei cibi sprecati. In questo scenario di valorizzazione del *food waste*, alcuni insetti rappresentano una valida alternativa per il loro ruolo naturale di specie saprofaghe. Le larve di *H. illucens*, sono organismi saprofagi, sono cioè capaci di nutrirsi di matrice organica di varia natura, sia di origine animale che vegetale. Il *food waste* può quindi essere utilizzato come substrato di crescita per le larve che, a seguito di questo processo di bioconversione della matrice organica, degradano il *food waste* producendo contemporaneamente una biomassa larvale che può avere numerose applicazioni, tra cui la produzione di farine di insetto da utilizzare nel settore della mangimistica. La richiesta di mangimi in settori come l'acquacoltura o l'allevamento di avicoli è in crescita come conseguenza della maggiore domanda di questi alimenti, pertanto l'allevamento degli insetti rappresenta una valida strategia sostenibile per affrontare l'incremento della produzione necessario a nutrire la popolazione del nostro pianeta. L'allevamento di insetti, infatti, presenta notevoli vantaggi rispetto a quello di mammiferi e uccelli che attualmente costituiscono la principale fonte di proteine per l'alimentazione umana; allevare insetti richiede uno sfruttamento delle risorse (terreno, acqua, energia, ecc.) nettamente inferiore rispetto all'allevamento di altri animali. Inoltre, a parità di risorse utilizzate, si ottiene più biomassa con gli insetti che con gli altri animali; basti considerare che per produrre un kg di insetti occorrono 2 kg di mangime, mentre se dovessimo allevare dei bovini per produrre un kg di carne occorrono 8 kg di mangime. Un minore sfruttamento di risorse come acqua, terreni ed energia significa anche avere un minore impatto ambientale causato dagli allevamenti, quindi minore produzione di gas serra, minori emissioni di CO₂, ammoniaca e letame dei tradizionali allevamenti zootecnici.

Un altro valore aggiunto degli insetti è rappresentato dalle loro notevoli proprietà nutrizionali, in quanto diverse specie sono caratterizzate da un alto contenuto proteico e di acidi grassi. In questo scenario, la mosca soldato *H. illucens* si propone come ottimo candidato per affrontare simultaneamente due sfide globali in un contesto di economia circolare: una migliore gestione degli scarti alimentari attraverso la valorizzazione del *food waste* e la produzione di biomassa larvale ad elevato valore nutrizionale, in termini di contenuto proteico, lipidico, acidi grassi, minerali e vitamine, da utilizzare nella formulazione di mangimi per animali come ingredienti che promuovono la salute ed il benessere degli animali.

1.5 La mosca soldato *Hermetia illucens*

Hermetia illucens (Linnaeus 1758) è un dittero saprofago appartenente alla famiglia Stratiomyidae, ed è comunemente conosciuto con il nome di Black Soldier Fly (BSF), ovvero mosca soldato nero, per la forma e il colore caratteristici del torace dell'adulto, simile ad un'armatura (Lemke et al., 2023). Tipica delle zone neotropicali del Sud-Est degli Stati Uniti d'America, col passare del tempo si è diffusa in gran parte dei continenti diventando a tutti gli effetti un insetto cosmopolita. Gli adulti sono caratterizzati da una colorazione nera con riflessi metallici tendenti al blu ed al verde, un aspetto simile ad una vespa e una lunghezza di circa 15 - 20 millimetri. Il capo di questo insetto è largo e presenta due antenne che sono lunghe il doppio della testa; gli occhi sono ben sviluppati e le zampe sono di colore nero con dei tarsi di colore bianco. Durante il loro ciclo vitale, avvenuta la fase di riproduzione, gli adulti depongono le uova su un materiale di natura organica; la grandezza delle uova è di circa 1 mm e la loro colorazione può variare dal bianco crema al giallo pallido (Figura 8). Trascorsi 4 giorni dalla deposizione, le uova iniziano a schiudersi e le larve appena nate, lunghe circa 1.5-2 mm, sono caratterizzate da un corpo allungato e segmentato. Le larve di questi organismi saprofagi sono molto voraci, e iniziano a nutrirsi di substrati organici in decomposizione. Durante questa fase, lo sviluppo larvale avviene attraverso cinque stadi di sviluppo consecutivi fino al raggiungimento del sesto stadio larvale in cui vengono chiamate prepupe (Figura 9). Successivamente, le prepupe si evolvono in pupe, smettono di mangiare e compiono, all'interno dell'exuvia, la metamorfosi per poi emergere come individui adulti (Figura 10) (ITIS, 2009).

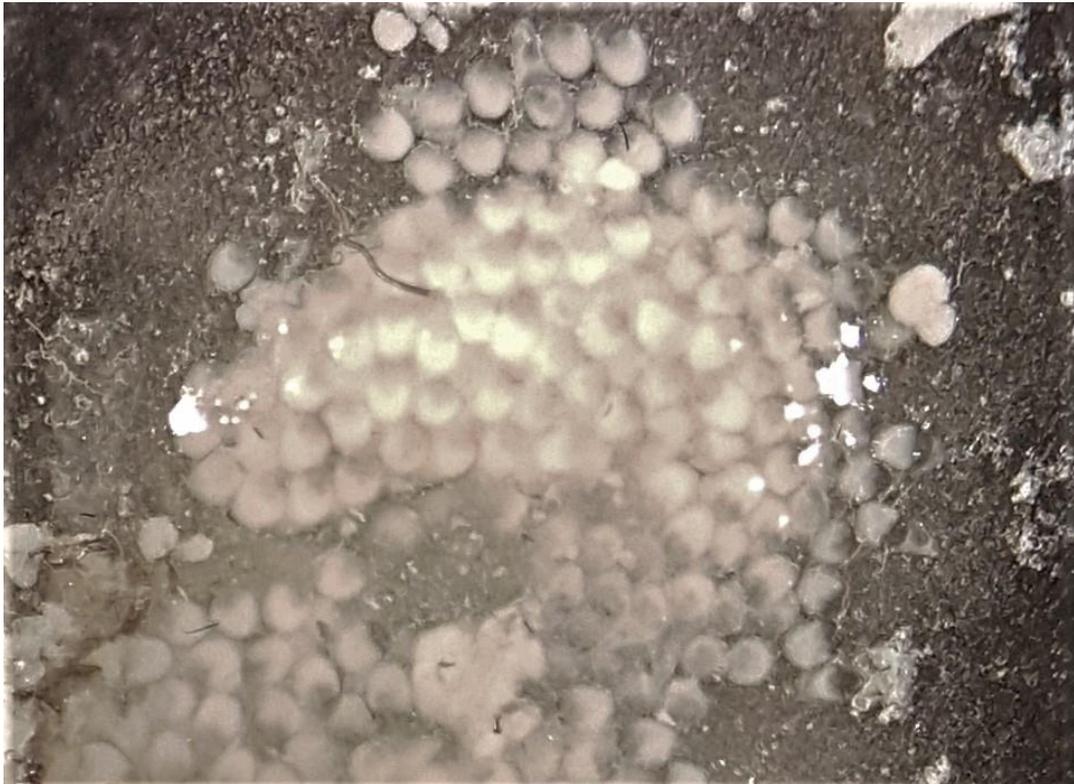


Figura 8 Uova di *Hermetia illucens*



0000

Figura 9 Rappresentazione dei 6 stadi larvali di *H. illucens* (https://www.insectschool.com/wp-content/uploads/BSFcircle_Insect_School_22-scaled-847x582-c-default@2x.jpg).



Figura 10 Emplare adulto di mosca soldato *H. illucens* (<https://bugguide.net/images/cache/dk4/k1k/dk4k1k5kek1qa04q10wqlspqb0gqb02qo00k9keqlswqlspqt0eqb09qj0nqakikvk8kj08qt01qvkqvq304qd0aqbkaq.jpg>)

L'interesse scientifico per questa specie di insetto ha dato un nuovo impulso alle conoscenze sulla biologia della mosca soldato. Fino a pochi anni fa, si pensava che gli adulti non si nutrissero e che questo avvenisse solo durante le fasi larvali. Recentemente è stato dimostrato che questi insetti si nutrono durante lo stadio di adulto e che questo migliora la loro longevità (Bruno et al., 2019). Il dimorfismo sessuale di questa specie è presente solo negli organi riproduttivi degli esemplari adulti. I genitali maschili sono corti e presentano due paia di lobi laterali posteriori e un paio di gonostili molto piccoli, mentre quelli femminili sono costituiti da due segmenti più lunghi e una furca sub triangolare (Figura 11) (Oliveira et al., 2015).



Figura 11 Rappresentazione genitali femminili di *H.illucens*

Le larve di BSF sono caratterizzate da enormi potenzialità quali:

a) Capacità di nutrirsi di svariati substrati organici, incoraggiano fortemente il loro utilizzo per il trattamento dei rifiuti organici che possono essere di varia natura come prodotti di origine animale, vegetale e derivati e sostengono lo sviluppo di allevamenti di BSF su larga scala che possano beneficiare delle caratteristiche di sostenibilità peculiari di questa specie. I punti di forza dell'allevamento di *H. illucens* sono di seguito riportati: Le larve di *H. illucens* sono saprofaghe e si alimentano di svariati substrati organici; di conseguenza è possibile utilizzare i rifiuti organici come fonte alimentare delle larve per ridurre e valorizzare i rifiuti, e contemporaneamente produrre, attraverso il processo di bioconversione, una

biomassa larvale con potenziali applicazioni specialmente nel settore agro-alimentare.

b) Tutto il materiale di scarto ottenuto dal processo di bioconversione, ovvero tutto il materiale digerito dalle larve (*biocompost*) ha delle ottime proprietà come fertilizzante biologico e può avere un'applicazione nel settore dell'agricoltura.

c) Se fatto essiccare, il *biocompost* può essere utilizzato come combustibile ad alto potere calorifero.

d) Gli esoscheletri rilasciati durante le metamorfosi contengono chitina, un polisaccaride da cui è possibile ricavare il chitosano, un biopolimero che trova larga applicazione in vari settori tra cui la cosmetica e l'enologia.

e) La biomassa larvale può essere usata per la produzione di farine di insetto con una conseguente applicazione nel settore della mangimistica, sia nell'acquacoltura che negli allevamenti avicoli.

f) La frazione proteica delle larve, a seguito di processi biochimici come l'idrolisi enzimatica, può essere utilizzata per la produzione di sostanze con attività biologica.

g) La frazione lipidica delle larve può essere utilizzata nella produzione di biodisel.

La chiave della sostenibilità economica, ambientale e sociale degli allevamenti di *H. illucens* risiede proprio nel processo di bioconversione, un processo in cui le larve degradano il 70% del substrato organico convertendolo in biomassa larvale (7.7%) con enormi potenzialità applicative in diversi settori, inclusa la mangimistica, e *biocompost* con potenziale applicazione in agricoltura.

1.6 La farina di *H. illucens* come fonte proteica in aquafeed

Le larve di BSF, caratterizzate da un elevato valore nutrizionale, rappresentano delle ottime fonti proteiche alternative e sostenibili per la produzione di farina d'insetto da impiegare nel settore della mangimistica, in particolare nei mangimi per l'acquacoltura (*aquafeed*). La farina di *H. illucens* è stata oggetto di studio come nuova fonte proteica nella formulazione di mangimi, anche per specie avicole come i polli (De Marco et al., 2015).

Nel settore dell'acquacoltura, le caratteristiche nutrizionali delle farine di *H. illucens* hanno incoraggiato gli studi mirati alla sostituzione totale o parziale della farina di pesce con la farina di insetto e i risultati ottenuti hanno generalmente dimostrato una migliore performance di crescita delle specie allevate, alcune delle quali di interesse commerciale, come rombo, salmone o tilapia (Kroeckel et al., 2012, Henry et al., 2015, Bruni et al., 2020, Tippayadara et al., 2021). In specie d'acqua dolce come la trota arcobaleno (*Oncorhynchus mykiss*), la farina di *H. illucens* è stata inclusa nella dieta con percentuali di inclusione del 25% e 50% senza alcuna alterazione dei parametri di crescita. Le differenze osservate in queste diete sperimentali sono state a livello intestinale, nella risposta immunitaria e nella deposizione di lipidi nel fegato suggerendo di prestare particolare attenzione quando si vuole effettuare un'inclusione del 50% di farina di BSF (Cardinaletti et al., 2019). Sebbene l'utilizzo delle farine di BSF come ingrediente alternativo e sostenibile nella formulazione di *aquafeed* abbia fornito risultati controversi, sembra chiaro che oltre alla specie allevata e al suo stadio di sviluppo, altri fattori possono influenzare il valore nutrizionale delle farine determinando effetti diversi sulla crescita, sul metabolismo dei pesci e quindi sulla composizione macromolecolare dei filetti e qualità nutrizionale delle carni, sulla loro salute e benessere. Il valore nutrizionale delle farine di BSF è notevolmente influenzato dalla natura della matrice organica sulla quale vengono allevate le larve di insetto (Gobbi et al., 2013; Nguyen et al., 2015; Pimentel et al., 2017). Durante il processo di bioconversione, infatti, la composizione nutrizionale delle larve cambia a seconda della qualità e quantità di substrato organico del quale esse si nutrono; la determinazione della composizione nutrizionale ha dimostrato che, sebbene la frazione proteica delle larve di BSF sia meno variabile con un range di circa 37-63%, la frazione lipidica, al contrario, può variare dal 7 al 39% di sostanza secca (Barragan-Fonseca et al., 2017). La frazione dei lipidi delle larve di *H. illucens* (BSF) è costituita essenzialmente dagli acidi grassi che rappresentano la porzione maggiore in termini di percentuale; tra questi, l'acido laurico è presente in quantità significative e, proprio per le sue proprietà antibatteriche ed antivirali, potrebbe svolgere un ruolo essenziale per la crescita delle larve su substrati organici nei quali possono essere presenti diversi tipi di microorganismi. Una frazione importante degli acidi grassi, le cui proporzioni dipendono dalla dieta delle larve è rappresentata dagli acidi grassi saturi,

principalmente acido ottadecenoico, stearico, palmitico, miristico e esadecenoico, che sono in netta predominanza rispetto quelli insaturi e polinsaturi che costituiscono solo una piccola parte della biomassa larvale (Oonincx et al., 2015; Ushakova et al., 2016). Il valore nutrizionale delle farine di BSF, oltre che dal substrato di crescita, è influenzato dallo stadio di sviluppo delle larve ed è stato dimostrato che il contenuto proteico e lipidico variano considerevolmente lungo l'intero ciclo vitale di BSF, con un aumento del contenuto di sostanza secca ed una riduzione del contenuto proteico negli ultimi stadi larvali (Liu et al., 2017; Rachmawati et al., 2017).

Gli ultimi stadi di sviluppo larvale sono quelli più comunemente utilizzati per la formulazione delle farine di BSF in quanto sono caratterizzati da una biomassa maggiore e permettono una migliore resa in termini quantitativi. La maggior parte degli studi su BSF mirati alla caratterizzazione nutrizionale delle larve per la produzione di farine di insetto da applicare in acquacoltura o in formulazione di mangimi per specie avicole, ha focalizzato l'attenzione sullo stadio di prepupe (Surendra et al., 2016, Liu et al., 2017), ma evidenze scientifiche di una eventuale maggiore efficacia di questo stadio larvale nella formulazione delle farine di insetto sono ancora scarse. Uno studio sull'analisi del microbiota di trote arcobaleno (*Oncorhynchus mykiss*) alimentate con farine di larve e prepupe di BSF, ha dimostrato che le diete sperimentali possono modificare la composizione batterica del microbiota intestinale (Huyben et al., 2019) indicando che i differenti profili biochimici e nutrizionali che caratterizzano i diversi stadi larvali possono influenzare differentemente lo stato di salute e benessere delle specie alimentate con farine a base di insetti.

Più recentemente, l'analisi della composizione nutrizionale dei due ultimi stadi larvali di BSF allevati su matrici di origine vegetale, ha rilevato le peculiarità dei profili biochimici di larve V stadio e prepupae (Giannetto et al., 2020a) per il loro contenuto proteico, lipidico e di chitina (Tabella 2). Le prepupe sono caratterizzate da un contenuto proteico più elevato rispetto alle larve V stadio, anche a seguito della correzione della percentuale di proteine in funzione del contenuto di chitina, un polisaccaride presente nelle cuticole ed esoscheletro degli insetti con numerose applicazioni nel settore farmaceutico, che risulta essere maggiore nelle prepupe.

Composizione (%)	Substrato	Larve V stadio	Prepupe
Sostanza secca	73.66 ± 0.11	85.51 ± 0.12 ^a	89.46 ± 0.06 ^b
Proteina grezza (CP)	9.49 ± 0.88	36.70 ± 2.69 ^a	39.88 ± 1.11 ^a
Cenere	11.99 ± 0.02	5.00 ± 0.03 ^a	5.66 ± 0.07 ^b
Grassi grezzi (CF)	3.42 ± 0.05	32.97 ± 0.16 ^a	30.80 ± 0.20 ^b
NDF	48.24 ± 0.27	33.40 ± 0.55 ^a	39.14 ± 0.56 ^b
ADF	37.92 ± 0.29	22.51 ± 0.32 ^a	27.40 ± 0.11 ^b
Recupero di ADF (asaminoacidi)	4.03 ± 0.06	14.86 ± 0.17 ^a	16.31 ± 1.39 ^a
Contenuto stimato di chitina		19.16 ± 0.32 ^a	22.97 ± 0.45 ^b
Contenuto proteico corretto		33.35 ± 0.37 ^a	35.40 ± 0.37 ^b

Tabella 2 Profili nutrizionali di *H. illucens*. Sono mostrate le differenze del contenuto proteico, lipidico e di chitina tra larve V stadio e prepupae (Giannetto et al., 2020a).

La valutazione della componente lipidica delle larve V stadio e delle prepupe ha mostrato che, sebbene il contenuto di grassi grezzi sia comparabile, il profilo degli acidi grassi varia significativamente tra i due stadi larvali (Tabella 3).

Le prepupe sono caratterizzate da livelli significativamente più elevati di acido caprico, miristico e laurico, un acido grasso con rilevanti attività antibatteriche e proprietà antiinfiammatorie (Kim e Rhee, 2016, Zarantoniello et al., 2019). Il contenuto degli acidi grassi pentadecanoico e eptadecanoico è invece più abbondante nelle larve V stadio, questi acidi, svolgono un ruolo importante nella funzionalità della membrana rendendola più fluida (Jenkins et al., 2015). Gli acidi grassi monoinsaturi e polinsaturi sono maggiormente abbondanti nelle larve V stadio rispetto alle prepupe che, al contrario, sono caratterizzate da maggiori quantità di acidi grassi saturi.

Acidi grassi	Larve V stadio	Prepupe
Butirrico (C4:0)	< 0.01	< 0.01
Caproico (C6:0)	< 0.01	< 0.01
Caprilico (C8:0)	< 0.01	< 0.01
Caprico (C10:0)	0.46	1.19
Caproleico (C10:1)	< 0.01	< 0.01
Undecanoico (C11:0)	0.23	< 0.01
Laurico (C12:0)	28.10	61.87
Lauroleico (C12:1)	< 0.01	< 0.01
Miristico (C14:0)	3.85	9.07
Miristoleico (C14:1)	0.66	0.54
Pentadecanoico (C15:0)	0.81	0.03
Pentadecenoico (C15:1)	0.41	< 0.01
Palmitico (C16:0)	5.78	7.90
Palmitoleico (C16:1)	1.65	2.44
Eptadecanoico (C17:0)	33.62	3.22
Eptadecenoico (C17:1)	< 0.01	< 0.01
Stearico (C18:0)	0.72	1.15
Oleico (C18:1)	4.27	5.26
Linoleico (C18:2)	1.27	2.38
Linolenico (C18:3)	10.30	4.75
Arachidico (C20:0)	< 0.01	< 0.01
Eicosenoico (C20:1)	7.96	< 0.01
Behenico (C22:0)	< 0.01	0.08
Omega 3	2.88 g/100g	2.99 g/100g
Omega-6	2.5 g/100g	0.99 g/100g
Acidi grassi trans	< 0.01	0.12
Acidi grassi saturi	73.48	84.51
Acidi grassi monoinsaturi	14.95	8.36
Acidi grassi polinsaturi	11.57	7.13

Tabella 3 Composizione di acidi grassi delle larve V stadio e prepupae (Giannetto et al., 2020a).

L'analisi del profilo amminoacidico di larve V stadio e prepupe di BSF ha mostrato che esistono differenze tra i due stadi larvali. Maggiori percentuali di amminoacidi essenziali come la leucina e la valina o non essenziali come alanina e l'acido aspartico sono più abbondanti nelle larve V stadio che nelle prepupe; di contro amminoacidi come arginina e istidina sono maggiori nelle prepupe che nelle larve V stadio (Tabella 4). Un dato particolarmente interessante riguarda il contenuto di taurina, che risulta essere maggiore nelle prepupe rispetto alle larve V stadio. Questo amminoacido, infatti, è noto per le sue proprietà antiossidanti, per il suo coinvolgimento in processi fisiologici come l'osmoregolazione, e inoltre è un nutriente fondamentale nella dieta di alcune specie ittiche; infatti l'integrazione di questo amminoacido ha determinato effetti positivi sulla crescita e sulle funzioni digestive in molte specie (Salze e Davis, 2015).

Amminoacidi (%)	Larve V stadio	Prepupe
ESSENZIALI		
Arginina ^f	6.49	8.87
Istidina ^{hf}	7.49	8.12
Isoleucina ^{hf}	1.71	1.37
Leucina ^{hf}	2.25	1.79
Lisina ^{hf}	3.65	3.35
Metionina ^{hf}	0.21	0.19
Metionina e cistina		
Fenilalanina ^{hf}	1.28	1.03
Fenilalanina e tirosina		
Treonina ^{hf}	2.49	2.29
Tirosina ^h	0.73	0.92
Valina ^{hf}	3.04	2.59
NON ESSENZIALI		
Alanina	16.49	11.67
Acido aspartico	4.08	2.72
Acido glutammico	21.76	17.74
Glicina	2.08	2.02

Serina	2.51	1.80
Altri	23.94	32.95
EAA	29.34	30.52
NEAA	46.92	35.95
Taurina (mg/Kg)	24	45

Tabella 4 Composizione amminoacidica delle larve V stadio e prepupae (Giannetto et al., 2020c).

Le notevoli differenze riscontrate nella composizione nutrizionale dei due stadi larvali di BSF allevate sullo stesso substrato di crescita, indicano che i peculiari profili biochimici sono il risultato di differenze nei *pathway* metabolici degli acidi grassi e delle proteine che caratterizzano le larve V stadio e le prepupe, e suggeriscono la possibilità di utilizzare selettivamente i due stadi larvali nella formulazione di farine a base di BSF a seconda delle richieste nutrizionali e dello specifico stadio di sviluppo delle specie allevate, per supportare la crescita del settore dell’acquacoltura.

La formulazione dei mangimi per acquacoltura (*aquafeed*) è, infatti, un elemento cardine per lo sviluppo di un’acquacoltura sostenibile sia in termini ecologici che economici.

L’uso di proteine di *H. illucens* come ingredienti nei mangimi è infatti consentito dal 2017, quando il Regolamento UE 2017/893 ha disposto l’utilizzo di 7 specie di insetti, tra cui BSF, in acquacoltura e nei mangimi per gli animali da laboratorio e da compagnia.

I promettenti profili nutrizionali di BSF e la presenza di molecole bioattive con potenziali effetti benefici sulla salute dei pesci, insieme alla elevata efficienza di conversione, indicano che *H. illucens* rappresenta una soluzione promettente per applicare un approccio di economia circolare nel settore dell’acquacoltura.

1.7 Il modello zebrafish per lo studio di diete a base di *H. illucens*

Zebrafish (*Danio rerio*) è un piccolo pesce che popola i bacini d’acqua dolce in Asia e, per le sue caratteristiche intrinseche rappresenta un organismo modello nella sperimentazione scientifica. Circa il 75% del suo genoma è simile a quello umano; ciò

lo rende un ottimo candidato per il settore della ricerca scientifica e per i saggi di tossicologia. Ulteriori caratteristiche lo rendono un ottimo modello sperimentale:

- 1. Dimensioni ridotte:** questo pesce raggiunge dimensioni che variano dai 4 cm ai 6 cm; di conseguenza è possibile allevare un gran numero di esemplari in piccoli acquari, senza la necessità di grandi spazi per la sperimentazione.
- 2. Ciclo di vita breve:** a partire dalla schiusa delle uova occorrono circa 90 giorni affinché si formi un nuovo individuo adulto; di conseguenza è possibile osservare tutte le fasi di sviluppo dei pesci che vanno dalla schiusa all'accrescimento fino alla formazione di un individuo adulto in soli tre mesi.
- 3. Uova trasparenti:** le uova di questo organismo sono trasparenti; ciò permette di effettuare delle osservazioni dei vari stadi di sviluppo che intercorrono dalla fecondazione delle uova fino alla loro schiusa.

Raggiunta l'età adulta e la maturità sessuale gli esemplari di zebrafish sono pronti per riprodursi: le femmine, durante questa fase, presentano un addome gonfio per la presenza delle uova, il cui numero si aggira tra le 300 e le 400 unità; queste ultime, una volta deposte, possono essere fecondate dal maschio. Avvenuta la fecondazione, ulteriori 48- 72 ore sono necessarie affinché possa avvenire la schiusa; le larve di zebrafish traggono nutrimento dal sacco vitellino per circa 5/6 giorni, ed infine iniziano a nutrirsi di piccoli organismi come piccoli insetti e vermi. A 90 giorni di vita i pesci sono già adulti e possono vivere fino a 5 anni (D'Costa e Shepher, 2009) (Figura 12).

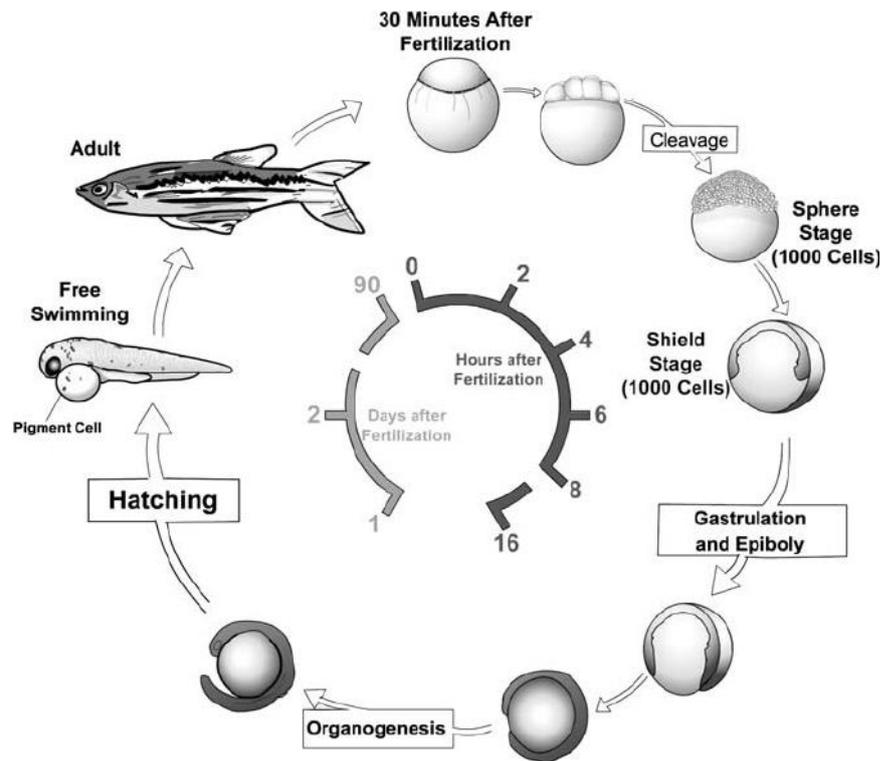


Figura 12 Rappresentazione del ciclo vitale di zebrafish dalla fecondazione all'individuo adulto (D'Costa e Shepherd, 2009).

Studi precedenti sull'inclusione della farina di *H. illucens* nella dieta di zebrafish, sostituendo totalmente la farina di pesce con farina di prepupe di BSF nell'alimentazione del piccolo organismo modello in una fase precoce dello sviluppo, dai 7 ai 21 *day post fertilization (DPF)* (giorni dopo la fecondazione), hanno valutato l'espressione di geni coinvolti nella crescita, nel metabolismo lipidico e alterazioni a livello intestinale (Vargas et al., 2018). Nei pesci alimentati con la dieta sperimentale a base di BSF, i tassi di crescita e di sopravvivenza sono paragonabili agli esemplari allevati con una dieta controllo, così come supportato dai dati di espressione dei geni coinvolti nella crescita come *igf1*, *igf2* e *msntb*, che non hanno mostrato differenze sostanziali in risposta alla dieta. È stato tuttavia dimostrato che la dieta a base di BSF può determinare infiammazioni a livello intestinale e uno squilibrio nella composizione degli acidi grassi con un aumento del contenuto di acidi grassi saturi e una diminuzione di acidi grassi polinsaturi.

Inclusioni parziali della farina di prepupe di BSF nell'alimentazione di zebrafish con percentuali di sostituzione della farina di pesce pari al 25% e 50%, nella fase di

sviluppo dai 7 ai 21 *DPF* (*days post fertilization*), hanno dimostrato che, sebbene non ci fossero differenze nei tassi di mortalità osservati nelle diverse diete sperimentali, i pesci alimentati con la sostituzione del 50% risultavano più grandi rispetto a quelli alimentati con altre diete e presentavano steatosi epatica (Zarantoniello et al., 2018). L'alimentazione di zebrafish con diete a base di prepupe di BSF con le stesse percentuali di inclusione (25% e 50%), ma per un periodo di sei mesi, quindi dalla fase larvale di zebrafish fino alla fase adulta, hanno dimostrato che la sostituzione parziale della farina di pesce non è responsabile dell'insorgenza di stati infiammatori o alterazioni della risposta immunitaria negli esemplari adulti (Zarantoniello et al., 2019). Questi risultati preliminari incoraggiano fortemente l'utilizzo di farine a base di BSF, in sostituzione delle costose e scarsamente sostenibili farine di pesce, come ingrediente con potenziali proprietà benefiche in *aquafeed* e evidenziano la necessità di orientare la ricerca scientifica verso una migliore comprensione delle proprietà nutrizionali e degli effetti benefici sulla salute delle farine di BSF nella dieta di specie di interesse commerciale.

1.8 Fonti nutrizionali alternative e regolazione epigenetica

Numerosi studi hanno evidenziato che esiste una stretta correlazione tra l'ambiente circostante e gli individui, e che diversi fattori, tra i quali la dieta, possono determinare dei cambiamenti epigenetici, cioè delle modificazioni dell'espressione genica in un organismo o in una cellula che non sono imputabili a differenze nella sequenza del DNA. Tra i cambiamenti epigenetici, la metilazione della citosina, ovvero l'aggiunta di un gruppo metilico in posizione 5' nelle citosine del DNA, è indubbiamente la modificazione epigenetica più nota e responsabile della modulazione dell'espressione genica in diverse specie animali (Bird, 2007). Si ritiene che l'alimentazione possa influire sulla metilazione del DNA attraverso diversi percorsi epigenetici come l'alterazione dei substrati e dei cofattori necessari per una corretta metilazione del DNA, la modifica dell'attività degli enzimi che regolano il *one carbon cycle* oppure agendo in meccanismi coinvolti nell'attività di demetilazione del DNA (Zhang, 2015, Kadayifci et al., 2018). È quindi ipotizzabile che l'introduzione di fonti proteiche alternative a base di insetto nei mangimi per l'acquacoltura, necessaria allo sviluppo di questo settore alimentare per sopperire ai costi e alla scarsa sostenibilità delle farine di pesce (Gatlin, 2007, Hardy, 2010, Kroeckel et al., 2012), possa essere responsabile

di modificazioni a livello epigenetico e quindi modificare l'espressione di alcuni geni negli organismi alimentati con farine di insetto.

In un recente studio sono stati valutati i cambiamenti epigenetici determinati dall'introduzione di fonti proteiche vegetali nella dieta di zebrafish (Dhanasiri et al., 2020). I pesci sono stati alimentati per un periodo di 42 giorni con tre diete a base vegetale, sostituendo il 30% della farina di pesce con proteine concentrate di piselli, soia e grano. Alla fine del periodo di alimentazione gli intestini dei pesci sono stati prelevati per valutare i cambiamenti epigenetici del genoma tramite la tecnica RRBS (sequenziamento del bisolfito a rappresentazione ridotta). I risultati ottenuti hanno dimostrato che la presenza di proteine vegetali nella dieta di zebrafish ha causato la metilazione di numerosi geni correlati all'immunità, al sistema NF- κ B, alla via ubiquitina-proteasoma, alla via MAPK e al sistema di difesa antiossidante (Dhanasiri et al., 2020). È stata inoltre osservata la regolazione epigenetica di diversi processi biologici, tra cui la neurogenesi, l'adesione cellulare, la risposta allo stress e l'immunità. Ad oggi, gli effetti dell'inclusione delle farine di *Hermetia illucens* BSF nella dieta di zebrafish sui possibili cambiamenti epigenetici non sono stati ancora valutati. Pertanto, uno studio sulla metilazione delle citosine in pesci alimentati con farine di BSF potrebbe fornire indicazioni preziose per comprendere meglio le relazioni che intercorrono tra dieta e cambiamenti epigenetici e analizzare pienamente i benefici e i rischi derivanti dall'utilizzo di queste fonti proteiche alternative e sostenibili in acquacoltura.

1.9 Attività biologica di molecole estratte da *Hermetia illucens*

Il valore nutrizionale delle farine di BSF è soltanto uno degli aspetti delle enormi potenzialità dell'utilizzo di questo insetto come *food* e *feed*. È ormai riconosciuto che le larve, oltre ad essere una valida fonte di proteine e lipidi che possono essere utilizzati in diverse applicazioni biotecnologiche, incluse ma non limitate alla produzione di farine, biodiesel e materiali plastici (Surendra et al., 2016, Barbi et al., 2019, Surendra et al., 2020), possono essere una fonte preziosa di composti con rilevanti proprietà biologiche e non si può escludere che alcuni degli effetti positivi delle farine di BSF in acquacoltura siano in realtà dovuti alla presenza di molecole con attività benefica per la salute.

Sebbene l'utilizzo di antiossidanti di origine vegetale sia stato incoraggiato negli ultimi anni, le limitazioni tecnologiche dovute alla enorme variabilità delle matrici vegetali e alla loro composizione proteica, hanno stimolato la ricerca di nuove molecole con attività biologica. È estremamente importante sottolineare che gli antiossidanti di origine animale, essendo principalmente proteine e peptidi, sono caratterizzati da un valore nutrizionale rilevante rispetto ai composti fenolici, ai carotenoidi e alle vitamine delle piante (Abeyrathne et al., 2022).

Negli ultimi anni, evidenze scientifiche hanno dimostrato che dalla frazione proteica delle biomasse di qualsiasi natura possono essere ricavati peptidi bioattivi attraverso processi di idrolisi chimica o enzimatica, fermentazione o trattamenti ad alta pressione ed il loro ruolo come ingredienti promotori della salute è stato ampiamente riconosciuto (Kiewiet et al., 2018, Nirmal et al., 2022) incoraggiando l'utilizzo degli idrolizzati proteici anche in applicazioni industriali nel settore alimentare (Tang et al., 2023).

Studi recenti hanno descritto idrolizzati proteici ottenuti dai pesci che svolgono il ruolo di ingredienti promotori della salute (Nirmal et al., 2022). Tra le proprietà biologiche degli idrolizzati proteici, l'attività antiossidante è stata dimostrata per gli idrolizzati proteici dell'acciuga (*Engraulis encrasicolus*) che hanno mostrato un elevato potenziale antiossidante e antinfiammatorio sia in modelli cellulari in vitro che in vivo (Giannetto et al., 2020b).

Il nuovo interesse per le proteine degli insetti edibili ha orientato la ricerca verso una maggiore comprensione delle proprietà funzionali, attività biologiche, benefici, applicazioni alimentari, sicurezza biologica - specialmente in relazione alle possibili reazioni allergiche- delle proteine e dei loro derivati (Pan et al., 2022; Quintieri et al., 2023; Teixeira et al., 2023).

Idrolizzati proteici sono stati prodotti dalle larve di *Tenebrio molitor* ed è stato dimostrato che, oltre ad essere una promettente fonte proteica alternativa per l'alimentazione di specie acquatiche come le trote (*Salmo trutta m. trutta*) (Hoffmann et al., 2020, Mikołajczak et al., 2020), posseggono importanti attività antipertensiva agendo come ACE (Angiotensin Converting Enzyme) inibitori in ratti maschi spontaneamente ipertesi (Dai et al., 2013).

Nonostante il ruolo cruciale delle proteine delle larve di BSF come fonte proteica sostenibile e alternativa alla farina di pesce nei mangimi per il settore dell'acquacoltura sia ben documentato, ad oggi le potenzialità dei derivati proteici e le loro proprietà funzionali rimangono ancora da esplorare.

Studi preliminari sulla produzione di idrolizzati proteici di *H. illucens* hanno dimostrato che la resa è fortemente influenzata dalle metodologie di estrazione della frazione proteica, dalla tipologia di idrolisi (chimica o enzimatica) e nel caso di idrolisi enzimatica anche dagli enzimi utilizzati (tripsina, papaina, bromelina, ecc., o loro miscele) e dai tempi di idrolisi (Firmansyah e Abduh 2019, Leni et al., 2020b). L'utilizzo di enzimi diversi può infatti determinare differenti gradi di idrolisi e, conseguentemente, anche possibili attività biologiche distinte; è stato dimostrato per esempio che gli idrolizzati proteici di BSF ottenuti mediante alcalasi mostrano un grado di idrolisi più elevato ed una maggiore attività antiossidante rispetto a quelli ottenuti mediante pepsina (Batish et al., 2020). Inoltre, i metodi di uccisione delle larve di BSF (essiccazione convenzionale, pastorizzazione, essiccazione a microonde, scottatura e congelamento) possono influenzare la produzione di idrolizzati e le loro attività biologiche (Mintah et al., 2019, Ravi et al., 2020).

Gli idrolizzati proteici di BSFL hanno mostrato un notevole effetto benefico quando inclusi nei mangimi dei pesci e, quando utilizzati in formula, hanno determinato una maggiore appetibilità nel gambero bianco del Pacifico (*Litopenaeus vannamei*). Questi risultati sono generalmente attribuiti all'elevato contenuto di piccoli peptidi e aminoacidi liberi caratterizzati da una maggiore solubilità in acqua (Roques et al., 2020, Terrey et al., 2021). L'aggiunta di aminoacidi liberi e peptidi ottenuti dalla frazione proteica di BSF ha determinato infatti un miglioramento delle performance di crescita e dell'efficienza alimentare della trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*), fornendo substrati facilmente disponibili per il metabolismo della sintesi proteica e per il fabbisogno energetico.

I derivati proteici ottenuti dalle larve di *H. illucens* attraverso idrolisi chimica o enzimatica della frazione proteica sono caratterizzati dalla presenza di piccoli polipeptidi e aminoacidi liberi che possiedono attività biologiche rilevanti, quali attività antiossidanti (Firmansyah e Abduh 2019; Mouithys-Mickala et al., 2020; Zhu

et al., 2020), e una potenziale capacità di ridurre il rischio allergenico (Leni et al., 2020a). Tuttavia, ad oggi, le proprietà biologiche degli idrolizzati proteici sono state valutate mediante analisi biochimiche basate sui saggi spettrofotometrici ma mancano ancora chiare evidenze scientifiche dell'attività biologica degli idrolizzati di BSF in modelli cellulari *in vivo* e sono quindi necessari ulteriori studi per comprendere i meccanismi cellulari e molecolari che stanno alla base delle potenziali proprietà biologiche utili al loro utilizzo come ingredienti promotori della salute.

1.10 Food waste per l'allevamento di *H.illucens*

La capacità delle larve di BSF di crescere su matrici organiche di varia natura, composte da sostanze di origine animale, vegetale, liquami e varie tipologie di scarti è una peculiarità di *H. illucens* che, attualmente, rappresenta un ottimo candidato per valorizzare gli scarti alimentari producendo contemporaneamente, durante il processo di bioconversione, una biomassa larvale ad elevato valore nutrizionale e sottoprodotti che possono essere impiegati come fertilizzanti in agricoltura, secondo i principi dell'economia circolare. Nonostante le enormi potenzialità di BSF come nuova biotecnologia per risolvere contemporaneamente due sfide globali, la gestione dei rifiuti e la produzione di fonti proteiche alternative e sostenibili, l'utilizzo delle larve di BSF nei mangimi per acquacoltura o per animali da allevamento non può prescindere dalla valutazione della sicurezza microbiologica delle larve allevate su substrati di crescita catalogati come scarti alimentari. Tali scarti alimentari, inevitabilmente destinati a processi di putrefazione, sono soggetti alla proliferazione di microorganismi di varia natura come batteri, lieviti e muffe che trovano un ambiente idoneo per la loro crescita per la presenza di acqua e nutrienti. Una delle peculiarità di BSF è la capacità delle larve di crescere in ambienti ostili dal punto di vista microbiologico e, recentemente, è stato dimostrato che tale prerogativa è imputabile ad una sostanziale espansione del genoma di questo insetto nei moduli funzionali correlati all'adattamento settico, inclusi alcuni fattori del sistema immunitario (Zhan et al., 2019). Ad incrementare le capacità delle larve di BSF di crescere su substrati microbiologicamente ostili contribuisce la presenza di geni che codificano circa 50 peptidi antimicrobici (AMP) nel genoma di *H. illucens*, creando così la più grande famiglia di AMP mai identificata negli insetti fino ad oggi. È stato dimostrato che questi peptidi antimicrobici sono responsabili di una notevole attività antimicrobica

nelle larve di BSF trattate con *Lactobacillus casei* e possono inibire la contaminazione e la crescita di ben tre specie diverse di *Salmonella* (*Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* e *Salmonella pullorum*) (Lee et al., 2020, Xia et al., 2021).

Nonostante queste notevoli proprietà antibiotiche delle larve, il loro utilizzo come fonti nutrizionali alternative e sostenibili richiede una attenta valutazione della sicurezza alimentare, basata su rigorose evidenze scientifiche che supportano l'autorizzazione dei nuovi alimenti, senza le quali si applica il “principio di precauzione”. Soltanto i nuovi alimenti che sono già stati valutati sotto il profilo della sicurezza, e sono stati approvati perché sicuri per la salute umana vengono immessi sul mercato. Attualmente la maggior parte degli alimenti presenti in commercio viene trattata con diverse tecniche per abbassare la carica microbica eventualmente presente; sono perlopiù trattamenti di tipo fisico che prevedono l'abbassamento della temperatura, come il congelamento o il CAPP (*cold atmospheric pressure plasma*) (Bußler et al., 2016, Megido et al., 2016), oppure l'innalzamento della temperatura, come la bollitura o lo sbiancamento (Vandeweyer et al., 2017). Esiste inoltre una serie di metodologie per ridurre la carica microbica attraverso l'allontanamento totale o parziale del contenuto di acqua degli alimenti (essiccazione) che, privi di questo componente essenziale per la crescita dei microorganismi, risultano così ambienti sfavorevoli per la proliferazione microbica: essiccazione al microonde, essiccazione a letto fluidizzato, essiccazione con vuoto e liofilizzazione (Kröncke et al., 2018).

Il progetto di ricerca propone un modello di economia circolare nel quale le larve dell'insetto BSF rappresentano una promettente biotecnologia per valorizzare gli scarti alimentari attraverso il processo di bioconversione e produrre contemporaneamente una biomassa larvale ad elevato valore nutrizionale. La valutazione della sicurezza microbiologica di un tale modello è fondamentale e non può prescindere dall'analisi della carica microbica presente nei substrati di crescita delle larve, nelle larve stesse e nel prodotto di scarto della bioconversione (digestato). Al fine di migliorare la sicurezza microbiologica delle larve di BSF, e quindi ridurre la carica microbica, è stato sperimentato un trattamento di pastorizzazione delle larve a diversi tempi di esposizione ed è stato valutato il potenziale rischio biologico di un modello che ha il potenziale di risolvere contemporaneamente due sfide globali, la gestione degli scarti

e la produzione di fonti nutrizionali alternative nel rispetto della sostenibilità economica, ambientale e sociale

1.11 Utilizzo delle farine d'insetto e normativa Europea

La legislazione dell'Unione Europea regola la produzione, il commercio e la destinazione al consumo umano di nuovi alimenti attraverso le disposizioni contenute nel Regolamento CE n. 258/1997 che ha, tra le altre, la finalità di assicurare “un elevato livello di tutela della salute umana e degli interessi dei consumatori”. La commercializzazione di un nuovo alimento richiede la preliminare valutazione della sua sicurezza alimentare da parte dell'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) che in caso di esito positivo rilascia la certificazione. L'iter legislativo che ha portato agli attuali progressi nell'utilizzo degli insetti per scopi alimentari è durato poco più di 25 anni ed è stato costellato da continue ricerche che hanno dimostrato il valore nutrizionale degli insetti e i loro effetti benefici. Nonostante permangano ancora delle resistenze alla loro commercializzazione dovute principalmente a fattori culturali e alla verifica che i prodotti a base di insetti siano esenti dallo scatenare reazioni allergiche, il primo passo verso l'immissione degli insetti sul mercato in ambito europeo è rappresentato dal sopra citato “Regolamento CE 258/97” che considera gli insetti come *Novel Food* senza però consentire il loro consumo. Successivamente la normativa europea ha progressivamente affermato il ruolo chiave degli insetti quale fonte nutrizionale alternativa con i seguenti regolamenti:

1. **Regolamento (CE) 999/2001:** autorizza l'utilizzo di insetti esclusivamente per la formulazione di mangimi destinati agli animali d'affezione e da pelliccia.
2. **Regolamento (CE) 2015/2283:** disciplina l'utilizzo di insetti nel *novel food*: ed *H. illucens* è una delle specie di insetto considerate commestibili.
3. **Regolamento (CE) 2017/893:** ammette l'utilizzo degli insetti quali fonti proteiche in acquacoltura autorizzando l'utilizzo delle farine d'insetto dal 1 luglio 2017 per l'alimentazione di specie allevate. In particolare, 7 diverse specie di insetti vengono considerate idonee a tale scopo: la mosca soldato (*Hermetia illucens*), la mosca comune (*Musca domestica*), la tarma della farina (*Tenebrio molitor*), il verme della farina minore (*Alphitobius*

diaperinus) e tre specie di grilli (*Acheta domesticus*, *Gryllobes sigillatus* e *Gryllus assimilis*). Lo stesso regolamento stabilisce che gli insetti sono animali di allevamento e, pertanto, devono essere alimentati con prodotti consentiti, quali ad esempio i substrati di origine vegetali non definiti come rifiuto (EC 1069/2009). Il regolamento autorizza anche l'utilizzo di PAP (proteine animali processate) ottenute dagli insetti come fonti proteiche nell'alimentazione di animali da compagnia, da laboratorio e d'acquacoltura (Figura 13).

4. Regolamento UE 2021/1372: autorizza l'utilizzo dei PAP nella formulazione di mangimi di specie terricole come suini ed avicoli.



Figura 13 Rappresentazione degli insetti da poter utilizzare nell'alimentazione animale secondo i regolamenti (CE) 2017/893 ed UE 2021/1372 (<https://ipiff.org/wp-content/uploads/2022/02/Screen-Shot-2018-07-24-at-16.52.54-768x620-1.png>)

Questi insetti utilizzati per i mangimi devono rispettare determinati standard, ovvero non devono essere patogeni per l'essere umano, non devono essere specie invasive o specie in via d'estinzione, non devono causare danni a specie vegetali o animali locali e infine come già citato nel Regolamento EC 2017/893 devono essere allevati su substrati autorizzati. I più significativi aggiornamenti in materia di utilizzo di insetti come fonte alimentare sono quelli del 2021, anno nel quale l'EFSA ha approvato il

consumo della tarma della farina come alimento e la successiva approvazione dell'utilizzo della farina di grillo (*Acheta domesticus*) per il consumo umano nel mese di gennaio 2023 (**Regolamento UE 2023/5**). La graduale evoluzione normativa è il risultato del rigore di ricerche scientifiche e valutazioni ad opera degli Organismi preposti al controllo della sicurezza alimentare e orienta la popolazione verso una progressiva accettazione degli insetti quali valide fonti nutrizionali alternative e sostenibili per rispondere efficacemente alla crescente domanda di cibo della popolazione globale.

2 Obiettivi del progetto

Il presente progetto mira a valutare il potenziale applicativo della mosca soldato (BSF), *Hermetia illucens*, quale nuova biotecnologia sostenibile per la valorizzazione di scarti organici e la produzione di fonti nutrizionali alternative e molecole bioattive.

H. illucens durante il suo stadio larvale, infatti, è in grado di alimentarsi di una grande varietà di scarti organici operando un processo di bioconversione che produce biomassa larvale che rappresenta una valida fonte nutrizionale alternativa e sostenibile utilizzabile in diverse applicazioni, incluse l'alimentazione animale e la produzione di derivati e idrolizzati proteici con attività biologica, valorizzando al tempo stesso gli scarti alimentari.

Il progetto, nel suo insieme, si propone di studiare, attraverso un approccio multidisciplinare, le risposte cellulari ai diversi derivati di BSF sia *in vitro* che *in vivo*.

Gli obiettivi specifici del progetto sono di seguito riportati:

- *Valutazione del potenziale nutritivo di farine ottenute dalla biomassa larvale di BSF come fonti proteiche alternative in acquacoltura.*

Per sviluppare questo obiettivo è stato utilizzato l'organismo modello zebrafish (*Danio rerio*) che, condividendo diverse risposte fisiologiche nonché i meccanismi di sviluppo e altre caratteristiche morfologiche con molte specie ittiche di acquacoltura, può fornire informazioni utili per comprendere le risposte cellulari e molecolari alle diete a base di BSF di altre specie di interesse commerciale.

Per valutare gli effetti della sostituzione della farina e olio di pesce, principali fonti proteiche dei mangimi per acquacoltura, con le farine di larve di BSF degrassate, ricavate dai due stadi di sviluppo larvali (V stadio e prepupe) caratterizzati da peculiari proprietà nutrizionali, i pesci sono stati alimentati con queste fonti proteiche alternative in un *feeding trial* di 60 giorni, dallo stadio di larva a quello di adulto, e sono stati valutati le *performance* di crescita e lo stato di salute di zebrafish giovanili e adulti, anche attraverso lo studio della modulazione dell'espressione di geni chiave coinvolti in diversi *pathways* quali la miogenesi (*igf-1*, *igf-2*, *mstnb*, *myod1*, *myog*, *myf5*), la risposta immunitaria (*il1b*, *il6*, *tnfa*), l'idrolisi enzimatica della chitina

(*chia.2, chia.3, chia.5*), e la risposta allo stress (*hsp70 e nr3c1*). Le informazioni ricavate possono fornire preziose indicazioni per comprendere le risposte fisiologiche, cellulari e molecolari all'inclusione delle farine di BSF nella dieta di zebrafish e per la possibilità di formulare diete specie-specifiche selezionando lo stadio di sviluppo di BSF più adatto per la futura inclusione di farine di BSF nell'alimentazione di specie acquatiche di interesse commerciale.

Nell'ambito di questo obiettivo il progetto si propone, inoltre, di valutare l'influenza delle diete sperimentali sulle eventuali modificazioni epigenetiche del genoma di zebrafish, in particolare la metilazione del DNA, per meglio chiarire le risposte cellulari alle diete a base di BSF.

- *Valutazione in vitro delle proprietà biologiche di molecole estratte da BSF su modelli cellulari di stress ossidativo*

Le considerevoli proprietà nutrizionali della biomassa larvale di BSF, caratterizzata da proteine ad elevato valore che possono essere utilizzate anche nelle formulazioni di mangimi per animali e acquacoltura, è stato il prerequisito per indirizzare l'attività di ricerca verso la possibilità di produrre molecole bioattive tramite idrolisi enzimatica della frazione proteica.

Gli idrolizzati proteici di BSF (BPH) prodotti e caratterizzati sono stati valutati per indagare le potenziali proprietà biologiche dei BPH in un modello cellulare di stress ossidativo *in vitro* costituito da fibroblasti L-929 trattati con H₂O₂. Obiettivi specifici riguardano la valutazione dell'attività degli idrolizzati BPH come *scavenger* dei ROS, i meccanismi cellulari e molecolari implicati e l'eventuale partecipazione del fattore nucleare eritroide-2 (*Nrf2*), uno dei principali fattori di trascrizione che regolano la risposta cellulare allo stress ossidativo. I dati di questo studio possono far luce sul ruolo potenziale di questi idrolizzati proteici nella protezione dallo stress ossidativo cellulare e sul potenziale applicativo di queste nuove molecole naturali con attività biologica come nutraceutici e ingredienti promotori del benessere animale e della salute nei settori del *feed* e *food*.

- *Valutazione della sicurezza nell'utilizzo del food waste per la produzione di biomassa larvale destinata all'alimentazione animale*

H. illucens possiede enormi potenzialità come nuova biotecnologia per risolvere contemporaneamente due sfide globali, la gestione degli scarti e la produzione di fonti proteiche alternative e sostenibili; tuttavia, l'utilizzo delle larve di BSF nel settore mangimistico non può prescindere dalla valutazione della sicurezza microbiologica delle larve allevate su substrati di crescita catalogati come scarti alimentari e, come tali, soggetti alla proliferazione di microorganismi di varia natura come batteri, lieviti e muffe che trovano un ambiente idoneo per la loro crescita per la presenza di acqua e nutrienti.

Questo specifico obiettivo del progetto mira alla valutazione della sicurezza microbiologica dell'utilizzo di scarti alimentari come substrato organico per la crescita delle larve di BSF destinate all'alimentazione animale. La presenza di microorganismi e la caratterizzazione del profilo microbiologico nei substrati di crescita e nelle larve può fornire informazioni utili sulla eventuale contaminazione microbiologica dovuta a batteri, muffe e lieviti della biomassa larvale e suggerire la necessità di trattamenti post-raccolta finalizzati all'abbattimento della carica microbica per garantire la sicurezza microbiologica dell'utilizzo delle larve di BSF per le possibili applicazioni nei molteplici settori industriali, incluso l'alimentazione animale e il nutraceutico.

Nel complesso, tale attività di ricerca focalizzata sul considerevole potenziale applicativo di *H. illucens*, può fornire preziose informazioni sulla possibilità di i) impiegare le farine di BSF come valida alternativa alle costose e poco sostenibili farine di pesce, attualmente utilizzate come principale fonte proteica in acquacoltura, anche per la formulazione di diete specie-specifiche; ii) produrre idrolizzati proteici di BSF contenenti molecole con attività biologica e proprietà citoprotettive come nuovi ingredienti promotori della salute e iii) ottenere nuove fonti nutrizionali e nutraceutiche che rispettano i criteri di sicurezza microbiologica attraverso un processo di bioconversione e valorizzazione degli scarti alimentari ad opera delle larve di BSF, un insetto che rappresenta una biotecnologia innovativa e sostenibile per produrre nuove fonti nutrizionali e migliorare la gestione degli scarti alimentari.

Questo progetto di ricerca rappresenta una soluzione promettente per le sfide globali evidenziate dagli Obiettivi per lo Sviluppo Sostenibile - *Sustainable Development*

*Goals, SDGs – dell'Agenda 2030, attraverso un approccio di economia circolare sostenibile basato sull'utilizzo di *H. illucens*.*

3 Capitolo 1

Hermetia illucens come fonte nutrizionale alternativa.

Valutazioni delle risposte cellulari in vivo sull'organismo modello zebrafish

3.1 Background

La crescita della produzione in acquacoltura richiesta per soddisfare le esigenze nutrizionali di una popolazione mondiale in aumento richiede l'urgente necessità di trovare fonti proteiche alternative ed *environmental-friendly* in sostituzione alle tradizionali costose e non più sostenibili farine e oli di pesce.

Il presente studio è mirato alla valutazione delle potenzialità delle farine di *Hermetia illucens* (BSF), ottenute da due stadi larvali caratterizzati da peculiari profili nutrizionali (BSF V stadio e prepupe), come sostituti delle farine di pesce nella formulazione di *aquafeed*. Gli effetti dell'inclusione delle farine a base di BSF nella dieta dell'organismo modello zebrafish (*Danio rerio*) sono stati investigati valutandone le performance di crescita e lo stato di salute e il benessere, anche attraverso l'analisi quantitativa dell'espressione di geni coinvolti in specifici *pathways*, quali la miogenesi, l'idrolisi della chitina, la risposta immunitaria e allo stress.

I risultati potranno fornire preziose indicazioni sul potenziale applicativo di BSF come sostituto degli ingredienti tradizionali utilizzati per la formulazione dei mangimi e guidare la transizione dell'acquacoltura verso ingredienti innovativi e sostenibili in un contesto di economia circolare.

L'attività di ricerca svolta nell'ambito di questa tematica ha contribuito alla pubblicazione di un articolo su rivista con IF del quale si riportano parzialmente informazioni, figure e tabelle (Figura 14) (Lanes et al., 2021 <https://doi.org/10.3390/ani11030720>).

Article

Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) Larvae and Prepupae Defatted Meals in Diets for Zebrafish (*Danio rerio*)

Carlos F. C. Lanes ¹, Fabio A. Pedron ¹, Giovanni T. Bergamin ¹, Andressa L. Bitencourt ¹, Brenda E. R. Dorneles ¹, Jessica C. V. Villanova ¹, Kimberly C. Dias ¹, Kristian Riolo ², Sabrina Oliva ², Domenico Savastano ³ and Alessia Giannetto ^{2,*}

Figura 14 Lanes et al., 2021

3.2 Materiali e Metodi

3.2.1 Allevamento degli insetti

Le larve di *Hermetia illucens* sono state allevate e raccolte presso l'allevamento *Progetto Hermetia* (www.progettohermetia.it) che collabora con il Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, farmaceutiche ed Ambientali dell'Università degli Studi di Messina. Dopo la schiusa delle uova, le larve sono state alimentate con una matrice contenente un mix di farina (35%) e acqua (65%) per i primi 5 giorni. Successivamente, sono state poste in differenti vasche e allevate su un substrato costituito da una miscela di scarti vegetali e frutta (40% pere, 45% banane, 5 % pomodori, 10% verdure a foglia verde, % p/p sul peso fresco), opportunamente preparato e sottoposto a macinatura, fino al raggiungimento del V stadio e dello stadio di prepupe (Figura 15). Il riconoscimento degli stadi larvali è stato effettuato seguendo i criteri stabiliti da Kim et al. (2010) e da Tomberlin et al. (2009). Le larve al V stadio e le prepupe sono state quindi raccolte, poste a 4°C per consentire il raggiungimento della quiescenza ed essiccate a 55 °C fino all'ottenimento di un peso costante utilizzando un forno ventilato (TE-394/2-MP, Tecnal, Piracicaba/SP, Brasile). La composizione biochimica di entrambi gli stadi larvali è riportata in Tabella 2.

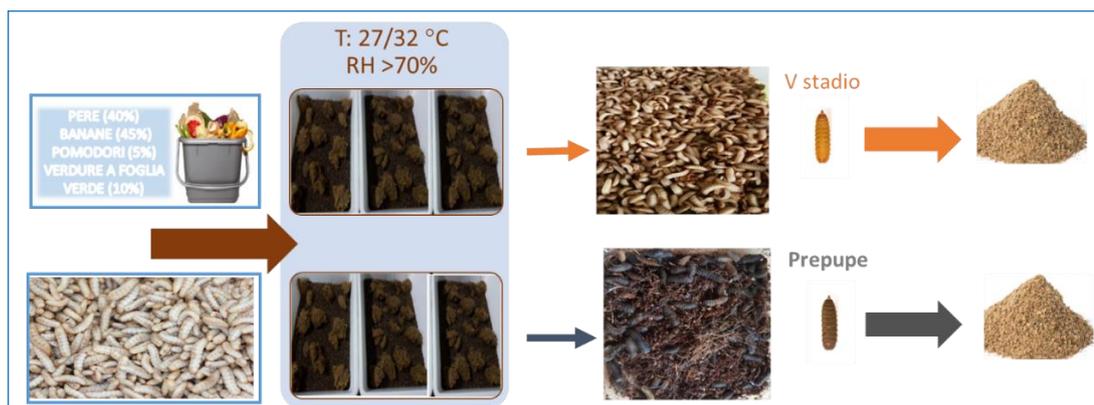


Figura 15 Rappresentazione dell'allevamento delle larve fino alla produzione della farina d'insetto.

3.2.2 Formulazione delle diete sperimentali

Per la formulazione delle diete sperimentali le larve V stadio e le prepupe sono state prima essiccate, poi omogenizzate ed infine degrassate utilizzando come solvente l'esano con un rapporto 4:1 (4 L di reagente per 1 kg di materiale). Dopo 30 minuti, l'esano è stato rimosso ed il materiale è stato essiccato per 24 ore a temperatura ambiente (~ 20 °C). Successivamente, le farine di *H. illucens* così ottenute sono state miscelate ad altri ingredienti necessari per la formulazione dei mangimi, macinate e setacciate utilizzando un setaccio a maglie da 150 μm . Le diete sono state formulate per essere isoproteiche e isolipidiche, secondo il fabbisogno nutrizionale di zebrafish. La dieta di controllo (Ctr) conteneva farina di pesce come principale fonte proteica. Nelle due diete sperimentali, la farina di pesce è stata sostituita con il 100% di farina degrassata di larve al V stadio (V instar) oppure con il 100% farina sgrassata di prepupe (Prepupe). Per preparare i mangimi sperimentali tutti gli ingredienti macinati (<150 μm) e gli oli necessari sono stati accuratamente miscelati manualmente. Per la pellettizzazione è stata aggiunta dell'acqua in modo da ottenere la consistenza desiderata. Infine, i mangimi sono stati pressati attraverso l'utilizzo di un tritacarne (PBM10I, Beccaro, Rio Claro/SP, Brasile) con un diametro di 3,5 mm, essiccati a 50°C per 24 h in stufa ventilata (TE-394/2-MP, Tecnal, Piracicaba/SP, Brasile) e successivamente conservati a 4°C. La composizione dei mangimi è presentata in tabella 5.

Ingredienti	Controllo	Larve V Stadio	Prepupe
Farina di pesce	500	0	0
Farina sgrassata di larve (V stadio)	0	500	0
Farina sgrassata di prepupe	0	0	500
Concentrato di proteine di soia	250	148.8	200
Farina di soia	140	241.2	190
Olio di canola	40	40	40
Farina di riso sgrassato	30	30	30
Vitamine/MineraliPremix	30	30	30
Sale	10	10	10
Proximate composition (%)			
Proteina grezza	46.43	45.39	46.92
Lipidi grezzi	9.40	9.70	9.13
Ceneri	22.19	9.16	9.01
NFE ¹	13.86	24.11	18.50
Fibra detergente acida	8.12	11.64	13.60
Chitina	0	6.31	7.22
Sostanza secca	94.53	92.69	93.30
Energia (MJ Kg ⁻¹) ²	17.09	18.74	18.57
Proteine/Energia (g/MJ)	27.17	24.22	25.27

Tabella 5 Formulazione (g Kg⁻¹) e composizione biochimica* delle diete sperimentali *Valori analizzati; ¹ estratto senza azoto = 100 - (% proteine grezze + % grassi grezzi + % fibre grezze + % umidità + % ceneri); ² Energia (MJ Kg⁻¹) = 0.0236 Proteina grezza + 0.0393 Lipidi grezzi + 0.0174 Estratto privo di azoto. (Lanes et al., 2021)

La sostanza secca, le ceneri e il contenuto proteico sono stati determinati in accordo con l'AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*). Il contenuto totale di grassi è stato determinato gravimetricamente seguendo il metodo di Bligh e Dyer (1959), mentre la fibra detergente acida (ADF) è stata determinata con il metodo di Van Soest et al. (1991). Il contenuto di chitina è stato stimato calcolando le fibre detergenti acide (ADF) e sottraendo a questo valore gli amminoacidi (in peso) contenuti nel residuo

ADF (%), come descritto da Finke (2013). Tutte le analisi chimiche sono state effettuate in triplicato.

3.2.3 Alimentazione dei pesci con le diete sperimentali

Gli esemplari di zebrafish utilizzati in questo esperimento sono stati ottenuti dalle uova prodotte dai riproduttori allevati presso il “Laboratorio di Pesci Ornamentali dell'Università Federale di Pampa-Campus Uruguaiana” (Brasile) nelle condizioni descritte da Westerfield et al. (1995). Trascorsi 30 giorni dopo la schiusa (*dph*, *day post hatching*), le larve, con un peso di $5.0 \text{ mg} \pm 0.5$ (media \pm errore standard) e una lunghezza di $9.2 \text{ mm} \pm 0.3$ (media \pm errore standard) sono state distribuite in modo casuale in dodici vasche da 4 L (25 larve per vasca) utilizzando 4 vasche di replica per ciascun trattamento (Controllo, V stadio e prepupe) fornite di un sistema di ricircolo dell'acqua. I parametri fisici e chimici come la temperatura dell'acqua e l'ossigeno disciolto sono stati monitorati quotidianamente, mentre altri parametri di qualità dell'acqua sono stati monitorati settimanalmente. La temperatura delle vasche è stata mantenuta a $27 \text{ }^\circ\text{C} (\pm 0.3 \text{ }^\circ\text{C})$, il pH = $8.1 (\pm 0.1)$, l'ossigeno disciolto è stato mantenuto intorno ai $6.4 \text{ mg/L} (\pm 0.12 \text{ mg/L})$ e infine il fotoperiodo è stato modulato in modo da avere un'alternanza di 12 ore di luce con 12 ore di buio ogni giorno. Il piano sperimentale di alimentazione è mostrato in figura 16.

Durante la fase di alimentazione con le diete sperimentali gli organismi sono stati alimentati *ad libitum* tre volte al giorno (8:00, 12:00 e 17:00) per 60 giorni. Le vasche sono state sifonate una volta al giorno allo stesso orario e l'acqua reintegrata. Nei primi 15 giorni della fase di alimentazione, i pesci sono stati nutriti con un mangime le cui particelle avevano dimensioni inferiori ai $150 \text{ }\mu\text{m}$. Dal 16° al 35° giorno i pesci sono stati alimentati con un mangime con particelle di dimensioni più grandi comprese tra 150 e $250 \text{ }\mu\text{m}$. Infine, nella fase finale i pesci sono stati alimentati con un mangime con particelle di dimensioni comprese tra i 300 - $400 \text{ }\mu\text{m}$.

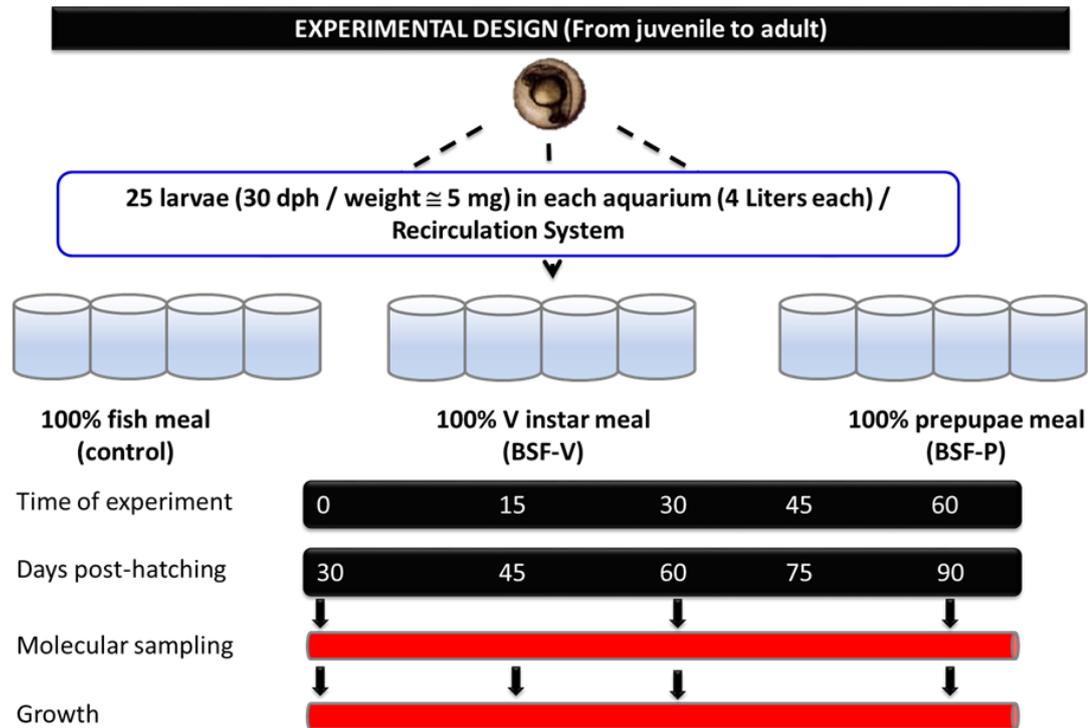


Figura 16 Rappresentazione della fase di alimentazione dei pesci con tempi di durata e campionamenti effettuati.

3.2.4 Analisi dei parametri di crescita

Durante i 60 giorni di alimentazione sono state effettuate le analisi per valutare le performance di crescita di zebrafish sottoposti alle tre diete sperimentali. Sono stati registrati i tassi di mortalità al netto degli individui sacrificati per i campionamenti e ogni 15 giorni è stata misurata la biomassa totale anestetizzando gli organismi con eugenolo (60 mg/L) (Grush et al., 2004).

Alla fine dell'esperimento, gli animali sono stati anestetizzati individualmente, pesati e fotografati per valutare altri parametri di crescita come la lunghezza totale, la lunghezza standard e l'altezza utilizzando il software IMAGE J (US National Institute of Health, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

I parametri di crescita sono stati calcolati sui singoli individui utilizzando le seguenti equazioni:

- **Weight gain** (WG) = peso finale (Wf) – peso iniziale (Wi).

- **Daily growth rate** (DGR) = $(W_f - W_i) / T$, dove T rappresenta il tempo in giorni.
- **Specific growth rate** (SGR) = $(\ln W_f - \ln W_i) / T \times 100$.
- **Condition factor index** (K) = $(W \times L^{-3}) \times 103$ dove W è la massa (in milligrammi) e L la lunghezza standard (in millimetri).

3.2.5 Analisi delle risposte cellulari alle diete

Estrazione dell'RNA e sintesi del cDNA

I campionamenti per le analisi molecolari sono stati effettuati nei tempi 30, 60 e 90 dph. Il primo campionamento è stato effettuato all'inizio della fase di alimentazione (30 dph) e ha previsto il prelievo di pool di 10 larve per ciascuna vasca (8 campioni per trattamento). Il secondo campionamento è stato effettuato dopo 30 giorni (60 dph) e ha previsto il prelievo di 2 giovanili per vasca (8 campioni per trattamento) ed infine l'ultimo campionamento è stato effettuato alla fine dei 60 giorni (90 dph) sacrificando 3 esemplari adulti per ogni vasca (12 campioni per trattamento). Dagli esemplari adulti, a differenza delle larve e dei giovanili sono stati prelevati tessuti come fegato (per valutare l'espressione dei geni correlati alla risposta immunitaria e allo stress), muscolo (per valutare l'espressione dei geni implicati nella crescita muscolare) e intestino (per valutare l'espressione dei geni coinvolti nell'idrolisi della chitina). Tutti i campioni sono stati conservati in RNAlater (Sigma-Aldrich Milano, Italia).

L'RNA totale è stato estratto dai campioni utilizzando il reagente di lisi QIAzol (Qiagen, Milano, Italia). La quantità, la purezza e l'integrità dell'RNA sono state verificate mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1.0% e misure di assorbanza UV a 260 e 280 nm mediante spettrofotometro Nano Drop (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Wilmington, MA). Per eliminare la presenza di eventuale DNA genomico contaminante, l'RNA estratto è stato trattato con DNasi RNasi-free (Qiagen, Milano, Italia). Il cDNA è stato sintetizzato a partire da un microgrammo di RNA totale mediante il kit di trascrizione inversa QuantiTect (Qiagen).

Real time PCR

È stata valutata l'espressione quantitativa, mediante qPCR, di geni coinvolti nei seguenti *pathways* metabolici:

- **Miogenesi:** *Insulin like growth factor-1 (igf-1)* e *2 (igf-2)*, *myostatin b (mstnb)*, *myogenic differentiation 1 (myod1)*, *myogenin (myog)* e *myogenic factor 5 (myf5)*
- **Risposta immunitaria:** *interleukin 1 beta (il1b)*, *interleukin 6 (il6)*, *tumor necrosis factor α (tnfa)*,
- **Risposta allo stress:** *heat-shockprotein-70 (hsp70)*, *glucocorticoid receptor (nr3c1)*
- **Idrolisi enzimatica della chitina:** *chitinase 2, 3 e 5 (chia.2, chia.3, chia.5)*

I primers utilizzati per l'amplificazione di ciascun gene sono riportati in Tabella 6

Nome del gene	Forward (5'- 3') Reverse (5'- 3')	Size (bp)	E (%)	GenBank	Reference
<i>igf-1</i>	GGCAAATCTCCACGATCTCTAC CGGTTTCTCTTGCTCTCTCAG	198	105	ENSDART0000004717.8	Zarantoniello et al., 2019
<i>igf-2</i>	CGTGTGTGGAGAAGATGGCT ACATCTCGCTCCGACTTCAC	156	108	ENSDART00000009642.7	This study
<i>mstnb</i>	CGGACTGGACTGCGATGAG AGATGGGTGTGGGATACTTC	174	97	ENSDART00000100386.2	Zarantoniello et al., 2019
<i>myod1</i>	AGACGAGAAGACGGAACAGC CACGATGCTGGACAGACAAT	116	99	NM_131262.2	This study
<i>myog</i>	CACATACTGGGTGTCTGCTCC GCCTCTGTTCCCGTTATGCT	199	94	ENSDART00000014062.7	This study
<i>myf5</i>	GCAGTGTGTCAGCATCG GCAAGCAGTGTGAGTAAGCGT	192	102	ENSDART00000112035.2	This study
<i>il1b</i>	AGGCTGGAGATGTGGACTTC GTGGATTGGGGTTTGATGTG	95	94	ENSDART00000185837	Zarantoniello et al. 2019
<i>il6</i>	ATGACGGCATTGGAAGGGGT TCAGGACGCTGTAGATTCCGC	115	94	ENSDART00000166112.2	This study
<i>tnfa</i>	GGAGAGTTGCCTTTACCGCT TGTTGATTGCCCTGGGTCTT	155	90	ENSDART00000025847.9	This study
<i>hsp70</i>	TCCTGACCATTGAAGACGGC GCCCTCTGTTCTGACTGATGT	151	100	ENSDART00000124762.3	This study
<i>nr3c1</i>	CTGTGTTTCGCTCCAGACCT TCTTCAACCCATCCTTCGG	184	94	ENSDART00000181179.1	This study
<i>chia2</i>	AGTGCTGCTGTATCTGCTGG CTGTGAATCGCTCCCAAGTT	127	90	ENSDART00000164702.2	This study
<i>chia3</i>	TGCCCTCAATGCCTTCAACT TCCATCTGGCTTCCCATTACA	122	101	ENSDART00000067817.6	This study
<i>chia5</i>	CACGGCTCACAGGACAACAT CATACGCAGCAAAGCCCAT	160	105	NM_001110041	This study
<i>arp</i>	CATCTCGCCCTTCTCCTACG GCAAGAGTTGGGTAGCCGAT	168	101	AF134852	This study
<i>rpl13</i>	ATCTCTGTTGACTCACGCCG GTGCGGTATTCCTTCAGCCT	80	103	ENSDART00000176368.2	This study
<i>ef1-α</i>	CCTGCCAATGTAACCACTGA TGATGACCTGAGCGTTGAAG	193	95	NM_131263	This study

Tabella 6 Sequenze di primer, dimensione del prodotto amplificato, efficienza di amplificazione (E), GenBank/Ensembl *accession number* e riferimenti relativi ai geni analizzati mediante PCR quantitativa in tempo reale (Lanes et al., 2021).

Le reazioni di qPCR sono state effettuate utilizzando chimica SYBER Green (Qiagen) nel termociclatore Rotor Gene Q 2plex Hrm (Qiagen). I campioni di cDNA sono stati opportunamente diluiti con un rapporto di 1:20. Per ogni reazione sono state utilizzate sei repliche biologiche (in duplicato) per gruppo sperimentale e per tempo di trattamento insieme a due controlli negativi (*no template* e *-RT control*). L'efficienza di amplificazione è stata determinata eseguendo per ciascun gene una curva standard costruita con diluizioni seriali di pool di RNA (da 1:1 a 1:32) come descritto da Giannetto et al. (2013). L'espressione dei geni target è stata normalizzata sui valori di espressione del gene referente più stabile tra quelli testati [fosfoproteina ribosomiale acida (*arp*), proteina ribosomiale L13 (*rpl13*) e fattore di allungamento 1 α (*efl- α*)]. Il fattore di normalizzazione è stato calcolato tramite il software GeNorm (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>) come descritto da Nagasawa et al. (2012). La specificità di ciascuna reazione è stata valutata mediante l'analisi della curva di melting che ha mostrato un singolo picco in ciascuna corsa.

Analisi statistiche

I dati dei parametri di crescita sono stati sottoposti all'analisi della varianza one-way (ANOVA) e test di Tukey per la comparazione post-hoc. I dati sono stati espressi come media \pm S.E.

Le differenze nei livelli di trascrizione dei geni target tra i gruppi sperimentali di pesci alimentati con le tre diete (Ctr, V instar e Prepupe) sono state valutate mediante analisi della varianza seguita da test post-hoc di Student-Newman-Keuls. La normalità e l'omogeneità della varianza sono state preventivamente verificate ed è stato adottato un livello di significatività del 5% in ogni caso. I dati sono stati espressi come media \pm S.D. Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

3.2.6 Valutazione dell'influenza delle diete sperimentali sulle variazioni epigenetiche di zebrafish

È ormai noto che le modificazioni epigenetiche, come la metilazione del DNA, possono essere regolate da diversi fattori incluso la nutrizione. Per tale motivo uno degli obiettivi di questo progetto di dottorato è stata la valutazione del grado di metilazione del DNA negli esemplari di zebrafish sottoposti alle diete sperimentali a

base di *H. illucens*. Uno dei metodi utilizzati per l'analisi di metilazione del DNA è il sequenziamento dell'intero genoma con bisolfito (WGBS), che fornisce l'analisi della metilazione del DNA con risoluzione a singolo nucleotide sull'intero genoma. Tuttavia, poiché il tempo e i costi richiesti per il sequenziamento e per le analisi bioinformatiche dell'intero genoma sono parecchio elevati, molti ricercatori stanno adottando un metodo chiamato *Reduced Representation Bisulphite Sequencing (RRBS)*. Il principio di questa tecnologia è basato sull'analisi delle sole regioni del genoma contenenti dinucleotidi CpG, che sono i siti primari della metilazione del DNA, piuttosto che sull'intero genoma, riducendo di gran lunga la mole di dati da analizzare e conseguentemente i costi. Questa parte del progetto è stata sviluppata presso la Nord University di Bodo (Norvegia) dove ho svolto un periodo di formazione di sei mesi.

Reduced Representation Bisulphite Sequencing (RRBS)

Negli esemplari adulti (90 dph) sono stati prelevati i tessuti nei gruppi controllo, V stadio e prepupe dopo 60 giorni di trattamento con le diete, conservati in RNA Later e spediti presso la Nord University di Bodo (Norvegia) per le successive analisi. Il DNA totale è stato estratto dagli intestini degli esemplari adulti di zebrafish utilizzando il DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN). La qualità, quantità e purezza del DNA sono state valutate attraverso il fluorimetro qubit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e l'Agilent TapeStation 2200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Le librerie sono state preparate con il kit Zymo-Seq RRBS Library Kit (ZYMO RESEARCH) e verificate per qualità e quantità attraverso l'utilizzo della TapeStation. Sono state eseguite due corse di sequenziamento per due pool contenenti 10 librerie, ognuna con uguale rappresentazione della dieta controllo con farina di pesce e delle due diete a base di BSF V stadio e prepupe, su una piattaforma Illumina NextSeq (San Diego, CA, USA), utilizzando un single-end 75 bp high-throughput sequencing kit con il 4% di DNA di controllo Phix (Illumina) come controllo interno. I dati di sequenza verranno depositati nel database SRA (*Sequence Read Archive*) di NCBI.

3.3 Risultati

3.3.1 Effetti delle diete sulle performance di crescita

Gli esemplari di zebrafish alimentati con le diete sperimentali contenenti farine di BSF, non hanno mostrato nel corso dell'esperimento non hanno mostrato differenze significative nel consumo dei mangimi né nei tassi di mortalità rispetto alla dieta controllo. Durante i primi 30 giorni dell'esperimento, non sono state riscontrate differenze significative nel peso tra gli esemplari dei tre gruppi sperimentali ($p > 0.05$); tuttavia, alla fine dell'esperimento, sono state registrate differenze significative per tutti i parametri di crescita. I pesci alimentati con il mangime a base di prepupe presentavano parametri come *final body weight*, *weight gain* (Figura 17A, 17B), *final total length*, *final standard length*, *height* (Figura 18A), *daily growth rate* e *specific growth rate* (Figura 18B) significativamente più elevati rispetto ai pesci alimentati col mangime controllo. Invece, non sono state osservate differenze significative tra i pesci alimentati con larve V stadio e quelli alimentati con prepupe. Per tutti questi parametri non sono state osservate differenze significative nemmeno tra i pesci alimentati con la dieta controllo e i pesci alimentati con la dieta a base di larve di V stadio. Per quanto riguarda il *condition factor index*, i pesci del gruppo controllo hanno mostrato un valore più elevato rispetto al gruppo V stadio, ma non sono state osservate differenze tra il gruppo di controllo e quello delle prepupe (Figura 18B).

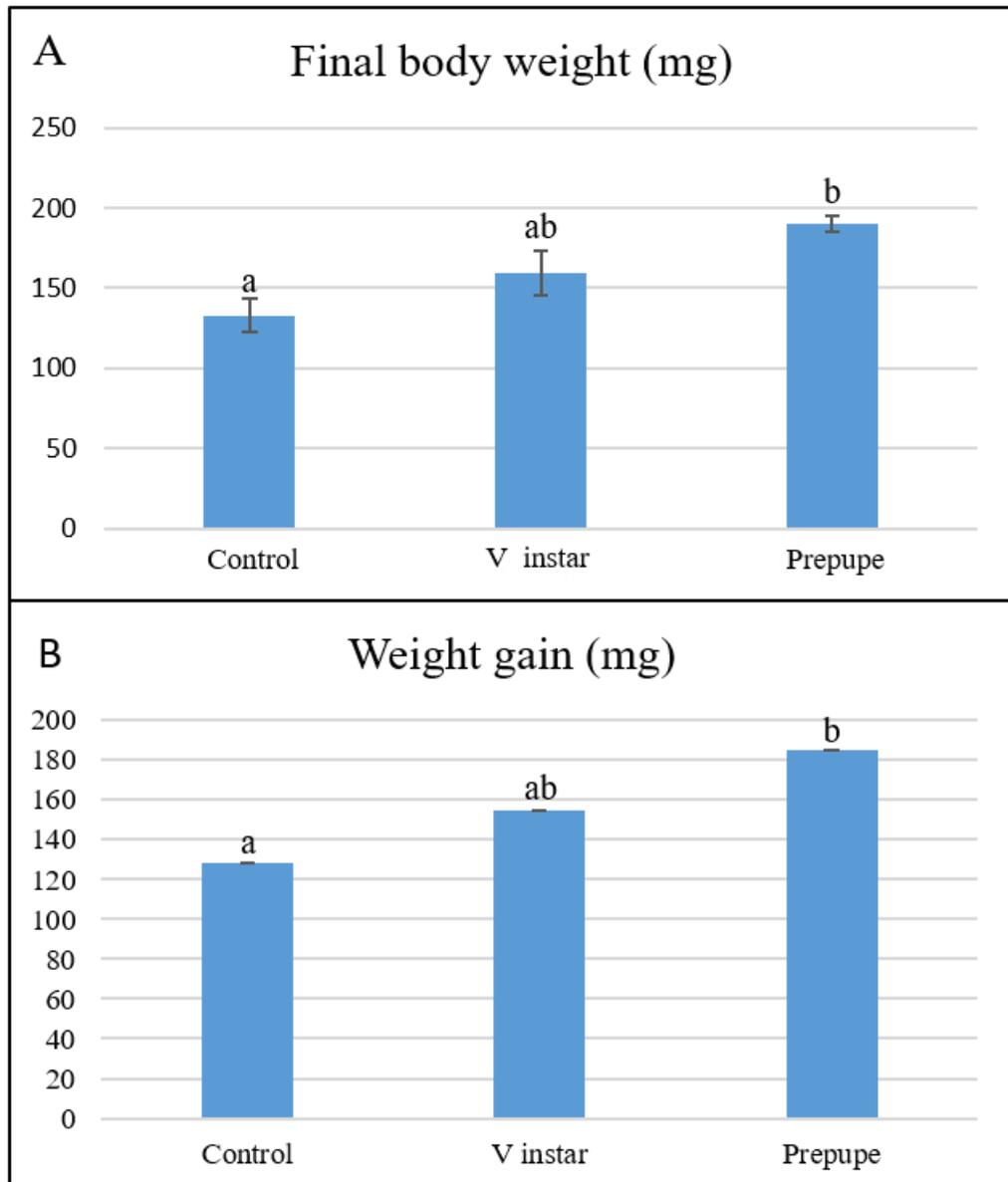


Figura 17 Valori di *final body weight* (A) e *weight gain* (B). I dati sono espressi come media \pm S.E. Lettere diverse indicano differenze significative tra i trattamenti ($p < 0.05$; ANOVA) (Lanes et al., 2021).

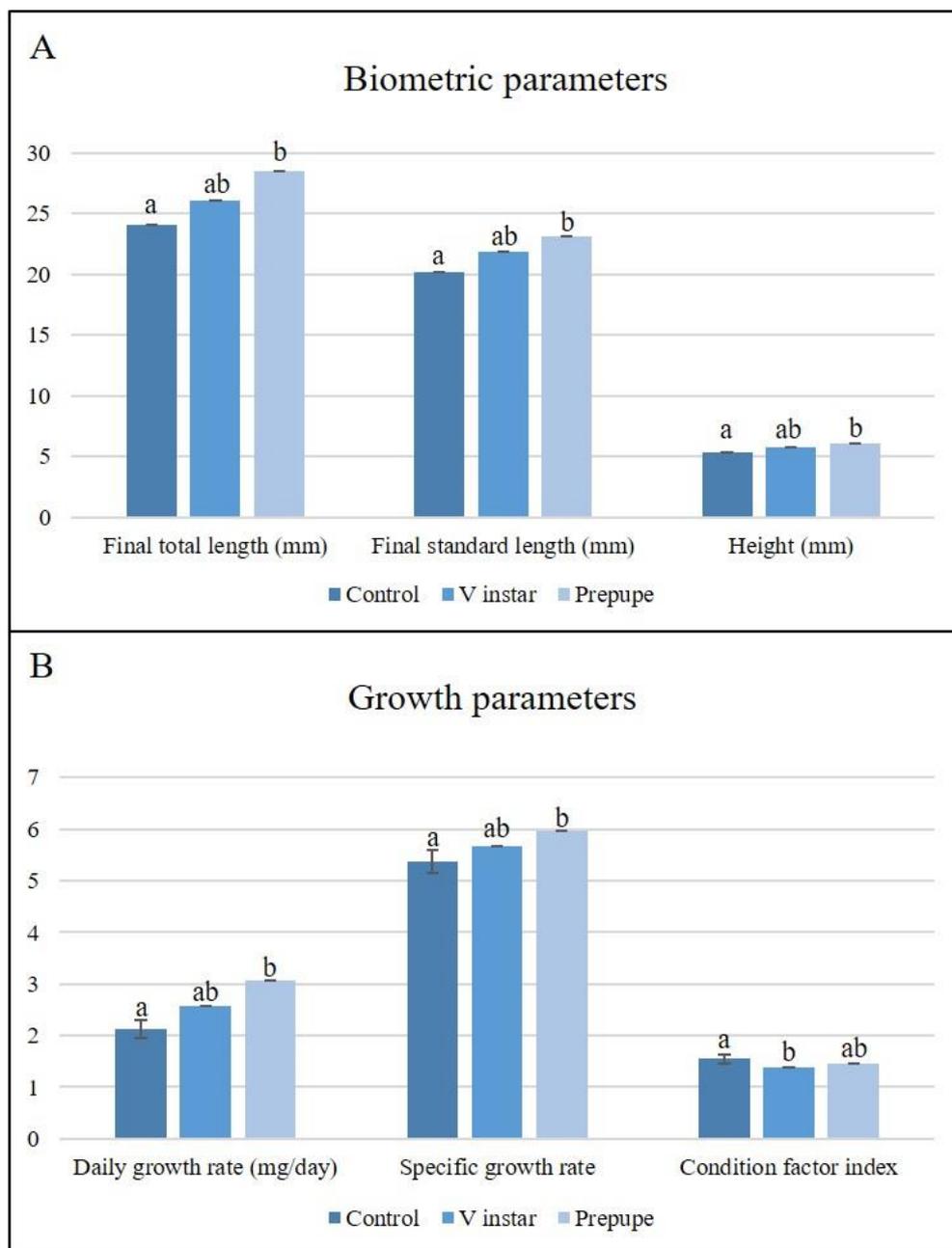
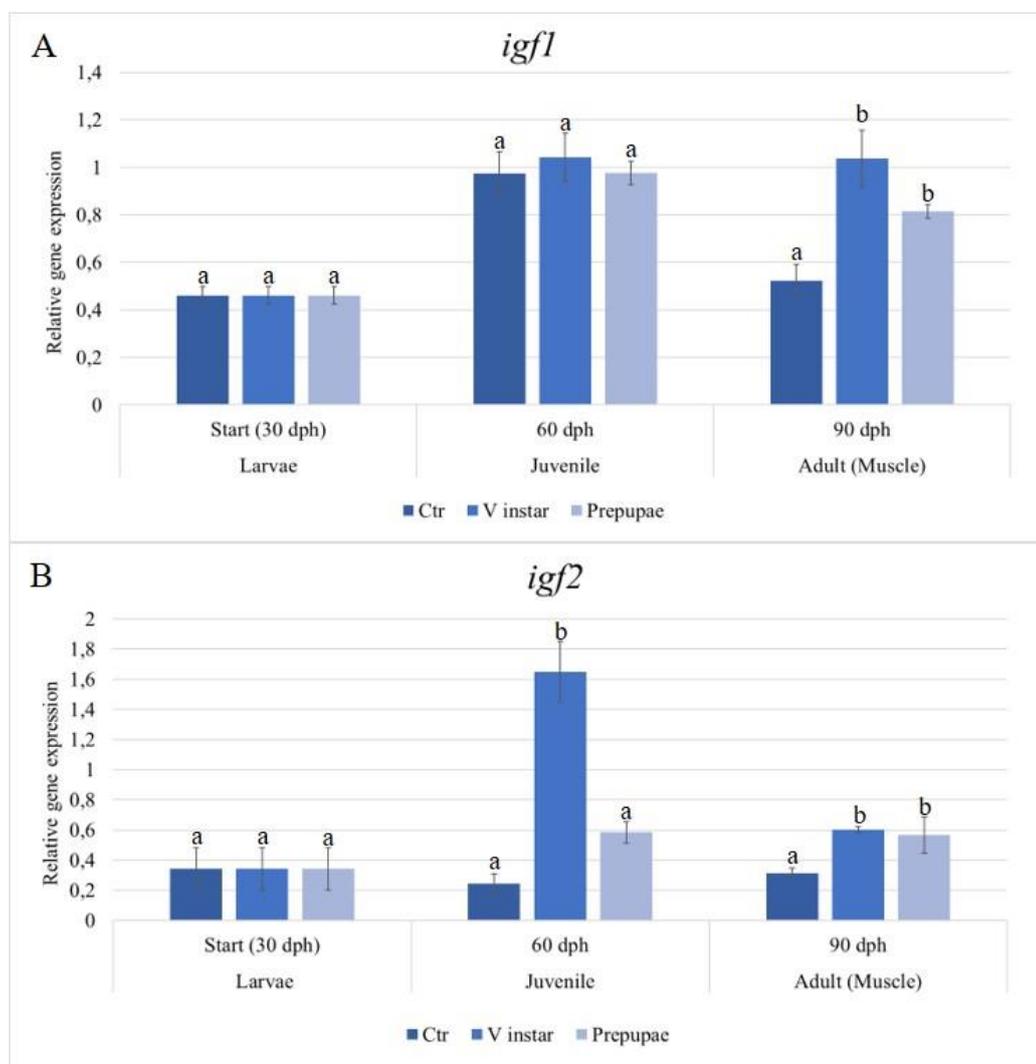


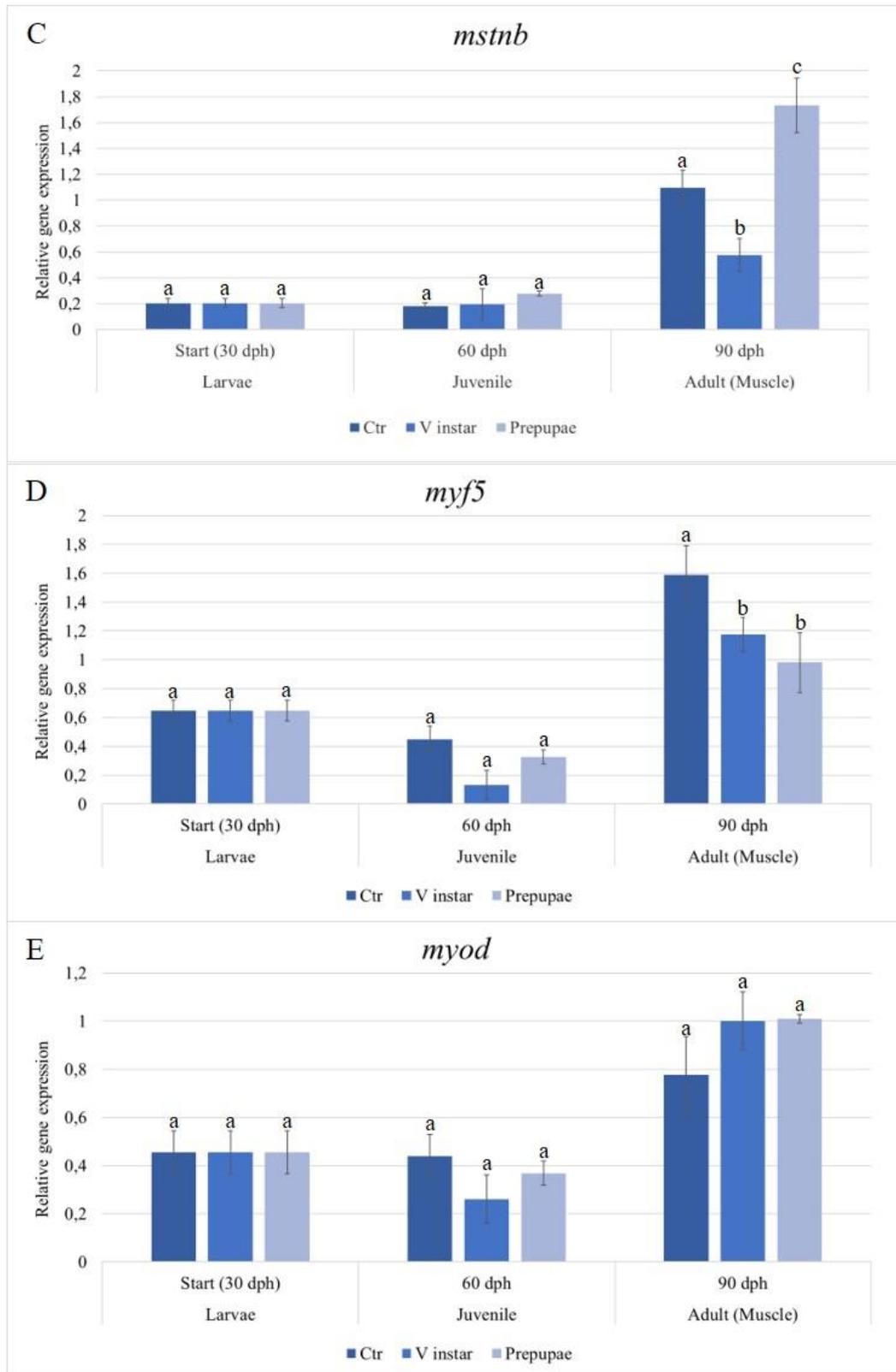
Figura 18 Valori dei parametri biometrici, *final total length*, *final standard length*, *height* (**A**) e dei parametri di *daily growth rate*, *specific growth rate* e *condition factor index* (**B**). I dati sono espressi come media \pm S.E. Lettere diverse indicano differenze significative tra i trattamenti ($p < 0.05$; ANOVA) (Lanes et al., 2021).

3.3.2 Effetti delle diete sulla modulazione dei pathways correlati alla crescita e al benessere

Miogenesi

L'analisi quantitativa dell'espressione genica ha mostrato che i livelli di trascrizione dei geni coinvolti nella crescita muscolare sono stati modulati in maniera peculiare dalle due diete a base di farina di BSF. I principali effetti dell'inclusione di BSF sull'espressione genica erano evidenti negli adulti (90 dph) e in misura minore nei *juveniles* (60 dph) (Figura 19).





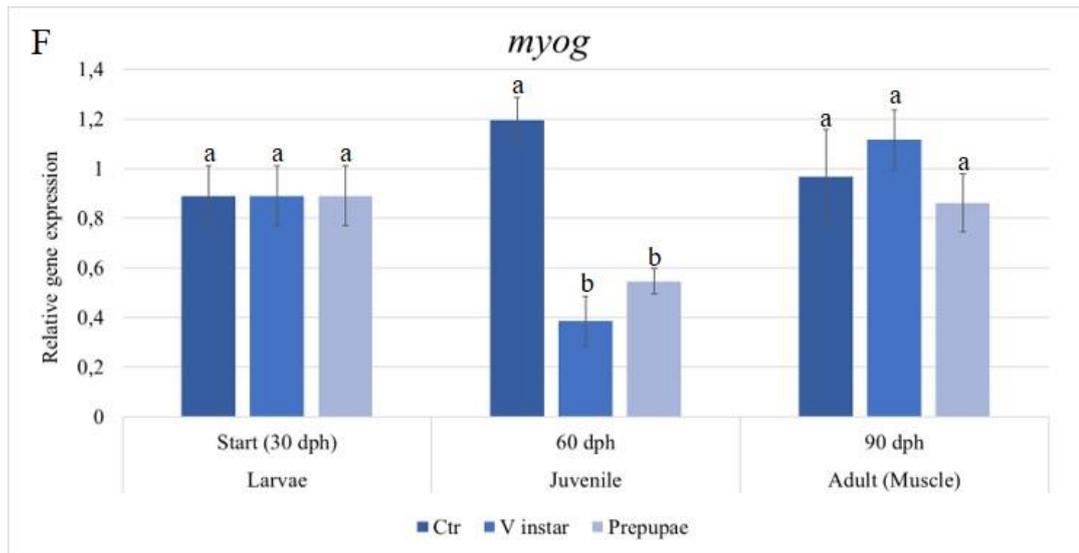


Figura 19 Profili di espressione dei geni coinvolti nella crescita: (A) *igf1*, (B) *igf2*, (C) *mstnb*, (D) *myf5*, (E) *myod* e (F) *myog*. I livelli di mRNA sono stati valutati in larve (30 dph), giovani (60 dph) e adulti (90 dph) di zebrafish alimentati con mangimi contenenti farina d'insetto V stadio e prepupe rispetto ai controlli alimentati con mangimi contenenti farina di pesce come principale fonte proteica. I dati sono espressi come media \pm S.D. (n = 6). Lettere diverse indicano differenze significative nei livelli di trascrizione tra gruppi sperimentali all'interno dello stesso tempo di campionamento (p < 0.05) (Lanes et al., 2021).

Sebbene l'espressione del gene *igf1* non abbia mostrato differenze significative tra i tre gruppi sperimentali a 60 dph (giovani), le diverse diete a base di BSF hanno influenzato significativamente l'espressione di *igf1* a 90 dph (adulti) con entrambi i gruppi V stadio e prepupe che mostrano livelli di mRNA significativamente più alti (2 e 1.6 volte, rispettivamente) rispetto al gruppo di controllo (p < 0.001; Figura 19A).

Gli esemplari di zebrafish che sono stati alimentati con la dieta a base di farina di larve V stadio hanno mostrato un'espressione del gene *igf2* significativamente più alta nei giovani (60 dph) rispetto al gruppo controllo (5.3 volte; p < 0.05). A 90 dph, entrambi i gruppi sperimentali, V stadio e prepupe, hanno mostrato un'espressione del gene *igf2* significativamente più alta (circa 2 volte per entrambi i gruppi di trattamento) rispetto al gruppo controllo (p < 0.05; Figura 19B).

I livelli di trascrizione di *mstnb* non hanno mostrato differenze significative in entrambi i gruppi sperimentali (V stadio e prepupe) rispetto al gruppo controllo a 60 dph (Figura 19C). Al contrario, negli adulti, i livelli di espressione del gene *mstnb* erano significativamente più bassi (1.8 volte) nel gruppo V stadio (p < 0.05) e

significativamente più alti (1.5 volte) nel gruppo prepupae ($p < 0.05$) rispetto al controllo. Questo trend dell'espressione del gene *mstnb* osservato negli adulti ci indica come le diverse diete a base di BSF potrebbero anche modulare i livelli di trascrizione di questo fattore di crescita (Figura 19C). L'espressione genica di *myf5* a 60 dph non ha mostrato differenze significative in entrambi i gruppi sperimentali rispetto al controllo, mentre entrambi i gruppi V instar e prepupae hanno mostrato una significativa diminuzione dell'espressione genica *myf5* rispetto al gruppo controllo a 90 dph ($p < 0.05$), con livelli inferiori di 1.3 volte nel gruppo V stadio e 1.6 volte nel gruppo prepupae rispetto agli esemplari alimentati con dieta controllo (Figura 19D).

L'espressione del gene *myod* non ha mostrato differenze significative tra i tre gruppi sperimentali in tutti i tempi di campionamento poiché i livelli di trascrizione in entrambi i gruppi sperimentali erano paragonabili al controllo sia nei giovani che negli adulti di zebrafish (Figura 19E). Infine, sebbene l'espressione del gene *myog* negli adulti (90 dph) non ha mostrato differenze significative tra i gruppi sperimentali rispetto al gruppo di controllo (Figura 19F), i suoi livelli di trascrizione a 60 dph erano significativamente più bassi in entrambi i gruppi sperimentali (3 volte nel gruppo V stadio e 2.2 volte nel gruppo prepupae) rispetto al controllo ($p < 0.05$). Risposta immunitaria

Risposta immunitaria

L'analisi di espressione dei geni coinvolti nella risposta immunitaria quali *il1b*, *il6* e *tnfa* ha mostrato che entrambi i geni *il1b* e *il6* a 60 dph (nei giovani) erano up-regolati in entrambi i gruppi alimentati con farine a base di BSF rispetto al trattamento controllo, mentre negli adulti i loro livelli di trascrizione non mostravano alcuna differenza significativa tra i tre gruppi sperimentali (Figura 20A, 20B). L'espressione del gene *tnfa* è stata influenzata dalle diverse diete BSF esclusivamente nei pesci adulti alimentati con larve V stadio con valori 4 volte superiori rispetto al controllo (Figura 20C). La dieta a base di prepupae non ha influenzato l'espressione del gene *tnfa* né nei giovani, né negli adulti.

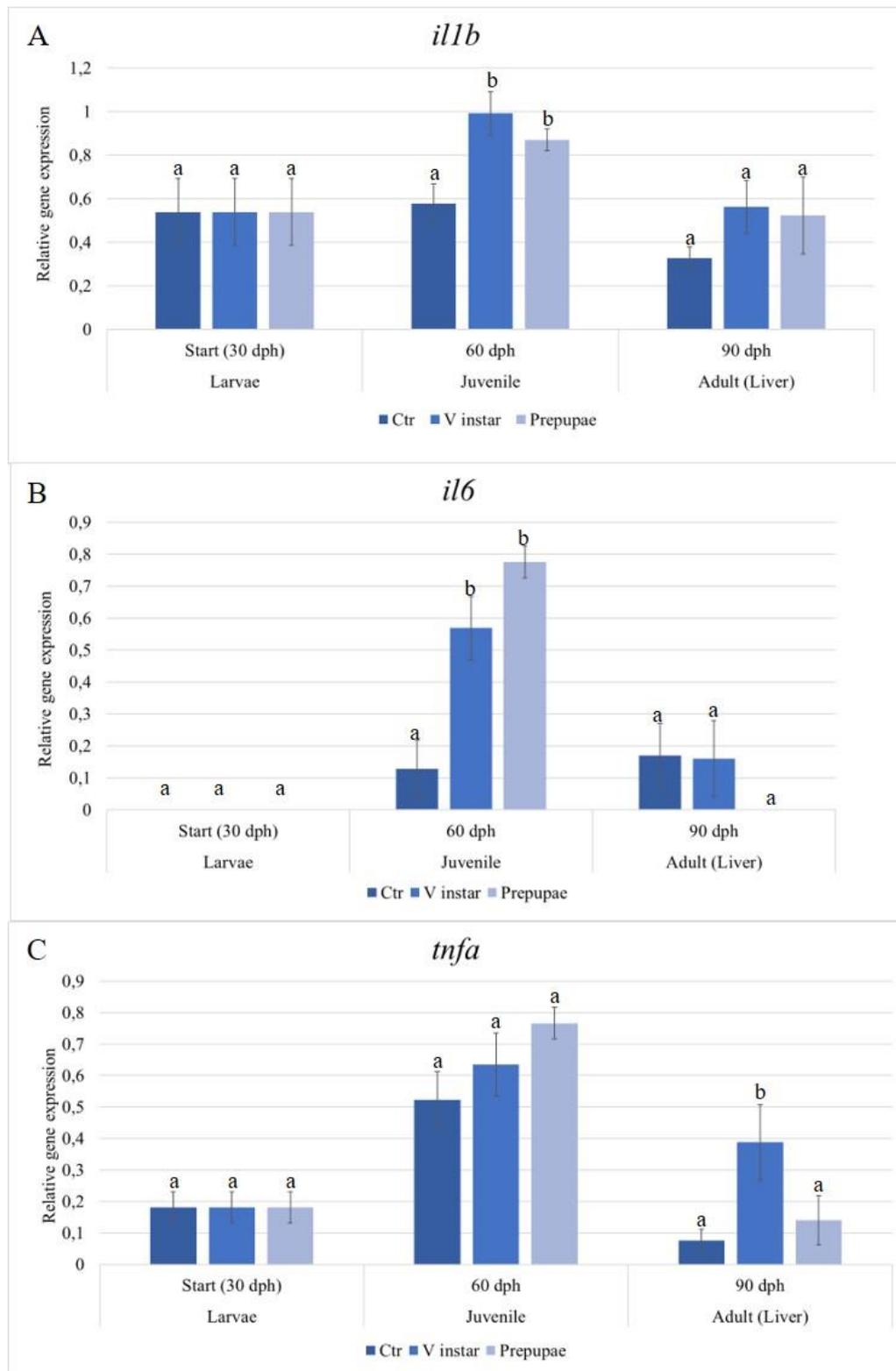


Figura 20 Profili di espressione dei geni coinvolti nella risposta immunitaria (A) *il1b*, (B) *il6* e (C) *tnfa*. I livelli di mRNA sono stati valutati in larve (30 dph), giovani (60 dph) e adulti (90 dph) di zebrafish alimentati con mangimi contenenti farina d'insetto V stadio e prepupe rispetto ai controlli alimentati con mangimi contenenti farina di pesce come principale fonte proteica. I dati sono espressi come media \pm S.D. (n = 6). Lettere diverse indicano differenze

significative nei livelli di trascrizione tra gruppi sperimentali all'interno dello stesso tempo di campionamento ($p < 0.05$) (Lanes et al., 2021).

Risposta allo stress

I livelli di trascrizione dei marcatori di stress *hsp70* (*heat-shock protein-70*) e *nr3c1* (*glucocorticoid receptor*) sono stati modulati dalle diverse diete a base di BSF solamente nei giovani zebrafish (60 dph); di contro, a 90 dph i livelli di espressione genica di *hsp70* e *nr3c1* non hanno mostrato differenze significative tra i 2 gruppi V stadio e prepupae rispetto al gruppo controllo (Figura 21A, 21B).

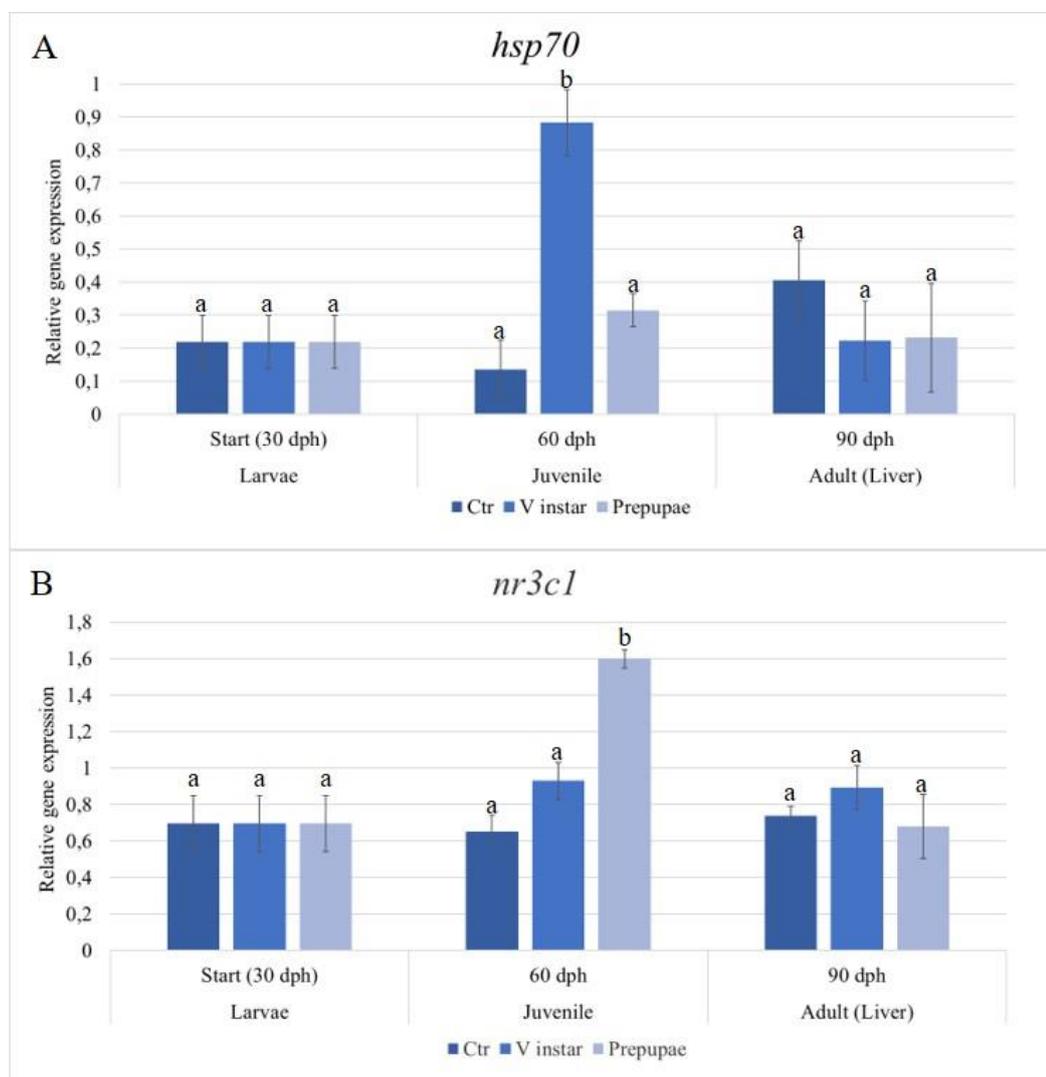
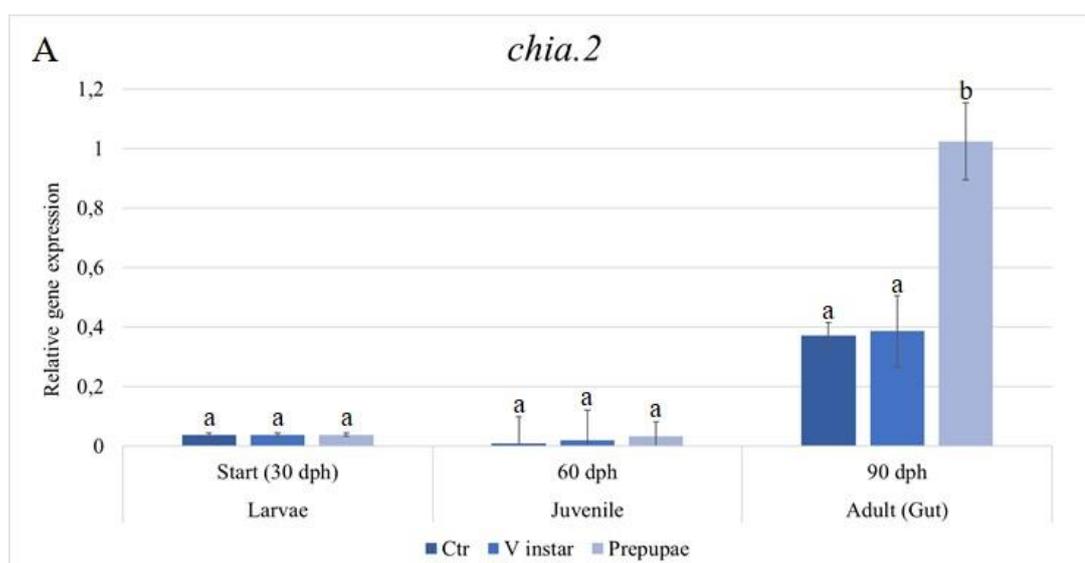


Figura 21 Profili di espressione dei geni correlati allo stress (A) *hsp70* e (B) *nr3c1*. I livelli di mRNA sono stati valutati in larve (30 dph), giovani (60 dph) e adulti (90 dph) di zebrafish alimentati con mangimi contenenti farina d'insetto V stadio e prepupae rispetto ai controlli

alimentati con mangimi contenenti farina di pesce come principale fonte proteica. I dati sono espressi come media \pm S.D. (n = 6). Lettere diverse indicano differenze significative nei livelli di trascrizione tra gruppi sperimentali all'interno dello stesso tempo di campionamento ($p < 0.05$) (Lanes et al., 2021).

Idrolisi enzimatica della chitina

L'espressione dei geni coinvolti nell'idrolisi enzimatica della chitina (*chia.2*, *chia.3* e *chia.5*) è stata modulata dalle diverse diete a base di BSF soltanto negli esemplari adulti di zebrafish. I livelli di trascrizione di tutte e tre le chitinasi studiate erano significativamente up-regolati nei pesci alimentati con mangime a base di prepupae ($p < 0.001$) mostrando valori di 2.5 (*chia.2*), 3.1 (*chia.3*) e 3.5 (*chia.5*) volte più alti rispetto al gruppo controllo (Figura 22A, 22B, 22C). Di contro, i pesci alimentati con il mangime a base di larve V stadio non hanno mostrato differenze significative nell'espressione dei geni delle chitinasi sia nei giovani che negli adulti rispetto al gruppo controllo.



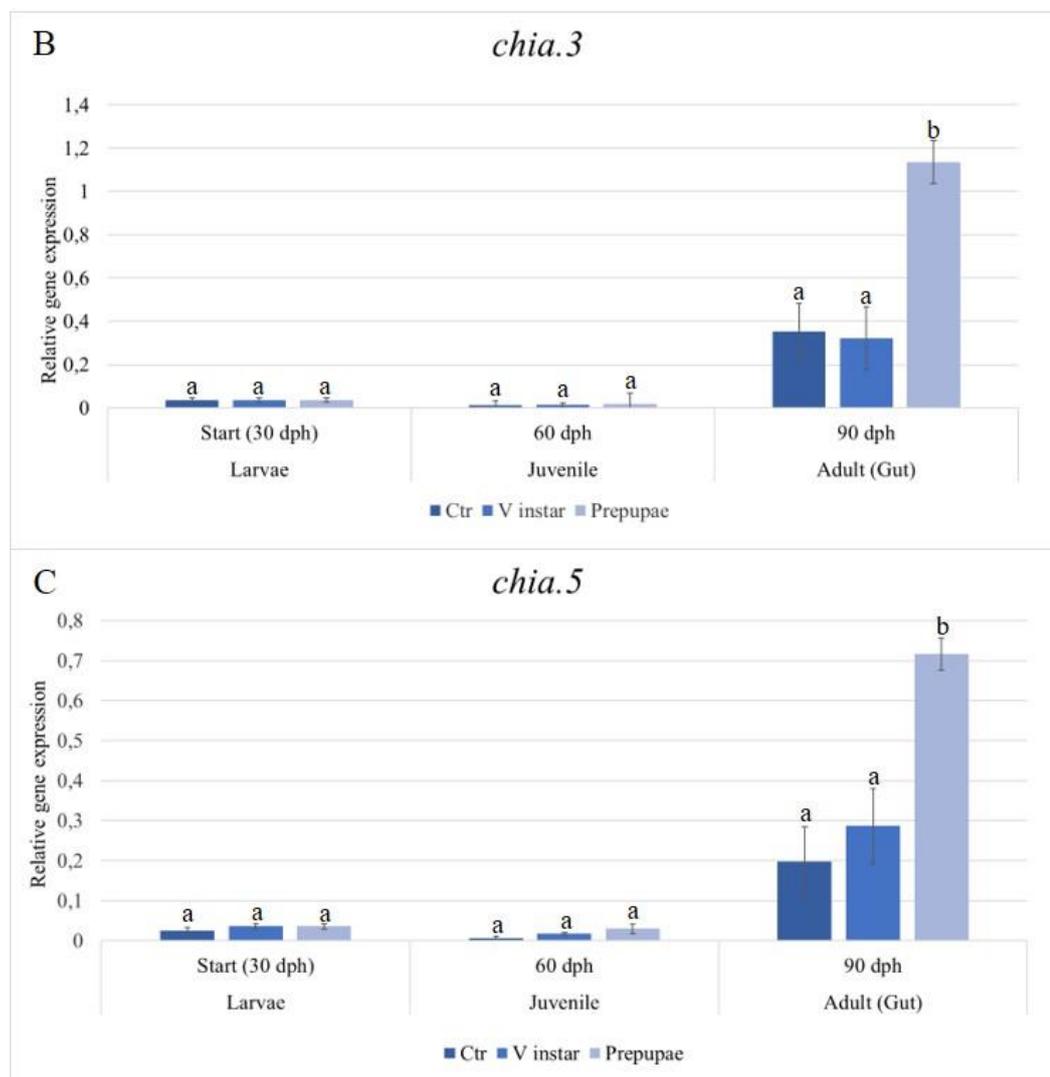


Figura 22 Profili di espressione dei geni associati all'idrolisi della chitina: **(A)** *chia.2*, **(B)** *chia.3* e **(C)** *chia.5*. I livelli di mRNA sono stati valutati in larve (30 dph), giovani (60 dph) e adulti (90 dph) di zebrafish alimentati con mangimi contenenti farina d'insetto V stadio e prepupae rispetto ai controlli alimentati con mangimi contenenti farina di pesce come principale fonte proteica. I dati sono espressi come media \pm S.D. (n = 6). Lettere diverse indicano differenze significative nei livelli di trascrizione tra gruppi sperimentali all'interno dello stesso tempo di campionamento (p < 0.05) (Lanes et al., 2021).

3.4 Discussioni

Negli ultimi anni, numerosi sono stati i tentativi di sostituire le farine di pesce con le farine di insetto nel settore dell'*aquafeed*. Tra le diverse specie di insetti testate, BSF si è mostrata una delle più promettenti poiché possiede un profilo di aminoacidi essenziali simile a quello contenuto nella farina di pesce (Henry et al., 2015). In questo studio abbiamo valutato le performance di crescita dell'organismo modello zebrafish

alimentato con mangimi a base di BSF formulati in modo da sostituire al 100% la farina di pesce con la farina di *H. illucens*. In particolare, sono state preparate 2 diverse diete sperimentali costituite da farina di BSF al V stadio e farina di BSF allo stadio di prepupa ed i dati ottenuti sono stati messi a confronto con la dieta di controllo a base di farina di pesce. I risultati ottenuti hanno dimostrato che la sostituzione totale della farina di pesce utilizzata nel mangime commerciale con due diverse farine di BSF non influisce negativamente sulle *performance* di crescita e sul benessere di zebrafish. Sorprendentemente, l'inclusione di farine degrassate di larve di V stadio e di prepupe ha indotto un effetto positivo sui parametri di crescita degli organismi. Sebbene la letteratura recente abbia riportato dati contrastanti sull'effetto dell'inclusione degli insetti nelle diete dei pesci (Hua 2021), lo studio a lungo termine qui valutato (dallo stadio larvale a quello adulto) ha mostrato il ruolo benefico delle farine degrassate di BSF nella dieta di zebrafish. Studi condotti in passato hanno mostrato evidenti differenze sui profili di acidi grassi e amminoacidi tra i diversi stadi larvali di BSF (Liu et al., 2017, Giannetto et al., 2020a, Giannetto et al., 2020c). Recenti studi condotti su zebrafish hanno dimostrato che le diete contenenti livelli superiori al 50% di inclusione di farina di prepupe di BSF non degrassata influenzano negativamente la crescita e lo sviluppo dei pesci e inducono steatosi epatica, modificazione del microbiota, aumento del contenuto lipidico, modificazione degli acidi grassi e maggiore espressione di marcatori di risposta immunitaria (Zarantoniello et al., 2019, Zarantoniello et al., 2020). Secondo gli autori, questi effetti negativi potrebbero essere correlati allo squilibrio degli acidi grassi presenti nelle farine di BSF. È noto, infatti, che diversi fattori, principalmente del substrato utilizzato per nutrire le larve, possono influire sul contenuto di proteine e di lipidi in BSF. Mentre il profilo degli amminoacidi è meno influenzato, la composizione degli acidi grassi dipende molto dalla fonte di alimentazione (Tschirner et al., 2015, Spranghers et al., 2016). La differenza riscontrata in questo studio negli effetti dell'inclusione al 100% di BSF nell'alimentazione di zebrafish rispetto a quanto osservato da altri autori sopra citati potrebbe dipendere dalla composizione del mangime che è stato formulato partendo da farina degrassata di BSF, suggerendo quindi che questa dieta così formulata potrebbe mitigare lo squilibrio degli acidi grassi HUFA/SFA (Highly Unsaturated Fatty Acid/Saturated Fatty Acid) che caratterizza le farine di insetti e i conseguenti

effetti negativi precedentemente riportati (Zarantoniello et al., 2019, Zarantoniello et al., 2020). Dati ottenuti su altre specie come il salmone atlantico (*Salmo salar*) alimentati con farina di insetti degrassata, dimostrano, infatti, che la sostituzione della farina di pesce con BSF fino al 100% non determina un effetto negativo sulla crescita degli organismi, suggerendo che BSF può essere considerata una buona fonte proteica alternativa per questa specie (Belghit et al., 2019).

I dati biometrici ottenuti in questo lavoro sono stati pienamente supportati dall'analisi dell'espressione genica dei fattori di crescita e dei fattori regolatori della miogenesi. Sebbene i fattori di crescita insulino-simile (*igf1*, *igf2*) siano coinvolti in diversi processi cellulari, partecipano al controllo della crescita neuroendocrina con un ruolo principale nella regolazione della crescita somatica; la loro espressione nel tessuto muscolare può indurre localmente l'espressione di fattori miogenici che a loro volta promuovono la crescita muscolare (Johnston et al., 2011). È interessante notare come l'espressione genica di entrambi i fattori di crescita insulino-simile *igf1* ed *igf2* abbia mostrato nel tessuto muscolare una *up-regulation* nei pesci alimentati con farina di BSF, supportando i parametri di crescita registrati durante l'esperimento. Sorprendentemente, il livello di mRNA di *igf2* era più alto negli individui *juveniles* (60 dph) alimentati con farina di larve V stadio rispetto sia al controllo che al gruppo alimentato con farina di prepupe. Gabillard et al. (2006) hanno dimostrato che l'espressione genica di *igf1* e *igf2* nei pesci dipende dal regime alimentare e, i nostri risultati sull'espressione genica di *igf2* nei *juveniles* di zebrafish suggeriscono che i due mangimi testati a base di larve di V stadio e di prepupe hanno avuto effetti diversi sulla crescita dei pesci, probabilmente a causa dei loro diversi valori nutrizionali, come precedentemente dimostrato (Giannetto et al., 2020a, Giannetto et al., 2020c). Oltre ai fattori di crescita insulino-simile (*igf1* e *igf2*), altri fattori chiave regolano la crescita dei pesci; in particolare, la crescita muscolare è modulata da fattori regolatori miogenici (MRF) e dalla miostatina che è un regolatore endogeno negativo, questi fattori controllano finemente il processo fino all'età adulta. Sebbene l'effetto di diverse diete sulla miogenesi non sia stato studiato approfonditamente, i pochi studi pubblicati hanno dimostrato che l'apporto di nutrienti potrebbe influenzare l'espressione dei geni che codificano per i fattori miogenici *myf5*, *myod* e *myog*, regolando così il processo della miogenesi scheletrica (Lavajoo et al., 2020). Il pattern di espressione genica

osservato in zebrafish alimentati con due diverse diete a base di BSF ha evidenziato che il mantenimento della crescita è controllato dalla differente regolazione di precisi geni correlati alla crescita muscolare nei giovanili che negli adulti. Nonostante le modulazioni osservate nell'espressione genica di *igf1* ed *igf2*, le diete a base di farina di BSF, sia V stadio che prepupe non hanno avuto effetti sulla modulazione dell'espressione di *myod1* durante lo sviluppo né sull'espressione di *myf5* e *mstnb* negli adulti, così come *myog* nei giovani. Questi risultati suggeriscono fortemente che le diverse proprietà nutrizionali caratteristiche dei due stadi larvali di BSF (V stadio e prepupe) possono modulare in maniera specifica la crescita nei pesci.

Una delle principali controversie sull'utilizzo di farine a base di insetti nella dieta dei pesci è sicuramente l'alto livello di chitina, il polisaccaride principale componente dell'esoscheletro degli insetti. L'inclusione di un alto livello di chitina nei mangimi destinati ad alimentare specie acquatiche può influenzare negativamente la digeribilità e l'assimilazione dei nutrienti compromettendo, quindi, la crescita e la salute dei pesci (Shiau e Yu 1999, Gopalakannan et al., 2006, Hansen et al., 2007, Diener et al., 2009, Kroeckel et al., 2012, Henry et al., 2015, Rapatsa e Moyo 2017). Studi precedenti hanno riportato la diversa attività chitinolitica di diverse specie di pesci (Lindsay et al., 1984, Danulat et al., 1986, Fines et al., 2010, Kroeckel et al., 2012). I nostri risultati hanno mostrato chiaramente che i livelli di espressione genica delle chitinasi erano notevolmente alti solo negli individui adulti. Inoltre, è degno di nota che l'espressione genica di tutte le chitinasi era molto più elevata nei pesci alimentati con mangime a base di prepupe rispetto ai pesci alimentati con mangime a base di larve di V stadio che ha mostrato, invece, valori simili al gruppo di controllo. Questi dati suggeriscono che l'attività chitinolitica in zebrafish è strettamente dipendente dallo stadio larvale di BSF utilizzato come *feed* visto che la farina di prepupe ha un contenuto di chitina più elevato rispetto alla farina di larve di V stadio (Giannetto et al., 2020a). A nostro avviso, questi risultati forniscono importanti conoscenze sull'inclusione di insetti nei mangimi e aprono scenari innovativi nell'ottica di selezionare la dieta a base di BSF appropriata per diverse specie di pesci o stadi di sviluppo, garantendo così una corretta assunzione di mangime ed una corretta crescita in quelle specie in cui l'attività chitinolitica risulta essere scarsa o completamente assente. Diversi studi hanno indagato gli effetti della chitina sul sistema immunitario per chiarire il suo potenziale

come additivo immunostimolante per i mangimi per pesci (Kamilya e Khan, 2020). È stato osservato come generalmente, nelle diete per pesci, l'inclusione di bassi livelli di chitina (dallo 0.01% al 2%), attiva l'immunità innata (Esteban et al., 2000, Gopalakannan et al., 2006, Harikrishnan et al., 2012). Altri studi hanno indagato i possibili effetti delle farine di insetti sul sistema immunitario dei pesci. Nella dieta del pesce gatto giallo (*Pelteobagrus fulvidraco*), un'inclusione di farina di insetto BSF del 25% ha migliorato l'immunocompetenza dei pesci (Xiao et al., 2018). Nel salmone atlantico, la sostituzione totale della farina di pesce con la farina di larve di BSF non ha avuto alcun effetto sulla trascrizione dei geni pro- infiammatori nelle cellule renali; tuttavia, è stato osservato un effetto sulla trascrizione di geni antiossidanti e correlati allo stress nei leucociti (Stenberg et al., 2019). Nel presente studio, i livelli di chitina erano rispettivamente del 6.31% nelle larve degrassate di V stadio e del 7.22% nelle prepupe. La modulazione dell'espressione delle interleuchine (*il1b* e *il6*) nei *juveniles*, ma non negli adulti potrebbe essere dovuta ai livelli di chitina presenti nelle diete sperimentali; al contrario, l'espressione di *tnfa* è stata modulata soltanto negli individui adulti alimentati con il mangime a base di farina di larve V stadio, mostrando quindi una risposta peculiare alle due diverse diete sperimentali. Per indagare l'effetto delle diverse farine di BSF sul benessere di zebrafish è stata valutata l'espressione di geni correlati allo stress (*hsp70* e *nr3c1*) che non risultano modulati dalle diete. Questo dato dimostra che entrambe le diete sperimentali non inducono livelli generali di stress negli individui adulti. Questo risultato è in accordo con Zarantoniello et al. (2019) che hanno valutato gli effetti dell'inclusione di farina di BSF non degrassata (50% di inclusione) in zebrafish adulti di 6 mesi.

I risultati ottenuti sull'organismo modello zebrafish possono essere utili per comprendere le risposte fisiologiche e molecolari alle diete a base di BSF di altre specie di pesci di interesse commerciale. Infatti, zebrafish condivide diverse risposte fisiologiche con molte specie ittiche di acquacoltura, oltre ai meccanismi di sviluppo e alle caratteristiche morfologiche (Zarantoniello et al., 2019); pertanto, i dati ottenuti possono fornire informazioni utili sui possibili effetti dell'inclusione di BSF come ingrediente nei mangimi per l'acquacoltura convenzionale. I dati ottenuti dallo studio di metilazione del DNA mediante RRBB, che al momento della stesura di questa tesi sono ancora in fase di analisi e valutazione, potranno fornire ulteriori informazioni

sulla regolazione dei diversi *pathways* analizzati e sull'effetto che le diete sperimentali a base di insetto hanno sul metiloma dell'intestino di zebrafish. Presi insieme, i risultati di questa tesi dimostrano che i due stadi larvali di BSF utilizzati come alimento nelle diete di zebrafish hanno effetti diversi sulla *performance* di crescita dei pesci ed effetti peculiari sulla risposta immunitaria e sulla modulazione delle chitinasi. Pertanto, il 100% di inclusione di farina di larve V stadio o di prepupe degrassate nella dieta di zebrafish potrebbe superare i limiti dell'utilizzo della farina di pesce come unica fonte proteica nei mangimi di specie acquatiche. I dati suggeriscono l'intrigante prospettiva di utilizzare farine degrassate a base di BSF nella formulazione dei mangimi come fonti proteiche alternative preziose e sostenibili per le specie ittiche di acquacoltura rilevanti. Un aspetto degno di nota, è che le farine BSF qui testate rappresentano la biomassa di larve e prepupe ottenuta attraverso la bioconversione di scarti vegetali, evidenziando, pertanto, il potenziale di *H. illucens* nel processo di valorizzazione degli scarti, una nuova biotecnologia per ottenere risorse nutrizionali di elevato valore in un contesto di economia circolare.

4 Capitolo 2

*Molecole con attività biologica estratte da *Hermetia illucens*.*

Valutazione in vitro dell'attività antiossidante in un modello cellulare di stress ossidativo

4.1 Background

Gli insetti, inclusa la mosca soldato *Hermetia illucens* (BSF), rappresentano una promettente risorsa di proteine di alta qualità per la loro composizione amminoacidica, sostenibili e naturali, utili anche per la produzione di derivati proteici contenenti molecole con rilevanti caratteristiche funzionali e attività biologiche che possono essere impiegate in diversi settori industriali quali la nutraceutica. Sebbene recenti studi abbiano riportato la produzione di idrolizzati proteici di BSF, ad oggi dati sulla loro attività biologica in modelli cellulari sono assenti.

Il presente studio è mirato alla valutazione delle potenziali attività biologiche degli idrolizzati proteici di *H. illucens* (BPH) *in vitro*. La potenziale attività citoprotettiva dei BPH, qui prodotti dalla frazione proteica delle larve di BSF mediante estrazione e idrolisi enzimatica e, successivamente caratterizzati mediante spettroscopia NMR ed elettroforesi su gel, è stata valutata in un modello cellulare di stress ossidativo costituito da fibroblasti L-929 trattati con H₂O₂.

I risultati potranno fornire preziose indicazioni sulle attività biologiche degli idrolizzati proteici di BSF e sul loro potenziale applicativo come ingredienti promotori della salute innovativi e sostenibili.

L'attività di ricerca svolta nell'ambito di questa tematica ha contribuito alla pubblicazione di un articolo su rivista con IF del quale si riportano parzialmente informazioni, figure e tabelle (Figura 23) (Riolo et al., 2023 <https://doi.org/10.3390/antiox12020519>).

Article

Cytoprotective and Antioxidant Effects of Hydrolysates from Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*)

Kristian Riolo ¹, Archimede Rotondo ², Giovanna Loredana La Torre ², Ylenia Marino ¹, Gianluca Antonio Franco ³, Rosalia Crupi ³, Roberta Fusco ¹, Rosanna Di Paola ³, Sabrina Oliva ¹, Giuseppe De Marco ¹, Domenico Savastano ⁴, Salvatore Cuzzocrea ¹, Enrico Gugliandolo ^{3,*} and Alessia Giannetto ^{1,*}

Figura 23 Riolo et al., 2023

4.2 Materiali e metodi

4.2.1 Allevamento degli insetti

Le larve di *Hermetia illucens* sono state allevate e raccolte presso l'allevamento *Progetto Hermetia* (www.progettohermetia.it). Quattro giorni dopo la schiusa, le larve sono state allevate su un substrato composto da scarti organici (65% vegetale; 5% carne/pesce; 25% pane/pasta/riso; e il 5% altri tipi di scarti alimentari). Il substrato è stato opportunamente trattato e omogenizzato prima di essere utilizzato per nutrire le larve. Al raggiungimento del VI stadio larvale (Prepupa), le larve sono state raccolte, lavate in acqua distillata sterile, pastorizzate ed essiccate a temperatura ambiente (25 °C) prima di essere conservate a -80 °C per le successive analisi.

4.2.2 Produzione degli idrolizzati proteici di BSF (BPH)

Laboratory scale

Per ottenere degli idrolizzati proteici di BSF (BPH) le larve sono state macinate, liofilizzate, degrassate e successivamente digerite con enzimi. In una prima fase sono stati eseguiti test preliminari su scala di laboratorio, durante i quali sono stati utilizzati, in maniera separata, tre solventi organici diversi per il degrassamento: n-esano, cloroformio e acetil acetato, al fine di verificare quale fosse il solvente migliore in termini di maggiore resa e minore impatto ambientale e di valutare la possibile influenza dei diversi solventi organici utilizzati sui composti biologici recuperati. Una volta filtrato il solvente organico, il solido residuo è stato sottoposto a liofilizzazione e successiva digestione enzimatica in acqua. Ciò ha portato alla solubilizzazione dei

metaboliti, che sono stati successivamente esaminati mediante spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR).

Sebbene la composizione chimica non sia stata drammaticamente influenzata dall'utilizzo dei diversi solventi organici nel processo su piccola scala, le prove sperimentali effettuate hanno mostrato che l'n-esano è stato di gran lunga il solvente più adatto per la successiva analisi NMR eseguita sulla fase idrofilica. Nello specifico, sebbene il cloroformio fosse il miglior solvente degrassante, l'impatto ambientale e sulla salute non lo rendono ideale per un utilizzo in processi su larga scala; l'acetato di etile, che a differenza del cloroformio è un solvente con minori impatti ambientali, non ha invece portato ad una buona resa estrattiva. Pertanto, nel processo di produzione di BPH su larga scala la separazione della componente lipidica dalle larve di BSF è stata eseguita utilizzando n-esano.

Scale-up del processo di produzione degli idrolizzati proteici

Le larve che precedentemente sono state pastorizzate e poi congelate (973 g) sono state macinate e successivamente liofilizzate a -72 °C raggiungendo un peso di 410.71 g. Il campione liofilizzato così ottenuto è stato degrassato in n-esano (1.6 L) e la soluzione è stata separata mediante filtrazione fino ad ottenere una soluzione di n-esano perfettamente limpida senza particelle galleggianti. Il residuo solido ottenuto dalla filtrazione è stato liofilizzato, pesato (276.27 g) e digerito utilizzando una miscela enzimatica di tre enzimi (flavourzyme/protamex/alkalase 1:1:1) al 3% del peso solido stimato (8.28 g), diluita in acqua in un volume finale di 1.6 L con pH 6.9. La digestione è stata eseguita per 10 ore a 50 °C e, infine, gli enzimi sono stati inattivati a 90 °C per 40 minuti. La miscela è stata purificata attraverso setacci e successivamente attraverso decantazione, centrifugazione e separazione. Infine, sono state eseguite l'evaporazione e la liofilizzazione per misurare il campione idrolizzato idrosolubile ottenuto (126 g).

Resa degli idrolizzati BPH

La resa in idrolizzati proteici può essere calcolata in diverse forme a seconda della materia prima di partenza che viene considerata. Per tale motivo sono state effettuate diverse quantificazioni utilizzando misure già riportate da altri autori (Firmansyah e Abduh 2019; Surendra et al., 2020) e applicando la seguente formula:

$$\text{Yield (resa) (\%)} = \frac{m_{\text{final}} \text{ (g)}}{m_{\text{initial}} \text{ (g)}} \times 100x$$

dove m_{final} è la massa del campione finale, cioè gli idrolizzati proteici di larve di BSF liofilizzati e m_{initial} è la massa iniziale secca o fresca. I dati di resa sono riportati in Tabella 7.

	Peso misurato (g)	Resa sostanza secca (%)	Resa sostanza totale (%)
Specie idrosolubili	126.40	30.83	12.99
Amminoacidi idrosolubili estratti	85.89	20.95	8.83
Specie solubili in n-esano (frazione grassa)	83.40	20.34	8.57
Solido insolubile (polimeri-chitina)	150.30	36.66	15.45

Tabella 7 Rese misurate rispetto alla sostanza secca totale delle principali frazioni estratte (Riolo et al., 2023).

4.2.3 Caratterizzazione dei BPH

Elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE)

I campioni di proteine sono stati quantificati mediante Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) utilizzando una curva standard di albumina di siero bovino (BSA) ad ampio spettro e lo spettrofotometro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Monza, Italia). La distribuzione del peso molecolare è stata valutata mediante SDS-PAGE. I campioni di proteine sono stati incubati con sample buffer in un bagno termostato a 100 °C per 10 min prima della separazione su gel al 15%. L'elettroforesi è stata eseguita utilizzando l'apparato Bio Rad Mini-protean II. Un marker di peso molecolare di 10–250 kDa (Precision Plus Protein Standards Dual color, Biorad) è stato fatto correre insieme ai campioni di proteine. Il gel di poliacrilammide è stato colorato con una soluzione blu Coomassie (Coomassie brillante blu R-200, 45% metanolo, 45% acqua e 10% acido acetico glaciale) e risciacquato in una soluzione decolorante (45% metanolo, 45% acqua e 10% acido acetico glaciale). Per acquisire le immagini del gel è stato utilizzato il sistema di acquisizione di immagini Alliance LD287WL (UVITEC Ltd., Cambridge, Regno Unito).

Analisi spettroscopica mediante NMR

È stata preparata una soluzione D₂O (adatta come standard) con 10 mM di TSP (3-(Trimethylsilyl) propionic-2,2,3,3-d₄ acid sodium salt) usata come frequenza NMR ($\delta^1\text{H} = 0.0$ ppm) e standard di quantificazione e PBS (phosphate buffer solution) 500 mM con NaN₃ (0.2%) per inibire la crescita batterica. Questa soluzione è stata aggiunta ai campioni idrosolubili in rapporti volumetrici 1:9 (pH 7.25 ± 0.05) (Lanza et al., 2020, Rotondo et al., 2020, Mangano et al., 2021). Tutti i campioni sono stati analizzati alla stessa temperatura costante ($T = 298$ K) con uno spettrometro NMR Agilent ProPulse 500 MHz dotato di una sonda ONE_NMR. Il set-up sperimentale è stato effettuato attraverso l'ottimizzazione di (1) omogeneità del campo; (2) durata dell'impulso di 90° per raggiungere la massima sensibilità ($6,8 \pm 0,1$ ls; attenuazione di potenza 60 Db); (3) frequenza di presaturazione dell'acqua con potenza a 25 Hz; e (4) tempo di acquisizione e il ritardo di tempo adeguati in base ai tempi di rilassamento (T₁). Quest'ultimo parametro è stato misurato attraverso l'esperimento "inversion recovery" e validato dai rapporti di integrazione costanti dopo un diverso numero di scansioni. Poiché T₁ era fino a 3 s, sono stati scelti 2 s di tempo di acquisizione e 13 s di ritardo. Per ogni campione, sono stati eseguiti tre diversi esperimenti analitici che evidenziano caratteristiche diverse: (1) esperimento ¹H standard con acqua presaturata; (2) presaturazione dell'acqua durante una sequenza 1d 1H-NOESY con un tempo di miscelazione molto basso chiamato "NOESYpresat"; e (3) esperimento ¹H presaturato con acqua con un ritardo spin-echo in grado di filtrare la molecola ad alto peso molecolare dell'esperimento "pr_cp". Il rilevamento e la quantificazione degli α -amminoacidi liberi e di altri metaboliti sono stati effettuati mediante la quantificazione MARA-NMR, che è stata già applicata con successo negli studi precedentemente citati (Rotondo et al., 2019, Lanza et al., 2020, Rotondo et al., 2020, Mangano et al., 2021). La presenza di diversi metaboliti è stata confermata attraverso l'1D TOCSY (Total correlation spectroscopy), selezionando i diversi sistemi di spin che rappresentano diversi sistemi molecolari.

4.2.4 Attività biologica dei BPH su modelli cellulari in vitro

Colture cellulari

Per questa parte sperimentale del progetto sono state utilizzate cellule L-929 (fibroblasti murini) coltivate in DMEM addizionato con il 10% di streptomicina di

siero bovino fetale (100 µg/mL) e penicillina (100 µg/mL) a 37 °C con il 5% di CO₂. Raggiunto circa l'80% di confluenza, le cellule sono state raccolte e subcoltivate dopo trattamento con tripsina/EDTA.

Saggio di vitalità cellulare

Il saggio di vitalità cellulare è stato effettuato attraverso il test del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolio bromuro (MTT) (Vasantharaja et al., 2019). Brevemente, 1×10^4 cellule sono state seminate in una piastra a 96 pozzetti e incubate per 24 ore a 37 °C con il 5% di CO₂. Le cellule sono state incubate con diverse concentrazioni di BPH (50, 10, 5, 1.5, 1, 0.5, 0.1, 0.05 e 0.01 mg/mL) per 24 ore. Successivamente, le cellule sono state incubate con una soluzione MTT (0,5 mg/mL, Invitrogen) per 2 ore a 37°C. Dopo la rimozione della soluzione MTT sono stati aggiunti 200 µL di DMSO ed è stata registrata l'assorbanza a 540 nm con un lettore di micropiastre (Multiskan, Thermo Fischer Scientific) e Skanlt Software 6.0.2 (Thermo Fisher Scientific, Italia).

Per testare l'effetto citoprotettivo dei BPH contro lo stress ossidativo, le cellule sono state pretrattate, in una piastra a 96 pozzetti, con le concentrazioni non citotossiche di BPH per 2 ore; quindi, è stato aggiunto H₂O₂ 1 mM e le cellule sono state incubate a 37°C per 24 ore. Dopo il periodo di incubazione, è stato eseguito il test MTT come descritto sopra. I risultati sono stati espressi in percentuale delle cellule vitali rispetto al controllo non trattato.

Determinazione dei ROS intracellulari

Per valutare la generazione di ROS intracellulari è stato effettuato il saggio carbossi-H₂DCFDA (Invitrogen, Thermo Fisher # C400). Le cellule L-929 sono state trattate con concentrazioni non citotossiche di BPH (1.5, 1, 0.5, 0.1 e 0.05 mg/mL) per 2 ore. Successivamente sono stati aggiunti 10 µL di H₂O₂ (1 mM) e le cellule sono state incubate per 1 h. I segnali di intensità della fluorescenza sono stati valutati con il citometro Attune NxT (Thermo Fischer Scientific) e con il microscopio a fluorescenza (Evos M5000, Thermo Fisher) (Huang et al., 2020). Tutti gli esperimenti sono stati ripetuti tre volte in modo indipendente.

Saggio di localizzazione intracellulare del fattore Nrf2

Le cellule L-929 sono state e incubate con BPH (1.5, 1, 0.5 e 0.1 mg/mL) in presenza o meno di H₂O₂ (1 mM) per 24 ore in piastre da 12 pozzetti. Le cellule sono state fissate in una soluzione 4% paraformaldeide in PBS e in una soluzione 0.1% Triton X-100 in PBS e poi incubate con anticorpo anti-Nrf2 *anti-rabbit* (SAB4501984, Sigma-Aldrich) per 1h. Successivamente le cellule sono state incubate con anticorpo secondario *anti-rabbit* coniugato con Texas Red (#T- 6391, Termos Fisher). Per la visualizzazione dei nuclei, le cellule sono state colorate con il DAPI (#D3571, Invitrogen Thermo Fisher). Le immagini fluorescenti sono state catturate con il microscopio digitale invertito a fluorescenza EVOS M 5000 (Thermo Fisher).

Livelli di mRNA di nrf2

L'RNA totale è stato estratto dalle cellule utilizzando il reagente TRIsure (Bioline, Francia), e verificato, per qualità e quantità, mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1% (p/v) e lettura spettrofotometrica con NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Italia). Dopo aver rimosso qualsiasi potenziale contaminazione del DNA genomico, la sintesi del cDNA è stata eseguita da 1 µg di RNA totale utilizzando il kit di trascrizione inversa QuantiTect (Qiagen). I livelli di trascrizione di *nrf2* sono stati quantificati mediante qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction) utilizzando il kit QuantiTect SYBR®Green PCR (Qiagen) in un termociclatore Rotor-Gene Q2 plex Hrm (Qiagen). I campioni di cDNA (diluiti 1:50) sono stati amplificati utilizzando un set di primers specifici per il gene target *nrf2* e per i geni di riferimento *gadph* e *36b4*. I primers utilizzati sono riportati in Tabella 8.

Gene	Forward	Reverse
<i>Nrf2</i>	TTTCAGCAGCATCCTCTCCA	AGCCTTCAATAGTCCCGTCC
<i>gadph</i>	TCCATGACAACCTTTGGCATTG	TCACGCCACAGCTTTCCA
<i>36b4</i>	GGACCCGAGAAGACCTCCTT	GCACATCACTCAGAATTTCAATGG

Tabella 8 Primers utilizzati per le reazioni di qPCR (Riolo et al., 2023).

Per ciascuna reazione di qPCR sono state utilizzate sei repliche biologiche (n=6) insieme ad un controllo negativo di retro trascrizione (-RTC) ed un controllo negativo di reazione (no template control). L'efficienza e specificità della PCR sono state valutate rispettivamente mediante curva standard e curva di melting come precedentemente descritto da Giannetto et al. (2013). Il fattore di normalizzazione calcolato dal software GeNorm a partire dai due geni di riferimento più stabili (*gadph* e *36b4*) è stato utilizzato per correggere i dati grezzi (Nagasawa et al., 2012).

Analisi statistiche

Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software GraphPad Prism versione 9 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). I dati degli studi *in vitro* sono stati valutati per le differenze tra i gruppi mediante one-way ANOVA seguita dal test post hoc di Bonferroni per confronti multipli. Le differenze nei livelli di trascrizione dei geni testati tra i gruppi sperimentali sono state valutate mediante analisi della varianza seguita da test post hoc di Student-Newman-Keuls. Un valore $p < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo.

4.3 Risultati

4.3.1 Caratterizzazione di idrolizzati proteici estratti da larve di BSF

Gli idrolizzati proteici sono stati prodotti dalle larve di BSF in seguito ad estrazione con solvente e successiva idrolisi con proteasi selezionate. La fase di degrassamento eseguita con n-esano e la successiva digestione enzimatica hanno prodotto 126.40 g di polvere idrosolubile da larve di BSF (973 g di peso fresco). Questo rappresentava il 30% della sostanza secca e, in maniera del tutto coerente, la quantificazione tramite spettroscopia NMR di tutti i metaboliti nella soluzione acquosa era indicata come il 29.7% di questo stesso riferimento. La quantificazione mediante risonanza magnetica nucleare, a differenza delle altre tecniche mirate, consente anche il rilevamento e la quantificazione di metaboliti non amminoacidici; è stato quindi possibile conoscere la netta presenza di amminoacidi liberi (*free amino acid*, FAA, 20%) rispetto al materiale secco di partenza. La Tabella 7 riassume tutti i valori significativi dedotti dai nostri esperimenti su larga scala. Come già evidenziato nel paragrafo 4.2.2, la resa può essere calcolata in diversi modi; inoltre, l'analisi NMR ha distinto gli altri metaboliti dagli

aminoacidi liberi (FAA) in modo da poter dedurre la resa relativa alla sola composizione amminoacidica.

Distribuzione del peso molecolare dei BPH

La distribuzione del peso molecolare degli estratti proteici delle larve di BSF è stata valutata attraverso SDS-PAGE. I pattern proteici ottenuti dai tre diversi metodi di estrazione delle proteine, ovvero l'estrazione con n-esano, acetato di etile e cloroformio, non hanno mostrato differenze rilevanti nella distribuzione delle bande che sono apparse in un intervallo di pesi molecolari di 10-150 kDa con un segnale più forte intorno ai 75 kDa, che ha mostrato la massima intensità nei campioni estratti con n-esano. Inoltre, erano presenti anche bande superiori a 250 kDa. I campioni proteici sottoposti ad idrolisi, invece, hanno mostrato la maggior parte delle bande in un intervallo più ristretto di 10-75 kDa; in questo caso, la banda di 75 kDa aveva un aspetto meno intenso rispetto alle bande di 75kDa osservate nei campioni di proteine non idrolizzate. Negli idrolizzati BPH la maggior parte delle bande era presente nell'intervallo di 50-75 kDa, e sono state rivelate anche singole bande tra 25 e 37 kDa, tra 20 e 25 kDa e a 10 kDa (Figura 24).

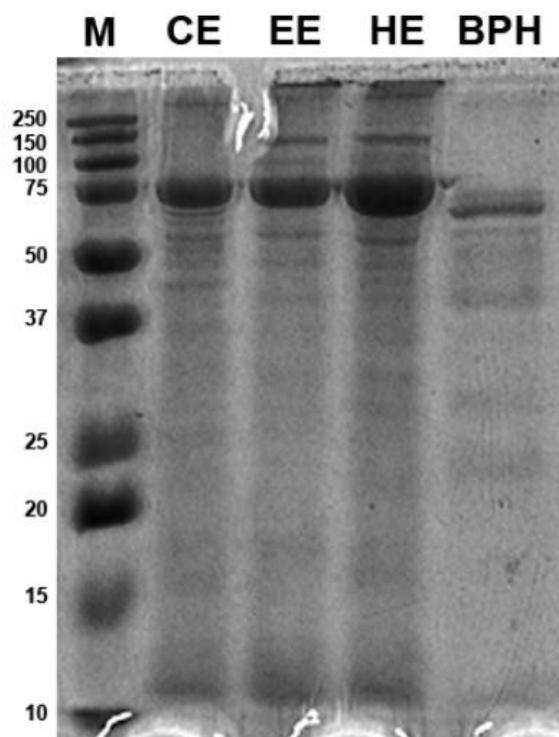


Figura 24 Proteine estratte da BSF e idrolizzati proteici (BPH), separati mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE). M, marker di peso molecolare; CE, estratto proteico

con cloroformio; EE, estratto con acetato di etile; HE, estratto con esano; BPH, idrolizzati proteici di BSFL (Riolo et al., 2023).

Analisi dei metaboliti mediante Risonanza Magnetica Nucleare (NMR)

I campioni di proteine idrolizzate sono stati soggetti ad analisi spettroscopica NMR attraverso la quale è stato possibile caratterizzare e quantificare i metaboliti. Sono state escluse alcune regioni dello spettro in cui il ritardo spin-echo (esperimento "pr_cp") ha mostrato notevoli differenze nell'identificazione di molecole ad alto peso molecolare. Sono stati analizzati tre campioni identici e le tre corrispondenti soluzioni diluite 1:10 per confermare la quantificazione all'interno della deviazione standard dopo almeno sei misurazioni. La quantificazione ha riguardato 16 aminoacidi liberi (FAA) e 14 altri metaboliti, fornendo un pannello totale di 30 specie molecolari (Tabella 9).

Composto/specie	Sigla	Concentrazione in una soluzione di 1.6 L (mM)	% in peso degli aminoacidi liberi	% molecolare degli aminoacidi liberi	Rapporto ponderale rispetto alla biomassa larvale grezza (mg/g)	W/W di sostanza secca (mg/g)	Millimoli totali in 1.6 L di soluzione
Leucina	LEU	32.8 ± 0.5	8.0	7.2	7.1	16.8	52.6
Isoleucina	ILE	35.6 ± 0.6	8.7	7.8	7.7	18.2	56.9
Valina	VAL	43.1 ± 0.8	9.4	9.4	8.3	19.7	68.9
Treonina	THR	21.7 ± 0.7	4.8	4.7	4.2	10.1	34.6
Lattato	LAC	23.6 ± 0.5	3.9	5.2	3.5	8.3	37.7
Alanina	ALA	80.7 ± 0.8	13.4	17.7	11.8	28.0	129.2
Prolina	PRO	36.4 ± 0.3	7.8	8.0	6.9	16.3	58.2
Glutammato	GLU	47.1 ± 1.0	12.9	10.3	11.4	27.0	75.4
Metionina	MET	12.4 ± 0.3	3.4	2.7	3.0	7.2	19.9
Aspartato	ASP	0.7 ± 0.1	0.2	0.2	0.2	0.4	1.1
Serina	SER	12.0 ± 0.4	2.3	2.6	2.1	4.9	19.1
fenilalanina	PHE	18.0 ± 0.6	5.5	3.9	4.9	11.6	28.8
Triptofano	TRP	8.1 ± 0.2	3.1	1.8	2.7	6.5	13.0
Tirosina	TYR	15.9 ± 0.8	5.4	3.5	4.7	11.2	25.4
Glicina	GLY	40.6 ± 0.5	5.7	8.9	5.0	11.9	65.0

4- amminobutirrato	GABA	28.6 ± 0.7	5.5	6.2	4.8	11.5	45.7
Etanolo	EtOH	28.3 ± 0.5	-	-	2.1	5.1	45.2
Propandiolo	PRDO	10.7 ± 0.4	-	-	1.3	3.2	17.1
Acetato	AcO	92.3 ± 1.5	-	-	9.1	21.6	147.7
Succinato	SUC	55.8 ± 1.5	-	-	10.8	25.7	89.3
3- idrossipropanoat	3- HPRO	11.8 ± 0.3	-	-	1.8	4.2	18.9
Dimetilammina	DMA	0.5 ± 0.2	-	-	0.0	0.1	0.8
Trimetilammina	TMA	3.9 ± 0.5	-	-	0.4	0.9	6.3
Etanolamina	ETN	12.1 ± 1.8	-	-	1.2	2.9	19.4
Colina	CHO	5.6 ± 0.6	-	-	1.0	2.3	8.9
Betaina	BETA	24.9 ± 1.0	-	-	4.8	11.4	39.9
Glicerolo	GLYOH	28.5 ± 1.4	-	-	4.3	10.2	45.5
Uracile	URA	4.1 ± 0.5	-	-	0.7	1.8	6.5
Tiramina	TYM	14.9 ± 1.0	-	-	3.4	8.0	23.9
Formato	FOR	27.8 ± 1.0	-	-	2.1	4.9	44.5
Totale	TOT	778.5 ± 6.2	-	-	131.3	311.6	1245.5
Aminoacidico totale	TOT FAA	457.3 ± 1.8	100.0	100.0	88.3	209.5	731.5

Tabella 9 Metaboliti presenti nei BPH, con specifico riguardo alla composizione di amminoacidi liberi. Vengono visualizzate diverse unità di quantificazione per un facile confronto con altri report simili (Riolo et al., 2023).

4.3.2 Effetti dei BPH su un modello cellulare di stress ossidativo *in vitro*

Valutazione della citotossicità di BPH in fibroblasti L-929

Per valutare l'effetto degli idrolizzati BPH sulla vitalità cellulare, le cellule L-929 sono state incubate con diverse concentrazioni di BPH (da 50 a 0.01 mg/mL) per 24 ore. Dopo l'incubazione, il test MTT ha mostrato che alle dosi comprese nell'intervallo 5 mg/mL – 0.001 mg/mL, la % di vitalità cellulare era quasi paragonabile al gruppo di controllo (Figura 25A). Sulla base di questi risultati, sono stati valutati gli effetti citoprotettivi e antiossidanti delle concentrazioni non citotossiche di BPH sulle cellule L-929 trattate con H₂O₂. Le cellule esposte a H₂O₂ hanno mostrato una significativa riduzione della vitalità cellulare rispetto al gruppo di controllo (Figura 25B). È interessante notare che il pretrattamento con gli idrolizzati nell'intervallo di

concentrazione compreso tra 0.1 e 1.5 mg/mL ha determinato un significativo miglioramento della percentuale di vitalità cellulare rispetto al gruppo di cellule trattate solo con H₂O₂, mostrando un effetto citoprotettivo nelle cellule che sono state pretrattate con idrolizzati proteici BPH.

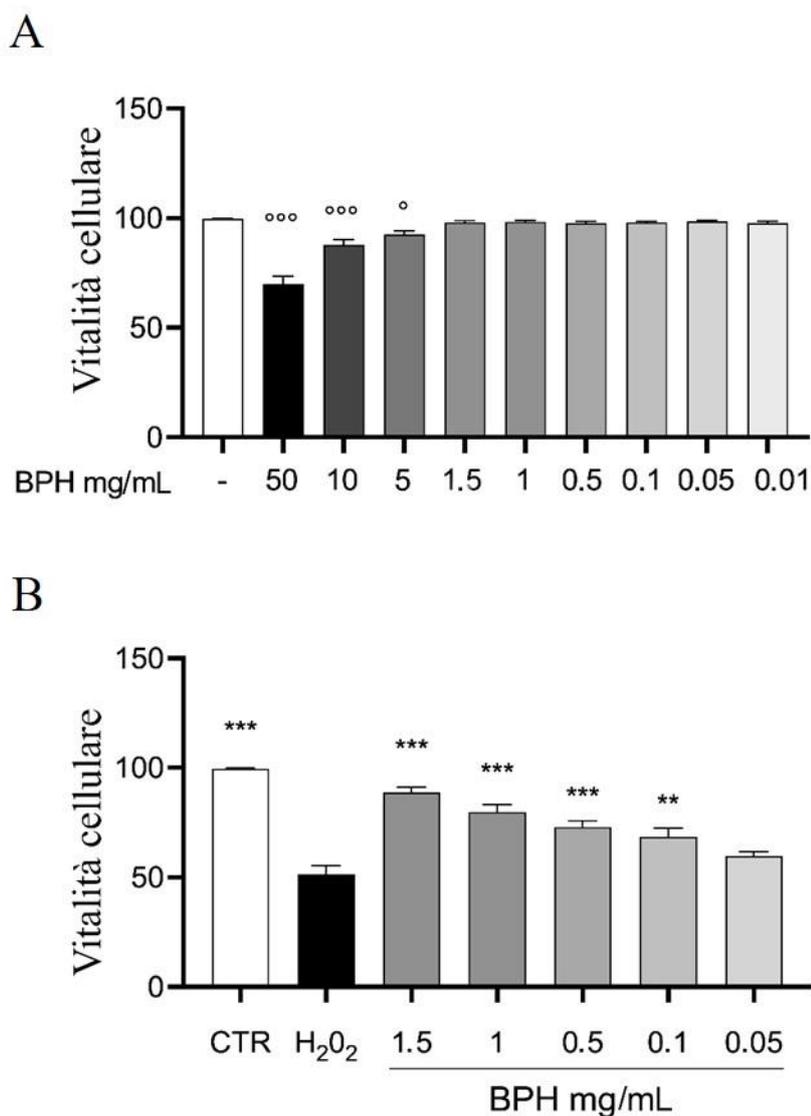
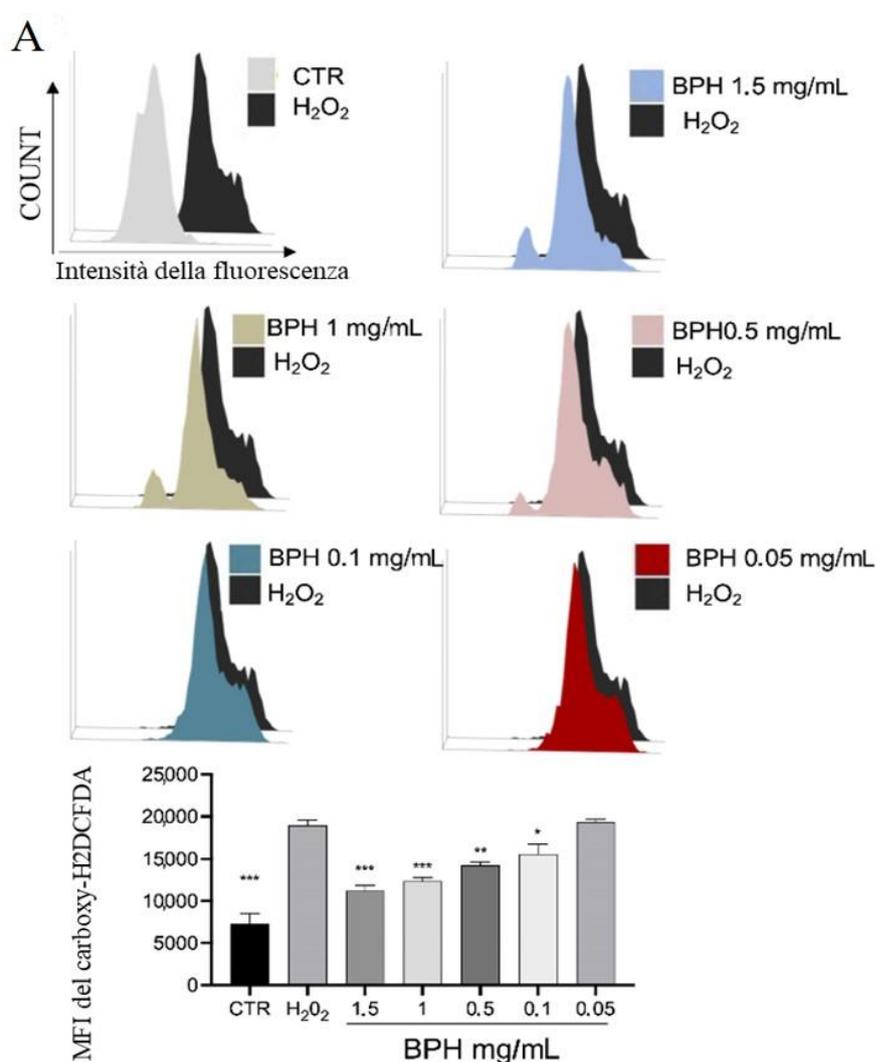


Figura 25 Vitalità cellulare di fibroblasti L-929. **(A)** Vitalità cellulare dopo 24 ore di esposizione agli idrolizzati proteici BPH. **(B)** Effetto protettivo degli idrolizzati BPH contro la citotossicità indotta da H₂O₂. I dati (media ± S.E.) sono rappresentativi di almeno tre esperimenti indipendenti. *** p < 0.001 rispetto a CTR; ° p < 0.05 rispetto a CTR; *** p < 0.001 rispetto a H₂O₂; ** p < 0.01 rispetto a H₂O₂ (Riolo et al., 2023).

Effetti dei BPH sulla produzione di ROS nelle cellule L-929

Come è noto, l'attività citotossica di H₂O₂ è correlata all'aumento dello stress ossidativo cellulare e dei ROS. Per valutare l'effetto protettivo dei BPH sullo stress ossidativo indotto da H₂O₂, sono stati marcati i ROS intracellulari con una sonda carbossi-H₂DCFDA. La colorazione fluorescente Carboxy-H₂DCFDA ha mostrato un aumento significativo dei livelli di ROS nelle cellule trattate con H₂O₂ rispetto alle cellule non trattate (Figura 26A, 26B). Nelle cellule trattate con BPH è stata osservata una diminuzione significativa dei livelli di ROS indotti da H₂O₂; le cellule trattate con le più alte concentrazioni di BPH (1.5 e 1 mg/mL) hanno mostrato effetti positivi comparabili sul decremento di ROS, mentre nelle cellule trattate con BPH a concentrazioni di 0.5 e 0.1 mg/mL, è stato osservato un effetto protettivo dose-dipendente contro lo stress ossidativo indotto da H₂O₂ (Figura 26A, 26B).



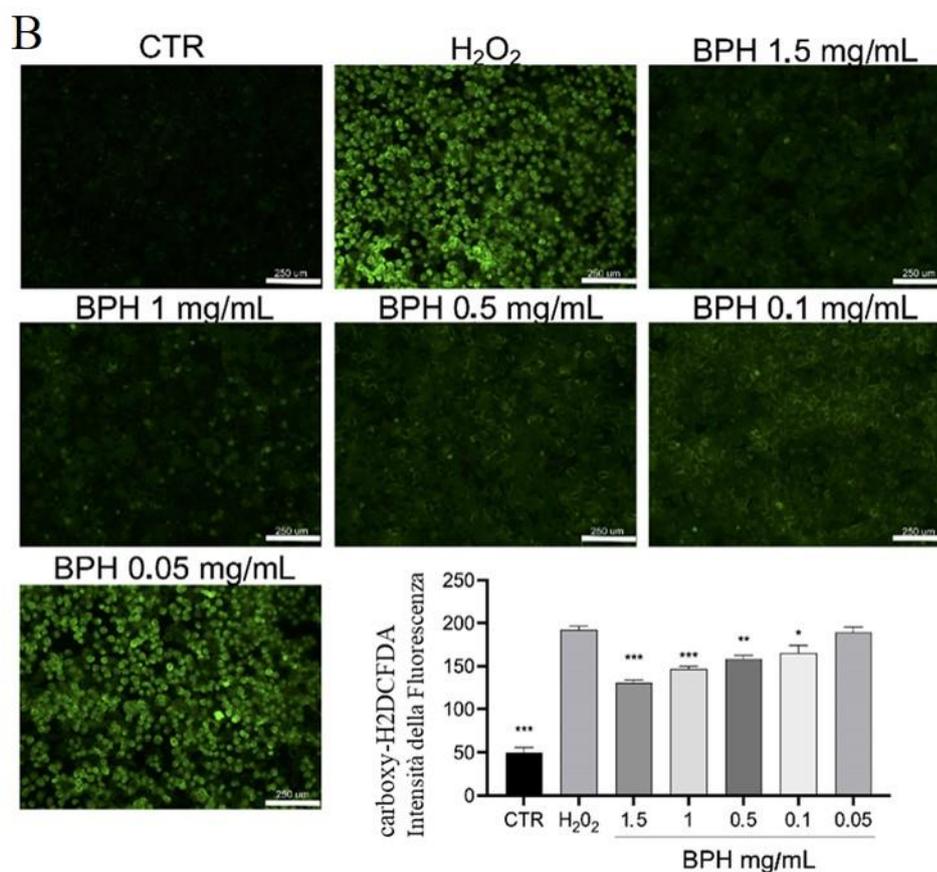


Figura 26 (A) Analisi citofluorimetrica della produzione dei ROS in ciascun gruppo sperimentale rispetto al gruppo H₂O₂. (B) Immagini di microscopia a fluorescenza di cellule positive al carbossi-H₂DCFDA per ciascuna condizione sperimentale. I dati (media \pm S.E.) sono rappresentativi di almeno tre esperimenti indipendenti. *** p < 0,001 rispetto a H₂O₂; ** p < 0,01 rispetto a H₂O₂; * p < 0,05 rispetto a H₂O₂ (Riolo et al., 2023).

Effetti degli idrolizzati proteici BPH sull'attivazione del fattore Nrf2

L'attivazione del fattore di trascrizione Nrf2, nelle cellule trattate con gli idrolizzati proteici BPH, ha determinato la riduzione della produzione di ROS, fornendo così ulteriori informazioni sul meccanismo alla base dell'effetto citoprotettivo mediato da BPH. La localizzazione e l'espressione di *Nrf2* sono state analizzate rispettivamente mediante immunofluorescenza e analisi qPCR. Dopo il trattamento con BPH alle concentrazioni di 1.5, 1, 0.5 e 0.1 mg/mL, le cellule L-929 hanno mostrato un aumento della sintesi di Nrf2 e della sua attivazione confermata della traslocazione nucleare (Figura 27A). Questi risultati sono stati confermati dall'analisi di espressione genica quantitativa (Figura 27B) in cui i livelli di mRNA di *nrf2* nelle cellule trattate con BPH

alle concentrazioni di 1 e 1.5 mg/ml erano 1.4 volte superiori rispetto al gruppo H₂O₂. Nelle cellule trattate con una concentrazione di idrolizzati più bassa (0.5 mg/ml), i livelli di mRNA erano 0.8 volte superiori rispetto al gruppo H₂O₂. Al contrario, la concentrazione più bassa (0.1 mg/mL) di BPH non ha avuto effetto sull'induzione dell'espressione genica di *Nrf2* che non ha infatti mostrato differenze significative rispetto a quella registrata nel trattamento con H₂O₂. Questi risultati mostrano che l'attivazione di *Nrf2* è dose-dipendente, cosicché all'aumentare della concentrazione di BPH aumenta l'espressione di *Nrf2*, confermando l'effetto citoprotettivo di BPH contro lo stress ossidativo indotto da H₂O₂ e dimostrano che gli idrolizzati possono modulare l'attività di *Nrf2* per fronteggiare lo stress ossidativo.

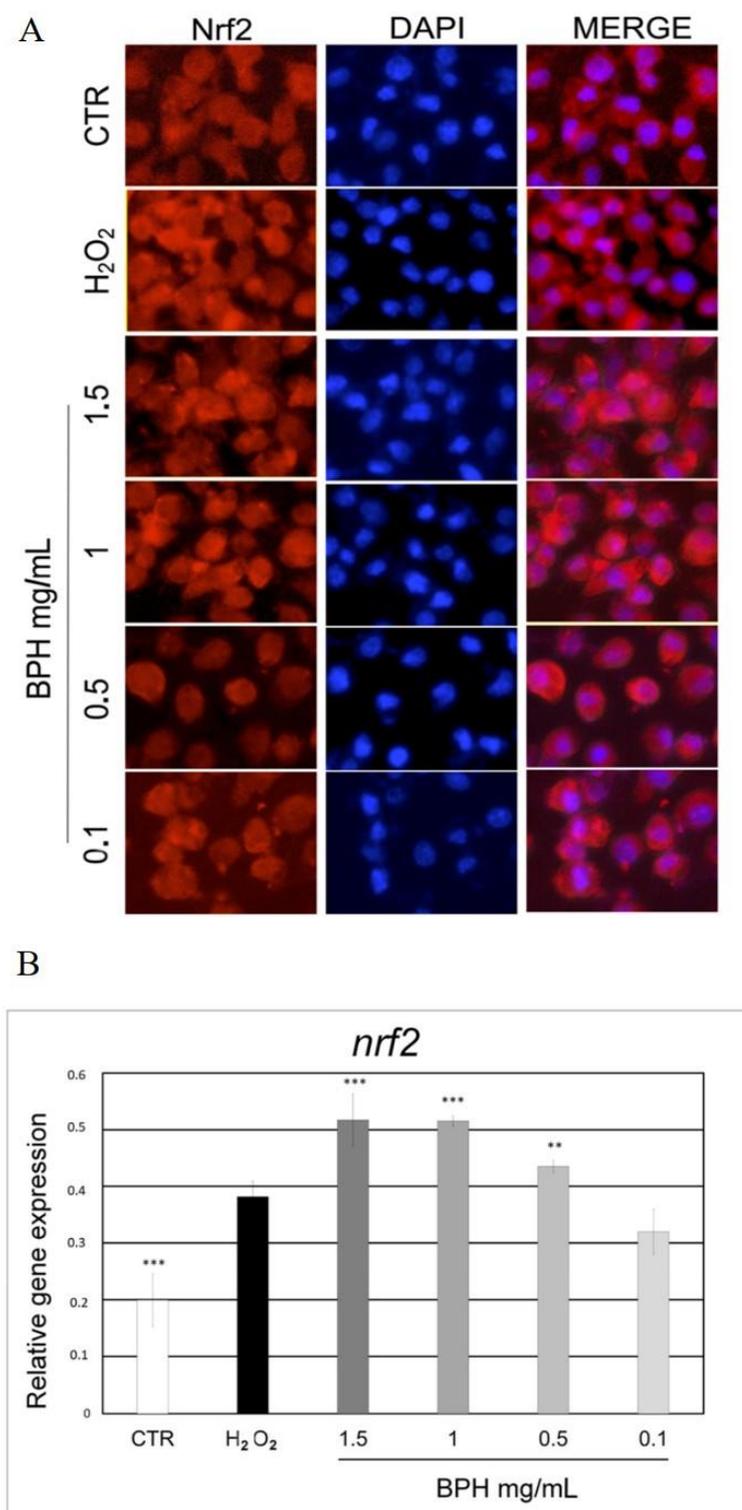


Figura 27 (A) Immunofluorescenza indiretta per l'espressione e la localizzazione intracellulare di Nrf2. Per la colorazione di contrasto nucleare, le cellule sono state colorate con DAPI. (B) Livelli di mRNA di *nrf2* nelle cellule L-929 trattate con BPH in ciascun gruppo sperimentale. I dati sono espressi come media \pm S.D. (n = 6). *** $p < 0.001$ rispetto a H₂O₂; ** $p < 0.01$ rispetto a H₂O₂ (Riolo et al., 2023).

4.4 Discussioni

La mosca soldato *H. illucens* ha ricevuto una crescente attenzione per il suo notevole potenziale come valida fonte proteica alternativa nella formulazione di mangimi per animali e acquacoltura, e per la sostenibilità dell'allevamento degli insetti che richiede minori risorse producendo impatti ambientali ridotti rispetto agli altri animali da allevamento (Van Huis e Oonincx 2017). Oltre all'utilizzo di questa biotecnologia come fonte proteica sostenibile per l'alimentazione animale, le proteine delle larve di BSF si sono dimostrate una preziosa fonte di molecole bioattive con attività biologiche (Zhu et al., 2020, Pan et al., 2022). L'idrolisi enzimatica delle proteine rappresenta una procedura ben validata per produrre peptidi di piccole dimensioni, nonché aminoacidi liberi caratterizzati da attività biologiche potenziate rispetto alla componente proteica di origine che includono proprietà antinfiammatorie, immunomodulanti, antiossidanti e antibatteriche (Hartmann e Meisel 2007, Firmansyah e Abduh 2019, Mintah et al., 2019). In studi più recenti, gli idrolizzati proteici ottenuti da BSF sono stati prodotti e caratterizzati per la loro composizione amminoacidica e la loro attività diretta di scavenging dei ROS (Firmansyah e Abduh 2019, Zhu et al., 2020).

Tuttavia, in base alle nostre conoscenze, non vi sono dati disponibili sugli effetti citoprotettivi degli idrolizzati proteici BPH, ottenuti attraverso un'idrolisi enzimatica, sui sistemi cellulari né sui meccanismi che sottendono alla protezione dalla citotossicità indotta dai ROS, a livello microscopico e molecolare. Nel presente progetto, viene dimostrato, per la prima volta, che gli idrolizzati proteici BPH prodotti dalle larve di BSF, in seguito a degrassamento e idrolisi enzimatica della frazione proteica, sono caratterizzati da rilevanti attività antiossidanti e citoprotettive in modelli cellulari *in vitro*. Dopo la caratterizzazione chimica degli idrolizzati BPH e l'analisi della distribuzione molecolare, i BPH ottenuti sono stati valutati per le loro proprietà antiossidanti in un modello di cellule di stress ossidativo, nel quale cellule L-929 sono state trattate con H₂O₂. La procedura di produzione di BPH su piccola scala ha fornito le informazioni preliminari per ridimensionare i processi nella prospettiva di future applicazioni degli idrolizzati proteici di BSF in diversi campi industriali. Le estrazioni chimiche e la digestione sono state sostanzialmente eseguite in modo da ottenere la decomposizione delle macromolecole in molecole semplici e aminoacidi liberi (FAA). Alla fine dell'estrazione, la resa delle tre frazioni estratte, ovvero la frazione

grassa estratta attraverso l'utilizzo del solvente n-esano, la frazione idrosolubile contenente gli idrolizzati e gli aminoacidi liberi e, la frazione solida insolubile contenente chitina e chitosano, è paragonabile ai risultati riportati da altri autori (Khayrova et al., 2019, Zhu et al., 2020). La frazione idrosolubile ottenuta è stata sottoposta a digestione enzimatica per produrre idrolizzati proteici al fine di valutarne la potenziale attività biologica. Infatti, i derivati proteici, ovvero i peptidi chiave negli idrolizzati, i FAA e altre piccole molecole disciolte in acqua sono noti per essere caratterizzati da una maggiore attività biologica rispetto alle proteine, pur mantenendo il loro valore nutrizionale (Mouithys-Mickalad et al., 2020). Negli animali, i processi digestivi, così come i peculiari processi metabolici cellulari, possono influenzare l'attività biologica di proteine e peptidi mediante meccanismi cellulari ubiquitari o specie-specifici che a loro volta modulano l'attività biologica delle proteine ingerite (Roques et al., 2020). La caratterizzazione delle proteine ottenute dalle larve BSFL e dei loro idrolizzati BPH mediante elettroforesi verticale (SDS-PAGE) ha mostrato che i pattern proteici non erano influenzati dai tre solventi organici utilizzati per l'estrazione delle proteine. Nella prospettiva della produzione di idrolizzati BPH su larga scala, l'utilizzo di un solvente per l'estrazione delle proteine che causa un minor impatto ambientale, come l'acetato di etile, dovrebbe essere preso in considerazione per applicazioni future. L'analisi della distribuzione del peso molecolare ha mostrato che la reazione di idrolisi ha prodotto un pattern proteico caratterizzato da diverse bande di dimensioni inferiori ai 25 kDa, che definiscono la frazione peptidica (Firmansyah e Abduh, 2019). Le bande proteiche con peso molecolare nel range compreso tra 25 e 37 kDa potrebbero appartenere a proteasi usate per catalizzare la reazione di idrolisi, come già discusso da Firmansyah e Abduh (2019). In generale, le differenze di distribuzione dei pesi molecolari dei nostri idrolizzati proteici BPH rispetto a quanto riportato in studi precedenti possono essere attribuite a diversi fattori, tra i quali l'utilizzo di diverse proteasi, il pH e il tempo di idrolisi. Durante il processo di idrolisi enzimatica delle proteine di BSF, infatti, questi fattori determinano la formazione di piccoli peptidi e aminoacidi con differenti efficienze (Firmansyah e Abduh, 2019, Ravi et al., 2020, Zhu et al., 2020). I metaboliti presenti negli idrolizzati BPH sono stati caratterizzati e quantificati mediante spettroscopia NMR; nello specifico i risultati sono stati recuperati principalmente dagli esperimenti

NOESYpresat mentre altre tecniche NMR utilizzate (^1H NMR presat e cp_pr) non hanno mostrato differenze significative nelle regioni dello spettro utilizzate per l'integrazione. Il valore principale della tecnica NMR è la possibilità di ottenere profili di tutte le molecole presenti nei campioni senza alcuna modifica chimica o funzionalizzazione. Ciò consente la quantificazione simultanea di 30 specie, tra cui 16 FAA (15 aminoacidi alfa e 4-amminobutirrato), insieme ad acidi organici, ammine e altri prodotti chimici. Il profilo chimico è paragonabile agli estratti di Black Soldier Fly ottenuti da altri studi (Almeida et al., 2020). È stato già osservato, attraverso la spettroscopia NMR, che la composizione degli idrolizzati proteici di BSF è influenzata da alcuni fattori, quali i diversi metodi di abbattimento delle larve o i fenotipi metabolici. I nostri risultati sono coerenti con il metodo della pastorizzazione rapida utilizzata per uccidere le larve prima del processo di congelamento, così come i nostri dati preliminari degli spettri (non mostrati) di analisi dei BPH ottenuti dalle larve congelate lentamente (Leni et al., 2019, Ho et al., 2021). Il profilo dei metaboliti degli idrolizzati BPH ha evidenziato che tra gli aminoacidi identificati (leucina, isoleucina, valina, treonina, alanina, prolina, glutammato, metionina, aspartato, serina, fenilalanina, triptofano, tirosina, glicina e 4-aminobutirrato), l'alanina e il glutammato sono i composti azotati maggiormente solubilizzati dall'idrolisi enzimatica, e questi dati sono coerenti con i dati dei profili nutrizionali di BSF recentemente pubblicati (Giannetto et al., 2020a, Giannetto et al., 2020c). Inoltre, i profili aminoacidici riscontrati hanno mostrato quantità di valina, isoleucina e leucina superiori a quelli riportati per idrolizzati proteici prodotti dalle larve di BSF alimentate con scarti come il letame di pollame e altri rifiuti vegetali, ma comparabili a quelli relativi a larve alimentate con i rifiuti alimentari organici (Lalander et al., 2019, Surendra et al., 2020, Wang et al., 2020). Oltre al rilevamento e alla quantificazione degli aminoacidi, l'analisi NMR ha consentito l'identificazione di diversi metaboliti, tra cui etanolo, formiato, colina, betaina, uracile e ammine anche bioattive come la tiramina. L'intero pannello chimico fornisce una panoramica delle caratteristiche biochimiche degli idrolizzati proteici BPH. La presenza di etanolo e formiato può essere correlata a processi di fermentazione dovuti a microrganismi anaerobici (Ho et al., 2021), così come la presenza di 3-idrossipropionato (3-HPO), trimetilammina (TMA) e dimetilammina (DMA) può essere dovuta a processi di degradazione biologica. Infatti,

studi precedenti hanno dimostrato che TMA e DMA derivano dalla degradazione delle proteine da parte del microbiota intestinale di BSF (Zeisel et al., 1985). Riguardo il 3-HPO, è spesso implicato nelle vie batteriche che coinvolgono il suo isomero lattato e il glicerolo, la cui presenza è nota negli idrolizzati proteici di BSF (Oliver et al., 2016). Recentemente, molti studi hanno dimostrato che gli idrolizzati proteici ottenuti da insetti possiedono diverse attività biologiche (Zielińska et al., 2017). In particolare, studi recenti hanno evidenziato il potenziale biologico dei derivati peptidici della mosca soldato *H. illucens* suggerendo un importante potenziale antiossidante per questi derivati in cui la caratteristica composizione proteica e peptidica contribuisce all'importante attività biologica e al potenziale antiossidante (Firmansyah e Abduh 2019, Batish et al., 2020, Lu et al., 2022). In letteratura, le evidenze scientifiche delle proprietà biologiche degli idrolizzati di *H. illucens* in vitro sono assenti; di conseguenza, uno degli obiettivi del progetto di ricerca è stato quello di testare e valutare l'effetto degli idrolizzati BPH in un modello cellulare di stress ossidativo indotto da H₂O₂, utilizzando fibroblasti L-929. I nostri risultati hanno mostrato che il trattamento con gli idrolizzati BPH ha avuto un significativo effetto citoprotettivo contro la riduzione della vitalità cellulare indotta dal trattamento con H₂O₂. La riduzione della vitalità cellulare indotta da H₂O₂ è correlata infatti, all'aumento dello stress ossidativo cellulare e alla generazione di ROS. Tuttavia, i nostri risultati hanno mostrato che il trattamento con gli idrolizzati proteici BPH è stato in grado di ridurre significativamente la generazione intracellulare di ROS indotta dall'esposizione al perossido di idrogeno H₂O₂. Questo risultato può essere spiegato sia da un'azione dei BPH come *scavenger* dei ROS ma anche con la capacità dei BPH di stimolare le difese cellulari endogene. Infatti, il controllo intracellulare del contenuto di ROS viene raggiunto quando c'è un equilibrio tra la loro generazione e ed eliminazione da parte dei sistemi antiossidanti enzimatici e non enzimatici (Li et al., 2015). Come osservato da Mouithys-Mickalad (2020), l'attività di scavenging dei radicali liberi delle molecole derivate dalle proteine, è influenzata dalla composizione degli aminoacidi; infatti, gli aminoacidi idrofobici hanno un'attività di scavenging dei radicali superiore rispetto agli aminoacidi idrofili. I residui amminoacidici idrofobici possono aumentare le interazioni idrofobiche con i doppi strati lipidici di membrana dove sono in grado di esercitare una significativa capacità di scavenging dei radicali (Li et al., 2015, Zou et

al., 2016). I nostri risultati sulla riduzione dei ROS intracellulari nelle cellule trattate con gli idrolizzati BPH possono essere dovuti all'elevata concentrazione di aminoacidi idrofobici, come alanina, prolina, leucina, tirosina e fenilalanina, presenti nei BPH. Inoltre, la presenza di altri aminoacidi come tirosina, metionina e triptofano, noti per la loro bioattività antiossidante, potrebbe contribuire al ruolo citoprotettivo dei BPH. È importante sottolineare che la capacità di scavenger dei radicali liberi dipende anche dalla distribuzione del peso molecolare dei peptidi, in quanto quelli a basso peso molecolare potrebbero eliminare i radicali liberi in modo più efficiente rispetto ai peptidi a più alto peso molecolare (Zou et al., 2016). Nelle cellule trattate con gli idrolizzati BPH è stata osservata una ridotta produzione intracellulare di ROS; questo fenomeno potrebbe essere attribuito ai pattern peptidici inferiori a 25 kDa generati dalla reazione di idrolisi delle proteine di BSF e visualizzati mediante SDS-PAGE. Tuttavia, non si può escludere che gli effetti antiossidanti osservati nelle cellule trattate con BPH siano dovuti alla cooperazione di altri antiossidanti sconosciuti o non identificati nei nostri idrolizzati che partecipano all'azione protettiva contro lo stress ossidativo. Il meccanismo molecolare alla base degli effetti citoprotettivi delle BPH può coinvolgere Nrf2, un fattore di trascrizione dei geni che codificano gli enzimi antiossidanti che ha dimostrato di controllare l'espressione di componenti chiave del sistema antiossidante cellulare, così come gli enzimi coinvolti nella disintossicazione da ROS e xenobiotici e il metabolismo dell'heme, svolgendo così un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'omeostasi redox della cellula (Tonelli et al., 2018). In questo studio è stato osservato una significativa attivazione di Nrf2 dopo il trattamento con BPH, valutata sia a livello di espressione genica tramite qPCR che a livello di proteina. Infatti, le cellule trattate con gli idrolizzati BPH sono in grado di esprimere il gene *nrf2* e di sintetizzare la sua proteina corrispondente in misura maggiore rispetto al controllo. Inoltre è stato osservato un cambiamento della localizzazione subcellulare della proteina Nrf2 che, in seguito al trattamento con BPH, viene traslocata nel nucleo, un passaggio fondamentale per l'attivazione di questa proteina. Questi dati suggeriscono che il trattamento BPH migliora la risposta antiossidante delle cellule contro lo stress indotto dal perossido di idrogeno con conseguente azione citoprotettiva. Sono necessari ulteriori studi, già in corso, per valutare l'espressione dei geni coinvolti nella risposta antiossidante al fine di

confermare il ruolo degli idrolizzati in questo meccanismo di difesa cellulare e il ruolo di Nrf2 nell'attivazione della risposta antiossidante nelle cellule.

Se prendiamo in considerazione quest'ultimo decennio, la letteratura ha dimostrato che le larve di BSF rappresentano una fonte di proteine sostenibile e di alto valore nutrizionale per l'alimentazione di specie acquatiche. Dato che i regolamenti UE del 2017 consentono l'utilizzo della farina di BSF come fonte proteica alternativa e sostenibile in acquacoltura e la ricerca ne ha dimostrato il potenziale nutrizionale, i derivati a base di larve di BSF possiedono proprietà peculiari, anche nel promuovere la salute degli animali, rendendoli ingredienti preziosi nella formulazione dei mangimi. Uno studio recente ha dimostrato che la farina di pesce mostra un lieve comportamento antiossidante rispetto agli idrolizzati BPH nelle cellule dei neutrofili (Mouithys-Mickalad et al., 2020); inoltre, nel nostro precedente studio, è stata dimostrata anche una diversa modulazione della risposta immunitaria nell'organismo modello zebrafish alimentato con farine di BSF (Lanes et al., 2021). Questo aspetto rappresenta un'opportunità rilevante per il settore dell'acquacoltura che è spesso soggetto a costi incrementati a causa dell'uso di farmaci e integratori alimentari per i pesci necessari per far fronte alle comuni infezioni da patogeni.

5 Capitolo 3

*Valutazione della sicurezza microbiologica delle larve di *H. illucens* allevate su scarti alimentari*

5.1 Background

Negli ultimi decenni si è assistito ad un crescente interesse sia verso la produzione di nuove fonti proteiche, che possono essere destinate al consumo umano e al settore mangimistico, sia verso la valorizzazione degli scarti organici sprecati lungo le filiere agroalimentari. L'utilizzo di insetti, ed in particolare di *H. illucens*, fornisce la concreta possibilità di trasformare i sottoprodotti vegetali dell'industria alimentare in materiale proteico dalle elevate proprietà nutrizionali. Tuttavia, i dati attualmente disponibili sulla sicurezza igienico-sanitaria nell'utilizzo di scarti organici per l'allevamento di *H. illucens* mirato alla produzione di proteine, sono ancora del tutto insufficienti per rendere tale biotecnologia applicabile al mercato attuale.

In questo scenario nasce l'ulteriore obiettivo di questo progetto di dottorato che mira alla valutazione dei profili microbiologici delle larve di BSF allevate su due substrati agroalimentari diversi per composizione e dell'efficacia di trattamenti post-raccolta delle larve, quali la pastorizzazione, per aumentare la sicurezza igienico-sanitaria sull'utilizzo degli scarti per l'allevamento delle larve.

I risultati potranno fornire preziose indicazioni sulla sicurezza igienico-sanitaria dell'allevamento delle larve di BSF su scarti agroalimentari e sulle misure da adottare per minimizzare il rischio microbiologico nella prospettiva di utilizzare la biomassa larvale per la produzione di fonti nutrizionali sostenibili e molecole bioattive con proprietà citoprotettive in un contesto di economia circolare.

5.2 Materiali e metodi

5.2.1 Preparazione dei substrati di crescita S1 e S2

Gli esemplari di *H. illucens* sono stati allevati e raccolti presso l'allevamento *Progetto Hermetia* (www.progettohermetia.it).

I substrati di crescita delle larve sono stati formulati per ottenere un campione rappresentativo del rifiuto umido urbano prodotto nelle abitazioni domestiche: sono

stati quindi miscelati scarti di carne, vegetali e prodotti lattiero caseari derivanti dal consumo giornaliero di 5 famiglie e posti in sacchetti di plastica chiusi per 2 giorni (tempo medio di raccolta del rifiuto umido da parte dei comuni).

I substrati così preparati sono stati successivamente macinati e posti in vasche diverse in modo da ottenere due repliche (A e B) per ciascun substrato (S1 e S2).

Subito dopo la schiusa delle uova, le larve sono state poste, per cinque giorni, su un substrato di svezzamento composto dal 35% di farina di frumento con il 65% di acqua. Successivamente sono state distribuite in vasche diverse e alimentate sui due diversi substrati preparati come descritto sopra:

- Substrato di crescita S1: costituito da una miscela di scarti vegetali, carni e prodotti lattiero-caseari.
- Substrato di crescita S2: è stato prodotto come il substrato S1 ad eccezione della componente carne.

5.2.2 Allevamento delle larve e trattamento termico

Dopo i cinque giorni di svezzamento le larve sono state alimentate con i substrati S1 e S2 e mantenute in condizioni di allevamento controllate e sovrapponibili per entrambe le repliche fino al raggiungimento dello stadio di prepupa. Alla fine dell'esperimento le larve sono state raccolte e conservate a 4°C in modo da raggiungere la quiescenza. Parte delle larve vive raccolte da entrambi i substrati di crescita sono state lavate in acqua corrente, asciugate per rimuovere l'acqua in eccesso e pastorizzate alla temperatura di 75° C per 1, 3 e 5 minuti (LP1, LP3, LP5). Subito dopo il trattamento, le larve sono state immerse in acqua ghiacciata, lavate nuovamente, asciugate a temperatura ambiente e confezionate in sacchetti di plastica sigillati sottovuoto. Sono stati inoltre campionati anche i 2 substrati (S1A, S1B, S2A, S2B) e i digestati rappresentati dallo scarto prodotto dal processo di bioconversione larvale (DS1A, DS1B, DS2A, DS2B). La Tabella 10 mostra i campioni, con le relative sigle, che sono stati considerati per le analisi chimiche e microbiologiche.

Campioni	Substrato 1		Substrato 2	
	A	B	A	B
Substrato	S1A	S1B	S2A	S2B
Larve non pastorizzate	LS1A	LS1B	LS2A	LS2B
Larve Pastorizzate 1'	LP1S1A	LP1S1B	LP1S2A	LP1S2B
Larve Pastorizzate 3'	LP3S1A	LP3S1B	LP3S2A	LP3S2B
Larve pastorizzate 5'	LP5S1A	LP5S1B	LP5S2A	LP5S2B
Digestato	DS1A	DS1B	DS2A	DS2B

Tabella 10 Campioni di substrato, larve vive, larve pastorizzate per 1 minuto, larve pastorizzate per 3 minuti, larve pastorizzate per 5 minuti e digestato. Tutti i campioni sono stati suddivisi in base ai substrati di crescita e alle repliche.

5.3 Analisi chimiche

Per ogni campione sono stati misurati i parametri di pH (AOAC 981.12 1982) attraverso l'utilizzo di una sonda ad infissione e del pHmetro Hanna Instruments HI9023CW e di attività dell'acqua (water activity, Aw) mediante un misuratore AquaLab - Serie 4TE applicando la tecnica del punto di rugiada.

5.4 Analisi microbiologiche

Le analisi microbiologiche sono state condotte presso l'Università degli Studi di Messina nel laboratorio di "Ispezione degli alimenti di origine animale" su tutti i campioni riportati in tabella 9. Da ogni campione sono state prelevate due aliquote da 25 g che sono state inserite in buste sterili da stomacher; successivamente le due aliquote sono state diluite 1:9 (w/v), una con acqua peptonata tamponata e l'altra con Fraser Broth Base (Biolife, Milano, Italia). I campioni diluiti sono stati omogenizzati per 60 secondi a 250 battiti al minuto utilizzando uno stomacher (400 Circulator; International PBI s.p.a., Milano, Italia). La prima aliquota è stata utilizzata per determinare: conta dei batteri totali (CBT), conta dei batteri coliformi (COLIFORMI), conta di lieviti e muffe (YEAST e MOLD), conta dei batteri lattici mesofili (LAB), conta di *Escherichia coli* beta-glucoronidasi positivi (ECOL), conta degli *Enterobacteriaceae* (ENTEROBATTERI), conta di *Pseudomonas spp.* (PSEUDOMONAS), ricerca e conta di clostridi (CLOSTRIDI) e ricerca di *Salmonella sp.* (SAL) con arricchimento in Mueller Kauffmann Tetrathionate Broth base (Biolife,

Milano, Italia) ed in Rappaport Vassiliadis Soy Broth (Biolife, Milano, Italia). La seconda aliquota è stata utilizzata per valutare la ricerca di *Listeria monocytogenes* (LISTERIA) mediante arricchimenti selettivi in Fraser Broth Base e Half Fraser (Biolife, Milano, Italia). I risultati sono stati espressi come valore di riduzione logaritmica dei diversi indicatori igienico-sanitari presi in esame, in funzione del tempo di trattamento termico. Tutte le informazioni riguardanti la tipologia di terreni di coltura utilizzati, tempi e temperatura di incubazione sono riportate nella Tabella 11, unitamente alle specifiche norme ISO di riferimento.

	ISO	TERRENO DI COLTURA	T°C	Tempo (h)
CBT	4833-1:2013	Plate Count Agar (Biolife, Milano, Italia)	30 ± 1	72 ± 3
COLIFORMI	4832:2016	Violet Red Bile Agar (Biolife, Milano, Italia)	30 ± 1	24 ± 2
YEAST e MOLD	21527-1:2008	Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (Biolife, Milano, Italia)	25 ± 1	120
LAB	15214:1998	MRS agar (Biolife, Milano, Italia)	30 ± 1	48 ± 2
ECOL	16649-2:2010	tryptone bile X-glucuronide (Biolife, Milano, Italia)	44 ± 1	24 ± 2
ENTEROBATTERI	21528-1:2017	Violet Red Bile Glucose Agar (Biolife, Milano, Italia)	37 ± 1	24 ± 2
PSEUDOMONAS		Pseudomonas Agar Base + CFC (Biolife, Milano, Italia)	25 ± 1	72 ± 2
CLOSTRIDI		TSC agar (Biolife, Milano, Italia)	37 ± 1	24 ± 2
SAL	6579-1:2017	Chromogenic <i>Salmonella</i> Agar (Biolife, Milano, Italia)	37 ± 1	24 ± 3
		Xylose Lysine Deoxycholate Agar (Biolife, Milano, Italia)		
LISTERIA	11290-1:2017	Agar <i>Listeria</i> according to Ottaviani e Agosti (Biolife, Milano, Italia)	37 ± 1	48 ± 2
		<i>Listeria</i> Palcam Agar (Biolife, Milano, Italia)		

Tabella 11 Rappresentazione del metodo, delle temperature e dei tempi di incubazione utilizzati per la valutazione di ciascuna analisi microbiologica.

5.3 Risultati

Per valutare il livello di sicurezza e di igiene delle larve allevate sugli scarti alimentari (S1 e S2) sono state condotte una serie di analisi microbiologiche qualitative e quantitative su specifiche popolazioni microbiche.

5.3.1 Substrato S1: profili microbiologici

L'analisi dei profili microbiologici, ha mostrato che le diverse popolazioni microbiche analizzate sono diversamente distribuite nel substrato 1, nelle larve allevate sul substrato 1 e nel residuo (digestato) che rimane dopo il processo di bioconversione (Tabella 12). Come si può osservare nel substrato, la CBT equivale a 6.23 log ufc/g; in questo caso la percentuale maggiore è caratterizzata dalla presenza di batteri lattici con un valore di 5 log ufc/g seguita da lieviti (0.7 log ufc/g), enterobatteri (0.5 log ufc/g) e muffe (0.5 log ufc/g). Nel substrato non è stata riscontrata la presenza di clostridi, *Listeria monocytogenes* o *Salmonella spp.*

Log ufc/g	S1	DS1	LS1
CBT	6.23	9.28	9.54
Batteri lattici	5	7.57	8.48
Enterobatteri	0.45	7.43	7.04
Coliformi	0.30	5.99	6.20
<i>E. coli</i>	0	5.29	6.08
<i>P. aeruginosa</i>	0	6.28	6.80
Lieviti	0.70	5.99	5.18
Muffe	0.50	7.24	4.80
Clostridi	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>
<i>Salmonella spp.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>
<i>L. monocytogenes</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>

Tabella 12 Valutazione microbiologica di substrato (S1), digestato (DS1) e larve vive allevate su S1 (LS1).

Il digestato ha mostrato valori di CBT di 9.28 log ufc/g con una predominanza di batteri lattici (7.57 log ufc/g) seguita da enterobatteri (7.44 log ufc/g). A differenza del

substrato, nel digestato è stata riscontrata la presenza di *P. aeruginosa* (6.29 log ufc/g) e di *E. coli* (5.29 log ufc/g); le analisi sulle ricerche di clostridi, *L. monocytogenes* e *Salmonella spp.* sono risultate negative. Le larve cresciute in S1 hanno mostrato carica microbica simile a quelle del digestato con una CBT di 9.54 log ufc/g e, come negli altri due gruppi, si ha una predominanza di batteri lattici (8.48 log ufc/g), seguiti da enterobatteri (7.04 log ufc/g) e coliformi (6.20 log ufc/g). Come nel digestato, anche nelle larve è stata osservata la presenza di *E. coli* (6.08 log ufc/g), *P. aeruginosa* (5.80 log ufc/g), lieviti (5.18 log ufc/g) e muffe (4.80 log ufc/g); di contro, non è stata rivelata la presenza di clostridi, *L. monocytogenes* e *Salmonella spp.* (Figura 28).

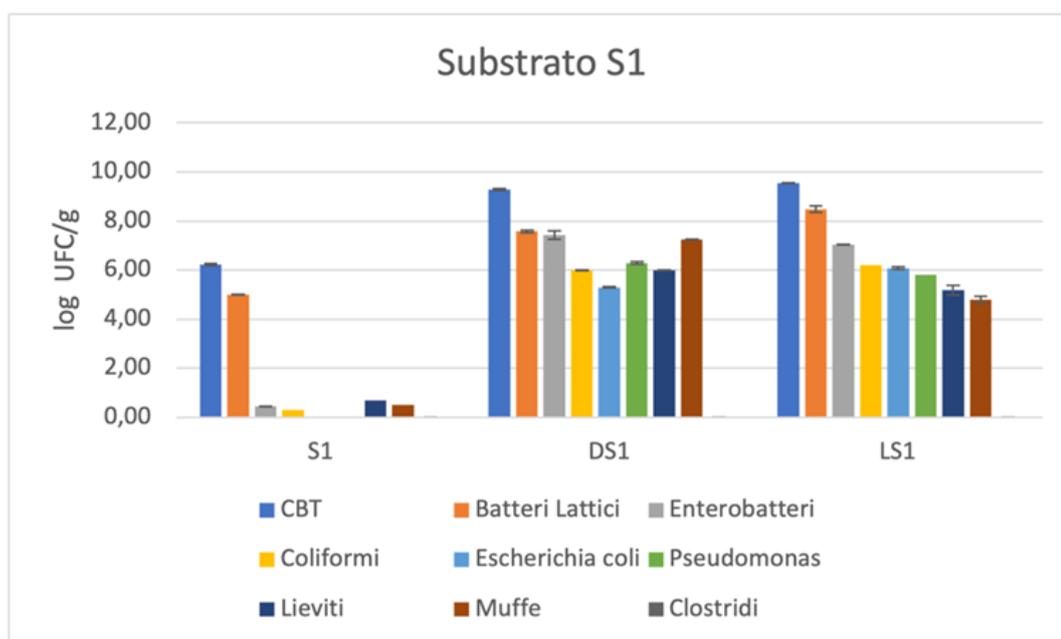


Figura 28 Rappresentazione grafica delle popolazioni microbiche presenti nel substrato (S1), nel digestato (DS1) e nelle larve (LS1).

5.3.2 Substrato S1: effetti della pastorizzazione

Sono stati effettuati trattamenti di pastorizzazione a 75°C in tre tempi diversi (1, 3 e 5 minuti) al fine di ridurre la contaminazione microbica. I risultati delle analisi microbiologiche hanno mostrato delle differenze nei profili e nelle cariche batteriche tra le larve non pastorizzate e le larve che hanno subito il trattamento (Tabella13) (Figura 29).

<i>Log ufc/g</i>	LS1	LP1S1	LP3S1	LP5S1
CBT	9.54	8.48	7.22	7.69
Batteri lattici	8.48	7.76	2.99	4.12
Enterobatteri	7.04	7.48	1.86	0
Coliformi	6.20	0	0	0
<i>E. coli</i>	6.08	5.99	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	5.80	0	0	0
Lieviti	5.18	3.49	0	0
Muffe	4.80	4.99	2.15	2.38
Clostridi	<i>n.r</i>	<i>n.r</i>	<i>n.r</i>	<i>n.r</i>
<i>Salmonella spp.</i>	<i>n.r</i>	<i>n.r</i>	<i>n.r</i>	<i>n.r</i>
<i>L. monocytogenes</i>	<i>n.r</i>	<i>n.r</i>	<i>n.r</i>	<i>n.r</i>

Tabella 13 Valutazione microbiologica di larve vive (**LS1**), larve pastorizzate per 1 minuto (**LP1S1**), larve pastorizzate per 3 minuti (**LP3S1**) e larve pastorizzate per 5 minuti (**LP5S1**).

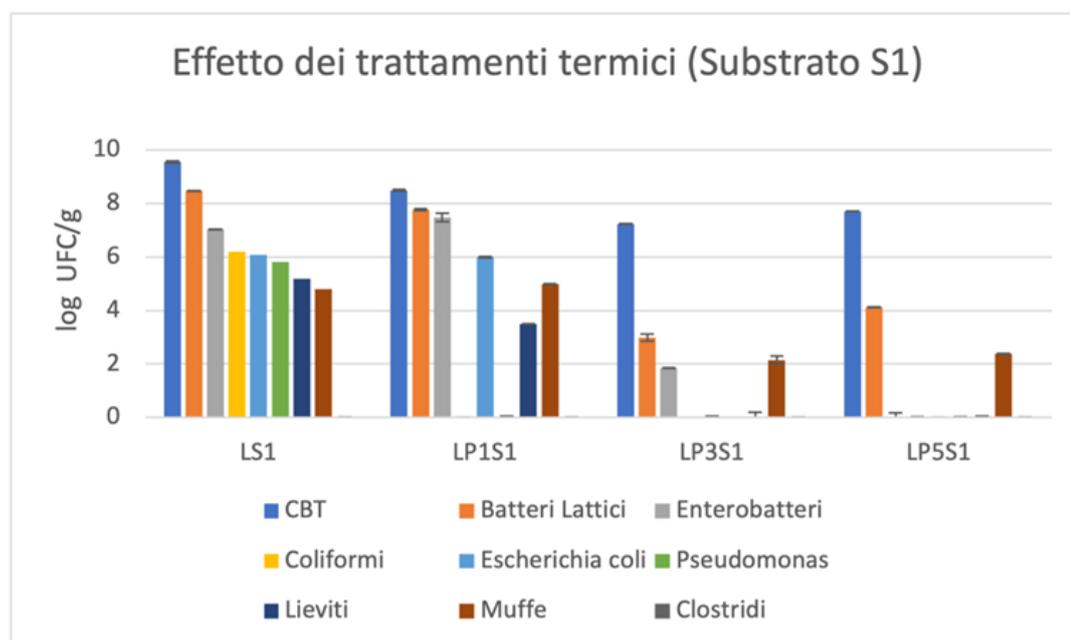
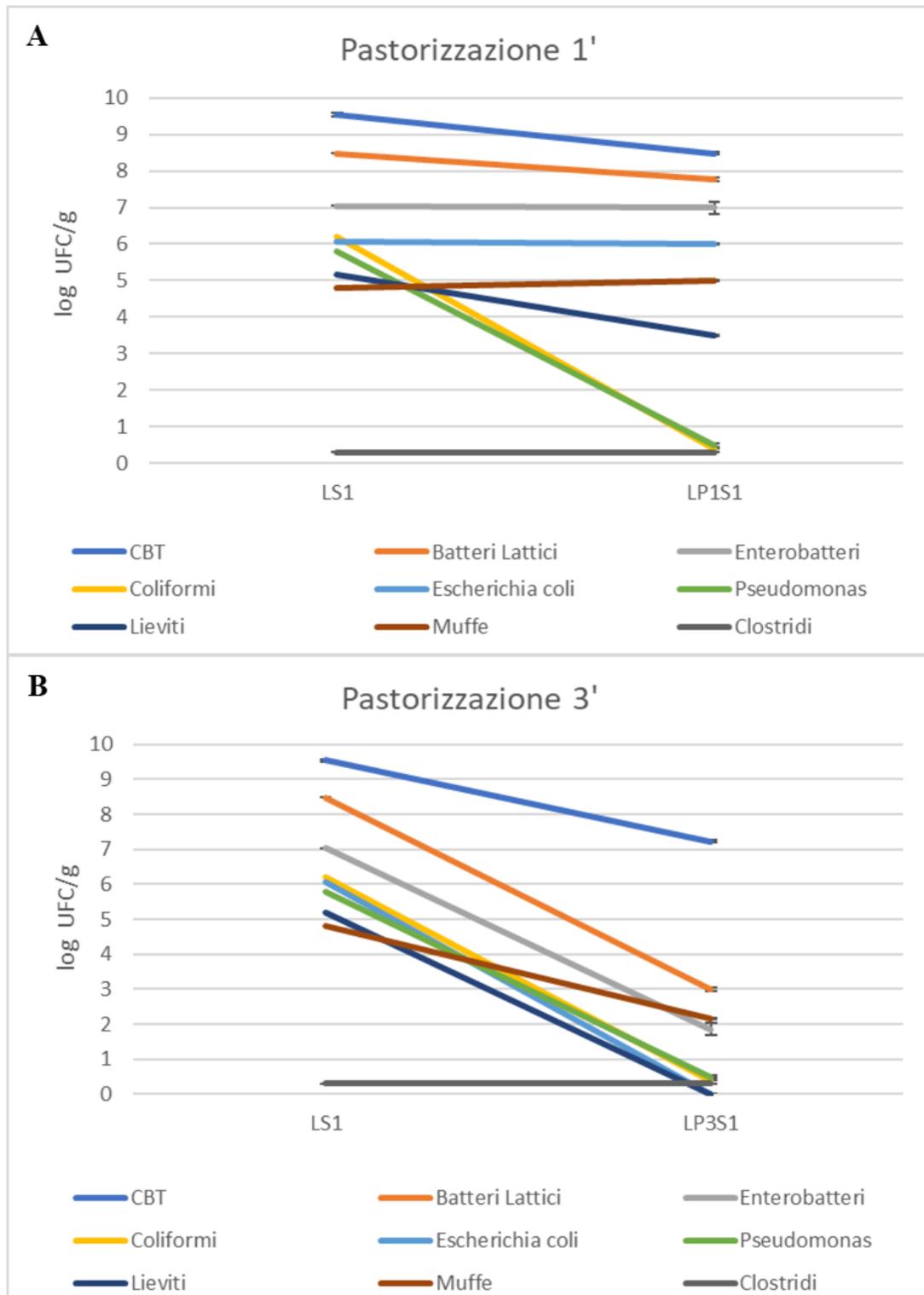


Figura 29 Rappresentazione grafica delle popolazioni microbiche presenti in larve non pastorizzate (**LS1**), larve pastorizzate per 1 minuto (**LP1S1**), larve pastorizzate per 3 minuti (**LP3S1**) e larve pastorizzate per 5 minuti (**LP5S1**).

La pastorizzazione ha avuto un effetto positivo sull'abbassamento della carica microbica; infatti, anche se in maniera lieve, i valori di CBT osservati nelle larve

pastorizzate per 1, 3 e 5 minuti (rispettivamente 8.48 log ufc/g, 7.23 log ufc/g e 7.69 log ufc/g) sono stati inferiori rispetto a quelli riscontrati nelle larve che non hanno subito il trattamento (9.54 log ufc/g). Come si può osservare nella tabella 13, dopo 1 minuto di pastorizzazione, la presenza di coliformi e *P. aeruginosa* è risultata negativa e si assiste ad una riduzione dei lieviti (Figura 30A). La pastorizzazione per 3 minuti risulta efficace per la riduzione di batteri come *E coli* e i lieviti che sono risultati assenti, inoltre, le popolazioni di enterobatteri hanno mostrato valori nettamente inferiori (1.86 log ufc/g) rispetto a quelli riscontrati nelle larve non pastorizzate (7.04 log ufc/g) e anche le muffe sono state ridotte da valori di 4.80 log ufc/g in LS1 a 2.15 log ufc/g (Figura 30B). La pastorizzazione per 5 minuti è stato il trattamento con la maggiore efficacia nella riduzione delle popolazioni microbiche presenti nelle larve; infatti nelle larve pastorizzate L P5S1 gli enterobatteri sono risultati assenti, mentre le uniche popolazioni microbiche presenti sono state batteri lattici e muffe che hanno mostrato valori di 4.12 log ufc/g (batteri lattici) e 2.38 log ufc/g (muffe), notevolmente più bassi rispetto ai 8.48 log ufc/g e 4.80 log ufc/g delle larve non pastorizzate. In tutti i campioni di larve pastorizzate e non pastorizzate non è stata osservata la presenza di clostridi, *Salmonella spp.* e *L. monocytogenes* (Figura 30C).



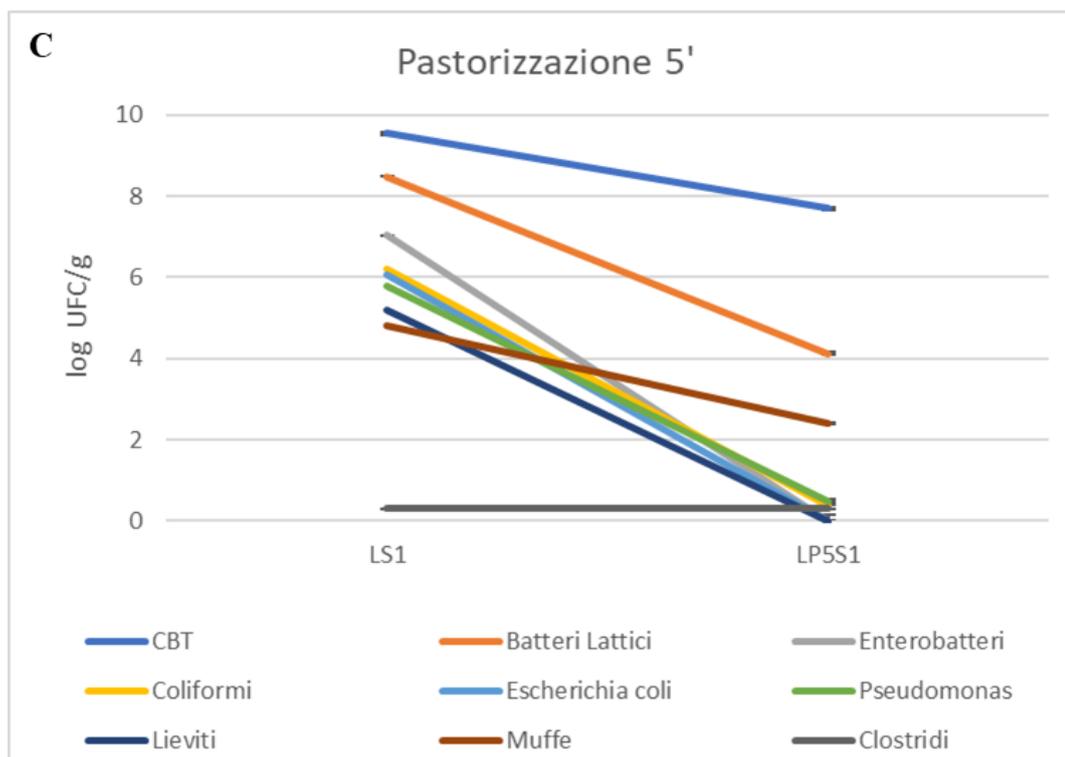


Figura 30 Effetti della pastorizzazione sulle popolazioni microbiche presenti nelle larve trattate per un minuto (A), tre minuti (B) e cinque minuti (C).

5.3.3 Substrato S2: profili microbiologici

Il substrato 2 (S2) è stato realizzato, come il substrato S1, in modo da rappresentare il rifiuto umido urbano prodotto dalle abitazioni domestiche, ma con l'esclusione della carne. La valutazione delle popolazioni microbiche è stata effettuata sui campioni di substrato, digerito e larve cresciute nel medesimo substrato (Tabella 14) (Figura 31).

<i>Log ufc/g</i>	S2	DS2	LS2
CBT	7.39	9.34	9.54
Batteri lattici	7.13	7.82	8.48
Enterobatteri	0.45	7.22	7.04
Coliformi	0	5.99	6.45
<i>E. coli</i>	0	5.87	6.08
<i>P. aeruginosa</i>	0	7.88	6.28
Lieviti	0	5.97	5.18
Muffe	0	7.24	4.80

Clostridi	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>
<i>Salmonella spp.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>
<i>L. monocytogenes</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>	<i>n.r.</i>

Tabella 14 Valutazione microbiologica di substrato (S2), digestato (DS2) e di larve vive allevate su substrato S2 (LS2).

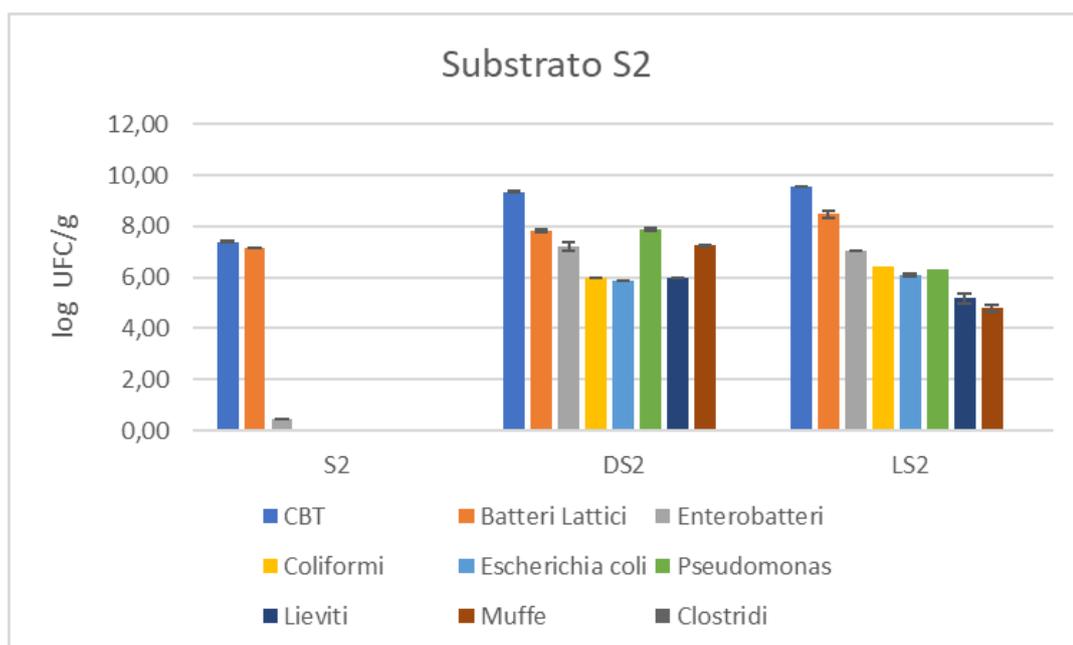


Figura 31 Rappresentazione grafica delle popolazioni microbiche presenti nel substrato (S2), nel digestato (DS2) e nelle larve (LS2).

Come si può osservare nella tabella sopra riportata, in S2 la CBT ha un valore di 7.39 log ufc/g, dove le specie microbiche più rappresentative sono i batteri lattici con un valore di 7.13 log ufc/g, seguite dagli enterobatteri con un valore nettamente inferiore (0.45 log ufc/g) rispetto ai batteri lattici. A differenza di S1, in S2 i coliformi, *E. coli*, *P. aeruginosa*, lieviti e muffe risultano assenti. Nel digestato la presenza di popolazioni microbiche è risultata maggiore rispetto al substrato; infatti, in DS2 la CBT è di 9.34 log ufc/g, un valore che si avvicina molto al valore soglia dove la crescita dei microorganismi viene inibita a causa di fattori limitanti come la competizione e lo spazio (*quorum sensing*). Le popolazioni microbiche maggiormente presenti in DS2 sono state *P. aeruginosa* (7.88 log ufc/g), batteri lattici (7.82 log ufc/g), muffe (7.24 log ufc/g) ed enterobatteri (7.22 log ufc/g) seguite da coliformi, lieviti ed *E. coli*. Nelle larve le popolazioni microbiche osservate erano più simili a

quelle di DS2 che a quelle di S2. I valori di CBT sono stati di 9.74 log ufc/g e le popolazioni maggiormente presenti sono state batteri lattici (8.48 log ufc/g) ed enterobatteri (7.04 log ufc/g). In tutti i campioni S2, DS2 e LS2 non è stata rivelata alcuna presenza di clostridi, *Salmonella spp.* e *L. monocytogenes*.

5.3.4 Substrato S2: effetti della pastorizzazione

Una parte delle larve cresciute sul substrato S2 (LS2) è stata sottoposta a pastorizzazione per 1, 3 e 5 minuti ed è stato valutato l'effetto di questo trattamento sulle variazioni delle popolazioni microbiche (Tabella 15) (Figura 32).

<i>Log ufc/g</i>	LS2	LP1S2	LP3S2	LP5S2
CBT	9.54	8.43	7.19	7.45
Batteri lattici	8.48	7.79	3.69	3.43
Enterobatteri	7.04	7.26	2.01	0
Coliformi	6.45	0	0	0
<i>E. coli</i>	6.08	6.42	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	6.28	6.28	0	0
Lieviti	5.18	0	0	0
Muffe	4.80	5.33	0	0
Clostridi	<i>n.r</i>	<i>n.r</i>	<i>n.r</i>	<i>n.r</i>
<i>Salmonella spp.</i>	<i>n.r</i>	<i>n.r</i>	<i>n.r</i>	<i>n.r</i>
<i>L. monocytogenes</i>	<i>n.r</i>	<i>n.r</i>	<i>n.r</i>	<i>n.r</i>

Tabella 15 Valori delle popolazioni microbiche presenti in larve non pastorizzate (**LS2**), larve pastorizzate per 1 minuto (**LP1S2**), larve pastorizzate per 3 minuti (**LP3S2**) e larve pastorizzate per 5 minuti (**LP5S2**).

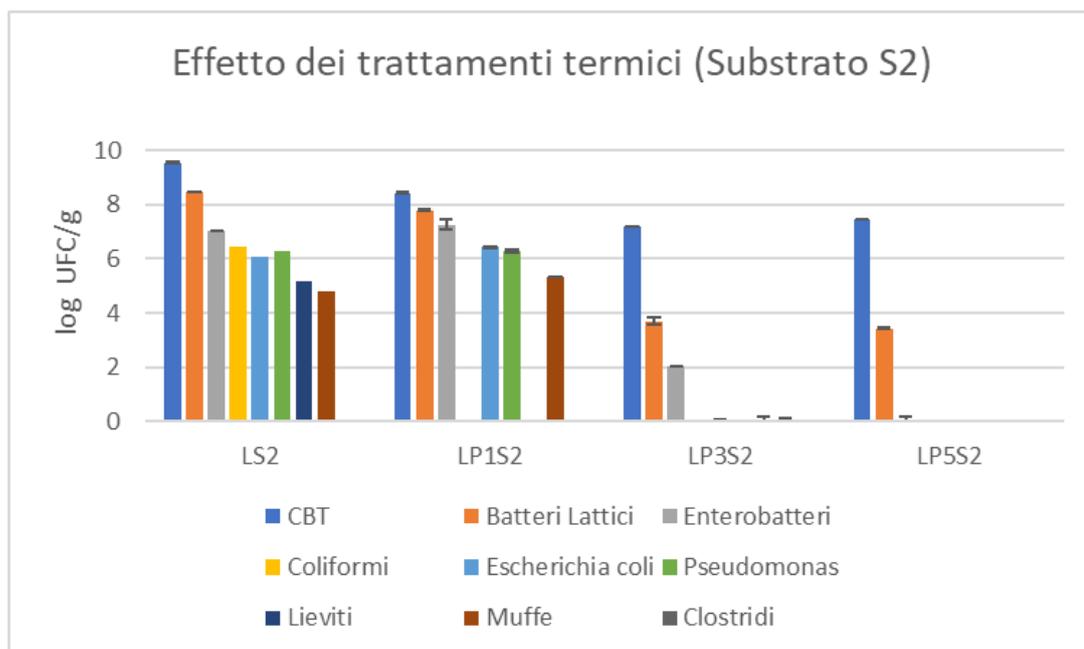
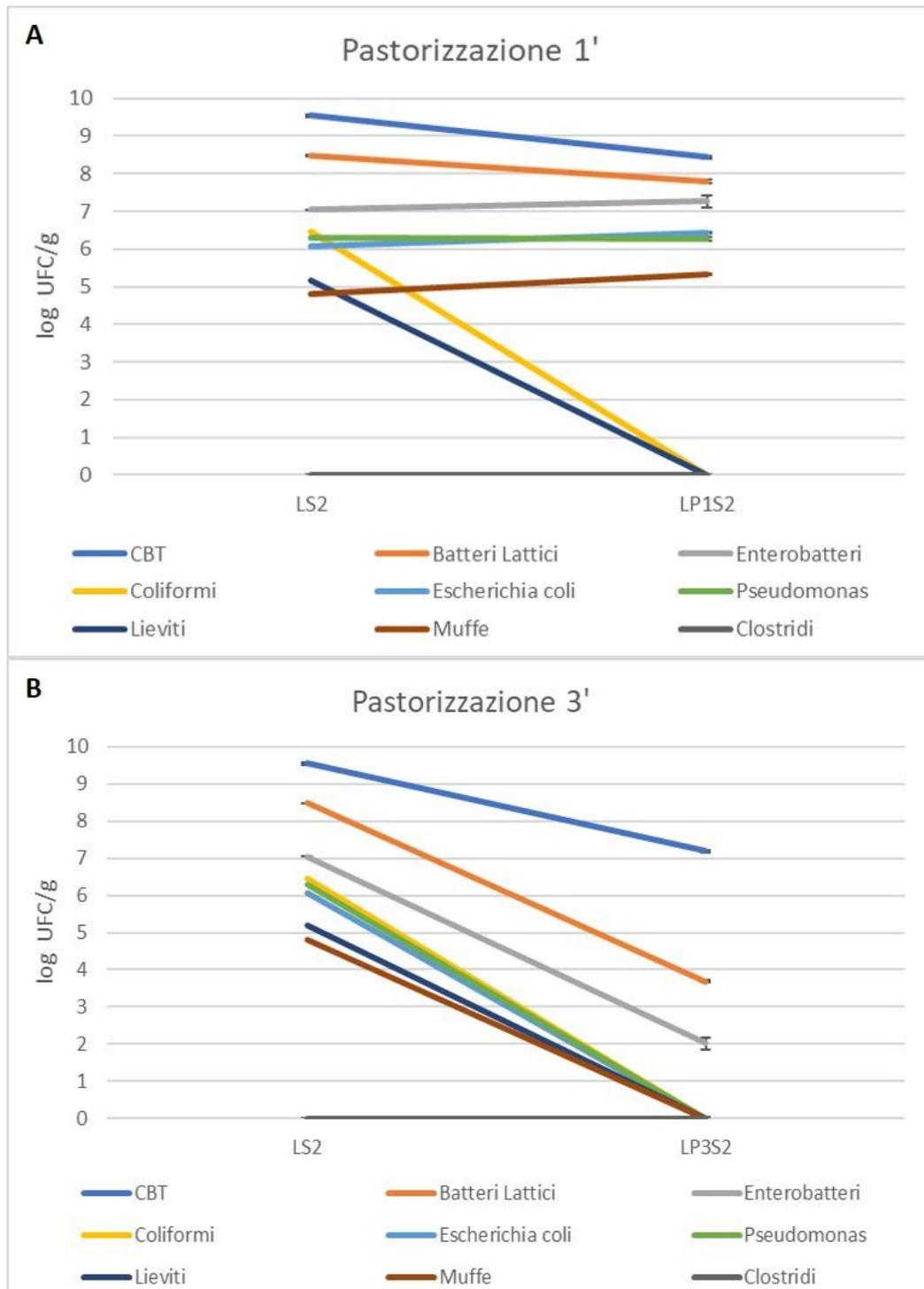


Figura 32 Rappresentazione grafica delle popolazioni microbiche presenti in larve non pastorizzate (**LS2**), larve pastorizzate per 1 minuto (**LP1S2**), larve pastorizzate per 3 minuti (**LP3S2**) e larve pastorizzate per 5 minuti (**LP5S2**).

In tutti i campioni di larve pastorizzate e non pastorizzate non è stata rivelata la presenza di clostridi, *Salmonella spp.* e *L. monocytogenes*. In seguito al trattamento di pastorizzazione per 1 minuto i coliformi e le muffe sono stati azzerati (Figura 33A), mentre le altre popolazioni microbiche non hanno subito una variazione significativa rispetto a quelle delle larve non pastorizzate. La pastorizzazione per 3 minuti invece ha causato la riduzione totale di *E coli*, *P. aeruginosa* e muffe (Figura 33B); inoltre, le altre popolazioni microbiche hanno mostrato una riduzione rispetto alle controparti riscontrate nelle larve non pastorizzate. La CBT mostrava valori di 7.19 log ufc/g e le popolazioni risultavano essere rappresentate da batteri lattici (3.69 log ufc/g) e enterobatteri (2.01 log ufc/g). Il trattamento più efficace sulla riduzione della carica microbica è stata la pastorizzazione per 5 minuti che ha azzerato tutte le cariche microbiche ad eccezione della CBT che aveva un valore di 7.45 log ufc/g ed era rappresentata esclusivamente da batteri lattici con un valore di 3.43 log ufc/g (Figura 33C).



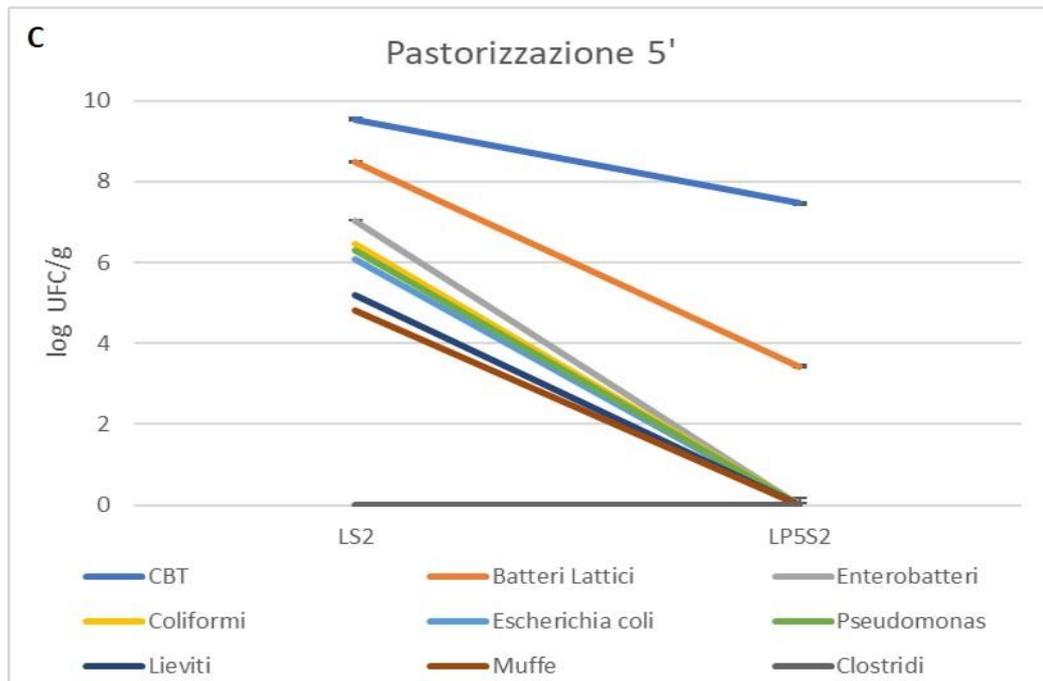


Figura 33 Effetti della pastorizzazione sulle popolazioni microbiche presenti nelle larve trattate per un minuto (A), tre minuti (B) e cinque minuti (C).

5.4 Discussioni

Anche se gli insetti sono stati riconosciuti come una fonte nutrizionale sostenibile, i problemi di sicurezza stanno attualmente limitando l'uso di insetti interi o dei loro derivati in molti paesi occidentali. Sono necessari ulteriori studi per promuovere l'accettabilità da parte dei consumatori di alimenti a base di insetti. Presi insieme, i risultati di questo studio fanno luce sull'attività biologica degli idrolizzati proteici derivati da larve di BSF che sono stati prodotti e caratterizzati nel corso dell'attività di ricerca, e sui loro effetti benefici nella prevenzione dello stress ossidativo nelle cellule.

Le attività biologiche uniche e preziose insieme ai dati sugli aspetti di sicurezza dell'utilizzo di ingredienti a base di insetti come additivi funzionali e naturali in diversi settori industriali, che vanno dai mangimi alla farmaceutica, potrebbero aumentare l'accettazione degli insetti da parte dei consumatori per nutrire la crescente popolazione mondiale.

L'approccio di economia circolare, applicato al progetto di ricerca, è indirizzato alla produzione di fonti proteiche alternative e sostenibili per settori del *feed* e *food*, e di molecole derivate da insetti (*BSF-based*) con rilevanti attività biologiche da utilizzare

come ingredienti naturali promotori del benessere a partire dagli scarti alimentari, in un contesto in cui la valorizzazione degli scarti determina una riduzione degli impatti ambientali. Sebbene l'EFSA (Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare) abbia più volte ribadito che i pericoli microbiologici associati al consumo di insetti sono simili a quelli associati ad altre fonti di proteine non trasformate, e quindi supportato l'evoluzione normativa europea verso la definitiva accettazione degli insetti come *food* e *feed*, ulteriori studi sono necessari per valutare la sicurezza degli insetti a scopo alimentare, specialmente nel caso in cui la produzione di fonti nutrizionali e molecole bioattive sia il risultato della bioconversione, ad opera delle larve di BSF, di substrati organici attualmente non consentiti per l'allevamento animale, quali sono gli scarti alimentari di origine animale ((Regolamento UE 1069/2009)). Considerato che le cifre dello spreco alimentare nel mondo (circa 1,3 miliardi di tonnellate di cibo edibile vengono sprecate ogni anno, FAO, 2011) sono destinate a crescere come conseguenza dell'incremento demografico previsto nei prossimi decenni, così come l'impatto ambientale dovuto allo sfruttamento delle risorse (acqua, terreni ed energia) utilizzate per la loro produzione e al loro accumulo in discarica, il processo di bioconversione delle larve di BSF, rappresenta un elemento con importanti ricadute nella produzione di fonti proteiche con elevate proprietà nutrizionali attraverso la trasformazione dei scarti vegetali dell'industria alimentare. La valutazione della potenziale contaminazione microbica delle larve allevate e cresciute su scarti alimentari che, essendo caratterizzati dalla presenza di acqua e nutrienti costituiscono un substrato favorevole alla crescita di diversi microorganismi, è fondamentale per provare la necessaria sicurezza microbiologica dell'utilizzo delle larve di BSF per le molteplici e promettenti applicazioni, ma anche e soprattutto per supportare con evidenze scientifiche i futuri orientamenti legislativi e politici che promuovono fonti nutrizionali alternative e sostenibili per garantire una adeguata alimentazione a tutta la popolazione mondiale. La presenza di diverse popolazioni microbiche nei substrati di crescita di origine animale e vegetale è correlata ai profili microbiologici, così come le cariche, nelle larve di BSF, come già riscontrato in altri studi (Klunder et al., 2012; Raimondi et al., 2020). La carica microbica può essere efficacemente ridotta attraverso trattamenti post-raccolta di pastorizzazione delle larve con un effetto tempo-dipendente sulla riduzione delle popolazioni costituite da batteri lattici, muffe, lieviti,

E. coli, enterobatteri. L'assenza di microrganismi patogeni come *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes* nei profili microbiologici delle larve di BSF, insieme alla riduzione della carica microbica in seguito al trattamento di pastorizzazione per 3 minuti (e una maggiore efficacia se la durata del trattamento si prolunga per 5 minuti), in combinazione alla successiva disidratazione che abbassa l'acqua libera (*Aw*) necessaria alla sopravvivenza e moltiplicazione dei microrganismi, supporta il potenziale applicativo delle larve allevate su scarti alimentari e costituisce un elemento cruciale per sperimentare metodologie alternative ed efficaci per garantire la sicurezza microbiologica delle larve. Ulteriori studi saranno necessari per verificare l'eventuale influenza dei trattamenti post-raccolta sulle proprietà nutrizionali e sulle caratteristiche delle molecole con attività biologica estratte dalla biomassa per soddisfare il fabbisogno nutrizionale della popolazione mondiale attraverso soluzioni sostenibili ed *eco-friendly* come l'allevamento di BSF. La mosca soldato *H. illucens* rappresenta ad oggi una valida biotecnologia per risolvere contemporaneamente due diverse sfide globali, la gestione dei rifiuti e la produzione di fonti proteiche alternative, in un contesto di economia circolare. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi in questa direzione potranno indirizzare le scelte politiche e legislative verso allevamenti sostenibili di insetti che riducendo gli impatti negativi permettano una significativa e valida produzione di nutrienti nel prossimo futuro.

6 Conclusioni

L'attività di ricerca sulle potenziali applicazioni/potenzialità delle larve di mosca soldato *H. illucens* ha dimostrato che il processo di bioconversione mediato dalle larve di BSF rappresenta ad oggi una valida biotecnologia per risolvere contemporaneamente, attraverso un approccio di economia circolare, due diverse sfide globali: la gestione dei rifiuti e la produzione di fonti proteiche alternative e sostenibili ad alto valore nutrizionale per la formulazione di alimenti e per la produzione di molecole con rilevanti attività biologiche da utilizzare come ingredienti promotori della salute in diverse applicazioni, inclusa la nutraceutica. La valutazione dei derivati proteici della biomassa larvale, essenzialmente rappresentati dalle farine e idrolizzati proteici, ha evidenziato un notevole potenziale nutritivo nella dieta di organismi modello *in vivo* e una apprezzabile attività antiossidante in modelli cellulari *in vitro*.

Il progetto di dottorato, nel suo insieme, si propone di studiare, attraverso un approccio multidisciplinare, le risposte cellulari ai diversi derivati di BSF sia *in vitro* che *in vivo* ed è stato suddiviso in tre principali filoni di ricerca.

Il primo filone è dedicato allo studio delle risposte cellulari dell'organismo modello zebrafish alimentato con derivati di BSF. I risultati ottenuti indicano che la farina di pesce può essere totalmente sostituita con le farine degrassate ottenute dai due stadi larvali di BSF (V stadio e prepupa) nelle diete di zebrafish senza comprometterne le *performance* di crescita e lo stato di salute. A livello cellulare, la crescita è supportata dalla modulazione dell'espressione di geni chiave coinvolti nella miogenesi, nella risposta immunitaria e nella risposta allo stress, con le diete a base di BSF capaci di modulare peculiarmente anche i geni coinvolti nel *pathway* dell'idrolisi enzimatica della chitina, senza influenzare negativamente il benessere dei pesci dallo stadio larvale fino all'adulto. Pertanto, i nostri risultati suggeriscono che le farine degrassate di larve V stadio e prepupe sono valide fonti nutrizionali per la sostituzione della farina di pesce in *aquafeed* necessaria alla transizione dell'acquacoltura verso ingredienti innovativi e sostenibili per soddisfare la crescente domanda di proteine correlata all'incremento demografico globale.

Il secondo filone di ricerca mira alla valutazione *in vitro* delle proprietà biologiche di molecole estratte da BSF su modelli cellulari di stress ossidativo. Le larve di BSF non

rappresentano esclusivamente una risorsa nutrizionale alternativa e sostenibile; infatti, non può essere escluso che molteplici degli effetti benefici osservati negli studi di sostituzione delle farine di pesce nelle diete di diverse specie siano da attribuire a singole componenti della matrice larvale, come ad esempio le proteine ad alto valore nutrizionale ricche di aminoacidi essenziali o loro derivati che permettono una maggiore biodisponibilità di molecole con rilevanti attività biologiche.

Gli idrolizzati proteici ottenuti dalle proteine delle larve di BSF mediante digestione enzimatica in un processo su larga scala e caratterizzati in questo studio, hanno infatti mostrato una significativa attività antiossidante nelle cellule L-929 trattate con H₂O₂ attraverso la riduzione dei ROS intracellulari e l'attivazione e traslocazione nucleare del fattore di trascrizione Nrf2, il regolatore principale della risposta cellulare allo stress ossidativo. Nel complesso, le notevoli proprietà antiossidanti incoraggiano fortemente l'uso di questi idrolizzati proteici di BSF come potenziali ingredienti promotori della salute.

Il terzo filone di ricerca è dedicato alla valutazione della sicurezza nell'utilizzo del *food waste* per la produzione di biomassa larvale destinata all'alimentazione animale.

La valutazione dei profili microbiologici delle larve di BSF allevate su scarti agroalimentari e dell'efficacia dei trattamenti di pastorizzazione ed essiccazione per ridurre l'acqua libera (Aw), così come l'assenza di patogeni rilevanti per la sicurezza igienico-sanitaria, quali *Listeria monocytogenes* o *Salmonella spp.*, ha mostrato che non sussistono potenziali controindicazioni alla possibilità di utilizzare gli scarti alimentari come substrato di crescita delle larve da destinare alle molteplici applicazioni, in continua crescita, suggerite nella letteratura recente.

Tuttavia, i risultati qui riportati sono ancora di natura preliminare e necessitano di ulteriori approfondimenti mirati anche a verificare che i trattamenti post raccolta delle larve non inficino i valori nutritivi delle larve stesse.

Ulteriori studi in questa direzione potranno indirizzare le scelte politiche e legislative verso allevamenti sostenibili di mosca soldato *Hermetia illucens* che riducendo gli impatti negativi permettano una significativa e valida produzione di risorse

nutrizionali e molecole bioattive in un contesto di economia circolare nel prossimo futuro.

7 Bibliografia

Abeyrathne, E.D.N.S.; Nam, K.; Huang, X.; Ahn, D.U. Plant-and Animal-Based Antioxidants' Structure, Efficacy, Mechanisms, and Applications: A Review. *Antioxid.* **2022**, *11*, 1025. <https://doi.org/10.3390/antiox11051025>

Almeida, C.; Rijo, P.; Rosado, C. Bioactive Compounds from *Hermetia Illucens* Larvae as Natural Ingredients for Cosmetic Application. *Biomolecules* **2020**, *10*, 976. <https://doi.org/10.3390/biom10070976>

AOAC—Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of the Association of the Analytical Chemists, 16th ed.; AOAC: Washington, DC, USA, **1995**; p. 1025

Barbi, S.; Messori, M.; Manfredini, T.; Pini, M.; & Montorsi, M. Rational design and characterization of bioplastics from *Hermetia illucens* prepupae proteins. *Biopolymers* **2019**, *110*(5), e23250. <https://doi.org/10.1002/bip.23250>

Barragan-Fonseca, K. B.; Dicke, M.; Van Loon, J.J.A. Nutritional value of the black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) and its suitability as animal feed—a review. *J. Insects Food Feed.* **2017**, *3*, 105–120. <https://doi.org/10.3920/jiff2016.0055>

Batish, I.; Brits, D.; Valencia, P.; Miyai, C.; Rafeeq, S.; Xu, Y.; Galanopoulos, M.; Sismour, E.; Ovissipour, R. Effects of Enzymatic Hydrolysis on the Functional Properties, Antioxidant Activity and Protein Structure of Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) Protein. *Insects* **2020**, *11*, 876. <https://doi.org/10.3390/insects11120876>

Belghit, I.; Liland, N.S.; Gjesdal, P.; Biancarosa, I.; Menchetti, E.; Li, Y.; Waagbø, R.; Krogdahl, Å.; Lock, E.J. Black soldier fly larvae meal can replace fish meal in diets of sea-water phase Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* **2019**, *503*, 609–619. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.032>

Biasato, I.; Gasco, L.; De Marco, M.; Renna, M.; Rotolo, L.; Dabbou, S.; & Schiavone, A. Yellow mealworm larvae (*Tenebrio molitor*) inclusion in diets for male broiler chickens: effects on growth performance, gut morphology, and histological findings. *Poult. Sci. J* **2018**, *97*(2), 540-548. <https://doi.org/10.3382/ps/pex308>

- Bird, A. Perceptions of epigenetics. *Nature*. **2007**, *447* (7143):396–398. <https://doi.org/10.1038/nature05913>
- Bligh, E.G.; Dyer, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Phys.* **1959**, *37*, 911–917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Bruni, L.; Belghit, I.; Lock, E. J.; Secci, G.; Taiti, C.; & Parisi, G. Total replacement of dietary fish meal with black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae does not impair physical, chemical or volatile composition of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *J. Sci. Food Agric.* **2020**, *100*(3), 1038-1047. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10108>
- Bruno, D.; Bonelli, M.; Cadamuro, A. G.; Reguzzoni, M.; Grimaldi, A.; Casartelli, M.; & Tettamanti, G. The digestive system of the adult *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae): morphological features and functional properties. *Cell Tissue Res.* **2019**, *378*(2), 221-238. <https://doi.org/10.1007/s00441-019-03025-7>
- Bußler, S.; Rumpold, B. A.; Fröhling, A.; Jander, E.; Rawel, H. M.; & Schlüter, O. K. Cold atmospheric pressure plasma processing of insect flour from *Tenebrio molitor*: Impact on microbial load and quality attributes in comparison to dry heat treatment. *Innov Food Sci Emerg Technol.* **2016**, *36*, 277-286. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.07.002>
- Cardinaletti, G.; Randazzo, B.; Messina, M.; Zarantoniello, M.; Giorgini, E.; Zimbelli, A.; Bruni, L.; Parisi, G.; Olivotto, I.; Tulli, F. Effects of graded dietary inclusion level of full-fat *Hermetia illucens* prepupae meal in practical diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animals* **2019**, *9*, 251. <https://doi.org/10.3390/ani9050251>.
- Chapagain, A. K. and A. Y. Hoekstra. Virtual water flows between nations in relation to trade in livestock and livestock products, value of water research report series. *UNESCO-IHE Delft*, Delft, **2003** The Netherlands.
- Cheng, Z.; Yu, L.; Li, H.; Xu, X.; & Yang, Z. Use of housefly (*Musca domestica L.*) larvae to bioconversion food waste for animal nutrition and organic fertilizer. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2021**, *28*(35), 48921-48928. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14118-8>

- Cho, K. H.; Kang, S. W.; Yoo, J. S.; Song, D. K.; Chung, Y. H.; Kwon, G. T.; & Kim, Y. Y. Effects of mealworm (*Tenebrio molitor*) larvae hydrolysate on nutrient ileal digestibility in growing pigs compared to those of defatted mealworm larvae meal, fermented poultry by-product, and hydrolyzed fish soluble. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* **2020**, *33*(3), 490. doi: 10.5713/ajas.19.0793
- Dai, C.; Ma, H.; Luo, L.; Yin, X. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived from *Tenebrio molitor* (L.) larva protein hydrolysate. *Eur. Food Res. Technol.* **2013**, *236*, 681–689. <https://doi.org/10.1007/s00217-013-1923-z>
- D'Costa, A.; & Shepherd, I. T. Zebrafish development and genetics: introducing undergraduates to developmental biology and genetics in a large introductory laboratory class. *Zebrafish*, **2009**, *6* (2), 169-177. <https://doi.org/10.1089/zeb.2008.0562>
- Danulat, E. The effects of various diets on chitinase and bglucosidase activities and the condition of cod, *Gadus morhua* (L.). *J. Fish Biol.* **1986**, *28*, 191–197. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1986.tb05157>.
- De Marco, M.; Martínez, S.; Hernandez, F.; Madrid, J.; Gai, F.; Rotolo, L.; ... & Schiavone, A. Nutritional value of two insect larval meals (*Tenebrio molitor* and *Hermetia illucens*) for broiler chickens: Apparent nutrient digestibility, apparent ileal amino acid digestibility and apparent metabolizable energy. *Anim. Feed Sci. Technol* **2015**, *209*, 211-218. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.08.006>
- Dhanasiri, A.; Chen, X.; Dahle, D.; Siriyappagounder, P.; Fæste, C. K.; & Fernandes, J. M. Dietary inclusion of plant ingredients induces epigenetic changes in the intestine of zebrafish. *Epigenetics* **2020**, *15*(10), 1035-1051. <https://doi.org/10.1080/15592294.2020.1747777>
- Diener, S.; Zurbrügg, C.; Tockner, K. Conversion of organic material by black soldier fly larvae: Establishing optimal feeding rates. *Waste Manag. Res.* **2009**, *27*, 603–610. <https://doi.org/10.1177/0734242X09103838>
- Esteban, M.A.; Mulero, V.; Cuesta, A.; Ortuño, J.; Meseguer, J. Effects of injecting chitin particles on the innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immun.* **2000**, *10*, 543–554. <https://doi.org/10.1006/fsim.2000.0271>

EUROPEAN COMMISSION DIRECTORATE-GENERAL FOR HEALTH AND FOOD SAFETY. Food sustainability, international relations Farm to fork strategy

Fan, K.; Liu, H.; Pei, Z.; Brown, P. B.; & Huang, Y. A study of the potential effect of dietary fishmeal replacement with cricket meal (*Gryllus bimaculatus*) on growth performance, blood health, liver antioxidant activities, intestinal microbiota and immune-related gene expression of juvenile channel catfish. *Animal Feed Science and Technology* **2023**, 295, 115542. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2022.115542>

FAO. 2011. Fisheries management. Marine protected areas and fisheries. FAO Technical Guidelines for Responsible Fisheries No. 4, Suppl. 4. Rome.

FAO. 2013. Statistical yearbook. World Food and Agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. pp, 289. FAO save food initiative

FAO. 2019. The State of Food and Agriculture **2019**. Moving forward on food loss and waste reduction. Rome.

FAO. 2022. The State of World Fisheries and Aquaculture **2022**. *Towards Blue Transformation*. Rome, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>

Fines, B.C.; Holt, G.J. Chitinase and apparent digestibility of chitin in the digestive tract of juvenile cobia, *Rachycentron canadum*. *Aquaculture* **2010**, 303, 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.03.010>

Finke, M.D. Complete Nutrient Content of Four Species of Feeder Insects. *Zoo Biol.* **2013**, 32, 27–36. <https://doi.org/10.1002/zoo.21012>

Firmansyah, M.; Abduh, M.Y. Production of protein hydrolysate containing antioxidant activity from *Hermetia illucens*. *Heliyon* **2019**, 5, e02005 <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02005>

Gabillard, J.C.; Kamangar, B.B.; Montserrat, N. Coordinated regulation of the GH/IGF system genes during refeeding in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Endocrinol.* **2006**, 191, 15–24. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06869>

- Gatlin, D.M.; Barrows, F.T.; Brown, P.;... & Wurtele, E. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquac Res.* **2007**, *38* 551–579. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01704.x>
- Giannetto, A.; Nagasawa, K.; Fasulo, S.; Fernandes, J.M.O. Influence of photoperiod on expression of DNA (cytosine-5) methyltransferases in Atlantic cod. *Gene* **2013**, *519*, 22, 222-230. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.02.028>
- Giannetto, A.; Oliva, S.; Lanes, C. F. C.; de Araújo Pedron, F.; Savastano, D.; Baviera, C.; ... & Fasulo, S. *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) larvae and prepupae: biomass production, fatty acid profile and expression of key genes involved in lipid metabolism. *J. Biotechnol* **2020a** *307*, 44-54. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.10.015>
- Giannetto, A.; Esposito, E.; Lanza, M.; Oliva, S.; Riolo, K.; Di Pietro, S.; Abbate, J.M.; Briguglio, G.; Cassata, G.; Cicero, L.; et al. Protein hydrolysates from anchovy (*Engraulis encrasicolus*) waste: In vitro and in vivo biological activities. *Mar. Drugs* **2020b**, *18*, 86. <https://doi.org/10.3390/md18020086>
- Giannetto, A.; Oliva, S.; Riolo, K.; Savastano, D.; Parrino, V.; Cappello, T.; Maisano, M.; Fasulo, S.; Mauceri, A. Waste Valorization via *Hermetia Illucens* to Produce Protein-Rich Biomass for Feed: Insight into the Critical Nutrient Taurine. *Animals* **2020c**, *10*, 1710 <https://doi.org/10.3390/ani10091710>
- Gobbi, P.; Martínez-Sánchez, A.; Rojo, S. The effects of larval diet on adult life history traits of the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). *Eur. J. Entomol.* **2013**, *110*, 461–468. <https://doi.org/10.14411/eje.2013.061>.
- Gopalakannan, A.; & Arul, V. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. *Aquaculture* **2006**, *255*, 179–187.
- Grush, J.; Noakes, D.J.G.; Moccia, R.D. The efficacy of clove oil as an anesthetic for the zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton). *Zebrafish* **2004**, *1*, 46–53. <https://doi.org/10.1089/154585404774101671>

- Hansen, A.C.; Rosenlund, G.; Karlsen, Ø.; Koppe, W.; Hemre, G.I. Total replacement of fish meal with plant proteins in diets for Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) I—Effects on growth and protein retention. *Aquaculture* **2007**, *272*, 599–611. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.08.034>
- Hardy, R.W. Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquac Res.* **2010**, *41* 770–776. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02349>.
- Harikrishnan, R.; Kim, J.S.; Balasundaram, C.; Heo, M.S. Dietary supplementation with chitin and chitosan on haematology and innate immune response in *Epinephelus bruneus* against *Philasterides dicentrarchi*. *Exp. Parasitol.* **2012**, *131*, 116–12 <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.03.020>
- Hartmann, R.; & Meisel, H. Food-derived peptides with biological activity: From research to food applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2007**, *18*, 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.01.013>
- Henry, M.; Gasco, L.; Piccolo, G.; Fountoulaki, E. Review on the use of insects in the diet of farmed fish: Past and future. *Anim. Feed Sci. Tech.* **2015**, *203*, 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.03.001>
- Ho, P.N.; Klanrit, P.; Hanboonsong, Y.; Yordpratum, U.; Suksawat, M.; Kulthawatsiri, T.; Jirahiranpat, A.; Deewai, S.; Mackawan, P.; Sermswan, R.W.; et al. Bacterial challenge-associated metabolic phenotypes in *Hermetia illucens* defining nutritional and functional benefits. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02752-8>
- Hoffmann, L.; Rawski, M.; Nogales-Merida, S.; Mazurkiewicz, J. Dietary inclusion of *Tenebrio molitor* meal in sea trout larvae rearing: Effects on fish growth performance, survival, condition, and GIT and liver enzymatic activity. *Ann. Anim. Sci.* **2020**, *20*, 579–598. DOI: 10.2478/aoas-2020-0002
- Hua, K. A meta-analysis of the effects of replacing fish meals with insect meals on growth performance of fish. *Aquaculture* **2021**, *530*, 735732. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735732>

- Huang, B.; Chen, Q.; Wang, L.; Gao, X.; Zhu, W.; Mu, P.; Deng, Y. Aflatoxin B1 Induces Neurotoxicity through Reactive Oxygen Species Generation, DNA Damage, Apoptosis, and S-Phase Cell Cycle Arrest. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6517. <https://doi.org/10.3390/ijms21186517>
- Huyben, D.; Vidaković, A.; Werner Hallgren, S.; Langeland, M. High-throughput sequencing of gut microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed larval and pre-pupae stages of black soldier fly (*Hermetia illucens*). *Aquaculture* **2019**, *500*, 485–491. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.034>
- Iaconisi, V.; Marono, S.; Parisi, G.; Gasco, L.; Genovese, L.; Maricchiolo, G.; ... & Piccolo, G. Dietary inclusion of *Tenebrio molitor* larvae meal: Effects on growth performance and final quality traits of blackspot sea bream (*Pagellus bogaraveo*). *Aquaculture* **2017**, *476*, 49-58. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.04.007>
- Jenkins, B.; West, J. A.; & Koulman, A. A review of odd-chain fatty acid metabolism and the role of pentadecanoic acid (C15: 0) and heptadecanoic acid (C17: 0) in health and disease. *Molecules* **2015**, *20*(2), 2425-2444.
- Johnston, I.A.; Bower, N.I.; Macqueen, D.J. Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish. *J. Exp. Biol.* **2011**, *214*, 1617–1628. <https://doi.org/10.1242/jeb.038620>
- Kadayifci, F.Z.; Zheng, S.; Pan, Y-X. Molecular mechanisms underlying the link between diet and DNA methylation. *Int J Mol Sci.* **2018**, *19*(12):4055. <https://doi.org/10.3390/ijms19124055>
- Kamilya, D.; & Khan, M. I. R. Chitin and chitosan as promising immunostimulant for aquaculture. In *Handbook of Chitin and Chitosan* (pp. 761-771). Elsevier. **2020** <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817966-6.00024-8>
- Khayrova, A.; Lopatin, S.; Varlamov, V. Black Soldier Fly *Hermetia illucens* as a Novel Source of Chitin and Chitosan. *Int. J. Sci.* **2019**, *8*, 81–86. DOI: 10.18483/ijSci.2015;
- Kiewiet, M. B.; Faas, M. M.; & De Vos, P. Immunomodulatory protein hydrolysates and their application. *Nutrients* **2018**, *10*(7), 904. <https://doi.org/10.3390/nu10070904>

- Kim, W. T.; Bae, S. W.; Park, H. C.; Park, K. H.; Lee, S. B.; Choi, Y. C.; ... & Koh, Y. H. The larval age and mouth morphology of the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). *Int. J. Ind. Entomol.* **2010**, *21*(2), 185-187.
- Kim, S. A.; & Rhee, M. S. Highly enhanced bactericidal effects of medium chain fatty acids (caprylic, capric, and lauric acid) combined with edible plant essential oils (carvacrol, eugenol, β -resorcylic acid, trans-cinnamaldehyde, thymol, and vanillin) against *Escherichia coli* O157: H7. *Food control* **2016**, *60*, 447-454. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.08.022>
- Klunder, H. C.; Wolkers-Rooijackers, J.; Korpela, J. M.; & Nout, M. R. Microbiological aspects of processing and storage of edible insects. *Food control* **2012**, *26*(2), 628-631. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.02.013>
- Kroeckel, S.; Harjes, A.G.E.; Roth, I.; Katz, H.; Wuertz, S.; Susenbeth, A.; Schulz, C. 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* **2012**, *364*, 345–352. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.08.041>
- Kröncke, N.; Bösch, V.; Woyzichowski, J.; Demtröder, S.; & Benning, R. Comparison of suitable drying processes for mealworms (*Tenebrio molitor*). *Innov Food Sci Emerg Technol.* **2018**, *50*, 20-25.
- Lalander, C.; Diener, S.; Zurbrügg, C.; Vinneras, B. Effects of feedstock on larval development and process efficiency in waste treatment with black soldier fly (*Hermetia illucens*). *J. Clean Prod.* **2019**, *208*, 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.10.017>
- Lanes, C. F.; Pedron, F. A.; Bergamin, G. T.; Bitencourt, A. L.; Dorneles, B. E.; Villanova, J. C.; ... & Giannetto, A. Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) larvae and prepupae defatted meals in diets for zebrafish (*Danio rerio*). *Animals* **2021**, *11*(3), 720. <https://doi.org/10.3390/ani11030720>
- Lanza, M.; Casili, G.; La Torre, G.L.; Giuffrida, D.; Rotondo, A.; Esposito, E.; Ardizzone, A.; Rando, R.; Bartolomeo, G.; Albergamo, A.; et al. Properties of a new food supplement containing *Actinia equina* extract. *Antioxid.* **2020**, *9*, 945.

- Lavajoo, F.; Perelló-Amorós, m.; Vélez, E.J.; Sánchez-Moya, A.; Balbuena-Pecino, S.; Riera-Heredia, N.; Fernández-Borràs, J.; Blasco, J.; Navarro, I.; Capilla, E.; et al. Regulatory mechanisms involved in muscle and bone remodeling during refeeding in gilthead sea bream. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57013-6>
- Lee, K., S.; Yun, E., Y.; & Goo, T. W. Antimicrobial activity of an extract of *Hermetia illucens* larvae immunized with *Lactobacillus casei* against *Salmonella* species. *Insects* **2020**, *11*(10), 704. <https://doi.org/10.3390/insects11100704>
- Lemke, N. B.; Dickerson, A. J.; & Tomberlin, J. K. No neonates without adults: A review of adult black soldier fly biology, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). *Bioessays*, **2023**, *45*(1), 2200162. <https://doi.org/10.1002/bies.202200162>
- Leni, G.; Caligiani, A.; Sforza, S. Killing method affects the browning and the quality of the protein fraction of Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) prepupae: A metabolomics and proteomic insight. *Food Res. Int.* **2019**, *115*, 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.021>
- Leni, G.; Tedeschi, T.; Faccini, A.; Pratesi, F.; Folli, C.; Puxeddu, I.; Migliorini, P.; Gianotten, N.; Jacobs, J.; Depraetere, S.; et al. Shotgun proteomics, in-silico evaluation and immunoblotting assays for allergenicity assessment of lesser mealworm, black soldier fly and their protein hydrolysates. *Sci. Rep.* **2020a**, *10*, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57863-5>
- Leni, G.; Soetemans, L.; Jacobs, J.; Depraetere, S.; Gianotten, N.; Bastiaens, L.; Caligiani, A.; Sforza, S. Protein hydrolysates from *Alphitobius diaperinus* and *Hermetia illucens* larvae treated with commercial proteases. *J. Insects Food Feed.* **2020b**, *6*, 393–404. <https://doi.org/10.3920/JIFF2019.0037>
- Li, S.; Tan, H.Y.; Wang, N.; Zhang, Z.J.; Lao, L.; Wong, C.W.; Feng, Y. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 26087–26124. <https://doi.org/10.3390/ijms161125942>
- Lindsay, G.J.H.; Walton, M.J.; Adron, J.W.; Fletcher, T.C.; Cho, C.Y.; Cowey, C.B. The growth of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) given diets containing chitin and its

- relationship to chitinolytic enzymes and chitin digestibility. *Aquaculture* **1984**, *37*, 315–334. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(84\)90297-7](https://doi.org/10.1016/0044-8486(84)90297-7)
- Liu, X.; Chen, X.; Wang, H.; Yang, Q.; ur Rehman, K.; Li, W.; Cai, M.; Li, Q.; Mazza, L.; Zhang, J.; Yu, Z.; Zheng, L. Dynamic changes of nutrient composition throughout the entire life cycle of black soldier fly. *PLoS One* **2017**, *12* (8), e0182601. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182601>
- Lu, J.; Guo, Y.; Muhmood, A.; Zeng, B.; Qiu, Y.; Wang, P.; Ren, L. Probing the antioxidant activity of functional proteins and bioactive peptides in *Hermetia illucens* larvae fed with food wastes. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 2799. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06668-9>
- Mangano, V.; Gervasi, T.; Rotondo, A.; De Pasquale, P.; Dugo, G.; Macrì, F.; Salvo, A. Protein hydrolysates from anchovy waste: Purification and chemical characterization. *Nat. Prod. Res.* **2021**, *35*, 399–406. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1634711>
- Megido, R. C.; Gierts, C.; Blecker, C.; Brostaux, Y.; Haubruge, É.; Alabi, T.; & Francis, F. Consumer acceptance of insect-based alternative meat products in Western countries. *Food qual. prefer.* **2016**, *52*, 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2016.05.004>
- Mikołajczak, Z.; Rawski, M.; Mazurkiewicz, J.; Kierończyk, B.; Józefiak, D. The effect of hydrolyzed insect meals in sea trout fingerling (*Salmo trutta m. trutta*) diets on growth performance, microbiota and biochemical blood parameters. *Animals* **2020**, *10*, 1031. <https://doi.org/10.3390/ani10061031>
- Miles, R.D.; Chapman, F.A. The Benefits of Fish Meal in Aquaculture Diets. U. S. Department of Agriculture, UF/IFAS Extension Service, University of Florida, **2015**, 1–6.
- Mintah, B.K.; He, R.; Dabbour, M.; Golly, M.K.; Agyekum, A.A.; Ma, H. Effect of sonication pretreatment parameters and their optimization on the antioxidant activity of *Hermetia illucens* larvae meal protein hydrolysates. *J. Food Process Preserv.* **2019**, *43*(9), e14093. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14093>

- Mouithys-Mickalad, A.; Schmitt, E.; Dalim, M.; Franck, T.; Tome, N.M.; van Spankeren, M.; Serteyn, D.; Paul, A. Black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae protein derivatives: Potential to promote animal health. *Animals* **2020**, *10*, 941. <https://doi.org/10.3390/ani10060941>
- Nagasawa, K.; Giannetto, A.; Fernandes, J.M.O. Photoperiod influences growth and *mll* (mixed-lineage leukaemia) expression in Atlantic cod. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e36908. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036908>
- Nguyen, T.T.X.; Tomberlin, J.K.; Vanlaerhoven, S. Ability of black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) larvae to recycle food waste. *Environ. Entomol.* **2015**, *44*, 406–410. <https://doi.org/10.1093/ee/nvv002>.
- Nirmal, N. P.; Santivarangkna, C.; Benjakul, S.; & Maqsood, S. Fish protein hydrolysates as a health-promoting ingredient—recent update. *Nutr. Rev.* **2022** 80(5), 1013-1026. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuab065>
- Oliveira, F.; Doelle, K.; List, R.; & O'Reilly, J. R. Assessment of Diptera: Stratiomyidae, genus *Hermetia illucens* (L., 1758) using electron microscopy. *J. Entomol. Zool. Stud.* **2015**, *3*(5), 147-152.
- Oliver, N.J.; Rabinovitch-Deere, C.A.; Carroll, A.L.; Nozzi, N.E.; Case, A.E.; Atsumi, S. Cyanobacterial metabolic engineering for biofuel and chemical production. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2016**, *35*, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.08.023>
- Oonincx, D. G.; & De Boer, I. J. Environmental impact of the production of mealworms as a protein source for humans—a life cycle assessment. *PloS one* **2012**, *7*(12), e51145. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051145>
- Oonincx, D.G.A.B.; Van Broekhoven, S.; Van Huis, A.; Van Loon, J.J.A. Feed conversion, survival and development, and composition of four insect species on diets composed of food by-products. *PLoS One* **2015**, *10* (12), e0144601. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144601>.
- Pan, J.; Xu, H.; Cheng, Y.; Mintah, B.K.; Dabbour, M.; Yang, F.; Chen, W.; Zhang, Z.; Dai, C.; He, R.; et al. Recent Insight on Edible Insect Protein: Extraction,

- Functional Properties, Allergenicity, Bioactivity, and Applications. *Foods* **2022**, *11*, 2931. <https://doi.org/10.3390/foods11192931>
- Pimentel, A.C.; Montali, A.; Bruno, D.; Tettamanti, G. Metabolic adjustment of the larval fat body in *Hermetia illucens* to dietary conditions. *J. Asia Pac. Entomol.* **2017**, *20*, 1307–1313. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2017.09.017>.
- Quintieri, L.; Nitride, C.; De Angelis, E.; Lamonaca, A.; Pilolli, R.; Russo, F.; & Monaci, L. Alternative Protein Sources and Novel Foods: Benefits, Food Applications and Safety Issues. *Nutrients* **2023**, *15*(6), 1509. <https://doi.org/10.3390/nu15061509>
- Rachmawati, R.; Buchori, D.; Hidayat, P.; Hem, S.; Fahmi, M.R. Perkembangan dan Kandungan Nutrisi Larva *Hermetia illucens* (Linnaeus) (Diptera: Stratiomyidae) pada Bungkil Kelapa Sawit. *J.Entomol. Indones.* **2017**, *7*, 28–41. <https://doi.org/10.5994/jei.7.1.28>.
- Rapatsa, M.M.; & Moyo, N.A.G. Evaluation of Imbrasia belina meal as a fishmeal substitute in *Oreochromis mossambicus* diets: Growth performance, histological analysis and enzyme activity. *Aquac. Rep.* **2017**, *5*, 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2016.11.004>
- Ravi, H.K.; Degrou, A.; Costil, J.; Trespeuch, C.; Chemat, F.; Vian, M.A. Effect of devitalization techniques on the lipid, protein, antioxidant, and chitin fractions of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. *Eur. Food Res. Technol.* **2020**, *246*, 2549–2568. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03596-8>
- Riolo, K.; Rotondo, A.; La Torre, G. L.; Marino, Y.; Franco, G. A.; Crupi, R.; ... & Giannetto, A. Cytoprotective and Antioxidant Effects of Hydrolysates from Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*). *Antioxid.* **2023**, *12*(2), 519. <https://doi.org/10.3390/antiox12020519>
- Roques, S.; Deborde, C.; Guimas, L.; Marchand, Y.; Richard, N.; Jacob, D.; Skiba-Cassy, S.; Moing, A.; Fauconneau, B. Integrative Metabolomics for Assessing the Effect of Insect (*Hermetia illucens*) Protein Extract on Rainbow Trout Metabolism. *Metabolites* **2020**, *10*, 83. <https://doi.org/10.3390/metabo10030083>

- Rotondo, A.; Mannina, L.; Salvo, A. Multiple Assignment Recovered Analysis (MARA) NMR for a Direct Food Labeling: The Case Study of Olive Oils. *Food Anal. Methods* **2019**, *12*, 1238–1245. <https://doi.org/10.1007/s12161-019-01460-4>
- Rotondo, A.; Rigano, F.; Mondello, L. Comprehensive Chemical Characterization of the Pistacia vera Fruits through Original NMR Quantification Methods. *Appl. Sci.* **2020**, *10*, 5523. <https://doi.org/10.3390/app10165523>
- Salze, G. P.; & Davis, D. A. Taurine: a critical nutrient for future fish feeds. *Aquaculture* **2015** *437*, 215-229. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.12.006>
- SAS Institute Inc. SAS®University Edition Quick Start Guide for Students with Visual Impairments; SAS Institute Inc.: Cary, NC, USA, **2018**
- Shiau, S.Y.; & Yu, Y.P. Dietary supplementation of chitin and chitosan depresses growth in tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Aquaculture* **1999**, *179*, 439–446. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00177-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00177-5)
- Sprangers, T.; Ottoboni, M.; Klootwijk, C.; Obyn, A.; Deboosere, S.; De Meulenaer, B.; De Smet, S. Nutritional composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) prepupae reared on different organic waste substrates. *J. Sci. Food Agric.* **2016**, *97*, 2594–2600. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8081>
- Stenberg, O.K.; Holen, E.; Piemontese, L.; Liland, N.S.; Lock, E.J.; Espe, M.; Belghit, I. Effect of dietary replacement of fish meal with insect meal on in vitro bacterial and viral induced gene response in Atlantic salmon (*Salmo salar*) head kidney leukocytes. *Fish Shellfish Immun.* **2019**, *91*, 223–232. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.05.042>
- Surendra, K.C.; Olivier, R.; Tomberlin, J.K.; Jha, R.; Khanal, S.K. Bioconversion of organic wastes into biodiesel and animal feed via insect farming. *Renew. Energy* **2016**, *98*, 197–202. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.03.022>.
- Surendra, K.C.; Tomberlin, J.K.; van Huis, A.; Cammack, J.A.; Heckmann, L.-H.L.; Khanal, S.K. Rethinking organic wastes bioconversion: Evaluating the potential of the black soldier fly (*Hermetia illucens* (L.)) (Diptera: Stratiomyidae) (BSF). *Waste Manag.* **2020**, *117*, 58–80. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.07.050>

- Tacon, A.G.J.; & Metian, M., 2008. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture* **2008**, 285, 146-158. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.08.015>
- Tang, T.; Wu, N.; Tang, S.; Xiao, N.; Jiang, Y.; Tu, Y.; & Xu, M. Industrial application of protein hydrolysates in food. *J. Agric. Food Chem.* **2023**, 71(4), 1788-1801. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c06957>
- Teixeira, C. S.; Villa, C.; Costa, J.; Ferreira, I. M.; & Mafra, I. Edible Insects as a Novel Source of Bioactive Peptides: A Systematic Review. *Foods* **2023**, 12 (10), 2026. <https://doi.org/10.3390/foods12102026>
- Terrey, D.; James, J.; Tankovski, I.; Dalim, M.; van Spankeren, M.; Chakraborty, A.; Schmitt, E.; Paul, A. Palatability Enhancement Potential of *Hermetia illucens* Larvae Protein Hydrolysate in *Litopenaeus vannamei* Diets. *Molecules* **2021**, 26, 1582. <https://doi.org/10.3390/molecules26061582>
- Tippayadara, N.; Dawood, M. A.; Krutmuang, P.; Hoseinifar, S. H.; Doan, H. V.; & Paolucci, M. Replacement of fish meal by Black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal: Effects on growth, haematology, and skin mucus immunity of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Animals* **2021**, 11(1), 193. <https://doi.org/10.3390/ani11010193>
- Tomberlin, J. K.; Adler, P. H.; & Myers, H. M. Development of the black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) in relation to temperature. *Environ. Entomol.* **2009**, 38(3), 930-934. <https://doi.org/10.1603/022.038.0347>
- Tonelli, C.; Chio, I.I.C.; Tuveson, D.A. Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxid. Redox Signal* **2018**, 29, 1727–1745. DOI: 10.1089/ars.2017.7342
- Tschirner, M.; Simon, A. Influence of different growing substrates and processing on the nutrient composition of black soldier fly larvae destined for animal feed. *J. Insects Food Feed* **2015**, 1, 249–259. <https://doi.org/10.3920/JIFF2014.0008>
- Ushakova, N. A.; Brodskii, E.S.; Kovalenko, A.A.; Bastrakov, A.I.; Kozlova, A. A.; Pavlov, D.S. Characteristics of lipid fractions of larvae of the black soldier fly

Hermetia illucens. *Dokl. Biochem. Biophys.* **2016**, 468,209–212. <https://doi.org/10.1134/s1607672916030145>.

Van Huis, A.; & Oonincx, D.G.A.B. The environmental sustainability of insects as food and feed. A review. *Agron. Sustain. Dev.* **2017**, 37, 43. <https://doi.org/10.1007/s13593-017-0452-8>

Van Soest, P.J.; Robertson, J.B.; Lewis, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* **1991**, 74, 3583–3597 [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)

Vargas, A.; Randazzo, B.; Riolo, P.; Truzzi, C.; Gioacchini, G.; Giorgini, E.; Loreto, N.; Ruschioni, S.; Zarantoniello, M.; Antonucci, M.; Polverini, S.; Cardinaletti, G.; Sabbatini, S.; Tulli, F.; Olivotto, I. Rearing zebrafish on black soldier fly (*Hermetia illucens*): biometric, histological, spectroscopic, biochemical, and molecular implications. *Zebrafish* **2018**, 15, 404–419. <https://doi.org/10.1089/zeb.2017.1559>

Vandeweyer, D.; Lenaerts, S.; Callens, A.; & Van Campenhout, L. Effect of blanching followed by refrigerated storage or industrial microwave drying on the microbial load of yellow mealworm larvae (*Tenebrio molitor*). *Food Control* **2017**, 71, 311-314. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.07.011>

Vasantharaja, R.; Stanley Abraham, L.; Gopinath, V.; Hariharan, D.; Smita, K.M. Attenuation of oxidative stress induced mitochondrial dysfunction and cytotoxicity in fibroblast cells by sulfated polysaccharide from *Padina gymnospora*. *Int. J Biol. Macromol.* **2019**, 124, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.104>

Wang, S.Y.; Wu, L.; Li, B.; Zhang, D. Reproductive potential and nutritional composition of *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) prepupae reared on different organic wastes. *J. Econ. Entomol.* **2020**, 113(1), 527-537. <https://doi.org/10.1093/jee/toz296>

WASTE WATCHER, LA SENTINELLA DEGLI SPRECHI

Westerfield, M. The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Brachydanio rerio*), 3rd ed.; University of Oregon Press: Eugene, OR, USA, **1995**.

- WRI, W. **2013**. World Resources Institute. World Business Council for Sustainable Development (Eds.): The Greenhouse Gas Protocol. The GHG Protocol for Project Accounting (2005).
- Xia, J.; Ge, C.; & Yao, H. Antimicrobial peptides from black soldier fly (*Hermetia illucens*) as potential antimicrobial factors representing an alternative to antibiotics in livestock farming. *Animals* **2021**, *11*(7), 1937. <https://doi.org/10.3390/ani11071937>
- Xiao, X.; Jin, P.; Zheng, L.; Cai, M.; Yu, Z.; Yu, J.; Zhang, J. Effects of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal protein as a fishmeal replacement on the growth and immune index of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Aquac. Res.* **2018**, *49*(4), 1569-15771. <https://doi.org/10.1111/are.13611>
- Yoo, J. S.; Cho, K. H.; Hong, J. S.; Jang, H. S.; Chung, Y. H.; Kwon, G. T.; ... & Kim, Y. Y. Nutrient ileal digestibility evaluation of dried mealworm (*Tenebrio molitor*) larvae compared to three animal protein by-products in growing pigs. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* **2019**, *32*(3), 387. doi: 10.5713/ajas.18.0647
- Zarantoniello, M.; Bruni, L.; Randazzo, B.; Vargas, A.; Gioacchini, G.; Truzzi, C.; Annibaldi, A.; Riolo, P.; Parisi, G.; Cardinaletti, G.; Tulli, F.; Olivotto, I. Partial Dietary inclusion of *Hermetia illucens* (Black Soldier Fly) full-fat prepupae in zebrafish feed: biometric, histological, biochemical, and molecular implications. *Zebrafish* **2018**, *15*, 519–532. <https://doi.org/10.1089/zeb.2018.1596>.
- Zarantoniello, M.; Randazzo, B.; Truzzi, C.; Giorgini, E.; Marcellucci, C.; Vargas-Abúndez, J.A.; Zimbelli, A.; Annibaldi, A.; Parisi, G.; Tulli, F.; et al. A six-months study on Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) based diets in zebrafish. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 8598. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45172-5>
- Zarantoniello, M.; Randazzo, B.; Gioacchini, G.; Truzzi, C.; Giorgini, E.; Riolo, P.; Gioia, G.; Bertolucci, C.; Osimani, A.; Cardinaletti, G.; et al. Zebrafish (*Danio rerio*) physiological and behavioural responses to insect-based diets: A multidisciplinary approach. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 10648. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67740-w>
- Zeisel, S.H.; DaCosta, K.A.; Fox, J.G. Endogenous formation of dimethylamine. *Biochem J.* **1985**, *232*, 403–408. <https://doi.org/10.1042/bj2320403>

Zhan, S.; Fang, G.; Cai, M.; Kou, Z.; Xu, J.; Cao, Y.; ... & Huang, Y. Genomic landscape and genetic manipulation of the black soldier fly *Hermetia illucens*, a natural waste recycler. *Cell Research* **2020**, *30*(1), 50-60. <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0252-6>

Zhang, N. Epigenetic modulation of DNA methylation by nutrition and its mechanisms in animals. *Anim Nutr.* **2015**, *1*(3):144–151. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2015.09.002>

Zhu, D.; Huang, X.; Tu, F.; Wang, C.; Yang, F. Preparation, antioxidant activity evaluation, and identification of antioxidant peptide from black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) larvae. *J. Food Biochem.* **2020**, *44*, e13186. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13186>

Zielińska, E.; Baraniak, B.; Karaś, M. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Hydrolysates and Peptide Fractions Obtained by Enzymatic Hydrolysis of Selected Heat-Treated Edible Insects. *Nutrients* **2017**, *9*, 970. <https://doi.org/10.3390/nu9090970>

Zou, T.B.; He, T.P.; Li, H.B.; Tang, H.W.; Xia, E.Q. The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. *Molecules* **2016**, *21*, 72. <https://doi.org/10.3390/molecules21010072>

8 Sitografia

<https://www.sprecozero.it/waste-watcher/>

<https://www.fishforward.eu/it/facts-figures/>

<https://www.fao.org/fishery/en/facp/ita?lang=en>

https://food.ec.europa.eu/safety/food-waste_en

https://www.insectschool.com/wp-content/uploads/BSFcircle_Insect_School_22-scaled-847x582-c-default@2x.jpg

<https://bugguide.net/images/cache/dk4/k1k/dk4k1k5kek1qa04q10wqlspqb0gqb02qo00k9keqlswqlspqt0eqb09qj0nqakikvk8kj08qt01qvkvq304qd0aqbkaq.jpg>

https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=130298#null

<https://ipiff.org/wp-content/uploads/2022/02/Screen-Shot-2018-07-24-at-16.52.54-768x620-1.png>

9 Ringraziamenti

- Ai miei genitori per il sostegno che mi hanno dato durante questi anni di dottorato.
- Ai miei colleghi per aver reso questi anni indimenticabili
- Alla Professoressa Giannetto per avermi guidato lungo questo percorso di crescita scientifica ed individuale
- Alla Dottoressa Oliva per il supporto che mi ha dato in questi tre anni
- A tutti i miei amici che sono stati sempre presenti