



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MESSINA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE

Dottorato di ricerca in Scienze Veterinarie

Coordinatore: Prof. Adriana Ferlazzo

Curriculum:

**Sanità Pubblica Veterinaria
e Sicurezza alimentare**

Nutrizione ecosostenibile in acquacoltura: la farina di mosca soldato (*Hermetia illucens*, Linnaeus, 1758) in parziale sostituzione della farina di pesce nell'alimentazione di esemplari adulti di orata (*Sparus aurata*, Linnaeus, 1758)

Tesi di:
Dott. Giovanni Marco Cusimano

Tutor:

Prof. Biagina Chiofalo

Cotutor:

Dott.ssa Giulia Maricchiolo

INDICE

Capitolo I

1.0 ACQUACOLTURA

- 1.1 STATO DELLE PRODUZIONI (SITUAZIONE MONDIALE ED ITALIANA)
 - 1.1.1 SOSTENIBILITÀ DELL'ACQUACOLTURA
- 1.2 L'ALIMENTAZIONE IN ACQUACOLTURA
 - 1.2.1 FABBISOGNI NUTRITIVI DEI PESCI
 - 1.2.2 ANATOMIA E FISIOLOGIA DEL TRATTO DIGERENTE DEI TELEOSTEI
 - 1.2.3 ENZIMI DIGESTIVI
 - 1.2.3.1 PRINCIPALI ENZIMI COINVOLTI NELLA DIGESTIONE
- 1.3 PRINCIPALI FARINE UTILIZZATE PER L'ALIMENTAZIONE IN ACQUACOLTURA
 - 1.3.1 FARINE DI ORIGINE ANIMALE
 - 1.3.1.1 FARINA DI PESCE
 - 1.3.2 FARINE DI ORIGINE VEGETALE
 - 1.3.3 FARINE DI INSETTO
- 1.4 CENNI DI LEGISLAZIONE IN MATERIA DI SPERIMENTAZIONE ANIMALE (DECRETO L.GS 26/2014)

Capitolo II

2.0 SCOPO DELLA TESI

- 2.1 SPECIE OGGETTO DELLA SPERIMENTAZIONE (*SPARUS AURATA*).
BIOLOGIA ED HABITAT

Capitolo III

3.0 MATERIALI E METODI

- 3.1 TECNICHE DI RIPRODUZIONE IN PISCICOLTURA
 - 3.1.1 MODULI DI ALLEVAMENTO
 - 3.1.2 PARAMETRI CHIMICO-FISICI
 - 3.1.3 DIETE SPERIMENTALI

- 3.1.4 PRODUZIONE DEL MANGIME**
- 3.1.5 GESTIONE ZOOTECNICA**
- 3.1.6 PRELIEVO ED ANALISI CAMPIONI**
- 3.1.7 ANALISI ENZIMATICHE: PROTEASI, LIPASI ED AMILASI**
- 3.1.8 ANALISI DELLA DIGERIBILITÀ**

Capitolo IV

4.0 RISULTATI

- 4.1 PERFORMANCES DI CRESCITA**
- 4.2 INDICI MORFOMETRICI E BIOMETRICI**
- 4.3 ANALISI ENZIMATICA**
- 4.4 ANALISI DELLA DIGERIBILITÀ**

Capitolo V

5.0 DISCUSSIONI

Capitolo VI

6.0 CONCLUSIONI

Capitolo VII

7.0 BIBLIOGRAFIA

Capitolo I

1. ACQUACOLTURA

L'antico proverbio cinese *“Dai un pesce ad un uomo e lo nutrirai per un giorno. Insegnagli a pescare e lo sfamerai per il resto della vita”* rende l'idea del valore che il pesce riveste come risorsa alimentare fin dalla preistoria. Sin dagli albori della storia umana, ancor prima della documentazione ad oggi disponibile, il pesce ha rappresentato la maggiore fonte proteica di origine animale consumata a livello umano, rivestendo un importante ruolo socioeconomico in tutte le civiltà.

Recentemente l'attività di pesca ha raggiunto, se non addirittura sorpassato, la massima sostenibilità produttiva dell'ambiente marino, intaccando in modo irreparabile gli stock naturali, causando un *overfishing* di organismi destinati al consumo umano (Jackson *et. al*, 2001). Questo, unito alla crescita esponenziale della popolazione globale ed allo sproporzionato incremento in produzione agricola avvenuto in molti paesi in via di sviluppo, ha progressivamente portato allo sviluppo dell'acquacoltura per la produzione di proteine animali destinate al consumo umano (Subasinghe *et. al*, 2009).

L'acquacoltura, viene definita come ***“L'allevamento di organismi acquatici (pesci, molluschi, crostacei e piante acquatiche). Questo implica forme di intervento umano attraverso l'allevamento nei processi di accrescimento, attraverso sistemi di semina e controllo, alimentazione, protezione o controllo dai predatori, etc.. L'allevamento implica, inoltre, la proprietà, in forma associata o singola, dello stock di allevamento”***. (FAO, Circolare 815).

La moderna acquacoltura si è sviluppata negli ultimi 40 anni, grazie all'accelerazione dovuta allo sviluppo scientifico e tecnologico. Attualmente quest'attività, secondo i dati FAO 2016, produce a livello mondiale circa 70 milioni di tonnellate e rappresenta il 50% della produzione ittica mondiale.

Secondo questi dati un totale di 580 specie vengono allevate a livello globale. Queste includono 362 teleostei (inclusi gli ibridi), 104 molluschi, 62 crostacei, 6 tra anfibi e rettili, 9 specie di invertebrati acquatici e 37 piante acquatiche.

La domanda di prodotti ittici sul mercato è il motore che stimola imprenditori e scienziati a mettere a punto tecniche di allevamento che permettano di massimizzare la produzione, mantenendo elevati standard qualitativi.

Tale attività è vantaggiosa rispetto alla pesca commerciale poiché racchiude la possibilità di predire, entro una certa misura, qualità e quantità della produzione, ed essere allo stesso tempo maggiormente controllata da un punto di vista produttivo. La raccolta risulta maggiormente efficiente ed il prodotto può rispecchiare a pieno le richieste del mercato vista la possibilità di agire sulle condizioni ambientali e sulla genetica degli stock allevati.

1.1 STATO DELLE PRODUZIONI (SITUAZIONE MONDIALE E ITALIANA)

A partire dagli anni '70, l'acquacoltura ha trovato la sua dimensione su scala industriale, evolvendo a sistema produttivo ad alta intensità in linea con quanto già sviluppato per gli organismi terrestri (Folke e Kautsky, 1992). I tassi di sviluppo registrati sono stati così elevati da acquisire il titolo di attività produttiva a più rapida crescita mondiale nell'ambito delle produzioni animali.

Statistiche FAO presentate nel 2003, mostrano che sulla base di una produzione totale a livello mondiale di pesci, molluschi e crostacei pari a 132,5 milioni di tonnellate, ben 42,3 milioni di tonnellate provenivano dall'acquacoltura, pari a circa il 32% del totale (agli inizi degli anni '70 l'incidenza non oltrepassava il 4%).

La crescita media annua del comparto acquacoltura, pari al 10,8% negli anni '80 e al 9,4% a partire dagli anni '90, se confrontata con la dinamica registrata dall'attività di pesca nello stesso arco di tempo (rispettivamente +2,3% e +0,5%) mette in evidenza il ruolo fondamentale assunto dall'attività di allevamento nel soddisfare il crescente fabbisogno di proteine che la pesca non è più in grado di coprire, specialmente nei paesi in via di sviluppo, in cui la politica delle autorità sanitarie raccomanda fortemente l'aumento di consumo di pesce (Kris-Etherton *et al*, 2009). In effetti, nell'ultimo decennio la produzione ittica mondiale è cresciuta grazie soprattutto allo sviluppo dell'acquacoltura che ha fatto registrare il suo massimo produttivo nel 2016 con 80 milioni di tonnellate con un valore stimato in 160,2 miliardi di dollari, mostrando una crescita superiore al 20%.

Dall'altro lato, i volumi di pesce catturati hanno mostrato un andamento produttivo altalenante e nell'ultimo quinquennio il *trend* è stato decisamente negativo, a causa del sovrasfruttamento degli stock ittici di molte specie (Figura 1).

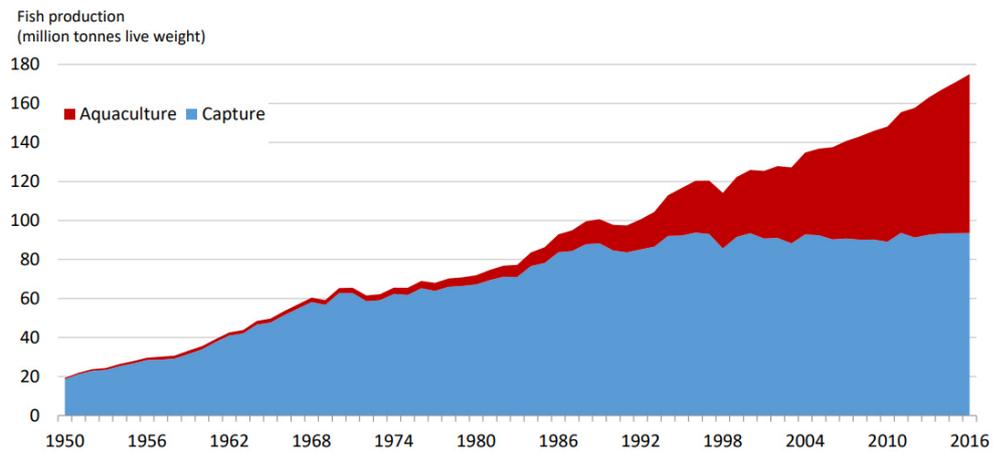


Fig.1. Trend produttivo del settore acquacoltura e pesca dal 1950 al 2016 (Fonte: FISHSTAT e IMPACT model projection)

Le previsioni elaborate dalla FAO indicano che il *trend* di crescita dell'acquacoltura proseguirà anche nei prossimi anni, eguagliando l'output proveniente dalla pesca nel 2030, con una produzione di 93 milioni di tonnellate (Figura 2).

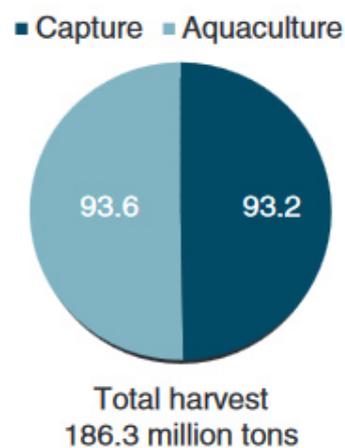


Fig.2. Previsioni di crescita della produzione in acquacoltura al 2030. (Fonte FishStat e IMPACT model projection)

Alla luce di questi dati, risulta evidente come il consumo pro capite di prodotti dell'acquacoltura abbia subito un incremento considerevole a partire dagli anni '60 in cui il valore si attestava intorno ai 9,9 kg. A distanza di 30 anni, la media era intorno ai 14 kg, fino a raggiungere il valore massimo di 20 kg nel 2014.

Questo sottolinea l'enorme potenziale produttivo dei mari e delle acque interne in proiezione futura, nel contribuire in modo significativo alla nutrizione ed alla

sicurezza alimentare di una popolazione globale che si presume possa raggiungere i 9,7 miliardi entro il 2050.

Allo stato attuale, oltre il 90% della produzione d'acquacoltura proviene da paesi in via di sviluppo, primo fra tutti la Cina con una quota superiore al 60% del totale mondiale, seguita da Indonesia, India e Vietnam (Figura 3). Tra i paesi industrializzati, Giappone, Norvegia e Stati Uniti sono leader produttivi, mentre l'Unione europea, seppure non ai tassi di crescita registrati nelle altre regioni del mondo, ha conosciuto uno sviluppo notevole ed è stata in grado di soddisfare una domanda crescente, diversificando l'offerta sul mercato attraverso l'introduzione di nuove specie e taglie.

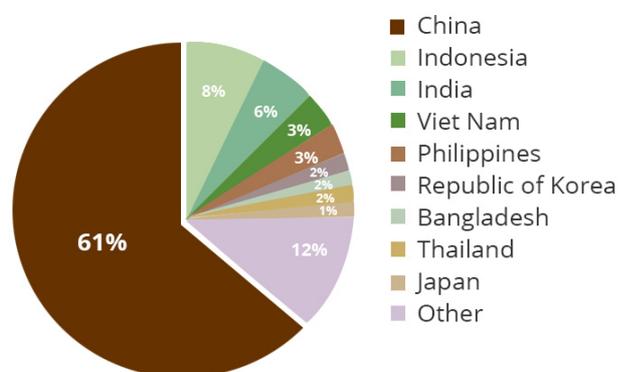


Fig.3. Produzione mondiale di organismi allevati (Fonte: Aqual)

La produzione attuale dell'Ue è di circa 1,4 milioni di tonnellate, con un'incidenza sul totale mondiale del 3,3% in volume. In Europa, tra le altre realtà produttive importanti va segnalata la Norvegia, primo produttore al mondo per l'allevamento dei salmoni. I principali produttori di acquacoltura tra gli Stati membri dell'UE sono la Spagna (22%), la Francia (17%), il Regno Unito (16%), l'Italia (~13%) e la Grecia (8,5%), che insieme hanno rappresentato circa il 77% della produzione complessiva in acquacoltura (FAO 2016).

L'Italia riveste un ruolo importante nell'acquacoltura europea, contribuendo al 12,6% del volume delle produzioni, attestandosi al quarto posto dopo Spagna, Francia e Regno Unito (FAO, 2016). La principale attività produttiva, così come in Spagna e Francia è costituita dalla molluschicoltura, rappresentando il primo paese produttore di vongole veraci (*Ruditapes philippinarum*) e coprendo i due terzi della produzione di mitili (*Mytilus galloprovincialis*). Inoltre rappresenta il

45% della storionicoltura e il 20% circa della produzione di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*).

La situazione italiana, evidenzia una sostanziale stabilità produttiva nel periodo 2002-2013 sia per le specie d'acqua dolce che marine, (Figura 4).

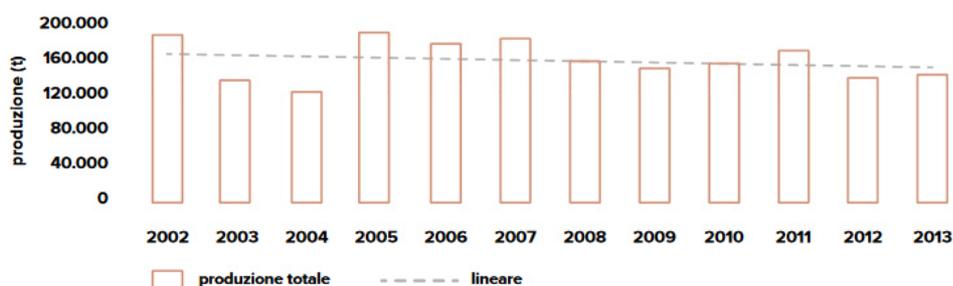


Fig.4. Linea di tendenza delle produzioni totali in Italia nel periodo 2002-2013

Nel 2014 la produzione ha subito un forte incremento in volume rispetto al 2013 (+5,6%), dovuto principalmente alla maggiore produzione di molluschi (+12,9%). Nel 2015, secondo dati elaborati dall'Associazione Piscicoltori Italiani (API), è rimasta sostanzialmente stabile in termini di quantità (+1%), rispetto al forte incremento verificatosi nel 2014. Nel dettaglio, il totale produttivo del settore ammonta a 176.000 tonnellate per un valore di circa 530 milioni di euro, di cui 114.000 tonnellate (64% del totale) con un valore di 200 milioni di euro (38% del totale) provenienti dalla molluschicoltura (Tabella 1).

	Produzione (tonnellate)			Valore (migliaia di euro)
	impianti a terra e a mare	impianti vallivi e salmastri	totale	
Spigola	6.450	500	6.950	55.400
Orata	7.360	500	7.860	59.000
Ombrina	250	-	250	1.900
Anguilla	1.000	250	1.250	14.000
Cefali	-	3.000	3.000	9.750
Trota	38.000	-	38.000	152.000
Salmerino	700	-	700	3.150
Pecece gatto	600	-	600	3.300
Carpe	700	-	700	2.500
Storioni	1.480	-	1.480	13.500
Altri pesci	2.000	-	2.000	14.500
Totale pesci	58.540	4.250	62.790	329.000
Mitili	-	-	80.000	64.000
Vongola verace	-	-	34.000	136.000
Totale molluschi	-	-	114.000	200.000
Totale acquacoltura	-	-	176.790	529.000

Tab.1. Produzione dell'Acquacoltura italiana nel 2015

L'acquacoltura in Italia comprende principalmente l'allevamento di 30 specie tra pesci, molluschi e crostacei (Grafico 1), ma effettivamente il 97% della produzione nazionale è basato soltanto su 5 specie: trota (acque dolci), spigola e orata (acque marine) e tra i molluschi, i mitili e le vongole veraci.

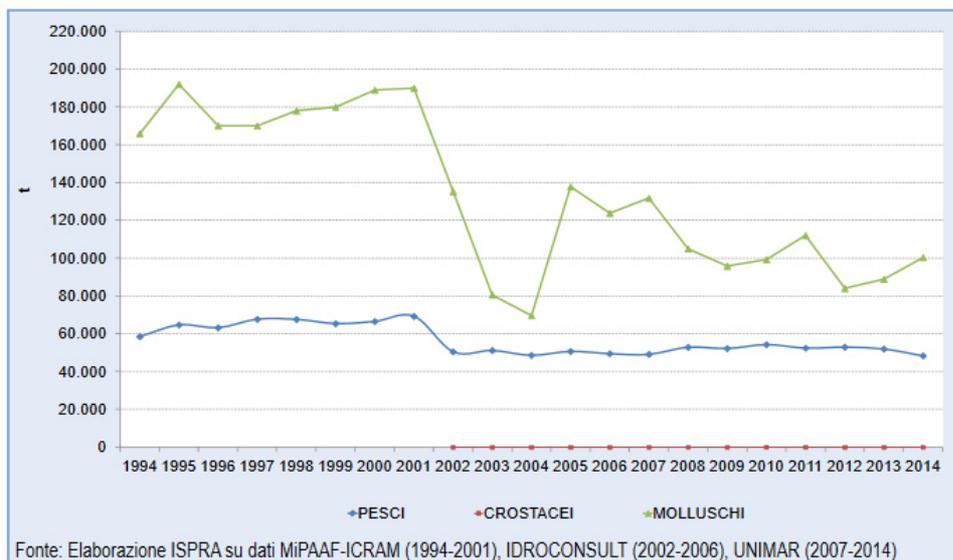


Grafico.1. Produzione annuale in acquacoltura di Pesci, Molluschi e Crostacei. (Fonte: Ispra 1994-2001; IDROCONSULT 2002-2006; UNIMAR 2007-2014)

Tra i pesci, la specie maggiormente prodotta è la trota, con una produzione nel 2015 di 38000 tonnellate, seguono l'orata con 7860 tonnellate e la spigola con 6950 tonnellate. Altre specie di pregio sono rappresentate da storione, anguilla e ombrina.

1.1.1 SOSTENIBILITÀ DELL'ACQUACOLTURA

La rapida crescita dell'acquacoltura ha posto un serio interrogativo sulla sostenibilità ambientale di questa pratica zootecnica. In particolare sull'utilizzo delle risorse ambientali, gli impatti generati sull'ambiente, la biodiversità e l'ecosistema.

Secondo la FAO, a seguito di un'analisi comparativa sulla sostenibilità ambientale dell'acquacoltura rispetto ad altre pratiche zootecniche, essa risulta tra i sistemi agroalimentari più efficienti come rapporto input/output, rappresentato dalla domanda di risorse (input) e dalla generazione di prodotti (output). In particolare l'utilizzo di risorse (suolo, acqua, fertilizzanti ed energia) ed il limitato impatto (nutrienti ed emissione di gas serra), appaiono più efficienti nei sistemi di produzione ittica rispetto ad altre tipologie di allevamento (avicolo, suinicolo e bovino). Inoltre, i pesci possiedono il minore indice di conversione alimentare (I.C.A.) tra gli animali allevati (Tabella 2).

Specie allevata	I.C.A
Salmonidi	<1
Pesci marini	Tra 1-2
Polli	~2
Suini	2/3
Bovini	6/10

Tab.2. Principali indici di conversione alimentare delle specie zootecniche

Tutto ciò si ripercuote sul costo potenziale del prodotto finale, che dimostra la sostenibilità economica di tale pratica zootecnica. Inoltre, in tempi in cui viene data grande enfasi all'importanza del valore nutrizionale degli alimenti, il pesce ha un notevole vantaggio rispetto agli altri animali di interesse zootecnico come bovini, ovini e suini. In particolare il pesce ha un'elevata digeribilità, un'adeguata composizione in tutti i maggiori componenti nutrizionali, in particolare in acidi grassi della serie ω -3, ma una deficienza in Calcio, Vitamina A e C.

Secondo questa analisi, la FAO auspica un aumento del consumo dei prodotti dell'acquacoltura nei prossimi anni, considerando che rappresenta la fonte di proteine ad uso umano con il minore impatto ambientale (FAO, 2014).

Se a questa analisi, si aggiunge che i prodotti ittici provenienti dall'attività di pesca hanno raggiunto, se non addirittura sorpassato la massima sostenibilità produttiva dell'ambiente marino, intaccando in modo irreparabile gli stock naturali (Robinson, 1984), appare chiaro come vi sia stato e continui ad esserci un progressivo sviluppo dell'acquacoltura, finalizzato alla produzione di proteine animali destinate al consumo umano (Subasinghe *et al.*, 2009).

Tuttavia, la progressiva espansione di questo settore ha causato un forte aumento della domanda di mangimi destinati all'allevamento intensivo, con ripercussioni sulla richiesta di materie prime destinate alla loro produzione.

Attualmente, le materie prime maggiormente utilizzate per l'alimentazione di specie ittiche sono la farina di pesce e l'olio di pesce, rispettivamente fonte proteica e di acidi grassi essenziali della serie omega 3, che vengono prodotte a seguito della cattura e lavorazione di specie pelagiche (*Trachurus murphyi*; *Engraulis ringens*; *Clupea harengus*). Tuttavia, questo ha portato al conseguente sovrasfruttamento degli stock ittici, che, secondo dati FAO del 2010, risultano per il 50% fortemente sfruttati, mentre per il 32%, addirittura esauriti (Botsford *et al.*, 1997; Garcia e de Leiva Moreno, 2000). Inoltre, se a ciò si aggiunge la naturale oscillazione produttiva, come quella verificatasi nel 2014 in Perù, in cui le catture di *Engraulis rigens* sono scese a 2,3 milioni di tonnellate, circa la metà rispetto al 2013, nonché il valore minimo registrato dal 1998 in occasione di El Nino, appare evidente come la dipendenza da tali materie prime sia un limite per la crescita di un settore che ne rappresenta attualmente il maggiore consumatore (58% circa di farina di pesce ed 80% circa di olio; IFFO, 2011).

Pertanto, alla luce di ciò, se l'acquacoltura si vuole realmente porre come attività dalla connotazione fortemente ecosostenibile, preservando gli stock ittici naturali dall'eccessivo impoverimento diretto ed indiretto, permettendo allo stesso tempo l'accesso a proteine dall'alto valore biologico anche ai paesi in via di sviluppo, diventa indispensabile diminuire la dipendenza da tali materie prime, investendo sulla ricerca di fonti alternative per rispettare l'equilibrio ecologico e i principi dello sfruttamento sostenibile.

1.2 L'ALIMENTAZIONE IN ACQUACOLTURA

L'alimentazione è definita come l'insieme dei processi che, tramite il procacciamento e l'assunzione di prodotti di origine animale e vegetale, forniscono l'energia, i costituenti chimici (nutrienti) e le sostanze ad azione nutrizionale necessari per il mantenimento e lo sviluppo degli organismi viventi. In acquacoltura questo si traduce con la scelta, formulazione, preparazione e somministrazione dell'alimento agli esemplari allevati, in modo che essi possano svolgere tutte quelle reazioni biochimiche e metaboliche inerenti l'utilizzazione delle molecole alimentari. L'alimentazione dunque, deve tener conto di una serie di fattori che permettano di soddisfare il fabbisogno nutrizionale della specie allevata:

- Comportamento alimentare ed assunzione del cibo;
- Digestione ed assorbimento dell'alimento;
- Metabolismo dei nutrienti;
- Escrezione ed eliminazione dei residui.

Tutto ciò richiede uno studio approfondito di quelle che sono le caratteristiche fisiologiche e metaboliche ed in tal senso la ricerca scientifica e tecnologica hanno portato negli ultimi anni alla comprensione e di conseguenza alla formulazione di mangimi completi e bilanciati che potessero soddisfare le richieste in termini di macro e micromolecole delle specie di interesse commerciale.

La strategia alimentare adottata dalle industrie del settore mira ovviamente a massimizzare la produzione, utilizzando la minor quantità possibile di alimento, vale a dire ottenere la massima efficienza di conversione alimentare (ICA) del prodotto finale. Tutto ciò è subordinato ovviamente al costo generale che ha l'alimentazione all'interno di un'azienda privata, in cui secondo stime effettuate, questa può comportare fino ad un 40-50% dei costi di produzione, arrivando durante alcune fasi della crescita anche al 70%. Secondo questa analisi, la scelta di diete equilibrate che garantiscano una crescita ottimale nonché uno stato di salute generale degli individui allevati, risulta fondamentale.

1.2.1 FABBISOGNI NUTRITIVI DEI PESCI

I pesci, come tutti gli altri vertebrati, necessitano di fonti energetiche e nutrienti provenienti dalla dieta per espletare le funzioni biologiche proprie di un sistema vivente come: acquisire energia e convertirla in una forma utilizzabile, sintetizzare macromolecole, crescere e riprodursi. Sebbene le conoscenze sui fabbisogni dei pesci non abbiano ancora raggiunto un livello paragonabile a quello delle specie terrestri, i risultati ottenuti dalla ricerca scientifica ed industriale assicurano ottime prestazioni produttive, elevata resistenza a stress e patologie, contenimento dell'impatto ambientale e qualità del prodotto finale da un punto di vista nutrizionale oltre che organolettico (Cataudella *et al.*, 2001)

L'aspetto primario che va tenuto in considerazione è quello relativo all'ingestione dell'alimento. Questo dipende da fattori classificati come intrinseci ed estrinseci. I primi possono essere a loro volta suddivisi in meccanismi a breve termine (sotto il controllo dell'ipotalamo) o a lungo termine e derivanti dal livello di grasso corporeo presente. Questi hanno una diretta correlazione con l'età, taglia e stato fisiologico dell'animale. Un classico esempio di fattore intrinseco è il peso del pesce, poiché la quantità di alimento ingerita diminuisce al crescere della taglia.

I fattori definiti estrinseci dall'altro lato, sono legati a caratteristiche dell'alimento quali contenuto energetico ed in macromolecole oltre che parametri ambientali come fotoperiodo, temperatura, livello di ossigeno ed intensità luminosa (Guillaume *et al.*, 2001).

In questo contesto il bilanciamento dei nutrienti forniti con la dieta deve essere tale da permettere di soddisfare i bisogni energetici, oltre a fornire quella quota di nutrienti essenziali a garantire una crescita ottimale della specie allevata (Cho e Kaushik, 1992). E' evidente come ogni specie, indipendentemente dal livello trofico a cui appartiene, necessiti di mangimi specificatamente formulati che abbiano un profilo bilanciato in proteine, lipidi, energia, vitamine e minerali.

Proteine

Le proteine rappresentano il principale costituente organico dei tessuti dei pesci, che le utilizzano per accrescersi, depositandole a livello muscolare (Carter e Houlihan, 2001). L'utilizzo degli elementi costitutivi delle proteine (aminoacidi) apportati con la dieta, sommati a quelli riciclati dalle proteine corporee, a seguito del turnover necessario al rinnovo cellulare, vengono utilizzati nella sintesi di nuova massa proteica (accrescimento) e di altri composti azotati bioattivi. Tra gli animali allevati, il riciclo di aminoacidi provenienti dalle strutture corporee è quantitativamente minore nei pesci, pertanto mostrano una maggiore dipendenza dalla dieta per la copertura dei fabbisogni proteico-aminoacidici. Come in tutti i vertebrati, vi sono alcuni dei 20 aminoacidi costituenti le proteine, definiti essenziali (AAE) che non sono sintetizzati a livello metabolico (Jauncey, 1988), ma devono necessariamente essere introdotti con la dieta (Tabella 3).

AAE	Salmonidi	Spigola	Anguilla	Orata
Arginina	4.4	3.9	4.5	5.4
Istidina	1.6	1.3	2.1	1.7
Isoleucina	2	2.6	4	2.6
Leucina	3.6	4.3	5.3	4.5
Lisina	4.8	4.8	5.3	5
Metionina + Cisteina	3.3	4.1	4.2	2.4
Fenilalanina + Tirosina	5.3	5.1	5.2	2.9
Treonina	2	2.6	4	2.8
Triptofano	0.6	0.6	1.1	0.6
Valina	3.3	2.9	4	3

Tab.3. Fabbisogni in aminoacidi essenziali (espressi in % di proteina della dieta) di alcune specie ittiche.

(Fonte: Cataudella e Bronzi, 2001; Kaushik, 1998)

Inoltre non tutta la proteina ingerita viene utilizzata per la crescita, poiché una certa quota (5-15%) viene escreta all'esterno attraverso le feci, mentre parte degli aminoacidi assorbiti vengono utilizzati nella catabolisi cellulare per produrre energia vitale, in special modo nelle specie carnivore che non riescono ad utilizzare i carboidrati a tal scopo. Questo processo porta alla formazione di composti di scarto azotati (NH_3) che verranno eliminati attraverso le branchie, e che insieme alle feci contribuiscono ad aumentare il carico inquinante di un allevamento. Di conseguenza la determinazione del livello proteico ottimale è

importante, da un lato perchè permette la costruzione dei tessuti e l'utilizzazione energetica da parte dell'organismo, dall'altra perchè minimizza l'immissione in natura di residui azotati. Questo è inoltre condizionato dal contenuto energetico del mangime ed in particolare della sinergia che si viene a creare con il contenuto lipidico e glucidico della dieta stessa. Un corretto rapporto tra proteina ed energia digeribile (PD/ED), favorisce l'utilizzo a scopo energetico della frazione lipidica e glucidica, riducendo il catabolismo aminoacidico; si tratta del cosiddetto “*protein sparing effect*”, definito come il processo mediante il quale il corpo ricava energia da fonti diverse dalle proteine. Tali fonti possono includere lipidi e carboidrati sia di riserva che alimentari. Il risparmio proteico così ottenuto, preserva il tessuto muscolare, permettendo agli amminoacidi di non essere catabolizzati a scopo energetico, ma di essere immagazzinati maggiormente a livello corporeo. Nei pesci carnivori, l'aumento del tenore lipidico del mangime è una strategia molto utilizzata a tal fine, giustificando l'efficace utilizzo di diete estruse ad alta densità energetica.

Specie	% Proteina greggia	PD/ED (mg/kj)
Trota iridea	38 – 45	17 – 19
Spigola	45 – 50	20 – 22
Orata	40 – 45	19 – 20
Anguilla	44 - 48	-

Tab.4. Livelli proteici ottimali (% s.s.) e rapporto PD/ED consigliati nella dieta di alcune specie ittiche di interesse commerciale (Fonte: Cataudella e Bronzi, 2001)

Anche la qualità della proteina condiziona il livello ottimale nel mangime, poiché fonti proteiche poco digeribili e carenti in AAE rispetto ai fabbisogni del pesce, portano a dover incrementare la quota proteica a discapito di un'efficiente conversione proteica.

Lipidi

I lipidi rappresentano importanti fonti energetiche e di acidi grassi essenziali (AGE) necessari per l'accrescimento e lo sviluppo del pesce. Da un punto di vista biochimico, i lipidi, vengono definiti come miscele eterogenee di grassi, oli, vitamine liposolubili ed ormoni, il cui elemento strutturale comune è l'acido grasso.

Esistono differenti classi di lipidi, ma la più importante è costituita dai trigliceridi e dai fosfolipidi. I trigliceridi, che sono la componente preponderante di qualsiasi lipide naturale, sono costituiti da 3 acidi grassi legati chimicamente (attraverso un legame "estere") ad una molecola di glicerolo. Gli acidi grassi a loro volta vengono suddivisi in saturi ed insaturi, a seconda se sono o meno presenti doppi legami.

Queste macromolecole vengono utilizzate a livello metabolico principalmente per il soddisfacimento del fabbisogno in acidi grassi essenziali (AGE), ovvero quelli che non possono essere sintetizzati dall'animale (acido linoleico, acido linolenico e i relativi derivati PUFA a catena lunga) Tabella 5.

Tuttavia solo una carenza dietetica prolungata nel tempo di AGE può condurre alla morte dell'esemplare, mentre sub carenze o carenze periodiche riducono le performances produttive e riproduttive. Gli AGE nei pesci infatti assolvono funzioni specifiche quali:

- Struttura portante dei fosfolipidi, delle membrane cellulari e delle lipoproteine di trasporto;
- Substrato per la sintesi delle prostaglandine ed in composti derivati (leucotrieni e trombassani);
- "Secondo messaggero" svolto, seppur in modo ancora poco conosciuto, dall'acido arachidonico AA.

I fabbisogni in AGE differiscono da specie a specie (Tabella 10), ma in generale si osserva che i pesci d'acqua dolce hanno un maggiore fabbisogno in acido linoleico e linolenico, mentre le specie marine richiedono maggiormente EPA (acido eicosapentaenoico) e DHA (acido docosaesaenoico) (Bell *et al.*, 1986)

Specie	AGE	Fabbisogno (% razione)
Trota iridea	18:3 n3	0.8 – 1.7
Salmone atlantico	18:3 n3	1 – 2.5
Carpa comune	18:2 n6 18:3 n3	1 1
Anguilla europea	18:2 n6 18:3 n3	0.5 0.5
Tilapia del Nilo	18:2 n6	0.5
Pesce gatto	18:3 n3 PUFA n3	1 – 2 0.5 – 0.75
Orata Giapponese	PUFA n3	0.4
Striped bass americano	PUFA n3	1.7

Tab.5. Fabbisogni in acidi grassi essenziali di alcune specie ittiche. (Fonte: Cataudella e Bronzi, 2001)

Come detto in precedenza l'importanza dei lipidi nella dieta è focalizzata maggiormente sull'aspetto energetico, dal momento che, se forniti in quantità idonee consentono di ridurre il consumo proteico a scopo energetico e di conseguenza limitare il rilascio di sostanze azotate in ambiente, migliorando al tempo stesso gli indici di conversione alimentare. Tuttavia definire una quota ottimale di lipidi nella dieta non è di facile determinazione, poiché sono diversi i fattori che la influenzano. Tra i principali ricordiamo la specie, lo stato di sviluppo dell'organismo (larva, avannotto, pesce adulto, riproduttore), il rapporto ottimale energia/proteina per quella data specie, nonché le tecnologie di preparazione del mangime stesso. In tal senso, come precedentemente accennato, l'avvento dell'estrusione, ha permesso un progressivo aumento del tenore lipidico nei mangimi. Queste diete, se gestite in maniera conforme, consentono di minimizzare l'impatto ambientale e di ottenere accrescimenti superiori. Tuttavia l'utilizzo di mangimi estrusi richiede, proprio in virtù dell'elevato tenore lipidico, una maggiore attenzione dello stato di conservazione, per evitare fenomeni di ossidazione ed irrancidimento.

Carboidrati

I carboidrati, detti anche glucidi, sono sostanze formate da carbonio ed acqua. Hanno forma molecolare $(CH_2O)_n$ e sono contenuti principalmente negli alimenti di origine vegetale. Si trovano prevalentemente sottoforma di glicogeno, amido, chitina, cellulosa, emicellulosa e lignina. La maggior parte degli animali ad eccezione dei ruminanti, dispone di un *pool* enzimatico limitato nella digestione di alcune di queste macromolecole e di conseguenza possono utilizzare solamente il glicogeno e l'amido, grazie alla produzione di amilasi per la loro digestione.

I pesci non fanno eccezione a questa regola, dato che la maggior parte delle specie è carnivora ed onnivora e i carboidrati non sono i maggiori costituenti della loro naturale dieta. Nonostante esistano specie erbivore, in grado di nutrirsi di alimenti di origine vegetale, in generale questa classe di organismi ha una scarsa capacità di utilizzazione dei carboidrati contenuti nella dieta, poichè incapaci di metabolizzare rapidamente il glucosio, che di conseguenza viene accumulato sottoforma di glicogeno. Dunque, la quantità di carboidrati nella dieta deve essere accuratamente controllata, in quanto un eccesso tende ad accumularsi come glicogeno, che risulta una forma di riserva non disponibile ad un rapido utilizzo come fonte energetica.

In generale, la percentuale di carboidrati nella dieta può essere più alta per le specie onnivore (ad es. 30-40 % nella carpa) e molto più bassa (fino al 10 %) per le specie carnivore, (Cataudella e Bronzi, 2001).

Sebbene queste macromolecole non siano indispensabili per l'alimentazione, poiché scarsamente digeribili, tuttavia vengono inclusi a percentuali variabili all'interno delle diete destinate alle specie di interesse commerciale. Questa integrazione ha diverse funzioni:

- Energia a basso costo (in termini di costo per kJ);
- Funzione legante all'interno del mangime grazie all'effetto gelatinizzante dovuto alla cottura in fase di estrusione;
- Miglioramento della pellettabilità e stabilità in acqua del mangime;
- Funzione riempitiva nella dieta durante la formulazione;
- *Protein sparing effect* (effetto in termini di miglioramento della crescita e di utilizzazione delle proteine) (Guillaume *et al.*, 2001).

Vitamine e minerali

Le vitamine sono molecole organiche che agiscono da cofattori o come substrato di reazioni metaboliche. Vengono classificate in liposolubili (A, D, E, K) ed idrosolubili (gruppo B, C, colina e inositolo). Le prime vengono assorbite a livello intestinale in presenza di lipidi e possono essere accumulate nelle riserve adipose. Le idrosolubili vengono assorbite mediante trasporto attivo e non possono essere accumulate dai pesci.

Il fabbisogno vitaminico è stato ampiamente studiato nei salmonidi e stabilito con precisione soltanto per alcune specie. I dati disponibili per specie quali carpa e pesce gatto sono piuttosto incompleti, mentre per le specie marine quasi inesistenti (Guillaume *et al.*, 2001). Di conseguenza, è pratica comune quella di utilizzare come fabbisogno di riferimento quello dei salmonidi, applicandolo alle altre specie allevate. In generale, ne sono necessarie piccole quantità da integrare nella dieta per soddisfare il fabbisogno della maggior parte delle specie ittiche.

I minerali invece, definiti essenziali per i pesci sono circa 20 e possono essere classificati in macroelementi (Ca, P, K, Mg) e microelementi (Fe, Zn, Mn, Co, Cu, I, Se). Tra i macroelementi il fosforo assume una particolare importanza poiché rappresenta un fattore limitante, da assumere necessariamente con la dieta. Peraltro, un contenuto eccessivo di fosforo (P) nelle diete aumenta la concentrazione di fosfati nei reflui. Il calcio viene utilizzato nella strutturazione dello scheletro ma assolve anche a funzioni coenzimatiche in diverse reazioni. Tra i microelementi, notevole importanza riveste il ferro, essenziale per la formazione dell'emoglobina oltre ad intervenire in diverse reazioni enzimatiche. Nella determinazione dei fabbisogni minerali dei pesci, è importante sottolineare come il mezzo ambientale dove vivono, sia una fonte naturale di molti minerali tra cui (Ca, Mg, Na, Fe, Zn, Cu e Se) che vengono assunti attraverso le branchie, la pelle e l'apparato digerente (Cataudella e Bronzi, 2001). I valori di riferimento dei fabbisogni vitaminici e minerali per le principali specie di interesse commerciale, sono riportati in Tabella 6.

Vitamine			Minerali		
A	UI	2500	Ca	%SS	0.5 – 0.8
D3	UI	2400	P	“	0.03 – 0.24
E	“	50	Mg	“	0.05
K		0.45	Zn	ppm	15 – 20
Tiamina		1	Mn	“	12
Riboflavina		4	Cu	“	3
Piridossina		3	Se	“	0.15 – 0.4
Acido pantotenico		20			
B12		0.01			
Niacina		10			
Biotina		0.15			
Acido folico		1			
C		50			
Colina		1000			
Inositolo		300			

Tab.6. Fabbisogni minimi di vitamine e minerali in diete per trote. (Fonte: Cataudella e Bronzi, 2001)

1.2.2 ANATOMIA E FISIOLOGIA DEL TRATTO DIGERENTE DEI TELEOSTEI

I pesci, in quanto classe di Vertebrati, mostrano una notevole diversità a livello del tratto digerente. Studi condotti a livello zoologico hanno permesso di suddividere le specie ittiche in relazione a due principali linee: l'evoluzione della specie da una parte e l'adattamento alla dieta dall'altra.

Caratteristiche generali

I pesci possono alimentarsi con modalità di ricerca e presa del cibo molto diverse, questo perché il sistema digerente ha subito, nel corso dei secoli, notevoli modificazioni per permetterne l'adattamento alle differenti abitudini alimentari.

Le diverse morfologie del tratto gastrointestinale dei pesci possono dare utili informazioni su alcune loro caratteristiche biologiche, quali:

- Dieta
- Comportamento alimentare
- Posizione trofica
- Metabolismo
- Capacità di assimilazione dei nutrienti

Notoriamente esistono pesci predatori, succhiatori, raschiatori e filtratori. La maggior parte dei pesci risulta carnivora, poche specie erbivore, altre onnivore. Alcune specie sono monofaghe o stenofaghe, cioè si alimentano con una sola o poche categorie alimentari, ma la maggior parte dei pesci è eurifaga. Questa versatilità è necessaria dato il verificarsi di naturali fluttuazioni, sia quantitative che qualitative, del cibo presente in natura.

Il tratto digerente dei pesci, strutturato sul piano generale proprio dei Vertebrati, presenta molti adattamenti differenti anche intraspecifici (ad esempio esistono differenze tra giovanili ed adulti), correlabili alle differenti abitudini alimentari ed alla forma del corpo. Questa alta variabilità spiega in parte il successo evolutivo dei pesci.

Da un punto di vista anatomico (Figura 8) il tratto digerente è pressoché omogeneo nelle famiglie primitive, ma è variabile in molte delle famiglie evolute, mostrando una notevole plasticità in relazione all'alimento assunto.

Esistono specie con o senza stomaco, con esofago corto o lungo, con intestini di varie forme e numero di ciechi pilorici che varia da nessuno a circa un migliaio.

Sebbene l'anatomia macroscopica del tratto digerente sia molto variabile, i tipi di cellule e tessuti sono piuttosto conservati. Come negli altri vertebrati, il canale alimentare consiste di quattro strati di tessuti:

1. lo **strato mucoso** interno che consiste di due componenti:
 - Epitelio: forma una barriera permeabile selettiva tra l'ambiente interno, il lume e la lamina propria.
 - Muscularis mucosae: sottile strato di muscolatura liscia spesso presente tra la lamina propria e gli strati spessi. Risulta meno sviluppata nei pesci rispetto ai mammiferi. Le estensioni di questo strato, quando presenti, penetrano fino ai villi fornendo a questi l'abilità di muoversi.
2. La **sottomucosa**, formata da tessuto connettivo ricco di nervi e vasi sanguigni che si estendono fino alla mucosa;
3. La **tonaca muscolare** composta da due strati di muscolatura liscia: uno strato circolare interno ed uno longitudinale esterno. La loro contrazione è molto importante per i movimenti peristaltici;
4. la **sierosa** rappresenta lo strato più esterno. Consiste nel peritoneo viscerale che riveste il canale alimentare ed altri visceri presenti nella cavità peritoneale.

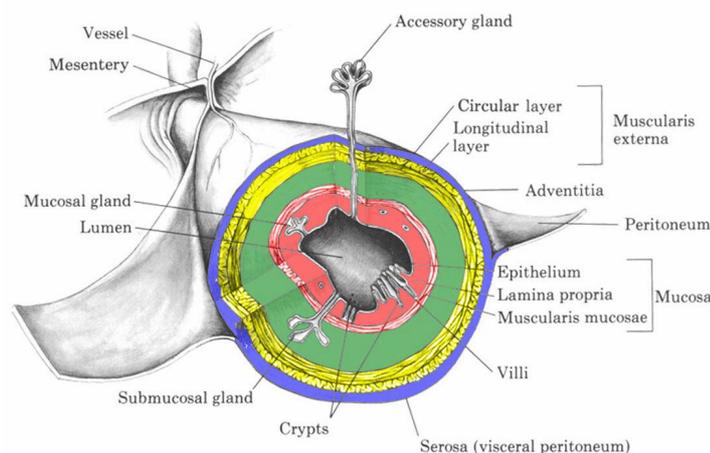


Fig.5. Anatomia del tratto digerente

Principali organi:

Bocca

Utilizzata nella prensione del cibo e nell'assunzione di acqua. Può essere posizionata parallelamente al corpo del pesce, rivolta verso l'alto o verso il basso a seconda della modalità di assunzione del cibo.

I denti, quando presenti, sono utilizzati per catturare e trattenere la preda o per filtrare (denti faringei). Le specie che si nutrono di crostacei o comunque di organismi duri da frantumare hanno denti modificati in vere e proprie piastre trituratrici (es. nell'orata).

Sono presenti organi al di fuori della bocca che possiedono cellule chemorecettrici con funzione di localizzazione, mentre le papille gustative assolvono ad altre funzioni collegate al comportamento alimentare come cessazione o rinforzo. Da un punto di vista microscopico, l'anatomia è simile a quella degli altri vertebrati. Nello specifico, le cellule mucose sono disperse tra le cellule epiteliali che rivestono la cavità orale e la faringe. Sono anche presenti ghiandole salivari unicellulari, al contrario degli altri vertebrati dove risultano essere pluricellulari. La secrezione derivante da tali ghiandole lubrifica e facilita il transito del cibo verso l'esofago.

Esofago

Considerato il primo tratto del canale alimentare vero e proprio, nonché l'organo di connessione tra la cavità buccale e lo stomaco. Nei pesci è quasi sempre corto ed ampio e la sua membrana mucosa, munita di varie cellule mucose, si distingue da quella che si trova nello stomaco e nell'intestino. L'esofago nei pesci è molto particolare in quanto la sua muscolatura è interamente o parzialmente striata a contrazione volontaria. Allo stato di riposo, si possono osservare sulla superficie interna dell'esofago delle pliche longitudinali che permettono la sua espansione, affinché possa essere attraversato da alimento di notevoli dimensioni. Queste pliche hanno la capacità di distendersi poiché le cellule epiteliali non sono ancorate alla membrana basale.

Solitamente è presente uno sfintere cardiaco nel punto di giunzione tra esofago e stomaco nelle specie d'acqua dolce, ma non in quelle marine. Questa differenza può essere spiegata dal fatto che pesci d'acqua dolce riducono al minimo l'ingestione di acqua, mentre le specie marine devono assumerne continuamente per assolvere ai processi di osmoregolazione.

A livello microscopico, l'anatomia risulta composta principalmente da un epitelio stratificato di cellule cuboidali con numerose cellule mucipare caliciformi. In questo caso la *muscularis mucosae* è assente, mentre la sottomucosa è spessa per via dell'abbondante tessuto connettivo.

Stomaco

Rappresenta l'organo adibito alla riserva di cibo, che permette ai pesci di nutrirsi sfruttando la disponibilità naturale di alimento. Questo, quando presente, mostra una certa variabilità tra le specie, ed in termini generali i pesci privi di stomaco sono spesso microfagi o erbivori, piuttosto che carnivori. Harder (1975) individua quattro linee fondamentali di differenziazione evolutiva (Figura 9):

- a) Forma ad Y: tipico delle specie carnivore (orata);
- b) Sifonale: tipico del pesce gatto, sogliola e salmone (saccato);
- c) A carattere rettilineo: tipico di specie microfaghe planctivore, che possiedono uno stomaco tubulare sifonale di tipo ciecale munito di ventriglio muscolare;
- d) Assenza di stomaco.

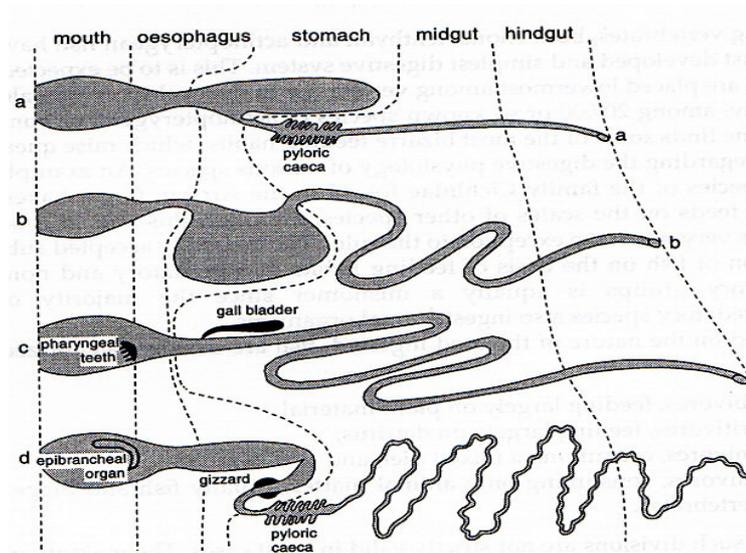


Fig.6. Linee di differenziazione evolutiva dello stomaco. (Fonte: Harder, 1975; Smith, 1980)

Le fibre muscolari longitudinali sono predominanti e tutti gli stomaci sono relativamente omogenei nella loro struttura istologica che differisce leggermente da quella dei vertebrati superiori. L'epitelio contiene numerosi villi coperti da cellule secretorie che producono proenzimi digestivi e acido cloridrico (HCl).

Lo stomaco è l'unica regione del tratto digerente che secreta acido, il quale consente la denaturazione delle proteine, l'inizio dell'idrolisi e l'abbattimento della carica batterica esogena. Il pH raggiunge solitamente valori di 2-3, ma può anche salire a 5, specialmente nei pesci marini che ingeriscono acqua a pH basico.

Lo stomaco è comunemente distinto in regione cardiaca (direttamente connessa all'esofago, la cui funzione principale è quella di riserva del cibo), fondo e regione pilorica (esplicano funzione secretoria).

Da un punto di vista microscopico la regione cardiaca è rivestita da un epitelio stratificato, mentre il fondo e la regione pilorica sono entrambe rivestite da un epitelio cilindrico semplice privo di villi in cui sono presenti numerose cellule mucipare caliciformi.

Intestino

Principale sito adibito alla digestione, la cui struttura varia notevolmente a seconda delle abitudini alimentari. Risulta particolarmente corto nelle specie carnivore mentre in quelle erbivore può raggiungere una lunghezza pari a 20 volte quella corporea. Nonostante ciò, la terminologia utilizzata dagli anatomisti per descrivere l'intestino dei pesci è estremamente confusa, vista l'assenza di differenziazione anatomica esterna. L'intestino è forse il tratto del canale alimentare dei pesci meglio caratterizzato istologicamente. È rivestito da un tessuto epiteliale semplice cilindrico o, in alcuni casi, cubico. Tra le cellule epiteliali sono disseminate cellule mucipare caliciformi ricche di granuli secretori, alcune cellule del sistema immunitario (e.g. macrofagi) e differenti tipi di cellule endocrine. La mucosa intestinale è simile a quella dei vertebrati superiori, provvista di pseudovilli che incrementano la superficie di assorbimento (circa 20 volte). Gli enterociti sono chiaramente visibili a livello del lume, il quale è ricoperto da microvilli strettamente adesi. I microvilli hanno una serie di filamenti polisaccaridici chiamati glicocalice e la loro membrana contiene enzimi, proteine

di trasporto e canali ionici. Pertanto, soltanto a livello citologico possono essere distinte tre o quattro regioni con specifiche funzioni.

- L'intestino prossimale, spesso chiamato duodeno, è presente nei pesci privi di stomaco e presenta una protuberanza altamente sviluppata in alcune famiglie quali i ciprinidi, la cui funzione è quella di immagazzinare temporaneamente il cibo a fine pasto. Esso si distingue dallo stomaco per la connessione ai dotti biliari; per la presenza di un pH non acido e per l'assenza di cellule secernenti di tipo gastrico. Nelle specie provviste di stomaco la parte prossimale dell'intestino presenta spesso dei diverticoli a fondo cieco detti ciechi, considerati come un'estensione della superficie dell'intestino, atta ad incrementare la superficie di assorbimento del tratto digerente.
- L'intestino medio, solitamente chiamato digiuno, è difficilmente separabile in due sezioni distinte in base all'anatomia macroscopica. A livello istologico presenta particolari adattamenti come la presenza di enterociti provvisti di molte invaginazioni che giungono fino alla base dei microvilli. Inoltre fra questi ultimi e i nuclei vi sono larghi vacuoli che assicurano l'assorbimento tramite endocitosi di molecole proteiche.
- L'intestino distale, talvolta chiamata ileo, è solitamente molto corto. Gli enterociti presentano corti microvilli con caratteristiche simili alle cellule assorbenti. Inoltre a livello citologico non dispongono di molti mitocondri ma effettuano la maggior parte dell'osmoregolazione tramite l'assorbimento selettivo di ioni minerali. A livello microscopico, la mucosa presenta una complessa architettura con numerose pieghe (villi) che permettono di aumentare l'area superficiale adibita all'assorbimento.

Ghiandole annesse:

Fegato

Ghiandola di dimensioni cospicue e di forma variabile che si adatta allo spazio lasciato dagli organi vicini. La sua anatomia interspecifica è estremamente diversificata e differisce istologicamente da quella dei mammiferi per l'assenza dei lobuli, sebbene le sue funzioni siano comparabili a quelle dei vertebrati superiori. La lobatura nei teleostei è particolarmente variabile:

- I. fegato unico (anguilla);
- II. bilobato (siluridi);
- III. trilobato (tonno);
- IV. polilobato (ciprinidi).

La vescicola biliare può essere sferica, ovoidale, allungata e raramente manca. Questo organo produce la bile e i sali biliari, che aiutano gli enzimi pancreatici a processare ed a assorbire i lipidi. Il fegato è il maggiore organo di immagazzinamento, può aumentare di dimensioni in relazione alla funzione adipogenica, agendo così come organo di riserva lipidica, di aminoacidi e carboidrati, che vengono rilasciati quando necessario.

Pancreas

Organo a carattere non autonomo nei pesci, fatta eccezione per gli elasmobranchi. In alcune specie risulta più compatto, ad esempio nell'anguilla, mentre nella maggior parte dei casi è presente come una diffusa raccolta di cellule attorno al duodeno ed ai ciechi, quando questi sono presenti. Questi "isolotti" o piccole ghiandole possono interpenetrare gli organi circostanti fino a formare una struttura detta "*epatopancreas*". In generale il pancreas è composto da una componente esocrina e una componente endocrina. Rappresenta inoltre, il sito di produzione della maggior parte degli enzimi digestivi che formano il "succo intestinale" destinato alla processazione di lipidi, proteine e carboidrati. Le secrezioni enzimatiche di tali strutture fuoriescono attraverso il dotto biliare. Le cellule endocrine (Isole di Langherans), secernenti insulina, sono localizzate accanto a tali cellule digestive.

1.2.3 ENZIMI DIGESTIVI

Gli enzimi digestivi dei pesci, così come quelli di tutti i vertebrati, si suddividono in tre principali categorie:

- Enzimi secreti dal pancreas e, in minor quantità, dallo stomaco. Tali enzimi sono sotto forma di granuli di zimogeno o proenzimi inattivi, mescolati al succo digestivo con specifica composizione ionica e pH. Tali proenzimi non sono mai di origine buccale e sono attivati nello stomaco e soprattutto nel duodeno;
- Enzimi membrana – adesi, presenti in minor quantità nel chimo, che in condizioni normali agiscono solo se legati a membrane microvillari. Questi enzimi sono tutti intestinali, capaci di frammentare macromolecole filtrate dal glicocalice. Essi sono situati vicino ai sistemi di trasporto che ne assicurano l'assorbimento nel citoplasma degli enterociti;
- Enzimi cellulari del tratto digerente contenuti nei lisosomi, situati in aree differenti dalla parete cellulare. Tali enzimi partecipano alla digestione extracellulare anche se la loro attività può essere rilevata in vitro dopo lisi cellulare.

La presenza di enzimi digestivi oltre al loro sito di produzione differisce tra le varie specie. Ad esempio, la pepsina è sempre assente nei pesci privi di stomaco, mentre la chitinasi è stata rilevata soltanto in alcune specie.

1.2.3.1 PRINCIPALI ENZIMI COINVOLTI NELLA DIGESTIONE

Enzimi prodotti da zimogeni (gastrici e pancreatici)

I principali enzimi di questo tipo sono elencati in Tabella 12. L'attivazione del proenzima avviene per rottura del peptide che maschera il sito attivo. Nel caso della pepsina, l'idrolisi inizia per azione dell'HCl ed è autocatalitico (idrolisi di pepsinogeno da parte della pepsina). Nel caso degli enzimi pancreatici, vi è un'attivazione iniziale del tripsinogeno da parte dell'enterochinasi; l'azione della tripsina sul chimotripsinogeno inizia una catena di eventi che attivano successivamente i seguenti enzimi: elastasi, collagenasi, carbossipeptidasi A e B, fosfolipasi e colipasi. Con l'eccezione della coppia lipasi – colipasi, tali tipi di

enzimi agiscono su macromolecole tramite rottura di legami interni (*endoidrolisi*), creando molecole di dimensioni minori che non possono essere in questa forma.

Proteasi

Questa classe di enzimi è responsabile della rottura delle proteine ingerite in molecole più semplici, attraverso processi chimici di idrolisi dei legami peptidici. Questi enzimi vengono suddivisi in accordo con il sito di idrolisi in endopeptidasi (agiscono sui legami interni alle molecole proteiche) ed esopeptidasi (agiscono sui legami terminali dei peptidi). Le endopeptidasi sono responsabili della riduzione delle proteine ingerite in polipeptidi più piccoli, la cui natura dipende dall'attività dell'enzima presente. In generale, le molecole proteiche sono efficientemente ridotte a polipeptidi da tre principali endopeptidasi (pepsina, chimotripsina e tripsina). Nello specifico, la pepsina idrolizza i legami sul lato amminico di un radicale aromatico; la chimotripsina riduce i legami sul lato carbossilico di un radicale aromatico, mentre la tripsina sui legami adiacenti alle molecole di arginina e lisina (De Silva e Anderson, 1995). Altri substrati proteici, tuttavia, richiedono endopeptidasi specifiche come sistemi elastina-elastasi che appartengono alla famiglia delle *serina proteasi*, enzimi che possiedono lo stesso sito catalitico, contenente un residuo serinico (Tabella 7-8).

Le esopeptidasi a loro volta vengono suddivise in: carbossipeptidasi, aminopeptidasi e dipeptidasi, a seconda del sito di azione. In particolare, le carbossipeptidasi rimuovono gli aminoacidi terminali e le estremità carbossiliche libere del polipeptide, mentre le aminopeptidasi liberano gli aminoacidi siti sull'estremità amminica libera della catena (De Silva e Anderson, 1995). Infine le dipeptidasi sono riconosciute come responsabili della digestione intracellulare di dipeptidi assorbiti attraverso il canale alimentare.

Le proteasi inoltre, possono essere classificate in base al sito di produzione dell'enzima stesso, pertanto sono rappresentate da enzimi gastrici (*pepsina*) e da quattro tipi di enzimi pancreatici (tripsina, chimotripsina, collagenasi ed elastasi).

	Enzima	Attività	Organo	Specie
Proteasi	Pepsina	Idrolisi di legami interni	Stomaco	Specie con stomaco
	Tripsina	“	Pancreas	Tutte le specie
	Chimotripsina	“		
	Elastasi	“		
	Collagenasi	“		
Peptidasi	Carbossipeptidasi A e B	Idrolisi di legami esterni	Pancreas	Tutte le specie
	Carbossiesterasi	Idrolisi di peptidi		
Glucosidasi	Amilasi	Idrolisi di amido (legami $\alpha 1 \rightarrow 4$)	Pancreas	Tutte le specie
	Chitinasi	Idrolisi di chitina	Stomaco e Pancreas	Specie che si nutrono principalmente di insetti o crostacei
Lipasi	Lipasi pancreatica	Idrolisi di triacilgliceroli (specialmente posizione α)	Pancreas	Tutte le specie
	Colipasi			
	Esterasi	Idrolisi di triacilgliceroli e altri lipidi		
Nucleasi	Ribonucleasi	Idrolisi di acidi nucleici	Pancreas	Poco conosciute

Tab.7. Principali enzimi secreti sottoforma di proenzimi nei pesci. (Fonte: Guillaume *et al.*, 1999)

Enzima	Legame idrolizzato
Pepsina	NH ₂ di aminoacidi aromatici biacidi
Tripsina	COOH di arginina e lisina
Chimotripsina	COOH di aminoacidi aromatici
Elastasi	Aminoacidi alifatici (specialmente attiva sull'elastina)
Carbossipeptidasi	Aminoacidi con gruppi COOH liberi
Aminopeptidasi	Aminoacidi con gruppi NH ₂ liberi
Di e tri-peptidasi	Legami di e tripeptidi

Tab.8. Siti di attività dei principali enzimi proteolitici rilevati nei pesci. (Fonte: Guillaume *et al.*, 1999)

Lipasi

E' un enzima la cui struttura risulta essere molto simile a quella delle serina-proteasi e, insieme all'amilasi, è l'unico enzima pancreatico ad essere secreto direttamente nella sua forma attiva. L'attività dell'enzima è subordinata alla presenza di un'altra molecola, la colipasi, anch'essa secreta a livello pancreatico. Il principale ruolo della colipasi consiste in una doppia affinità con la lipasi e le gocce lipidiche, con le quali forma dei complessi specifici (Figura 7).

Le lipasi dei pesci differiscono dai vertebrati superiori in quanto mostrano una simile affinità per i differenti acidi grassi dei triacilgliceroli anziché essere specialmente attivi nei confronti di quelli in posizione α . Infine, sebbene i sali biliari giochino un ruolo positivo nell'emulsione lipidica, o aiutando la dispersione in ambiente acquoso, il loro principale ruolo è quello di favorire l'azione del complesso lipasi – colipasi. Gli altri enzimi lipolitici nei pesci sono scarsamente conosciuti. Le attività di esterasi e fosfolipasi sono frequentemente rilevate, anche se è difficile confermare se questo tipo di enzimi siano secreti dallo stomaco o dal pancreas, in quanto in generale le lipasi tendono ad essere non specifiche.

In questo contesto, I lipidi assumono un ruolo di fondamentale importanza all'interno delle diete alimentari dei pesci, in quanto svolgono funzioni altamente specifiche a livello fisiologico, metabolico e strutturale. In particolare vengono utilizzati come precursori per la sintesi di ormoni, mantengono l'integrità funzionale delle membrane cellulari e rappresentano una fonte energetica imprescindibile specialmente nelle specie carnivore, nelle quali la disponibilità di carboidrati a scopo energetico è molto bassa (Watanabe 1982). In aggiunta, nelle specie marine, il fabbisogno lipidico è rappresentato maggiormente da acidi grassi polinsaturi della serie ω -3, quali l'acido eicosapentaenoico (20:5n-3 o EPA) e docosaesanoico (22:6n-3 o DHA) come acidi grassi essenziali per una normale crescita (Watanabe 1982; Bell *et al.*, 1987). Di conseguenza essi devono digerire oli alimentari contenenti un'elevata quantità di acidi grassi polinsaturi.

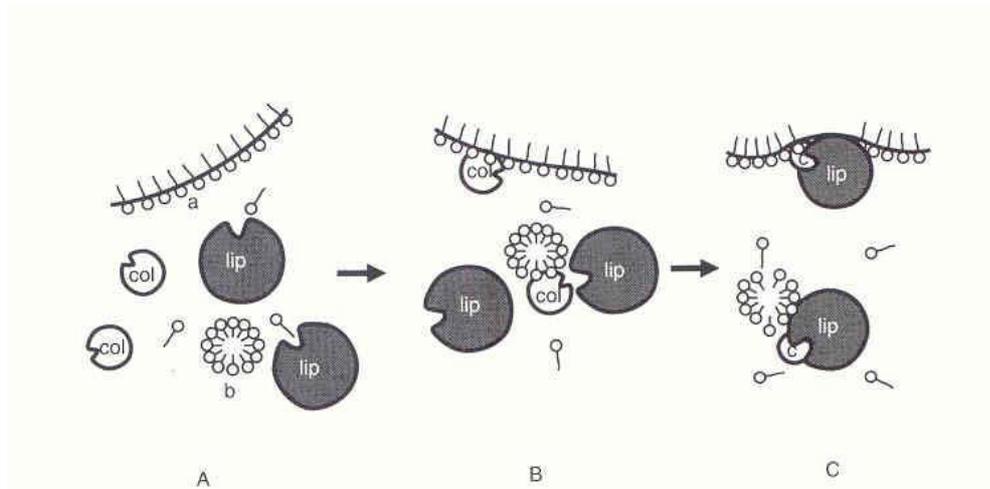


Fig.7. Modalità di azione di lipasi e colipasi. In A, lipasi e colipasi sono libere ed i sali biliari (b) coprono la superficie del globulo lipidico (a), quindi la lipasi non agisce. In B la colipasi si aggancia al globulo. In C, la lipasi è ancorata grazie alla colipasi e può idrolizzare i triacilgliceroli (Perez *et al.*, 1986) (Modificato da Guillame *et al.*, 1999)

Glicosidasi

Classe di enzimi responsabile della degradazione dei carboidrati. La principale glicosidasi è rappresentata dall' $\alpha 1 \rightarrow 4$ glucosidasi (amilasi), la quale idrolizza legami $\alpha 1 \rightarrow 4$ in amilosio o frammenti lineari di amilopectina o glicogeno. Attraverso l'attacco delle catene lineari, l'amilasi idrolizza l'amido in maltosio, lasciando nei punti di ramificazione, residui di taglia variabile e corte catene di destrina.

Studi dettagliati sulla distribuzione dell' α -amilasi nel tratto gastrointestinale e nelle ghiandole annesse dei pesci, è stato condotto su un'ampia varietà di specie. I risultati mostrano trend simili, con la maggiore attività localizzata a livello intestinale, dei ciechi pilorici e in pancreas/epatopancreas (Clark *et al.*, 1984; Kohla *et al.*, 1992; Reimer, 1982; Sturmbrauer *et al.*, 1992, Sabapathy e Teo, 1993).

I livelli di amilasi secreti dipendono da fattori quali: volume intestinale e condizione nutrizionale dell'animale. Studi condotti su alcuni rappresentanti della famiglia Sparidae, hanno mostrato come vi siano differenze notevoli nei corredi enzimatici. In particolare è stato dimostrato come le attività amilasiche siano maggiormente presenti in specie prettamente erbivore, ad esempio la boga (*Boops*

boops), mentre valori bassi sono stati riscontrati in specie carnivore strette come il *Pagellus erythrinus* ed il *Diplodus annularis* (Fernandez *et al.*, 2001).

Vi sono inoltre molte altre glucosidasi che mostrano però una bassa attività, come ad esempio ad esempio la *cellulasi*, la *laminarasi* ($\beta 1 \rightarrow 3$) trovata in pesci che si cibano di alghe, questa consente la parziale idrolisi di laminaria, un polioside che nelle alghe gioca un ruolo simile a quello della cellulosa delle piante terrestri. Tuttavia esiste un altro enzima capace di idrolizzare legami β nei carboidrati, ovvero la chitinasi. Tale enzima attacca i legami glucosaminici della chitina a formare chitobiosio (un dimero di N-acetilglucosamina). L'attività della chitinasi è stata associata da alcuni autori, al comportamento alimentare della specie, di conseguenza risulta essere elevata in specie che si nutrono di crostacei ed insetti, ed in special modo in quelli che inghiottono la preda senza masticazione.

Secrezione e condizioni per l'attività degli enzimi

La secrezione degli enzimi digestivi segue il quadro postprandiale simile a quello riscontrato nei vertebrati superiori. Gli ormoni del tratto digerente (gastrina, colecistochinina, etc..) partecipano all'avvio del rilascio dei granuli di zimogeno e della bile. Le condizioni fisiche ottimali per l'attività dei differenti enzimi sono mostrati in figura x. Il pH ottimale per la pepsina è circa 2-3, mentre per tutti gli altri è intorno a 7-8. Secondo questo schema, esiste un chiaro adattamento alle condizioni di pH nello stomaco e nel duodeno. La temperatura ottimale per l'attività di quasi tutti gli enzimi dei pesci è tra 30 e 40°C (Figura 8). È quindi sempre molto più vicino alla temperatura interna degli omeotermi che a quella degli ectotermi.

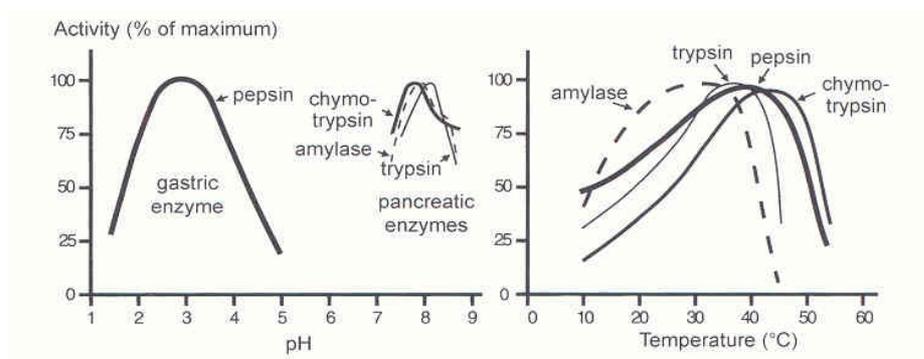


Fig.8. : Temperatura e pH ottimali dei principali enzimi gastrici e pancreatici nei pesci (Uys e Hecht, 1987)

(Modificato da Guillame *et al.*, 1999)

Enzimi membrana-adesi dell'intestino

L'intestino dei pesci, analogamente a quello degli altri vertebrati, non secerne enzimi. Alcune ghiandole possono trovarsi nella parte prossimale dei *gadoidi*, ma queste sono responsabili solamente della secrezione ionica.

L'attività degli enzimi di membrana, in condizioni fisiologiche, possono essere solo studiate a livello della parete intestinale. I principali enzimi (Tabella 9) agiscono idrolizzando frammenti di macromolecole ottenute dall'azione degli enzimi gastrici e pancreatici, peptidi, disaccaridi (principalmente maltosio) e destrine a catena corta. La maltasi agisce sul maltosio nello stesso modo in cui l'isomaltasi agisce sulle destrine ramificate, con successiva formazione di glucosio che può essere direttamente assorbito. L'azione della peptidasi non porta ad una completa idrolisi in aminoacidi, ma in una complessa e variabile miscela di aminoacidi e peptidi di cui, solo le più piccole possono essere assorbite (2-4 basi).

Classe enzimatica	Enzimi
Peptidasi	Dipeptidil peptidasi IV Leucina amino peptidasi Fenilalanina – Glicina peptidasi γ glutamil – transferasi Altri (probabili)
Glucosidasi	α glicosidasi (maltasi) Isomaltasi Chitobiasi Altri (poco conosciuti)
Lipasi	Esterasi Lipasi (poco conosciuta)
Vari	Fosfatasi acida Fosfatasi alcalina
Nucleasi	(localizzazione incerta)

Tab.9. Principali enzimi intestinali membrana – adesi rilevati nei pesci. (Fonte: Guillaume *et al.*, 1999)

Altri enzimi

A questa categoria appartengono:

- Aminopeptidasi: esopeptidasi che agiscono sulle estremità amino terminali dei peptidi a basso peso molecolare, formati grazie all'azione dell'endopeptidasi. Non rappresentano enzimi secreti in forma inattiva in granuli di zimogeno, ma enzimi lisosomiali pancreatici;
- Leucina-Alanina Peptidasi (LAP): enzima lisosomiale intestinale;
- Esterasi: enzimi endocellulari che svolgono un ruolo importante a carico delle molecole assimilate per endocitosi.

Attività enzimatica totale

Nonostante la lista degli enzimi digestivi appaia estremamente simile a quella dei vertebrati superiori, la loro attività totale non è la stessa.

L'attività proteolitica totale è sempre elevata, anche in specie definite erbivore mentre l'attività lipolitica è molto variabile, con valori che oscillano da considerevoli (salmone atlantico) a moderato (rombo). Per quanto concerne l'attività amilolitica, essa è rilevata in tutte le specie a partire dalle fasi larvali, ed è chiaramente più elevata negli erbivori piuttosto che negli onnivori (Tabella 10), mostrando un buon adattamento alle abitudini alimentari in ambiente naturale. La secrezione di amilasi sembra inoltre mostrare una correlazione positiva con l'incremento della temperatura dell'acqua.

Specie	Attività relativa
Pesce rosso	100
Carpa erbivora	84
Tilapia	44
Carpa comune	35
Carpa argentata	31
Trota	8
Anguilla	1
Ricciola	1

Tab.10. Attività amilasica in alcune specie ittiche in confronto con quanto rilevato nel pesce rosso (standard 100). (Fonte: Nagayama e Saito, 1968).

1.3 PRINCIPALI FARINE UTILIZZATE PER L'ALIMENTAZIONE IN ACQUACOLTURA

L'alimentazione in acquacoltura rappresenta un fattore fondamentale nella produzione di organismi con elevati standard qualitativi, di conseguenza la formulazione di mangimi prevede l'utilizzo di materie prime di alta qualità, appropriate per la specie di interesse. L'incidenza di tale voce di spesa a livello aziendale, può raggiungere il 70% dell'intero costo annuale della produzione. Pertanto le materie prime utilizzate nella formulazione dei mangimi devono possedere determinate caratteristiche che permettano all'organismo di massimizzare il proprio potenziale genetico di crescita e riproduttivo, migliorando allo stesso tempo la resistenza a patologie idiopatiche minimizzando l'eventuale effetto di fattori ambientali di natura stressogena e garantendo la qualità del prodotto. Al fine di produrre tali mangimi, risulta necessario acquisire una conoscenza approfondita dei fabbisogni nutrizionali della specie in esame e la propria abilità ad utilizzare tali ingredienti. Inoltre l'effetto dell'alimentazione sulla qualità delle acque di allevamento, associate alla perdita di nutrienti dovuti allo stazionamento del mangime in acqua, devono essere tenuti in considerazione. Pertanto la stabilità in acqua e le metodologie di somministrazione della razione alimentare sono aspetti essenziali in fase di formulazione dei mangimi per i motivi sopra citati.

I mangimi composti sono il risultato della miscelazione di materie prime che, unite tra loro in una determinata misura, formano un alimento destinato a soddisfare i fabbisogni nutrizionali della specie allevata. La componente più importante sia da un punto di vista biologico, sia di natura economica, risulta essere la frazione proteica, poiché assolve funzioni di tipo cellulare e strutturale. Di conseguenza la qualità di questa componente incide maggiormente sul costo finale dei mangimi rispetto alle altre.

Inoltre, un aspetto da tenere in considerazione è la specie ittica a cui è destinato il mangime, poiché i livelli proteici variano in funzione della posizione a livello trofico dell'organismo. Sono infatti richiesti livelli proteici maggiori per specie carnivore, come i Salmonidi (55%), mentre nel caso di specie onnivore come gli Sparidi, ed erbivore come i Ciprinidi, i livelli proteici risultano minori (rispettivamente 40 e 25 % circa). Pertanto la formulazione di mangimi

commerciali è fortemente condizionata dal profilo nutrizionale (digeribilità e biodisponibilità di nutrienti) delle materie prime utilizzate e di conseguenza di quelle disponibili sul mercato.

Attualmente, le fonti proteiche maggiormente utilizzate in acquacoltura possono essere suddivise in due grandi famiglie:

- Farine di origine animale
- Farine di origine vegetale

1.3.1 FARINE DI ORIGINE ANIMALE

Il processo di macinazione degli scarti della macellazione, nonché la lavorazione dei prodotti della pesca, producono materie prime largamente utilizzate nella formulazione di mangimi destinati all'alimentazione di varie specie ittiche di interesse commerciale. Le farine animali necessitano di specifiche certificazioni che ne attestino la salubrità a tutela della salute del consumatore finale. In questo contesto possiamo inquadrare le PAP (*Processed Animal Protein*) di origine terrestre come la farina di sangue, farina di carne e di ossa, farina di piume e sottoprodotti della lavorazione del pollame che, da un punto di vista nutrizionale, possiedono un elevato tenore proteico e lipidico, nonché un profilo in aminoacidi (lisina, istidina, arginina e solforati) e micronutrienti bilanciato (Tabella 11). Inoltre sono relativamente prive di fattori antinutrizionali, risultando appetibili per molte specie ittiche e la loro inclusione nei mangimi commerciali è complementare a quella di alcune proteine di origine vegetale (Bureau, 2006). Tuttavia, la deficienza in alcuni aminoacidi essenziali (metionina), la ridotta digeribilità (conseguenza dei processi di cottura), nonché la qualità nutrizionale altamente dipendente dai processi di lavorazione e conservazione, non consentono livelli di inclusione elevati (Bureau *et al.*, 1999, 2000; Goda *et al.*, 2007).

Inoltre, il loro utilizzo è strettamente dipendente dall'area geografica di interesse, basti pensare ad esempio al periodo di emergenza da BSE, in cui L'UE proibì l'utilizzo di tali materie prime (EC No 999/2001), poi successivamente revocato, seppur in maniera parziale nel 2013 (EC No 56/2013), con la riammissione di PAP provenienti da non ruminanti (polli e suini, categoria 3). Nonostante ciò, le PAP sono disponibili in quantità considerevoli sul mercato europeo ed il loro utilizzo porterebbe alla riduzione della dipendenza di forniture da paesi terzi, con

conseguente bilanciamento del deficit proteico (~70%) che caratterizza attualmente il settore mangimistico continentale.

	Unità	Farina di pollame	Farina di piume	Farina di sangue suino
Sostanza secca (SS)	%	92-94	92-94	95-97
Proteine	% SS	66	79-85	88-92
Lipidi (Estratto etereo)	% SS	10-14	10-12	1-2
Ceneri	% SS	10-15	2-5	2
Energia totale	MJ/kg SS	21.8-22.5	21-21.6	22-22.8
Aminoacidi essenziali				
Lisina	%	2.3	1.5	7.2
Metionina	%	0.7	0.5	1
Cisteina	%	1.3	3.1	0.9
Triptofano	%	0.4	0.4	1.2
Treonina	%	2	3.3	3.9
Leucina	%	3.6	5.8	10
Isoleucina	%	2	3.6	0.9
Valina	%	2.8	5.2	7
Istidina	%	0.9	0.6	5.1
Arginina	%	3.4	4.9	3.5
Tirosina	%	1.3	1.8	2.5
Fenilalanina	%	2	3.4	5.7
Aminoacidi non essenziali				
Alanina	%	2.8	3.3	6.5
Acido aspartico	%	3.5	4.9	8.9
Acido glutammico	%	5.6	7.7	7.9
Glicina	%	4.5	5.3	3.7
Prolina	%	4.1	6.8	3.3
Serina	%	3.2	8.3	4.1
Altri nutrienti				
Fosfolipidi totali	%	1.5	-	0.5
Colessterolo totale	%	0.2	0.1	0.4
Taurina	mg/KG	0.3	0.01	0.2

Tab.11. Composizione nutrizionale farine di origine animale terrestre (PAP). (Fonte: National Research Council 2011; DSM Vitamin Supplementation Guidelines 2011; Tacon *et al.*, 2009; Hardy e Barrows (2002); Hansen e Hemre (2011).

Considerando invece le fonti proteiche di origine animale che provengono dalla lavorazione di organismi acquatici interi o dall'utilizzo di sottoprodotti della loro lavorazione troviamo:

- **Idrolizzato di proteine del pesce:** prodotto attraverso l'idrolisi enzimatica di pesci interi o di parti, in assenza di parti ossee. Il contenuto proteico, principalmente composto da peptidi ed aminoacidi, non può essere inferiore al 30%;
- **Concentrato proteico di pesce (CPP):** prodotto dalla disidratazione del brodo di pesce, presenta una concentrazione proteica minima non inferiore al 60%;
- **Idrolizzato proteico disidratato:** prodotto attraverso l'idrolisi enzimatica di pesci interi o di parti, in assenza di parti ossee, successivamente

disidratato. La percentuale minima di proteina grezza non deve essere inferiore all'80%;

- **Farina di Krill:** raramente reperibile in mercato, è prodotta da animali interi. Tuttavia, l'elevato contenuto in fluoro ne limita l'inclusione;
- **Farina di cefalopodi:** ricca in proteine ma deficitaria in minerali. Viene utilizzata per lo più come attrattante per migliorare la palatabilità dei mangimi soprattutto quelli ad alta percentuale di proteine vegetali;
- **Farina di pesce:** materia prima maggiormente utilizzata per via della sua composizione in macro e micronutrienti, del profilo in acidi grassi e della digeribilità.

1.3.1.1 FARINA DI PESCE

Composizione

La farina di pesce è la materia prima maggiormente utilizzata nella formulazione di mangimi commerciali per il profilo nutrizionale che garantisce un adeguato tenore proteico (50-70%) con un elevato valore biologico. Inoltre l'eccellente profilo in aminoacidi essenziali ed in acidi grassi polinsaturi a catena lunga della serie $\omega 3$ (EPA e DHA), sono indispensabili per la corretta alimentazione dei pesci. Questa materia prima è anche un'ottima fonte di minerali essenziali (calcio, fosforo, magnesio ed oligoelementi) e di vitamine (vitamina B12, A, D, colina, inositolo e anche, in misura minore, di tutte le altre vitamine, fatta eccezione per l'acido ascorbico). A ciò va aggiunta l'elevata energia alimentare, palatabilità e digeribilità della frazione proteica, che la rendono ad oggi imprescindibile nella formulazione di diete alimentari.

In commercio esistono vari tipi di farine di pesce, solitamente suddivise per provenienza geografica e specie ittica da cui vengono ricavate; pertanto le caratteristiche nutrizionali, la digeribilità e la biodisponibilità dei nutrienti differiscono notevolmente tra loro.

I principali Paesi produttori hanno definito difatti una regolamentazione univoca sulla qualità delle farine destinate all'industria mangimistica. Tra queste troviamo principalmente la Norvegese, la Danese, la Cilena e l'Islandese (Tabella 12).

	Unità	FM LT 70	FM 60	CPP	Farina di cefalopodi	Farina di Krill
Sostanza secca (SS)	%	90-93	91-94	95-97	90-92	91-93
Proteine	% SS	69-72	57-64	80-85	78-80	58-62
Lipidi (Estratto etereo)	% SS	10-12	7-9	6-12	2-3	16-20
Ceneri	% SS	9-12	15-25	4-8	3-4	9-11
Energia totale	MJ/kg SS	20-20.5	18.8-19.3	21-21.5	21-21.4	22.3-22.8
Aminoacidi essenziali						
Lisina	%	4.7	4.5	7	8.2	4.9
Metionina	%	1.8	1.6	2.7	2.7	1.6
Cisteina	%	0.4	0.5	0.4	0.4	0.7
Triptofano	%	0.7	0.6	0.8	0.9	0.5
Treonina	%	2.5	2.5	3.5	4	2.7
Leucina	%	4.5	4.3	5.8	6.9	4.7
Isoleucina	%	2.5	2.5	3.4	4.1	2.8
Valina	%	2.7	2.9	4.1	4.2	3.4
Istidina	%	1.4	1.4	1.8	2	1.4
Arginina	%	3.7	3.7	7.8	7.9	3.8
Tirosina	%	1.9	1.9	2.8	2.3	2.7
Fenilalanina	%	2.4	2.3	3.9	3.7	2.5
Aminoacidi non essenziali						
Alanina	%	3.9	3.8	5.4	4.6	3.5
Acido aspartico	%	5.6	5.5	6.5	8.1	5.7
Acido glutammico	%	8.1	7.6	10	12.6	7.6
Glicina	%	3.8	3.8	9.4	4.4	2.9
Prolina	%	2.4	2.5	5.2	3.6	2.4
Serina	%	2.6	2.3	3.8	4	2.7
Altri nutrienti						
ω3 polinsaturi	%	2	1.8	0.6	1.7	3.0
Fosfolipidi totali	%	2.6	2.5	0.8	1.4	8.1
Taurina	%	0.3	0.4	0.5	0.1	0.5-0.7
Astaxantina	mg/KG	-	-	-	-	90

Tab.12. Composizione nutrizionale farine di origine animale terrestre. (Fonte: National Research Council 2011; DSM Vitamin Supplementation Guidelines 2011; Tacon *et al.*, 2009; Hardy e Barrows, 2002; Hansen e Hemre 2011).

La farina di pesce si ottiene da processi industriali di lavorazione di pesci interi e da sottoprodotti di specie ittiche lavorate per l'alimentazione umana che altrimenti andrebbero smaltite. Il processo di produzione prevede la separazione delle tre frazioni che compongono la materia grezza, ovvero solidi, olio e acqua, per ottenere un prodotto di elevata qualità (Figura 9).

In generale, le principali fasi che caratterizzano tutti i processi di produzione della farina di pesce prevedono:

1. **Cottura:** coagulazione delle proteine e rottura delle cellule adipose, con rilascio di olio e acqua, condotta a 95-100°C per una durata variabile (15-20 minuti);
2. **Compressione:** rimozione del liquido dalla massa cotta;
3. **Separazione:** attraverso un processo di decantazione si ottengono olio e brodo (*stickwater*);
4. **Concentrazione ed essiccazione:** in modo da ottenere i solubili di pesce;

5. **Essiccazione:** della massa cotta (*presscake*) con i solubili aggiunti. Il processo ha lo scopo di ridurre l'umidità al di sotto del 12%, in modo da garantire una buona conservabilità del prodotto;
6. **Macinazione** del materiale essiccato.

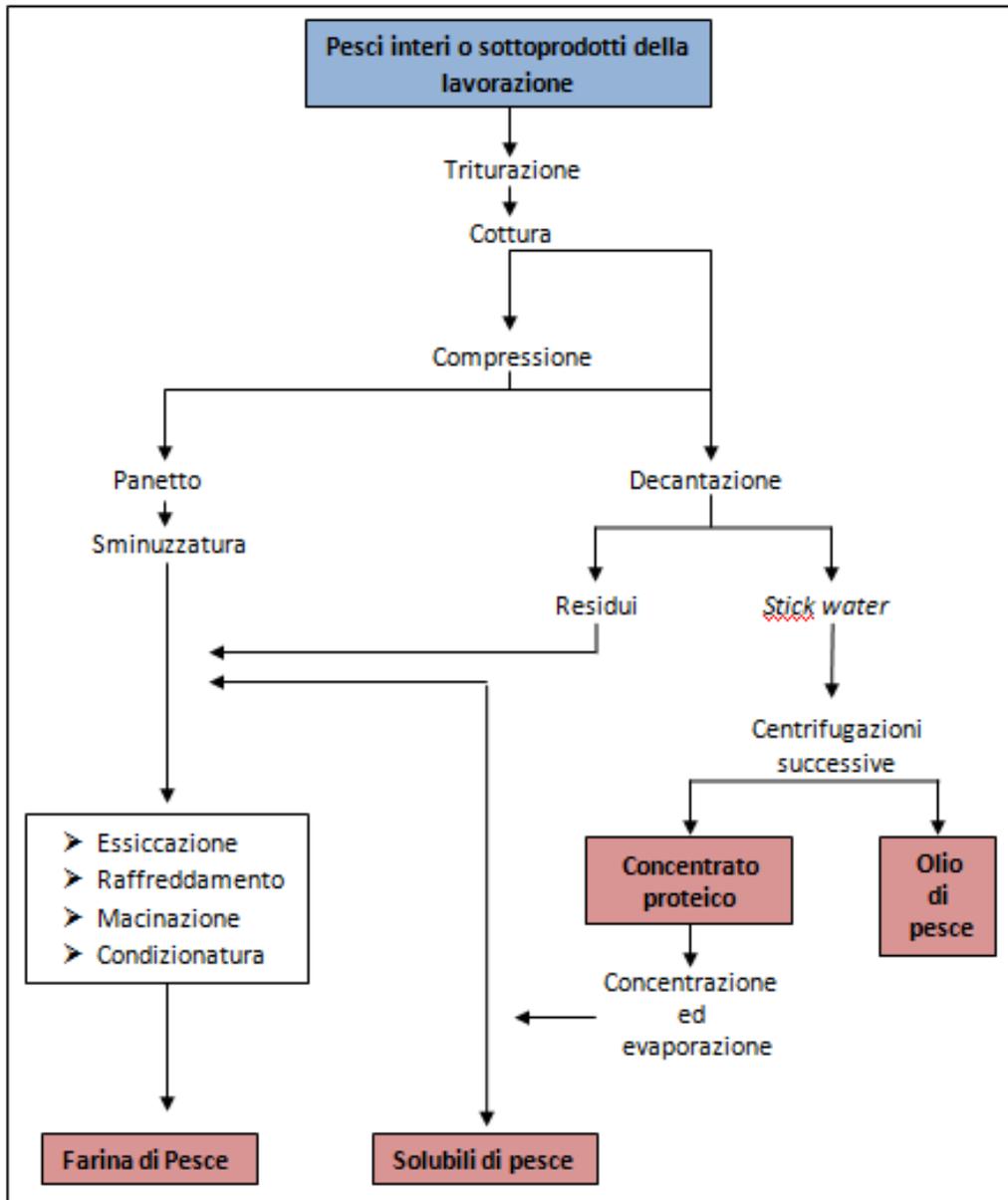


Fig.9. Fasi di produzione della farina di pesce. (Fonte: Guillaume *et al.*, 1999)

Aspetti economici e legislativi

Le farine di pesce vengono comunemente utilizzate per la produzione di mangimi destinati all'allevamento di specie di interesse commerciale, sia terrestri che acquatiche. Di conseguenza la richiesta di mercato è in continuo aumento, complice la crescita esponenziale subita dal settore dell'acquacoltura a partire dagli anni '70. Ciò ha portato ad un costante aumento del prezzo, che dal 1998 ad oggi è pressoché raddoppiato (560 €/t a 1290 €/t rispettivamente) (Fonte: www.indexmundi.com).

Tuttavia, le farine animali ed in particolare la farina di pesce utilizzate in zootecnia, possono essere veicolo di sostanze tossiche o potenzialmente nocive per la salute umana. Tra gli aspetti più preoccupanti vi sono la presenza di diossine, PCB e metalli pesanti (Mercurio, Piombo, Cadmio, ecc.) nei prodotti della pesca ma anche dell'acquacoltura (Hites *et al.*, 2004; Suominen *et al.*, 2011), derivanti sia dal bioaccumulo in ambiente naturale che dall'alimentazione fornita, come nel caso dei pesci allevati.

In tal senso la Direttiva del Consiglio Europeo 1999/29/EC del 22 Aprile 1999 sulle sostanze indesiderabili e prodotti nella nutrizione degli animali, prevede che le materie prime ed i mangimi possano essere messi in commercio soltanto se "sani, genuini e mercantili". Le materie prime per l'alimentazione animale ed i mangimi possono essere considerate di qualità "sana, genuina e mercantile" se il livello di diossine non rappresenta un rischio per la salute dell'uomo e degli animali.

L'esposizione umana a questi composti avviene in gran parte attraverso la catena alimentare ed in particolare circa il 90% proviene da alimenti di origine animale (Smith e Gangolli, 2002). I problemi di salute derivanti dalla presenza di questi composti sono riconducibili a processi patologici a carico di diversi organi ed apparati tra cui: cute, sistema immunitario, sistema riproduttivo, sistema endocrino e sistema nervoso. Inoltre l'esposizione alle diossine predispone fortemente le cellule alla trasformazione neoplastica (azione cancerogena). E' interessante inoltre notare come vi sia un contenuto maggiore di queste sostanze negli organismi acquatici e nei relativi prodotti da essi derivanti, rispetto ai prodotti di origine vegetale.

1.3.2 FARINE DI ORIGINE VEGETALE

Potenzialità e limiti delle fonti proteiche vegetali

Le fonti proteiche vegetali presenti in commercio provengono da sottoprodotti della lavorazione di semi di alcune specie botaniche, definite oleaginose, o da vegetali interi prodotti a tal scopo (Tabella 13).

Tra materie prime maggiormente utilizzate in campo mangimistico meritano di essere citate:

- **Farina di soia:** La farina di estrazione di soia (*Glycine max*) è attualmente la fonte proteica più utilizzata nel settore zootecnico. E' un sottoprodotto dell'estrazione dell'olio di soia e sul mercato è disponibile in due forme in funzione del tenore proteico: la farina di soia convenzionale, non decorticata, con un contenuto in proteina pari al 43-44% ed un quantitativo di fibra grezza di circa il 6% e la farina di soia decorticata, con un minore tenore in fibra grezza (circa 3,5-4,9%) ed un maggiore contenuto proteico (47-49%) (Tangendjaja, 2015). In acquacoltura, la farina di estrazione di soia è la fonte proteica vegetale più utilizzata per via della disponibilità di reperimento, del costo minore rispetto alla farina di pesce e del valore nutrizionale adatto al fabbisogno delle specie ittiche allevate. Presenta un discreto profilo in aminoacidi essenziali, nonostante la deficienza in metionina. Presenta diverse sostanze antinutrizionali (saponine, fattori clorogenici, inibitori delle proteasi, elevati livelli di oligosaccaridi che possono essere fattori limitanti nell'inclusione ad elevate percentuali in diete destinate a specie carnivore), che vengono però parzialmente inattivati attraverso rigorosi trattamenti termici (Gatlin *et al.*, 2007; Ayadi *et al.*, 2012). Il tenore lipidico è inferiore rispetto alla farina di pesce e non è sufficiente a soddisfare i fabbisogni sia in grassi che in energia, soprattutto per le specie carnivore. Esistono anche altri prodotti derivanti dalla lavorazione della soia, come il concentrato proteico di soia. I fiocchi residui dopo l'estrazione dell'olio vengono trattati in soluzione alcolica, riducendo i fattori antinutrizionali presenti nella farina di soia convenzionale. Inoltre a seguito di questo trattamento, vengono estratti i carboidrati solubili e gli oligosaccaridi, determinando un netto

miglioramento delle caratteristiche nutrizionali. Il tenore proteico di questo sottoprodotto è simile alla farina di pesce (65-67%), ma carente in lisina e metionina. Tali caratteristiche lo rendono adatto all'inclusione nell'alimentazione di specie carnivore come salmonidi e specie marine, tuttavia, il prezzo di questa materia prima non ne consente un elevato utilizzo (Ayadi *et al.*, 2012).

- **Farina di colza:** la sua presenza sul mercato è in aumento e di conseguenza il suo utilizzo. Presenta un tenore proteico abbastanza bilanciato, nonostante l'elevata presenza di fibre;
- **Farina di semi di girasole:** ricca in metionina e povera in fattori antinutrizionali (polifenoli). Tuttavia il deficit di lisina e l'elevato tenore in fibre, ne limitano l'utilizzo nella formulazione di mangimi;
- **Glutine di grano e glutine di mais:** presentano un tenore proteico tra il 60-82% ed un'elevata digeribilità. Vengono ampiamente utilizzati nella formulazione di mangimi destinati a salmone, orata e spigola. Tuttavia presentano un deficit in lisina e una relativa difficoltà di reperimento sul mercato.

	Unità	Glutine di grano	Glutine di mais	Farina di soia	Farina di colza	Farina di semi di girasole
Sostanza secca (SS)	%	95-97	90-92	91-93	91-93	92-94
Proteine	%	79-82	60-62	45-47	34-36	26-29
Lipidi	%	4-6	2-4	2-4	2-4	2-3
Fibre	%	<0.5	1-2	5-7	10-13	24-26
Amido	%	6-8	13-16	4-6	1-2	1-2
Ceneri	%	0.8	1.9	6.24	6.93	6.32
Energia totale	MJ/kg	22.3	20.8	17.3	17.2	17.3
AAE						
Arginina	%	3.4	1.6	3	1.8	2.1
Istidina	%	2.2	1.1	1	0.8	0.6
Isoleucina	%	2.8	2.2	1.8	1.2	1.1
Leucina	%	5.7	8.7	3	2	1.6
Lisina	%	1.8	0.9	2.4	1.7	0.9
Treonina	%	2.4	1.8	1.6	1.3	0.9
Triptofano	%	1.1	0.3	0.5	0.4	0.3
Valina	%	3.3	2.4	1.9	1.5	1.3
Metionina	%	1.8	1.3	0.6	0.6	0.6
Cisteina	%	1.8	1	0.6	0.7	0.4
Fenilalanina	%	4.4	3.3	2	1.2	1.1
Tirosina	%	3.5	2.6	1.4	0.9	0.6
AAE non essenziali						
Alanina	%	2.4	4.6	1.8	1.3	1.1
Acido aspartico	%	2.8	3.2	4.5	2.1	2.3
Acido glutammico	%	27.9	10.9	7.1	5	4.9
Glicina	%	2.8	1.4	1.7	1.5	1.4
Prolina	%	9.6	4.7	2	1.8	1.1
Serina	%	4.4	2.7	2	1.3	1.1

Tab.13. Composizione nutrizionale farine di origine animale vegetale. (Fonte: National Research Council 2011; DSM Vitamin Supplementation Guidelines 2011; Tacon *et al.*, 2009; Hardy e Barrows 2002; Hansen e Hemre 2011).

L'utilizzo in campo mangimistico di queste materie prime è esponenzialmente aumentato negli ultimi anni (Hardy, 2002; Espe *et al.*, 2006; Gatlin *et al.*, 2007), conseguenza del prezzo inferiore rispetto alle fonti proteiche di origine animale, della disponibilità sul mercato, della composizione nutrizionale e della riduzione dell'impatto ambientale.

La riduzione del prezzo delle materie prime è uno dei principali vantaggi offerti dall'utilizzo delle fonti vegetali. Come mostrato nel Grafico 2, è evidente la differenza di costo tra le principali farina di origine vegetale e la farina di pesce comunemente utilizzata nella formulazione dei mangimi commerciali.

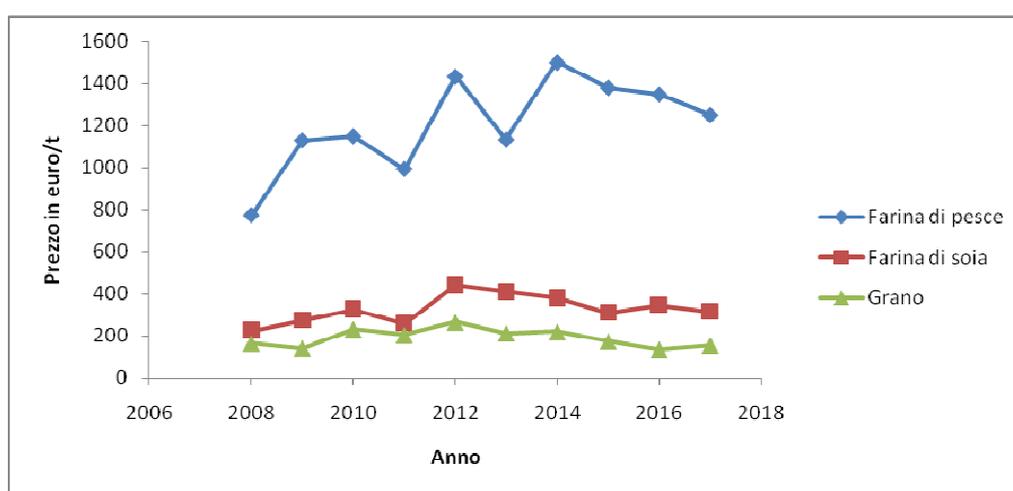


Grafico.2. Confronto tra il prezzo medio per anno tra farina di pesce, farina di soia e glutine

La sostituzione parziale o totale della farina di pesce in favore delle fonti vegetali (ampiamente utilizzata in campo mangimistico) permette di ridurre i costi di produzione legati all'alimentazione, che come già descritto in precedenza, incidono intorno al 70% negli allevamenti intensivi. Inoltre l'elevata disponibilità sul mercato permetterebbe di ridurre la pressione esercitata sugli stock ittici, come già descritto in precedenza.

Tuttavia, esistono dei limiti relativi all'impiego di queste fonti proteiche alternative nell'alimentazione delle specie ittiche, come ad esempio un contenuto proteico minore rispetto alla farina di pesce, l'assenza di acidi grassi della serie $\omega 3$, un profilo in aminoacidi non bilanciato e la presenza di composti endogeni chiamati fattori antinutrizionali o antinutrienti (ANFs) (Simões-Nunes, 1987;

Krogdahl, 1990; Tacon, 1993, 1997; Francis *et al.*, 2001; Ogunji, 2004; Gatlin *et al.*, 2007; Collins, 2014).

Questi ultimi sono stati definiti come sostanze che direttamente o attraverso i loro prodotti metabolici, interferiscono con l'utilizzo dei nutrienti nei sistemi viventi e condizionano la salute e la produttività degli organismi (Makkar, 1993; Francis *et al.*, 2001). Possibili effetti dannosi di questi composti includono per citarne alcuni: riduzione della palatabilità (Papatryphon e Soares, 2001), utilizzazione dei nutrienti inappropriata, alterato bilanciamento dei nutrienti nelle diete, inibizione della crescita, disfunzioni intestinali e danni al fegato, (Krogdahl *et al.*, 2010; Merrifield *et al.*, 2011). Mentre alcuni fattori antinutrizionali sono termolabili e possono essere facilmente eliminati/neutralizzati durante i processi tecnologici di produzione del mangime, altri sono più resistenti e di conseguenza più difficili da trattare (Francis *et al.*, 2001; Gatlin *et al.*, 2007). Vista la compresenza di molti di essi all'interno della stessa materia prima, risulta complicato comprendere quale sia il fattore responsabile dell'effetto avverso osservato sull'organismo, considerandone anche i differenti limiti di tolleranza di ciascuna specie. In particolare, le specie erbivore ed onnivore sembra tollerino meglio i fattori antinutrizionali rispetto alle controparti carnivore, le quali non consumano in natura proteine di origine vegetale (Gatlin *et al.*, 2007).

Tuttavia, considerata l'evoluzione dell'acquacoltura e la tendenza a massimizzare l'inclusione di proteine vegetali all'interno dei mangimi, l'esposizione ai fattori antinutrizionali è anch'essa cresciuta. Nonostante questi non causino effetti violenti ed immediati sugli organismi allevati, c'è la possibilità di un lento effetto cumulativo che potrebbe sfociare in patologie o in stati di salute non ottimali (Liener, 1980). Quindi, è plausibile sostenere che i fattori antinutrizionali siano coinvolti nella manifestazione di patologie emergenti a carico delle funzioni intestinali e della risposta immunitaria, come una ridotta digeribilità di proteine e lipidi, oltre a enteriti e neoplasie (Krogdahl *et al.*, 2010).

Nonostante ciò, la presenza di sostanze dal potere legante, la disponibilità di vitamine del gruppo B e i progressi tecnologici raggiunti nella lavorazione di queste materie prime, ne hanno permesso l'inclusione anche in percentuali elevate minimizzando gli effetti negativi sulle performances di crescita, benessere degli esemplari e qualità delle carni.

Prove di alimentazione in specie ittiche

Nell'ultima decade, l'utilizzo di proteine vegetali in diete destinate a specie di interesse commerciale, è stata focalizzata sulla diversificazione delle materie prime da includere nei mangimi (Messina *et al.*, 2013). Soia e altre piante terrestri con un alto tenore proteico e lipidico sono state introdotte in percentuale sempre maggiore nell'alimentazione di specie allevate al fine di sostituire la farina e l'olio di pesce (Espe *et al.*, 2006; Gatlin *et al.*, 2007; Hardy, 2010).

Queste alternative proteiche vegetali sono state testate su molteplici specie dall'elevato valore di mercato come il salmone atlantico (*Salmo salar*), l'ombrina americana (*Sciaenops ocellatus*), il cobia (*Rachycentron canadum*), il rombo (*Psetta maxima*), la spigola (*Dicentrarchus labrax*), l'orata (*Sparus aurata*), l'halibut (*Paralichthys olivaceus*), la seriola (*Seriola quinqueradiata*), il Tai (*Pagrus major*), *Pagellus bogaraveo*, lo storione siberiano (*Acipenser baerii*) e la trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) (Chou *et al.*, 1993; Kaushik *et al.*, 1995; Takagi *et al.*, 1999; Franco *et al.*, 2005; Palmegiano *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2006; Gatlin *et al.*, 2007; Daprà *et al.*, 2009; Rana e Hasan, 2009; Hardy, 2010; Kader *et al.*, 2010; Salze *et al.*, 2010; Welch *et al.*, 2010; Gai *et al.*, 2012; Jalili *et al.*, 2013; Sicuro *et al.*, 2015). Il risultato di una così elevata ricerca scientifica negli ultimi 10-15 anni, ha condotto ad esempio alla progressiva diminuzione dei livelli di inclusione di farina di pesce in specie marine e salmoni, passando da un 50 ad un 20% e da un 45 ad 20%, rispettivamente (Tacon *et al.*, 2011). In particolare in trota e orata, la combinazione di proteine vegetali provenienti da differenti materie prime (cereali, legumi, glutine di mais e grano, lupino, colza e pisello) ha permesso di sostituire fino al 75% di farina di pesce, senza effetti negativi sulla crescita, metabolismo e qualità delle carni (Kaushik *et al.*, 2004)

1.3.3 FARINE DI INSETTO

Stato dell'arte

Le fonti proteiche alternative alla farina di pesce sono molteplici (farine vegetali, farine animali, ecc.) ognuna delle quali presenta al contempo pro e contro riguardo l'inclusione nei mangimi commerciali. Le caratteristiche principali da possedere sono sicuramente la reperibilità delle materie prime, la sostenibilità produttiva ed allo stesso tempo un'elevata qualità nutrizionale, paragonabile a quella della farina di pesce.

Pertanto, al fine di rendere le filiere *feed* più sostenibili, la ricerca scientifica ha spostato l'attenzione verso innovative fonti proteiche alternative, in grado di esaltare la biodiversità, garantendo la sostenibilità ambientale e socio-economica delle produzioni animali terrestri ed acquatiche. Attualmente, fra le materie prime di maggiore interesse vi sono gli insetti, indicati dalla FAO come una valida fonte di proteine ed amminoacidi destinati alla formulazione di mangimi commerciali.

L'utilizzo degli insetti in nutrizione animale risale agli inizi del XX secolo. Lindner (1919) indicava la possibilità di allevare la mosca comune (*Musca domestica*) su scarti organici, al fine di ottenere proteine e lipidi utilizzabili in mangimi per bestiame; in seguito, Calvert e coll. (1969) valutarono l'utilizzo della stessa specie come alimento per polli, mentre Newton e coll. (1977) utilizzarono la mosca soldato (*Hermetia illucens*) come supplemento alimentare per suini. Queste materie prime non convenzionali vennero messe da parte negli anni '80, a causa dell'ampia disponibilità di altre fonti proteiche (soprattutto vegetali). Attualmente, come già descritto in precedenza, la situazione è cambiata e nuovi scenari sono emersi nell'utilizzo di queste promettenti fonti proteiche come alimento (Henry *et al.*, 2015).

Gli insetti, come riportato da Lindner (1919) rappresentano una fonte proteica utilizzabile nell'alimentazione di un'ampia varietà di specie animali allevate, pesci inclusi (Bondari e Sheppard, 1987; Awoniyi *et al.*, 2004; Lock *et al.*, 2015), ed inoltre come alimento per uso umano, principalmente in Paesi extra-europei dove sono profondamente radicati nella cultura culinaria (DeFoliart, 1992).

Gli insetti d'altro canto, fanno parte della dieta naturale di pesci marini e di acque interne (Whitley e Bollens, 2014), e tra di essi, ve ne sono alcune specie ritenute

più idonee per l'inclusione nei mangimi per via di caratteristiche peculiari che le contraddistinguono (facilità di allevamento/caratteristiche nutrizionali) (Nakagaki e Defoliart, 1991). In generale, possiedono un elevato tenore proteico, un buon profilo in aminoacidi essenziali (altamente biodisponibili), lipidi e vitamine (Finke, 2002). La frazione proteica varia dal 42 al 83% (sulla sostanza secca) e dipende dalla specie oltre che dal metodo di processazione dell'insetto stesso (Makkar *et al.*, 2014; Henry *et al.*, 2015).

Pertanto, non è possibile generalizzare sul tenore in macronutrienti dato che questi sono taxon-dipendenti (Barroso *et al.*, 2014), e variano oltretutto in funzione dello stadio di sviluppo dell'insetto stesso. Tuttavia tra i vari taxa, i Ditteri mostrano un profilo simile alla farina di pesce, mentre i Coleotteri e gli Ortotteri più simile alla farina di soia. Inoltre, la componente aminoacidica è ricca in aminoacidi essenziali, ma carente in solforati come metionina, cisteina, istidina, lisina e treonina (Finke, 2002). Il profilo lipidico varia dall'8.5 al 36% (Makkar *et al.*, 2014; Tran *et al.*, 2015), con una predominante presenza di acidi grassi saturi come il laurico (12:0) e carente in polinsaturi della serie $\omega 3$ (EPA-DHA), che sono estremamente importanti per l'alimentazione delle specie acquatiche, specialmente di quelle marine. L'elevato tenore lipidico può causare problemi a livello di formulazione ed inclusione nei mangimi, poiché ne influenza la stabilità e la conservabilità per via della facilità di irrancidimento. Per tale ragione la maggior parte delle farine subiscono un processo di degrassatura attraverso metodi fisici o chimici. In questo modo la percentuale di proteine e di conseguenza di aminoacidi essenziali aumenta notevolmente, mentre l'olio estratto può essere utilizzato per altri scopi zootecnici (Schiaivone *et al.* 2017), oppure per la produzione di biodiesel (Henry *et al.*, 2015; Surendra *et al.* 2016). Infine, il livello di carboidrati presenti (zuccheri, amidi e fibre) è relativamente basso, con un'alta percentuale però di chitina, un polimero di N-acetilglucosamina, componente principale dell'esoscheletro degli artropodi (Lindsay *et al.*, 1984).

Tra le caratteristiche peculiari che gli insetti mostrano vi è il basso impatto ambientale rispetto ad altre specie allevate, poiché a parità di proteine prodotte consumano quantità infinitesimali di alimento, di acqua potabile, di energia, di suolo, oltre a produrre una minore quantità di gas serra (Oonincx e de Boer,

2012). Possono inoltre essere utilizzati per decomporre e bioconvertire rifiuti organici, senza entrare in competizione alimentare con gli stessi esseri umani.

Tenendo conto di tutte queste caratteristiche, la FAO sottolinea come gli insetti possano rivestire un ruolo di fondamentale importanza all'interno delle filiere produttive in campo mangimistico.

Da ciò si evince come, tenendo conto della produzione annuale di mangimi a livello europeo, che si aggira attorno alle 153 milioni di tonnellate, rappresentando circa il 15% del mercato globale dell'alimentazione animale (Rozin *et al.*, 2008), la fornitura strategica di proteine alternative, provenienti da fonti sostenibili ed ecologicamente rispettose dell'ambiente, assuma un ruolo cruciale.

I primi studi sull'inclusione degli insetti in mangimi destinati all'acquacoltura hanno principalmente analizzato le risposte ottenute da specie erbivore/onnivore come pesci gatto, carpe e tilapie, nell'ottica di evitare la completa eliminazione di proteine animali dalla loro dieta, che è inevitabilmente associata alla riduzione delle performances di crescita e del benessere generale degli esemplari (Desai *et al.*, 2012; Krogdahl *et al.*, 2010; Oliva-Teles *et al.*, 2015). Nell'ultima decade, l'interesse è aumentato e l'attenzione è stata spostata anche su specie carnivore d'acqua dolce e marina (Henry *et al.*, 2015). Pertanto l'interesse che la ricerca scientifica ha mostrato nell'utilizzo degli insetti come materia prima è cresciuto rapidamente.

Alcune prove alimentari sono state condotte su differenti specie, in cui veniva valutato l'effetto dell'inclusione di diverse farine di insetto come parziale o completa sostituzione della farina di pesce. Nonostante l'elevato numero di specie di insetti utilizzabili ai fini alimentari (*Bombyx mori*, *Zophobas morio*, *Alphitobius diaperinus*, *Acheta domesticus*, *Gryllus assimilis*, *Gryllodes sigillatus* *etc.*), i risultati più promettenti sono stati ottenuti da specie appartenenti ai Ditteri (Calvert *et al.*, 1969; Newton *et al.*, 1977, 2004; Inaoka *et al.*, 1999; Fasakin *et al.*, 2003; Awoniyi *et al.*, 2004; Aniebo *et al.*, 2008). Una specie molto interessante è la mosca soldato (*Hermetia illucens*) che è stata testata su pesce gatto (*Ictalurus punctatus*), tilapia blu (*Oreochromis aureus*) (Newton *et al.*, 1977, 2004; Bondari e Sheppard, 1981, 1987), salmone atlantico (*Salmo salar*)

(Lock *et al.*, 2015), rombo (*Psetta maxima*) (Kroeckel *et al.*, 2012) e trota (*Oncorhynchus mykiss*) (Sealey *et al.*, 2011).

Anche la mosca comune (*Musca domestica*) è stata utilizzata in diverse prove alimentari su: pesce gatto africano (*Clarias gariepinus*) (Fasakin *et al.*, 2003), pesce gatto ibrido (*Heteroclarias*) (Sogbesan *et al.*, 2006), trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) (St-Hilaire *et al.*, 2007b), tilapia del nilo (*Oreochromis niloticus*) (Ogunji *et al.*, 2008b), carpa di Prussia (*Carassius auratus gibelio*) e pesce gatto nero (*Pelteobagrus vachelli*) (Dong *et al.*, 2013), black carp (*Mylopharyngodon piceus*) (Ming *et al.*, 2013) e barramundi (*Lates calcarifer*) (Lin e Mui, 2016).

Anche tra i coleotteri esistono specie che hanno mostrato risultati promettenti in acquacoltura (Ng *et al.*, 2001; Piccolo *et al.*, 2014; Belforti *et al.*, 2015; Roncarati *et al.*, 2015; Sanchez-Muros *et al.*, 2015; Gasco *et al.*, 2016; Iaconisi *et al.*, 2017). La specie maggiormente utilizzata è *Tenebrio molitor* che è stata testata su pesce gatto africano (*Clarias gariepinus*) (Ng *et al.*, 2001), pesce gatto comune (*Ameiurus melas*) (Roncarati *et al.*, 2015), tilapia del nilo (*Oreochromis niloticus*) (Sanchez-Muros *et al.* 2015), trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) (Belforti *et al.*, 2015), orata (*Sparus aurata*) (Piccolo *et al.*, 2014), spigola (*Dicentrarchus labrax*) (Gasco *et al.*, 2016) e *Pagellus bogaraveo* (Iaconisi *et al.*, 2017).

Aspetti legislativi

In seguito al parere scientifico dell' Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) sull'utilizzo degli insetti come alimento e mangime, il Comitato permanente per le piante, gli animali, gli alimenti e i mangimi ha recentemente approvato il progetto di regolamento che modifica gli allegati I e IV del Regolamento (CE) 999/2001 e degli allegati X e XV del Regolamento (CE) 142/201, per quanto concerne le disposizioni sulle proteine di origine animale trasformate. L'utilizzo di proteine provenienti da insetti nella formulazione di mangimi destinati all'acquacoltura, è consentita in Europa dal Luglio 2017 (Regolamento della Commissione EU; 2017/893 del 24 Maggio 2017). Secondo tale documento, le farine autorizzate possono provenire solamente dalle seguenti specie:

- *Hermetia illucens* (HI)

- *Musca domestica* (MD)
- *Tenebrio molitor* (TM)
- *Alphitobius diaperinus*
- *Acheta domesticus*
- *Grylloides sigillatus*
- *Gryllus assimilis*

Nonostante queste specie possiedano caratteristiche chimico-nutrizionali adeguate all'utilizzo in campo mangimistico (energia, proteine, aminoacidi essenziali, lipidi e minerali), esistono altri aspetti da considerare, di natura prettamente industriale come il potenziale per essere prodotte su larga scala e riuscire così a soddisfare le richieste di mercato. In tal senso solo tre specie (TM, HI e MD) rispecchiano a pieno tali caratteristiche e risultano ad oggi le più utilizzate su scala industriale (Tabella 14). Tra queste, particolare attenzione verrà dedicata alla mosca soldato (*Hermetia illucens*), data la centralità avuta nel presente progetto di tesi.

	Unità	TM ^a	HI ^b	MD ^c	FM ^d	SBM ^e
Sostanza secca (SS)	%	42.2 (37.1-57.6)	91.3 (90.0-92.5)	92.4 (90.0-94.7)	92.1 (90.0-94.4)	87.9 (85.0-92.1)
Proteine	% SS	51.5 (44.1-60.3)	49.1 (35.5-72.5)	49.9 (37.5-63.8)	75.6 (70.2-80.7)	51.4 (48.3-54.5)
Lipidi (Estratto etereo)	% SS	30.2 (16.6-43.1)	20.0 (3.4-38.6)	15.8 (6.3-31.3)	8.1 (2.0-12.0)	2.1 (2.0-2.2)
Fibre	% SS	5.9 (5-6.9)	7	14.7 (1.6-29.7)	-	6.7 (3.5-10.1)
Energia totale	MJ/kg SS	26.2 (24.4-28.7)	22.8 (21.2-24.4)	21.7 (19.3-24.4)	21.4 (19.6-23.8)	19.9 (19.8-20.0)
AAE						
Lisina	% proteine	4.5 (1.7-6.1)	6.4 (5.6-8.0)	6.1 (4.4-8.2)	6.1 (5.5-7.5)	6.1 (5.7-6.6)
Metionina	% proteine	1.5 (1.2-2)	1.8 (1.4-2.4)	2.3 (1.3-3.7)	2.2 (2.0-2.6)	1.4 (1.2-1.6)
Metionina + Cisteina	% proteine	2.3 (1.8-2.9)	2.2 (1.5-3.1)	3.0 (1.7-4.7)	2.9 (2.6-3.2)	2.9 (2.5-3.3)
Triptofano	% proteine	0.9 (0-1.8)	0.8 (0.5-1.1)	1.8 (1.4-3.2)	0.8 (0.7-0.9)	1.3 (1.2-1.4)
Treonina	% proteine	3.6 (2.7-4.4)	3.6 (1.3-4.8)	3.8 (2.0-7.6)	3.1 (2.9-4.3)	3.9 (3.5-4.3)
Leucina	% proteine	7.6 (4.5-10.6)	7.3 (6.6-8.4)	5.7 (4.5-6.4)	5.9 (5.2-7.3)	7.5 (6.8-8.0)
Isoleucina	% proteine	4.1 (2.6-5)	4.7 (4.0-5.6)	2.9 (1.7-3.7)	3.7 (3.3-4.4)	4.6 (4.3-5.0)
Valina	% proteine	5.5 (3.7-5.6)	6.9 (5.6-9.1)	3.3 (1.3-4.9)	4.2 (3.9-4.8)	4.8 (4.3-5.4)
Istidina	% proteine	3 (2.1-3.6)	3.1 (2.3-4.5)	3.0 (1.0-5.1)	1.8 (1.7-1.9)	2.6 (2.4-2.9)
Arginina	% proteine	4.5 (3.6-5.6)	5.4 (4.8-6.1)	4.9 (3.7-5.8)	4.6 (4.0-6.0)	7.4 (6.8-8.1)
Fenilalanina + Tirosina	% proteine	10.7 (8.6-12.1)	11.2 (9.6-13.3)	9.8 (6.2-17.3)	5.5 (5.2-6.5)	8.5 (7.7-9.4)
Acidi grassi						
Saturi	% FA totali	26.4 (22.2-35.1)	33.3	41.3 (33.1-49.2)	19.5 (18.9-19.7)	15.1 (14.9-15.2)
Monoinsaturi	% FA totali	41.7 (35.1-51.5)	43.4	38.9	50.8 (50.5-52.1)	21.1 (20.5-21.7)
ω6 polinsaturi	% FA totali	25.5 (11.5-34.5)	15	18.4	1.8 (1.8-2.0)	56.1 (55.9-56.3)
ω3 polinsaturi	% FA totali	1.1 (0.8-1.4)	8.3	-	8.1 (2.0-12.0)	2.1 (2.0-2.2)
Minerali (ceneri)	% SS	3.8 (1.0-6.5)	13.6 (4.3-28.4)	11.4 (5.0-23.1)	16.6 (12.0-23.3)	6.9 (6.8-7.0)
Ca	g/kg SS	2.7 (0.3-6.2)	75.6 (50.0-86.3)	4.7 (3.1-8.0)	36.3 (15.4-78.3)	3.9 (2.3-6.3)
P	g/kg SS	7.8 (4.4-14.2)	9.0 (6.4-15.0)	16.0 (9.7-24.0)	25.9 (19.0-40.4)	6.9 (5.8-8.6)
K	g/kg SS	8.9 (8.5-9.3)	6.9	5.7 (1.0-12.7)	10.2 (5.9-14.4)	23.7 (21.8-26.0)
Na	g/kg SS	0.9	1.3	5.2 (2.8-8.6)	10.0 (5.9-14.4)	0.1 (0.0-0.8)
Mg	g/kg SS	2.3 (2.0-2.8)	3.9	3.4 (0.7-11.5)	2.5 (1.6-3.1)	3.1 (2.4-3.6)

Tab.14. Composizione in nutrienti e valore nutrizionale di TM, HI e MD, comparata con farina di pesce (FM) e farina di soia (SBM). (Fonte: **A.** Barroso *et al.*, 2014; Feedpedia: www.feedipedia.org; Gasco *et al.*, 2016; Marono *et al.*, 2015; Sánchez-Muros *et al.*, 2015; Siemianowska *et al.*, 2013; **B.** Diener *et al.*, 2009; Feedpedia: www.feedipedia.org; Józefiak *et al.*, 2016; Makkar *et al.*, 2014; Maurer *et al.*, 2016; Marono *et al.*, 2015; Oonincx *et al.*, 2015; Sánchez-Muros *et al.*, 2015; Tschirner e Simon, 2015; **C.** Aniebo *et al.*, 2008; Aniebo e Owen, 2010; Barroso *et al.*, 2014; Feedpedia: www.feedipedia.org; Fasakin *et al.*, 2003; Józefiak *et al.*, 2016; Makkar *et al.*, 2014; Sanchez-Muros *et al.*, 2015; Sogbesan *et al.*, 2006; Tschirner e Simon 2015; Zuidhof *et al.*, 2003; **D.** Feedpedia: www.feedipedia.org; Guillame *et al.*, 2001; **E.** Feedpedia: www.feedipedia.org; Guillame *et al.*, 2001).

Hermetia illucens

La mosca soldato nera (*Hermetia illucens*) è un insetto saprofito appartenente all'ordine dei Ditteri, famiglia Stratiomidi. Originario delle regioni tropicali, subtropicali e temperate dell'America, ad oggi risulta presente in tutte le regioni del mondo comprese tra il 45° parallelo Nord e il 40° parallelo Sud (Makkar *et al.*, 2014). Le larve sono estremamente voraci (consumano quotidianamente una quantità di substrato alimentare pari al doppio del loro peso) e possono crescere su differenti rifiuti organici, tra cui scarti dell'industria agroalimentare e dei processi agricoli, reflui zootecnici, rifiuto umido urbano, riducendone in modo significativo la massa (Sheppard *et al.*, 1994; St Hilaire *et al.*, 2007; Diener *et al.*, 2009, Kalova *et al.*, 2013; Borkovcova, 2013; Van Huis *et al.*, 2013).

Il suo ciclo di sviluppo è relativamente veloce: in condizioni ideali di temperatura e umidità lo stadio larvale ha una durata media di 2 mesi, quello pupale di 2 settimane, mentre l'adulto si accoppia 48 ore dopo lo sfarfallamento e ovidepone entro pochi giorni (Makkar *et al.*, 2014). Inoltre l'adulto, a differenza di altre specie, non possedendo un apparato buccale funzionante, non si alimenta, ma sopravvive bevendo solamente (Figura 10). Questa caratteristica implica una minore possibilità di veicolare patologie e di conseguenza risulta un vantaggio per il suo utilizzo in campo zootecnico.



Fig.10. Ciclo vitale di *H.illucens*

Le larve di questa mosca possono essere utilizzate in diversi settori quali: scienza forense, medicina, uso commerciale, biotecnologico, zootecnico ed ecologico. Riguardo l'uso in campo forense, è stato dimostrato come *H.illucens* possa essere utilizzata al fine di datare l'intervallo minimo *post mortem* di un cadavere (Nguyen *et al.*, 2013). In ambito zootecnico viene utilizzato come materia prima a basso costo (Tomberlin *et al.*, 2002), avendo la possibilità di crescere direttamente sulla materia organica in decomposizione (letame) (Newton *et al.*, 2005). Inoltre, le larve vengono utilizzate come integratore dietetico all'interno dei laghetti di pesca sportiva, poiché, visto l'elevato tenore in calcio, aumenta gli indici di crescita degli esemplari allevati (Kroeckel *et al.*, 2012). Dal punto di vista igienico sanitario la capacità di degradare il letame e di modificarne allo stesso tempo la microflora, riducendo la carica batterica di *E.coli* e *Salmonella enterica*, è un grosso vantaggio negli allevamenti intensivi (Erikson *et al.*, 2014). Questa caratteristica è probabilmente legata alla capacità di produrre peptidi antimicrobici particolarmente efficaci nei confronti di differenti ceppi batterici (Makkar *et al.*, 2014). In tal senso, l'utilizzo di questo dittero viene ampiamente sfruttato in processi di degradazione di reflui urbani o animali, biotrasformandoli sia da un punto di vista quantitativo che qualitativo, assumendo un ruolo di fondamentale importanza nello smaltimento dei rifiuti di natura biologica (Figura 11).



Fig.11. Larve di *H. illucens* su substrato organico

In campo ecologico, viene inoltre utilizzato come deterrente nei confronti di altre specie di mosche nel colonizzare una determinata area (Newton *et al.*, 2005). In campo medico e farmaceutico, l'estrazione della chitina (polisaccaride costituito da un omopolimero di N-acetilglucosammina) dall'esoscheletro di *H. illucens* e la successiva trasformazione in chitosano, attraverso un processo di deacetilazione, permette di ottenere un prodotto ampiamente utilizzato nella cosmesi o come coadiuvante nel trattamento delle ustioni (Malette *et al.*, 1986) ma anche in campo fotografico vista l'elevata resistenza all'abrasione e le particolari caratteristiche ottiche (Muzzarelli *et al.*, 1995). Infine l'elevato contenuto lipidico delle larve viene utilizzato in campo biotecnologico per la produzione di biodiesel, le cui caratteristiche fisico-chimiche sono comparabili con quelle derivanti dall'utilizzo della colza (Li *et al.*, 2011).

Caratteristiche nutrizionali

Il concetto alla base dello studio di una fonte proteica alternativa annovera al suo interno caratteristiche quali: facilità di reperimento, sostenibilità e valore nutrizionale. Nello specifico, la composizione chimica nonché il valore nutrizionale delle larve di *H.illucens*, così come quelle di tante altre specie di insetto, variano sostanzialmente in funzione del substrato utilizzato per il loro allevamento (Tabella 15). In particolare, la frazione lipidica è quella più suscettibile a variazioni sia quantitative che qualitative rispetto alla quota proteica. Il contenuto proteico si attesta intorno al 35-72% (sulla s.s.) con un contenuto di grassi che, in funzione del substrato di allevamento, può variare dal 15%/s.s. (pollina) (Arango Gutierrez *et al.*, 2004) al 49%/s.s. (sottoprodotti ricchi in grassi) (Barry, 2004). Inoltre è presente un'elevata quantità di calcio e fosforo (5-8% e 0.6-1.5% rispettivamente) (Makkar *et al.*, 2014), con un contenuto medio in acqua del 35-45% ed un tenore in ceneri variabile tra l'11 ed il 28% (sulla s.s.) (www.feedipedia.org).

	Unità	<i>Hermetia illucens</i>
Sostanza secca (SS)	%	91.3 (90.0–92.5)
Proteine	% SS	49.1 (35.5–72.5)
Lipidi (Estratto etereo)	% SS	20.0 (3.4–38.6)
Fibre	% SS	7
Energia totale	MJ/kg SS	22.8 (21.2–24.4)
AAE		
Lisina	% proteine	6.4 (5.6–8.0)
Metionina	% proteine	1.8 (1.4–2.4)
Metionina + Cisteina	% proteine	2.2 (1.5–3.1)
Triptofano	% proteine	0.8 (0.5–1.1)
Treonina	% proteine	3.6 (1.3–4.8)
Leucina	% proteine	7.3 (6.6–8.4)
Isoleucina	% proteine	4.7 (4.0–5.6)
Valina	% proteine	6.9 (5.6–9.1)
Istidina	% proteine	3.1 (2.3–4.5)
Arginina	% proteine	5.4 (4.8–6.1)
Fenilalanina + Tirosina	% proteine	11.2 (9.6–13.3)
Acidi grassi		
Saturi	% FA totali	33.3
Monoinsaturi	% FA totali	43.4
ω6 polinsaturi	% FA totali	15
ω3 polinsaturi	% FA totali	8.3
Minerali (ceneri)	% SS	13.6 (4.3–28.4)
Ca	g/kg SS	75.6 (50.0–86.3)
P	g/kg SS	9.0 (6.4–15.0)
K	g/kg SS	6.9
Na	g/kg SS	1.3
Mg	g/kg SS	3.9

Tab.15. Composizione chimica e valore nutrizionale di *Hermetia illucens*

Prove di alimentazione in specie ittiche di interesse per l’acquacoltura

Hermetia illucens (HI) rappresenta da un punto di vista nutrizionale una valida alternativa alla farina di pesce nella formulazione di mangimi destinati all’acquacoltura. Tuttavia il livello di inclusione dipende soprattutto dal profilo lipidico, composto in misura maggiore da acidi grassi saturi e monoinsaturi. Di conseguenza per rispettare i fabbisogni nutrizionali delle specie acquatiche, in particolare dei pesci marini, in termini di acidi grassi polinsaturi della serie ω-3, le farine maggiormente utilizzate nelle prove sperimentali vengono sottoposte ad un processo di degrassatura, attraverso processi chimici o fisici, in modo da allontanare parte della componente lipidica ed allo stesso tempo aumentare il tenore proteico percentuale. In questo modo il contenuto lipidico medio viene

ridotto da un 21% fino ad un 4%, e l'apporto in PUFA ω -3 viene garantito attraverso la successiva grassatura del mangime con olio di pesce.

In questo contesto, le prove sperimentali effettuate su specie ittiche di interesse commerciale, sia dulcicole, sia marine, hanno permesso di valutare quelle che sono le risposte in termini di crescita ed utilizzazione dei nutrienti, derivanti dall'inclusione di questa materia prima all'interno dei mangimi. Nello specifico, come riportato in letteratura, il primo studio datato 1981, ha evidenziato come la somministrazione di larve tritate tal quale o in combinazione con una dieta commerciale, mostrava performance simili (peso corporeo e lunghezza totale) rispetto alla dieta di controllo in pesce gatto maculato (*Ictalurus punctatus*) e tilapia (*Oreochromis aureus*). Inoltre parametri quali aroma e texture risultavano comparabili ed accettabili dal consumatore (Bondari e Sheppard, 1981). Gli stessi autori, in un lavoro successivo, hanno dimostrato un minor incremento di peso con inclusione di HI al 10% in pesce gatto maculato in fase di ingrasso, allevato in gabbie, mentre la stessa dieta utilizzata in esemplari allevati in vasca non riduceva significativamente i tassi di crescita. L'alimentazione con il 100% di larve tritate non ha permesso una buona crescita né in pesce gatto, né tantomeno in tilapia, probabilmente dovuto all'insufficiente apporto proteico della dieta (Bondari e Sheppard, 1987). Newton e coll. (2005) hanno evidenziato che l'inclusione di HI al 30% in sostituzione totale di farina di pesce (fish meal – FM) e parziale di farina di soia (soybean meal, SBM) in pesce gatto maculato, non ha mostrato differenze statisticamente significative sulla crescita.

In un altro studio condotto su trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*), utilizzando farina di HI allo stadio prepupale, allevata su letame di maiale per 9 settimane, in parziale sostituzione di farina di pesce a percentuali del 25 e 50%, i risultati hanno mostrato che il 25% di sostituzione non ha prodotto effetti negativi sull'incremento di peso e nell'indice di conversione alimentare. Al contrario, questi parametri sono peggiorati al 50% di sostituzione, se confrontati con la dieta di controllo (St-Hilaire *et al.*, 2007a).

Un trial successivo condotto sempre su trota iridea (Sealey *et al.*, 2011) utilizzando una sostituzione del 25 e 50% di farina di pesce con farina di HI tal quale o arricchita con scarto di pesce, ha mostrato come nel primo caso, la crescita degli esemplari fosse significativamente ridotta se confrontata con la dieta

controllo, mentre nel secondo non erano presenti delle differenze significative con la stessa dieta di riferimento. Da un punto di vista compositivo, il filetto degli esemplari allevati, in termini soprattutto di contenuto lipidico, è risultato differente al crescere del livello di sostituzione.

In giovanili di rombo (*Psetta maxima*), sono state testate sei diete contenenti farina di *Hermetia illucens* degrassata in percentuali di inclusione dello (0-17-33-49-64 e 76%). I risultati mostrano un generale peggioramento degli indici di *performances* e dell'assunzione di cibo a livelli di inclusione superiori al 33%, a causa probabilmente della scarsa appetibilità del mangime. La presenza della chitina potrebbe aver influenzato la disponibilità e la digeribilità dei nutrienti, mentre il contenuto lipidico corporeo è diminuito all'aumento del livello di inclusione della farina di insetto (Kroeckel *et al.*, 2012).

In salmone atlantico (*Salmo salar*), parametri di accrescimento sovrapponibili alle diete di controllo, sono stati ottenuti a diversi livelli di inclusione (5-25%) di HI (Lock *et al.*, 2014), mentre la sostituzione di FM con due differenti tipi di farine di HI, in termini di contenuto proteico e lipidico, hanno condotto a risultati controversi (Lock *et al.*, 2016). Gasco e coll. (2017), hanno confrontato una dieta controllo a base di FM e una dieta a base di proteine vegetali sono state confrontate con diete a base di HI a livelli di inclusione differenti (18.5 e 37.5, in sostituzione del 25 e 50% di FM rispettivamente) in giovanili di storione siberiano (*Acipenser baerii*). I risultati hanno mostrato un significativo peggioramento degli indici di *performances* e del fattore di condizione. In generale, una sostituzione di FM fino al 25%, ha mostrato risultati sovrapponibili alle diete di controllo. Renna e coll. (2017), hanno osservato che l'utilizzo di una farina di HI parzialmente degrassata in trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*), non ha influenzato la sopravvivenza, gli indici di crescita e somatici, oltre ai parametri qualitativi del filetto.

Da questa panoramica generale si può dedurre come la ricerca scientifica stia prendendo in seria considerazione l'utilizzo di questo dittero come valida alternativa proteica alle materie prime comunemente utilizzate nella formulazione di mangimi destinati alle specie ittiche. Nonostante ciò restano ancora da valutare effetti a lungo termine sull'allevamento intensivo delle specie allevate, in modo da

ottenere dati ad ampio spettro sui livelli di sostituzione ed inclusione ottimali affinché il prodotto finale soddisfi le esigenti richieste di mercato.

1.4 CENNI DI LEGISLAZIONE IN MATERIA DI SPERIMENTAZIONE ANIMALE (DECRETO L.GS 26/2014)

I progetti di ricerca nei quali è previsto l'utilizzo di animali a fini scientifici, devono essere autorizzati dal Ministero della Salute in conformità con quanto previsto dall'articolo 31 del D.lgs. 26/2014. La procedura di presentazione prevede che il responsabile scientifico del progetto inoltri la domanda di autorizzazione per via telematica certificata, all'Organismo Preposto al Benessere Animale (OPBA) a cui afferisce lo stabulario.

L'OPBA, a seguito della verifica della correttezza formale della richiesta presentata, attribuisce al progetto un codice di riferimento che viene comunicato al responsabile scientifico e che verrà utilizzato nelle successive comunicazioni. L'Organismo può richiedere integrazioni al progetto qualora venisse ritenuto opportuno, inviando comunicazione al responsabile. Al termine della valutazione finale, l'OPBA esprime un parere motivato e, se positivo, provvede a inoltrare la domanda al Ministero della Salute.

La domanda di autorizzazione viene inoltrata per via telematica certificata, al Ministero tramite la Banca Dati Telematica della Sperimentazione Animale.

Il Ministero qualora la domanda fosse incompleta o errata, richiede le opportune integrazioni e modifiche da presentare entro trenta giorni lavorativi decorrenti dalla data di ricevimento della richiesta. In considerazione della complessità o del carattere multidisciplinare del progetto, il termine può essere prorogato una sola volta per un periodo non superiore a quindici giorni lavorativi. Nel procedimento per il rilascio dell'autorizzazione, il Ministero richiede una valutazione tecnico-scientifica all'Istituto Superiore di Sanità o ad altri enti tecnico-scientifici tenuto conto delle materie di pertinenza del progetto. La valutazione tiene conto:

- Della preventiva valutazione sugli scopi del progetto che giustificano l'uso dell'animale;
- Della presenza del parere positivo da parte dell'OPBA;
- Dell'analisi dei danni e dei benefici derivanti dal progetto, al fine di comprendere, tenuto conto anche delle considerazioni di natura etica, se il danno agli animali in termini di sofferenza, dolore, distress o danno

prolungato è giustificato dal risultato atteso in termini di benefici per gli esseri umani, per gli animali e per l'ambiente;

- Della preventiva valutazione circa lo svolgimento delle procedure nelle condizioni più umanitarie e più rispettose dell'ambiente possibili;
- Della effettiva necessità della ricerca in quanto non costituisce una inutile duplicazione di ricerche già effettuate;
- Della conformità rispetto al decreto 26/2014;
- Delle motivazioni poste alla base dell'utilizzo di una determinata specie, allevata o meno per essere impiegata nelle procedure;
- Del minor numero di animali per il raggiungimento delle finalità del progetto;
- Dell'utilizzo di metodi adeguati di eutanasia in conformità con l'articolo 6;

L'Istituto Superiore di Sanità, in fase di valutazione può richiedere eventuali integrazioni al responsabile del progetto. Al termine della valutazione finale, viene espresso un parere motivato e, se negativo, il Ministero invia un provvedimento di diniego. Se invece è positivo, viene rilasciata l'autorizzazione del progetto limitata alle procedure che sono state oggetto di valutazione e di una classificazione della gravità loro attribuita, e ne invia copia anche all'Azienda Sanitaria Locale territorialmente competente.

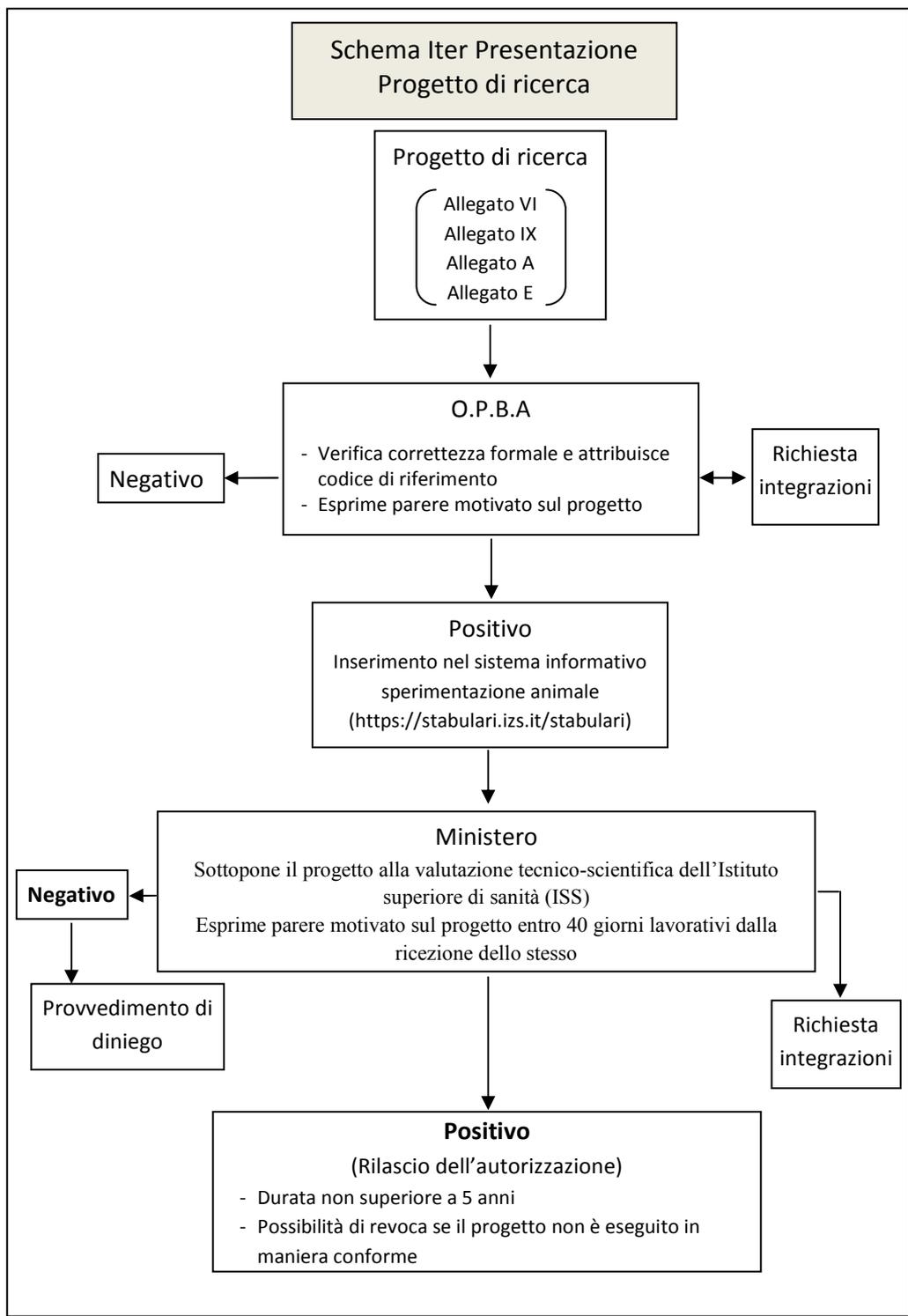


Fig.12. Iter presentazione progetto di ricerca

Capitolo II

2. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo del progetto di ricerca è quello di valutare l'effetto sulla crescita ed utilizzazione dei nutrienti di una farina di *Hermetia illucens* parzialmente degrassata, ovvero a contenuto lipidico ridotto, al fine di sostituire la farina di pesce in percentuali crescenti (25-50-75%), in diete destinate ad esemplari di orata adulti (*Sparus aurata*).

Gli obiettivi specifici prefissati sono stati:

- Caratterizzazione chimico-nutrizionale della farina di insetto (Proteina grezza; Lipidi, Ceneri, Fibra etc.);
- Valutazione delle *performances* zootecniche degli esemplari allevati attraverso specifici indici:
 - TAS: tasso di accrescimento specifico;
 - ICA: indice di conversione alimentare;
 - PER: efficienza di utilizzazione proteica;
 - FR: rapporto di alimentazione;
 - DIR: tasso di assunzione giornaliera.
- Valutazione degli indici morfometrici e biometrici:
 - HSI: indice epatosomatico;
 - VSI: indice viscerosomatico;
 - CF: coefficiente di adiposità;
 - K: fattore di condizione.
- Digeribilità del mangime;
- Analisi dell'attività enzimatica intestinale (proteasi totali, lipasi ed amilasi).

Sulla base di tali valutazioni ed analisi, il progetto mira a comprendere le potenzialità di questa fonte proteica alternativa sia da un punto di vista produttivo, che di salute generale degli individui allevati, in un'ottica di sostenibilità ambientale. L'originalità del progetto è rappresentata sia dall'utilizzo della farina di insetto, che dalle condizioni di allevamento utilizzate all'interno dell'impianto sperimentale, tali da ricreare su scala pilota un'unità di ricerca e sviluppo di cui

molte imprese operanti in campo mangimistico non dispongono e ciò limita le loro potenzialità di innovazione.

Infine, il progetto rappresenta un'interessante opportunità per testare ed eventualmente sviluppare nuovi mangimi sulla scorta di evidenze scientifiche precise.

2.1 SPECIE OGGETTO DELLA SPERIMENTAZIONE (*Sparus aurata*). BIOLOGIA ED HABITAT

L'orata (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758) è un pesce osseo di mare e di acque salmastre, appartenente alla famiglia degli sparidi.



Fig.13. *Sparus aurata*

L'orata è una specie comune nel mar Mediterraneo e lungo le coste orientali dell'oceano Atlantico, dalla Gran Bretagna al Senegal (Figura 14).



Fig.14. Distribuzione geografica

Questa specie è ermafrodita proterandrica, ovvero possiede entrambi gli apparati riproduttori maschile e femminile, che sviluppa in momenti diversi della propria vita.

La maturità sessuale in senso maschile è raggiunta a 2 anni di età (corrispondente ad una lunghezza approssimativa di 20-30 cm) e in senso femminile a 3 anni di età (circa 33-40 cm).

Gli individui di sesso femminile depongono le uova più volte durante la stagione riproduttiva, in numero di 20000-80000 ogni giorno, per un periodo di 4 mesi.

In cattività il cambiamento di sesso è condizionato non solo dall'età ma anche da fattori sociali e ormonali.

Tradizionalmente l'orata è stata allevata in modo estensivo nelle lagune costiere e nelle zone di acqua salmastra, fino a quando non si sono sviluppati i metodi di allevamento intensivo durante gli anni 80'. In Italia la vallicoltura e in Egitto "Hosha" sono tecniche di allevamento estensivo che si sviluppano sfruttando le migrazioni trofiche dei pesci agli stadi giovanili dal mare, all'interno delle lagune costiere.

L'orata è una specie che si è adattata bene all'allevamento intensivo grazie all'alta capacità di sopravvivenza sia in gabbie sia in vasca e la sua produzione annuale è cresciuta costantemente dal 2000, anno in cui ne sono state prodotte più di 87000 tonnellate.

Stato dell'arte delle prove di alimentazione effettuate con farine alternative in *Sparus aurata*.

L'orata, come già descritto in precedenza, rappresenta una delle specie ittiche più pregiate del Mediterraneo, diventando di conseguenza negli ultimi decenni la specie di punta dell'acquacoltura di specie marine mediterranee, grazie ai successi della riproduzione controllata ottenuti a partire dai primi anni settanta.

Pertanto in funzione degli elevati standard produttivi e di qualità richiesti dal mercato comunitario, le tecniche di allevamento su scala industriale hanno dovuto perfezionare l'intero ciclo produttivo, che comprende anche la qualità dell'alimento somministrato agli esemplari allevati. Anche in *Sparus aurata*, il costo dei mangimi rappresenta il 40-70% dei costi aziendali (Wilson, 2002; Rana *et al.*, 2009). Tale voce di bilancio è particolarmente elevata negli allevamenti di pesci carnivori che richiedono grandi quantità di farina di pesce (Manzano *et al.*, 2012). Ne consegue che la scelta del tipo di mangime ed in particolare delle materie prime utilizzate nella sua formulazione, insieme alle modalità di somministrazione e ad una corretta pratica gestionale, sono assolutamente determinanti nelle performances di crescita della specie dunque, nella redditività finale di un impianto commerciale.

Oltre a soddisfare i fabbisogni nutrizionali della specie e a garantirne la qualità finale del prodotto, il mangime deve anche rispondere a determinati criteri, tra i quali merita di essere citato quello di eco sostenibilità ambientale, che oggi più che mai assume una rilevanza fondamentale nell'era delle risorse finite. Pertanto la continua espansione industriale accompagnata dal progresso tecnologico, impone miglioramenti tecnologici e soprattutto scientifici nelle formulazioni nutrizionali dei mangimi. In quest'ottica di ricerca scientifica applicata all'ecosostenibilità, le prove di sostituzione della farina ed olio di pesce (FM; FO) effettuate negli ultimi decenni, hanno permesso di ridurre notevolmente i livelli di inclusione e di conseguenza la dipendenza a livello metabolico di queste materie prime da parte dell'orata, volgendo l'attenzione soprattutto sulle farine vegetali (soia, grano, mais, colza etc..).

Le ricerche effettuate hanno coinvolto vari stadi di vita della specie (forme larvali, avannotti, giovanili, adulti) in modo da ottenere uno spettro completo dei fabbisogni e dei relativi limiti di inclusione delle farine vegetali al fine di garantire la massima qualità del prodotto, garantendo standard di vita e di benessere elevati. I dati disponibili in letteratura suggeriscono che le diete in giovanili di orata non dovrebbero includere più del 20% di carboidrati digeribili, poiché a livelli più elevati le performances di crescita e l'utilizzo a livello metabolico del mangime risultano peggiorate (Peres *et al.*, 1999; Enes *et al.*, 2011). Studi effettuati utilizzando farina di lupino (*L. albus*) hanno mostrato che una sostituzione proteica fino al 30% non ha effetti negativi sulle performances di crescita di giovanili (42 g). Allo stesso modo l'utilizzo del glutine di mais ha permesso una sostituzione fino al 60% di FM in diete destinate a giovanili con peso medio di 8 g, senza effetti negativi sulle performances, mentre l'80% di inclusione della stessa ha comportato un effetto negativo nella crescita e sulla digeribilità delle proteine (Pereira e Oliva-Teles, 2003).

Martinez-Llorens e coll. (2007) hanno osservato che la farina di soia potrebbe essere inclusa fino al 30% in giovanili (15-80 g) e fino al 50% in pesci adulti (80-350 g) senza influenzarne la crescita o l'efficienza alimentare. Tuttavia, quando sono stati considerati gli aspetti economici e le analisi sensoriali sul prodotto, il livello massimo di inclusione raccomandato è stato solamente del 20-22%. Al contrario Bonaldo e coll. (2008) hanno evidenziato che l'inclusione del 30% di farina di soia in giovanili con peso medio di 18 g, non ha mostrato effetti sulle performances di crescita, nonostante alcune alterazioni morfologiche a livello dell'intestino distale.

Sono presenti anche studi in cui la sostituzione totale (100%) di FM con un mix di concentrati proteici vegetali (glutine di mais, glutine di grano, concentrato proteico di soia), supplementati con aminoacidi, condotti su orate con peso medio di 41 g, non hanno mostrato effetti negativi (Kissil e Lupatsch, 2004). Tuttavia, da un punto di vista economico, soltanto il 25% di sostituzione è apparso favorevole a causa dell'elevato costo di supplementazione dell'arginina.

Orate alimentate con mix di proteine vegetali (glutine di mais, glutine di grano, estruso di pisello, farina di colza) hanno mostrato solamente una lieve riduzione dell'aumento di peso in diete che includevano il 50% o 75 % di queste materie

prime, mentre a livelli massimi (100%) l'aumento di peso risultava gravemente condizionato, principalmente dovuto ad una marcata riduzione dell'assunzione di cibo da parte degli esemplari, i quali inoltre mostravano una minore deposito adiposo con una marcata ipocolesterolemia (Gomez-Requeni *et al.*, 2004).

Ulteriori prove effettuate utilizzando una parziale o totale sostituzione di FM (50, 75, 100%) con un mix di proteine vegetali (glutine di mais, glutine di grano, pisello estruso, farina di colza e lupino bianco) supplementate con aminoacidi, mostravano una riduzione della crescita e assunzione di cibo, un incremento dell'accumulo di grasso epatico e degenerazione intestinale in individui con peso medio di 16 g (Sitja-Bobadilla *et al.*, 2005).

In uno studio più recente la sostituzione di FM con farina di soia (20, 40 e 60%) mostrava una riduzione della crescita e di utilizzo del mangime, oltre ad alterazioni a carico dell'intestino distale in giovanili di 16 g alimentati con il 60% di farina di soia, mentre per tutte le diete sperimentali, risultavano influenzati negativamente alcuni indicatori della risposta immunitaria (Kokou *et al.*, 2012),

Altri studi sono stati condotti sulla sostituzione di FO con oli di origine vegetale. Nel 2004 Caballero e coll. sostituendo il 60% di FO con olio di soia osservarono una crescita normale in giovanili di 10 g; tuttavia vi fu un incremento dell'accumulo di lipidi all'interno degli epatociti. Izquierdo e coll. (2005) hanno testato la sostituzione del 60% di FO con olio di colza, olio di lino e di soia, non riscontrando effetti sulla crescita e sull'efficienza alimentare; mentre a livelli dell'80% di sostituzione si è osservata una diminuzione della crescita. Wassef e coll. (2007) hanno riportato l'assenza di effetti sulla crescita quando il 60% di FO veniva sostituito da un mix di oli vegetali (girasole, semi di cotone, semi di lino, soia), nonostante venisse riportato un accumulo di goccioline lipidiche al livello degli epatociti. Analogamente, il 60% e 80% di inclusione di olio di lino, colza o soia in diete destinate a giovanili (79 g) ha mostrato un incremento dell'accumulo di gocce lipidiche negli enterociti (Montero *et al.*, 2003).

Benedito-Palos (2007; 2008) ha studiato l'effetto della sostituzione (0, 33, 66, 100%) di FO con un mix di oli vegetali (colza, lino e palma) in diete con bassi livelli di farina di pesce (20%), riscontrando effetti negativi sulla crescita ed assunzione alimentare in orate di 16 g alimentate con la dieta al 100% di sostituzione di FO nell'arco di un periodo di 11 settimane, mentre, nello stesso

arco di tempo, la dieta al 66% di sostituzione non presentava effetti sulle performances.

La concomitante sostituzione di FM e FO durante la fase di ingrasso di orate (180 g) con un mix di proteine vegetali (soia, pisello, mais e grano; 40 e 60% di inclusione) e oli (soia, colza; 65% di inclusione), ha comportato una lieve diminuzione nell'aumento del peso ed una significativa diminuzione dell'efficienza alimentare soltanto nella dieta con le percentuali massime di sostituzione di entrambe le materie prime (Dias *et al.*, 2009).

Recentemente, uno studio condotto da Watson e coll. (2013) che prevedeva il 100% di utilizzo di farine vegetali in giovanili di orata (11 g) ha mostrato l'assenza di effetti negativi sulle performances di crescita e sulla composizione corporea finale.

Per quanto riguarda la sostituzione con farine di insetto, le ricerche condotte non sono numerose come quelle relative alle farine vegetali, ma hanno comunque mostrato risultati promettenti. Piccolo e coll. (2017) hanno dimostrato come la sostituzione del 25% di FM con farina di *Tenebrio molitor* in diete destinate ad esemplari di orata (105 g), per un periodo di 163 giorni, non ha influenzato negativamente l'incremento di peso e la digeribilità di proteine e lipidi. Inoltre a tale livello di inclusione l'indice di conversione alimentare ed il tasso di efficienza proteica sono apparsi migliori rispetto al gruppo di controllo. Al contrario, livelli di inclusione pari al 50%, hanno penalizzato la digeribilità dei nutrienti, non mostrando però un effetto negativo sulle performances di crescita rispetto al gruppo di controllo. De Haro e coll. (2016), su giovanili di 10 g, hanno testato diete a percentuali crescenti di farina di mosca verde (*Lucila sericata*) in sostituzione di FM; i risultati hanno mostrato l'assenza di effetti negativi sulle performances di crescita.

Rispetto alle farine vegetali, già ampiamente indagate, le farine di insetto risultano ad oggi poco utilizzate in prove sperimentali a carico dell'orata. Nonostante ciò, i dati disponibili indicano che numerose fonti proteiche provenienti dalle farine di insetti possono sostituire la farina e l'olio di pesce nell'alimentazione delle orate, senza effetti negativi a carico dei parametri zootecnici. Inoltre va assicurato anche uno stato di salute e di benessere degli animali, affinché i prodotti ittici risultanti

siano sicuri, nutrizionalmente adeguati e favorevolmente accettati dai consumatori.

Capitolo III

3. MATERIALI E METODI

3.1 DISEGNO SPERIMENTALE

Le prove di accrescimento sono state condotte presso l’Impianto Sperimentale di Acquacoltura dell’Istituto Marino Costiero (IAMC) del CNR di Messina, che consente sperimentazioni su piccola e media scala e per ricerche sia di base che applicate. L’impianto è autorizzato dal Ministero della Salute ai sensi del D. lgs 26/2014 quale “Stabilimento utilizzatore di animali ai fini sperimentali o altri fini scientifici” (D.lgs 105/2014 – A)

La sperimentazione oggetto della presente tesi è stata autorizzata dal Ministero della Salute (autorizzazione n°31/2017-PR del 16/1/2017) ai sensi dell’art 31 del D. lgs 26/2014, ed ha avuto una durata complessiva di cinque mesi a partire dall’Aprile 2017, ovvero fino al raggiungimento di una taglia media per replica di 350 grammi, corrispondente alla taglia commerciale comunemente utilizzata in ambito industriale per l’orata.

Il disegno sperimentale è stato impostato sulla valutazione di una farina parzialmente degrassata di *Hermetia illucens* (HI), acquistata presso Hermetia Deutschland GmbH & Co. KG (Baruth/Mark, Germany) ed utilizzata in sostituzione della farina di pesce in diete destinate ad esemplari adulti di orata (*Sparus aurata*). A tal fine sono state formulate quattro diete sperimentali isoenergetiche (EG ~ 22 MJ/kg SS), isoproteiche (PG ~ 47g/100g SS) ed isolipidiche (EE ~ 17g/100g SS), a livelli crescenti di farina di HI in sostituzione dello 0% (CTRL), 25% (HI25), 50% (HI50) e 75% di farina di pesce, corrispondenti ad un livello di inclusione dello 0 – 9,2 – 18,4 e 27,6% rispettivamente.

Il *feeding trial* ha avuto una durata complessiva di 120 giorni ed ha visto l’utilizzo di 360 orate con un peso medio iniziale di $181,6 \pm 13,5$ g, acquistate presso l’Azienda Agricola Ittica Caldoli S.r.l. All’inizio del *trial*, gli esemplari sono stati pesati individualmente e divisi all’interno di 12 vasche in vetroresina con un volume di 1,4 m³ (30 pesci per vasca) ed alimentati a razione (1,5%) due volte al giorno, per 6 giorni alla settimana. Al fine di garantire un ambiente ottimale per la

specie in esame, ogni vasca è stata equipaggiata con un sistema di filtrazione meccanica e sistema di aerazione supplementare, con un afflusso di acqua di 12L/min, che garantiva 12 ricambi completi nell'arco delle 24h. I parametri ambientali quali pH, O₂ e T sono stati monitorati quotidianamente mediante sonda multiparametrica (YSI Professional Plus Multi-Parameters Water QualityMeter). All'inizio della sperimentazione è stato stilato un programma di attività mirato alla valutazione di tutti quegli aspetti legati agli obiettivi del progetto:

- Monitoraggio quotidiano degli esemplari al fine di valutare eventuali anomalie comportamentali;
- Controllo giornaliero dei parametri chimico-fisici dell'acqua nonché pulizia e disinfezione delle attrezzature;
- Pesate quindicinali in *bulk* di ciascuna replica per valutare l'incremento di peso e ricalcolare la razione alimentare da somministrare;
- Prova di digeribilità parallela alla sperimentazione, della durata di un mese circa, in cui il mangime veniva addizionato con marcatore inerte (celite all'1% in peso);
- Pesata individuale al termine della sperimentazione per la valutazione degli indici di *performances*;
- Sacrificio previa eutanasia, al termine della sperimentazione, di 15 esemplari per ciascun trattamento alimentare (n=60), al fine di valutare:
 - 1) Indici morfometrici (HSI, VSI e CF) e biometrici (K);
 - 2) Attività enzimatica intestinale (Proteasi alcaline, Lipasi ed Amilasi).

3.1.1 Moduli di allevamento

Per il *feeding trial* sono stati utilizzati 12 moduli di allevamento cilindrici a fondo piatto in vetroresina (1,4 m³) (Figura 15). Il sistema a circuito aperto veniva alimentato con acqua di mare prelevata nella zona antistante l'Istituto, ad una profondità di circa 15 metri, mediante apposite pompe sommerse. L'acqua in entrata nelle vasche, con una portata di 12 L/min, permetteva 12 ricambi completi nell'arco delle 24h.

L'equipaggiamento tecnico delle vasche era composto da un sistema di filtrazione meccanica posizionato in ingresso, in modo da trattenere il particolato di grosse

dimensioni, ed un sistema di aerazione continua tale da mantenere la quantità di O₂ disciolto intorno a 6 mg/L.



Fig.15. Moduli di allevamento utilizzati durante la prova di alimentazione

L'associazione dieta/vasca è stata effettuata in modo da minimizzare la variabile ambientale, di conseguenza repliche dello stesso trattamento alimentare sono state posizionate ad una certa distanza tra loro, in modo da ottenerne una distribuzione omogenea, come mostrato nello schema in Figura 16.

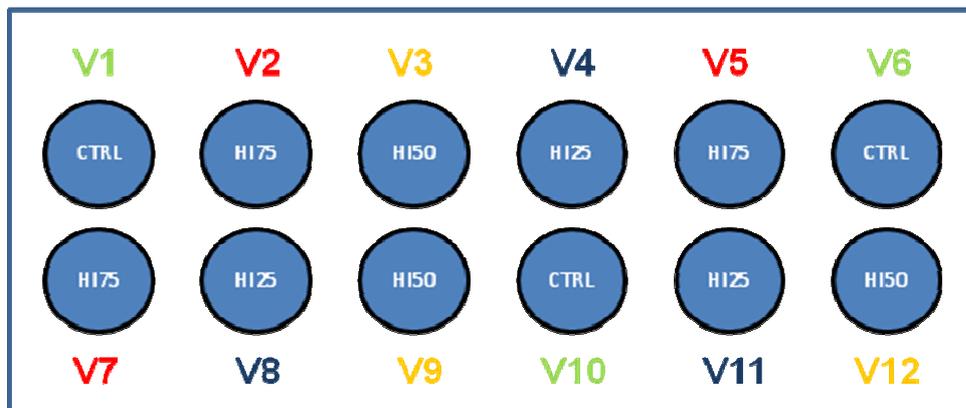


Fig.16. Distribuzione delle repliche sperimentali

3.1.2 PARAMETRI CHIMICO-FISICI

La prova sperimentale è stata condotta in condizioni di fotoperiodo e temperatura naturale, con regolazione manuale dell'illuminazione artificiale. I parametri chimico-fisici quali T°, pH e O₂ disciolto sono stati rilevati e registrati quotidianamente mediante sonda multiparametrica (YSI Professional Plus). L'andamento è rappresentato in grafico (3-4-5):

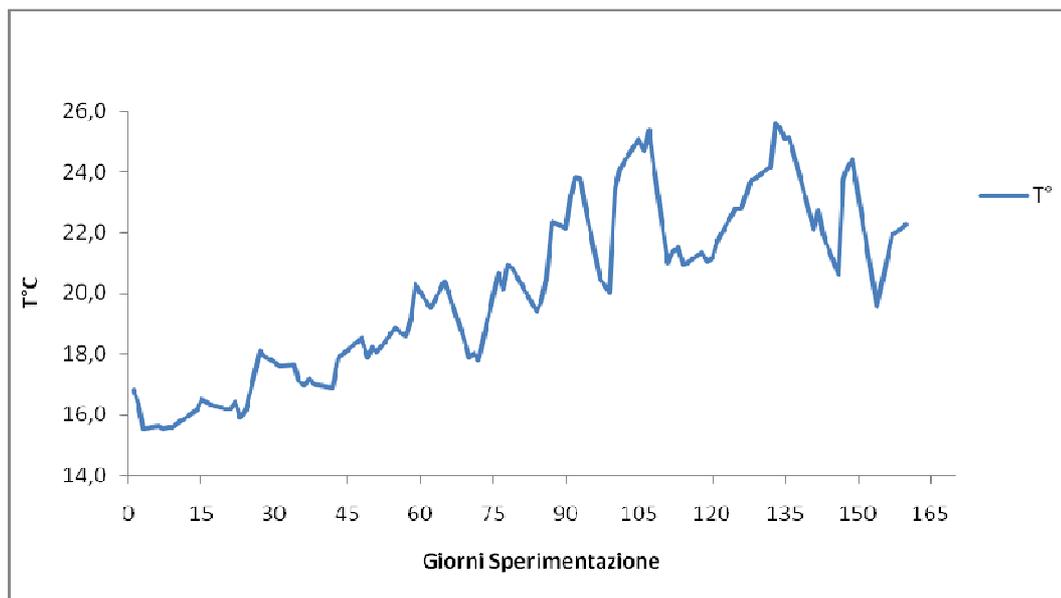


Grafico.3. Andamento della temperatura durante la sperimentazione

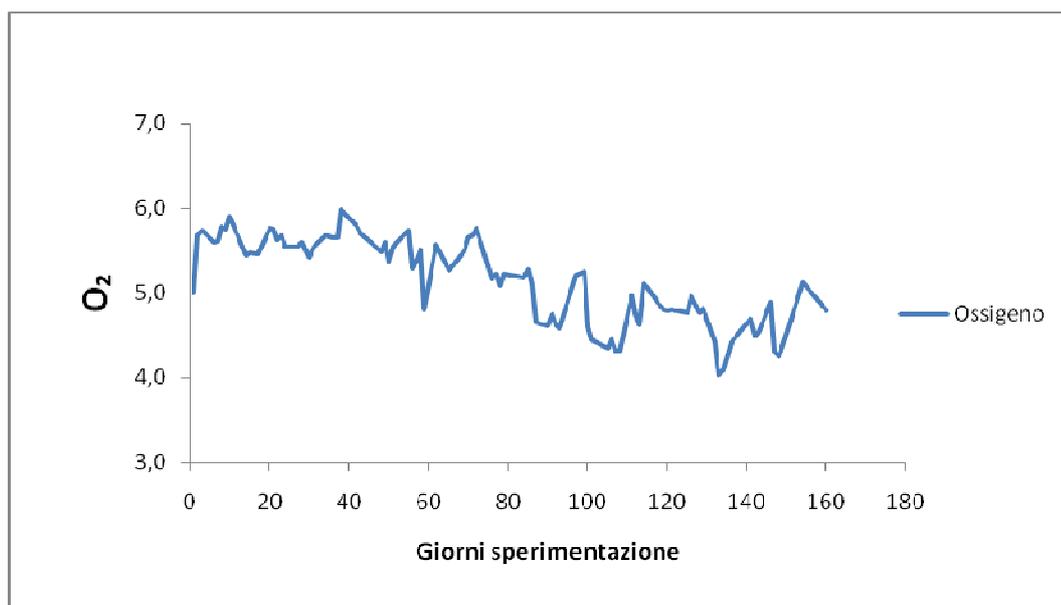


Grafico.4. Concentrazione dell'Ossigeno disciolto in mg/l durante la sperimentazione

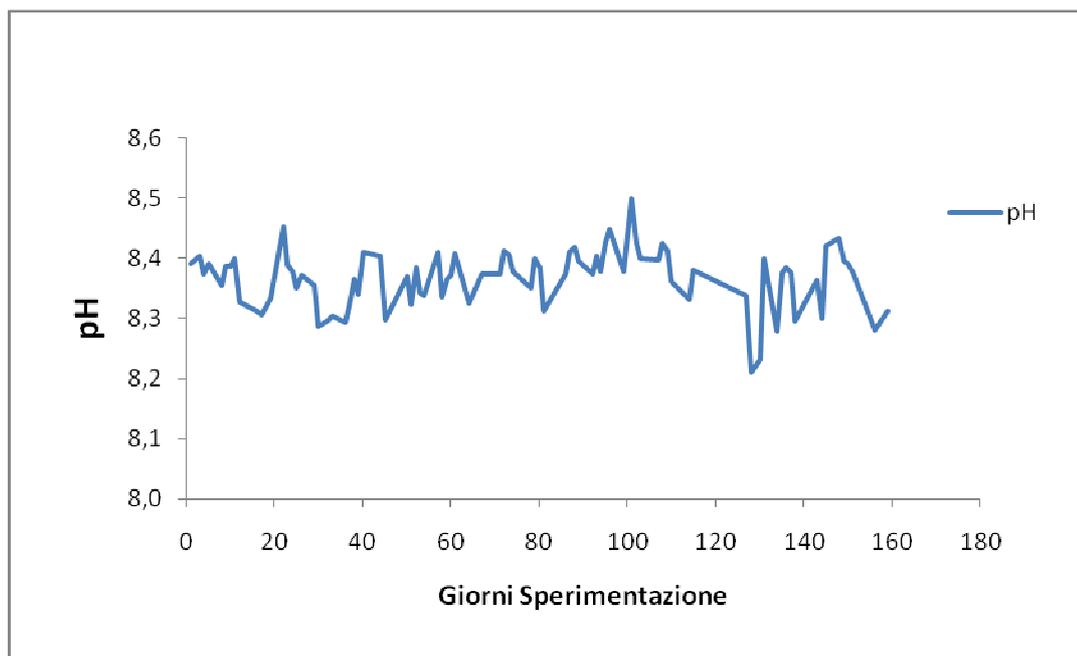


Grafico.5. Andamento del pH durante la sperimentazione

3.1.3 DIETE SPERIMENTALI

La farina di *H. illucens* destinata alla produzione dei mangimi è stata acquistata presso l'azienda tedesca Hermetia Deutschland GmbH & Co. KG (Baruth/Mark, Germany). Le analisi chimico-nutrizionali relative alla frazione proteica di tutte le materie prime utilizzate, sono state effettuate presso i laboratori del Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari dell'Università degli Studi di Torino. Le analisi centesimali relative alla sostanza secca, proteina grezza e ceneri sono state effettuate secondo la metodica AOAC (2000), invece la frazione lipidica, espressa in estratto etereo, è stata determinata secondo la metodica AOAC (2003). Il disegno sperimentale ha previsto la formulazione di 4 diete isoproteiche, isolipidiche ed isoenergetiche (Tabella 16), rispettando il fabbisogno nutrizionale della specie oggetto della prova, sulla scorta delle conoscenze pregresse e dei dati presenti in letteratura scientifica. Nello specifico la prova di accrescimento è stata impostata sul confronto di tre diete a sostituzione crescente di farina di pesce con farina di HI parzialmente degrassata, a cui corrispondevano livelli crescenti di inclusione della stessa, con una dieta di controllo, simile per composizione ad una dieta commerciale.

- **CTRL:** dieta contenente il 30% di farina di pesce;

- **HI25:** dieta contenente il 9,2% di farina di HI, in sostituzione del 25% di farina di pesce;
- **HI50:** dieta contenente il 18,4% di farina di HI, in sostituzione del 50% di farina di pesce;
- **HI75:** dieta contenente il 27,6% di farina di HI, in sostituzione del 75% di farina di pesce;

	CTRL	HI25	HI50	HI75
Materie prime (g kg⁻¹)				
Farina di pesce	300	225	150	75
<i>Hermetia illucens</i>	0	92	184	276
Concentrato proteico di soia	75	75	75	75
Glutine di mais	180	180	180	180
Farina di soia	150	150	150	150
Farina di grano	80	63	46	29
Olio di pesce	120	120	120	120
Merigel	60	60	60	60
Vitamine	10	10	10	10
Minerali	10	10	10	10
Metionina	7	7	7	7
Lisina	8	8	8	8

Tab.16. Composizione delle diete sperimentali

3.1.4 PRODUZIONE DEL MANGIME

La formulazione e realizzazione dei mangimi è stata effettuata presso l'Istituto di Scienze e Produzioni Alimentari (ISPA) del CNR di Torino, e prodotte nel Centro di Zootecnia Sperimentale della Facoltà di Agraria di Carmagnola (TO). La preparazione ha previsto le operazioni di pesatura delle singole materie prime ed il successivo inserimento delle stesse all'interno di un miscelatore (Brevetti S.A.G.A, Milano, Italia). Successivamente sono stati addizionati olio ed una certa quantità d'acqua al fine di agevolare la formazione del pellet (ϕ 3-4mm), ottenuto mediante l'ausilio di un tritacarne elettrico. Infine, il pellet prodotto è stato

essiccato in stufa ventilata ad una temperatura di 50°C per 48h e successivamente stoccato in cella frigorifera a 4°C (Figura 17).

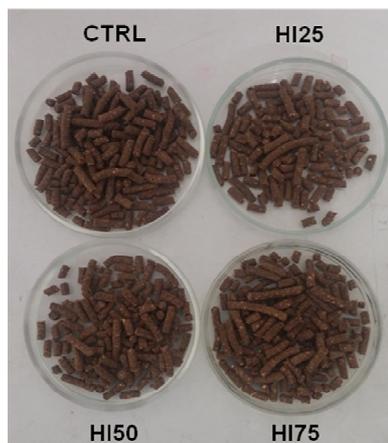


Fig.17. Diete sperimentali

Tutte le diete sono state sottoposte ad analisi centesimali effettuate in doppio per valutarne la composizione secondo le metodiche descritte in precedenza. È stato inoltre determinato il contenuto in energia grezza mediante bomba calorimetrica (IKA C7000, Staufen, Germany) (Tabella 17). Inoltre è stato determinato analiticamente il profilo aminoacidico delle 4 diete sperimentali secondo il metodo descritto da Cavallarin *et al.*, (2005). Tale metodica prevede l'idrolisi acida utilizzando lo strumento Beckman System Gold HPLC system (Beckman Instruments, Paolo Alto, CA, USA). Campioni del peso di circa 60 mg, posti in provette tappate, sono stati idrolizzati in 6 ml di HCL 6M. Nelle provette è stato fatto fluire dell'azoto in modo tale da ridurre al minimo l'ossidazione degli aminoacidi e, quindi, riscaldate a 110°C per 24h. Gli idrolizzati sono stati poi essiccati tramite un evaporatore rotante sotto vuoto a 40°C e quindi solubilizzati in un tampone di sodio citrato a pH 2.2.

Gli idrolizzati proteici sono stati poi analizzati in accordo con le raccomandazioni della casa produttrice (Beckman Instruments, Paolo Alto, CA, USA), sulla base del metodo sviluppato da Spackman *et al.*, (1958). Gli aminoacidi sono stati separati tramite cromatografia a scambio ionico su di una colonna di 20 cm (Sherogel IEX High Performance) della stessa casa costruttrice, e quindi, rilevati successivamente ad un post-colonna di derivatizzazione con ninidrina in seguito a misurazione dell'assorbanza a 570 nm (440 nm per la prolina). L'identificazione e la quantificazione degli aminoacidi rilevati è stata effettuata nei confronti di

standards esterni dopo aggiustamenti attraverso rette di regressione. Gli aminoacidi *standard* sono stati forniti dalla Beckman Instruments sotto forma di miscela di 17 aminoacidi sintetici (Tabella 18).

	CTRL	HI25	HI50	HI75
Composizione chimica				
Sostanza secca	100	100	100	100
Proteina Grezza	47,4	47,2	47,1	46,9
Estratto Etereo	17	17,1	17,1	17,2
Ceneri	8,7	8,1	7,5	6,9
Estrattivi Inazotati¹	24,6	25,4	26,2	27,1
Energia Lorda² (MJ/kg)	22,13	22,26	22,38	22,52

Tab.17. Composizione centesimale diete

¹Estrattivi inazotati calcolati come differenza: 100 – (Proteina Grezza + Estratto Etereo + Ceneri)

²Energia Lorda determinata mediante bomba calorimetrica (IKA C7000, Staufen, Germany)

	CTRL	HI25	HI50	HI75
Aminoacidi (g/Kg)				
Arginina	24,6	23,9	23,1	22,4
Cisteina	5,4	5,3	5,1	5,0
Fenilalanina	22,5	23,3	24,1	24,9
Isoleucina	18,4	18,1	17,7	17,4
Istidina	9,1	9,4	9,7	10,0
Leucina	42,9	42,4	42,0	41,5
Lisina	23,7	22,5	21,4	20,3
Metionina	14,9	14,1	13,2	12,4
Tirosina	16,7	17,6	18,4	19,3
Treonina	16,1	15,9	15,8	15,6
Triptofano	5,4	5,2	5,0	4,7
Valina	19,8	20,0	20,3	20,6

Tab.18. Composizione aminoacidica delle diete sperimentali

3.1.5 GESTIONE ZOOTECNICA

Gli esemplari adulti di *Sparus aurata* destinati alla prova sperimentale sono stati acquistati presso l'Azienda Agricola Ittica Caldoli S.r.l. (FG) nel Marzo 2017. Il trasporto presso L'IAMC CNR di Messina è avvenuto all'interno di vasche apposite in polietilene isotermitiche (Scubla Aquaculture). Al fine di rispettare il benessere animale, tutte le operazioni sono state condotte nel rispetto del documento: Question N° EFSA –Q-2003-094 “*Opinion of the Scientific panel on Animal Health and Welfare on a request from the Commission related to the welfare of animal during the transport*”.

Il sistema, supplementato con ossigeno puro, ha permesso di mantenerne il livello in vasca in un range compreso tra 6-7 mg/L, ottimale per la specie. Al fine di monitorare le condizioni generali di salute e rilevare eventuali alterazioni dei parametri chimico-fisici dell'acqua, è stato predisposto un programma di monitoraggio a cadenza oraria per tutta la durata del trasporto.

Gli esemplari, una volta giunti a destinazione, sono stati sottoposti ad un periodo di acclimatazione della durata di un mese circa, all'interno di una vasca circolare da 4,5m³ ed alimentati con mangime commerciale di tipo estruso (NaturAlleva) somministrato *ad libitum*. Periodiche osservazioni venivano effettuate al fine di verificare l'eventuale presenza di sofferenza, patologie e/o anomalie comportamentali.

Nell'Aprile 2017, al fine di costituire il parco sperimentale, gli esemplari sono stati anestetizzati mediante bagno in soluzione di tricaina metansolfonato (MS222 [0,1 g/L]), misurati e pesati singolarmente. I soggetti con peso medio pari a 181,6 ± 13,5 g sono stati distribuiti *at random* all'interno delle 12 vasche, per un totale di 30 esemplari per vasca (360 complessivi), più altri 12 esemplari di pari taglia che rappresentavano il tempo 0. Questi ultimi sono stati sacrificati prima dell'inizio della sperimentazione, per le valutazioni isto-patologiche di intestino e fegato, in modo da avere un quadro rappresentativo dello stato di salute degli esemplari e processati secondo le metodiche descritte in seguito.

Il disegno sperimentale ha previsto 4 trattamenti alimentari, con 3 repliche per gruppo.

La prova sperimentale ha avuto una durata complessiva di 120 giorni ed è stata preceduta da un periodo di adattamento alla nuova dieta di 7 giorni. Il protocollo alimentare ha previsto la somministrazione manuale del mangime a razione, due volte al giorno, per 6 giorni alla settimana. L'incremento graduale della razione dallo 0,8% iniziale, fino all'1,5% finale, nell'arco di un mese, è stato supportato da dati tabulari di riferimento forniti dalle principali aziende mangimistiche del settore, le quali correlano la razione alimentare sia alla taglia degli esemplari allevati, sia alla temperatura ambientale, all'interno di un sistema non termostato.

Al fine di valutare periodicamente l'incremento di peso ed adeguare quantitativamente la razione alimentare, gli esemplari sono stati sottoposti a pesate in bulk quindicinali.

Durante la prova, gli esemplari sono stati quotidianamente monitorati al fine di valutare eventuali anomalie comportamentali, che avrebbero potuto condizionare la sperimentazione. Il controllo giornaliero dei parametri chimico-fisici dell'acqua, le operazioni di pulizia e disinfezione delle attrezzature hanno permesso di minimizzare il rischio di patologie.

Il termine della sperimentazione è stato fissato al raggiungimento di una taglia media per replica di 350 grammi, corrispondente alla taglia commerciale comunemente utilizzata in ambito industriale.

Al termine della prova gli esemplari sono stati pesati e misurati singolarmente previa anestesia in MS222 [0,1g/L], dopo un digiuno di 24h. I dati ottenuti hanno permesso di valutare la biomassa finale presente nelle vasche sperimentali e la successiva analisi dei principali indici di performance zootecnica. La stabulazione, durante tutto il periodo sperimentale, è stata effettuata nel rispetto delle esigenze fisiologiche ed etologiche specie-specifiche, avendo come riferimento il documento Question N° EFSA –Q-2006-149. *“Animal welfare aspects of husbandry systems for farmed European seabass and gilthead seabream” del Panel di esperti EFSA sulla salute ed il benessere animale.*

Performance di crescita

Al fine di analizzare e comparare la risposta in termini di crescita ed utilizzazione delle differenti diete sperimentali, sono stati utilizzati i seguenti parametri zootecnici:

- **Indice di conversione alimentare: ICA** (indica l'efficienza con cui gli animali convertono l'alimento consumato in biomassa).

$$ICA = \text{g s.s.}/(\text{Peso finale} - \text{Peso iniziale})$$

- **Rapporto di efficienza proteica: PER** (indica l'incremento totale di peso in relazione alla quantità di proteine consumate).

$$PER = (\text{Peso finale} - \text{Peso iniziale})/\text{g Proteina greggia ingerita}$$

- **Tasso di accrescimento specifico: TAS** (indica la stima in termini di accrescimento giornaliero degli esemplari allevati).

$$TAS = [\ln(\text{Peso finale} - \text{Peso iniziale})/\text{giorni sperimentazione}]$$

- **Rapporto di alimentazione: FR** (esprime la quantità di alimento ingerito in un determinato periodo di tempo).

$$FR = (\text{g s.s.} * 100 / \text{giorni di alimentazione}) / (e^{(\ln \text{Peso finale} - \text{Peso iniziale} * 0.5)})$$

- **Tasso di assunzione giornaliera: DIR**

$$DIR = [(\text{g s.s.} / \text{Peso medio finale}) * 100] / \text{giorni di alimentazione}$$

Indici Morfometrici e Biometrici

Gli esemplari sono stati, precedentemente sedati e poi sacrificati mediante overdose di anestetico (MS222 [0,3 g/L]), e sono stati processati per le successive analisi, che comprendevano il prelievo del pacchetto viscerale comprensivo di fegato.

Gli indici morfometrici presi in considerazione sono stati:

- **Indice Epatosomatico HSI** (esprime il rapporto tra il peso del fegato rispetto al peso corporeo e permette di avere indicazioni sullo stato di salute del pesce (Montero et al., 1999; Paustenbach, 2002), in quanto nella maggior parte dei casi, un valore alto indica forme di degenerazione grassa epatica (steatosi) che nei pesci sono strettamente correlate con uno squilibrio qualitativo e quantitativo dell'alimentazione)

$$HSI = [100 * (\text{peso fegato} / \text{peso corporeo})]$$

- **Indice Viscerosomatico VSI** (esprime il rapporto tra il peso del pacchetto viscerale ed il peso corporeo)

$$VSI = [100 * (\text{peso visceri totali} / \text{peso corporeo})]$$

- **Coefficiente di adiposità CF** (esprime il grado di deposizione lipidica periviscerale rispetto al peso corporeo).

$$CF = [100 * (\text{peso grasso viscerale} / \text{peso corporeo})]$$

- **Fattore di condizione K** (rappresenta una misura della condizione generale di salute del pesce, calcolata in base al rapporto tra peso corporeo e lunghezza corporea).

$$K = [\text{peso finale (g)} / (\text{lunghezza totale})^3 \text{ (cm)}] \times 100$$

Prova di digeribilità

All'interno della prova sperimentale, gli esemplari sono stati sottoposti a prova di digeribilità del mangime mediante inclusione all'interno dello stesso di un marcatore inerte (celite) all'1% in peso, per un periodo di tempo della durata di un mese circa in cui è stata effettuata la raccolta del materiale fecale, finalizzato alla determinazione dei Coefficienti di Utilizzazione Digestiva (CUD) dei nutrienti, attraverso il metodo indiretto delle Ceneri Acido Insolubili (C.A.I.).

Formulazione e preparazione dei mangimi

La formulazione dei mangimi e le procedure utilizzate per la loro produzione sono state le medesime della prova di accrescimento ad eccezione fatta per l'inserimento dell'1% di marcatore inerte (Celite) in sostituzione dell'1% di merigel (Tabella 19). Il pellet è stato successivamente analizzato per determinarne la composizione analitica (AOAC 2000; AOAC 2003) ed il contenuto in energia grezza (bomba calorimetrica).

	CTRL	HI25	HI50	HI75
Materie prime (g kg⁻¹)				
Farina di pesce	300	225	150	75
<i>Hermetia illucens</i>	0	92	184	276
Concentrato proteico di soia	75	75	75	75
Glutine di mais	180	180	180	180
Farina di soia	150	150	150	150
Farina di grano	80	63	46	29
Olio di pesce	120	120	120	120
Merigel	50	50	50	50
Celite	10	10	10	10
Vitamine	10	10	10	10
Minerali	10	10	10	10
Metionina	7	7	7	7
Lisina	8	8	8	8

Tab.19. Composizione diete sperimentali per prova di digeribilità

3.1.6 PRELIEVO ED ANALISI CAMPIONI

Al termine della prova di alimentazione, come da autorizzazione ministeriale, sono stati prelevati e sacrificati complessivamente 60 esemplari di *Sparus aurata*, 5 per ogni replica, al fine di analizzare quegli obiettivi specifici del progetto che prevedevano l'utilizzo di campioni prelevati *post-mortem*. Nello specifico su campioni di intestino è stata determinata l'attività enzimatica totale (Proteasi alcaline, Lipasi ed Amilasi) nei vari trattamenti alimentari.

Tutte le operazioni di prelievo e dissezione degli esemplari sono state condotte dopo digiuno di 48h e previa eutanasia in soluzione di MSS222 a concentrazione di 0,3 g/L.

3.1.7 ANALISI ENZIMATICHE: PROTEASI, LIPASI ED AMILASI

Il campionamento è stato suddiviso in 3 fasi in modo da standardizzare al massimo la procedura, attribuendo ad ogni operatore coinvolto, una specifica mansione.

- Fase 1: Prelievo e sacrificio dell'esemplare;
- Fase 2: Dissezione e prelievo dei campioni;
- Fase 3: Conservazione dei campioni.

La prima fase del campionamento ha previsto il prelievo di 5 esemplari da ciascuna replica *at random*, per un totale di 15 individui per ogni trattamento alimentare (N = 60), procedendo con una sequenza lineare tra i moduli di allevamento (1→12), seguito da anestesia in soluzione di MS222 (0,1 g/l), al fine di valutare in prima istanza il peso dell'individuo, che da disegno sperimentale doveva aver raggiunto una taglia di almeno 350 grammi. Qualora l'esemplare non presentasse un peso idoneo, veniva stoccato in vasca di riabilitazione e si procedeva al prelievo di un secondo. Se il peso corrispondeva a quanto prefissato, si procedeva all'eutanasia in soluzione di MS222 a concentrazione di 0,3 g/L fino a morte avvenuta. A quel punto, sono stati rilevate e registrate le biometrie (Lunghezza totale – Lunghezza standard – Lunghezza alla furca) tramite ittiometro (Figura 18-19).



Fig.18. Operazioni di anestesia e pesatura degli esemplari



Fig.19. Registrazione delle biometrie

La seconda fase ha previsto la dissezione degli esemplari mediante l'apertura della cavità addominale a partire dal dotto anale in direzione caudo-craniale, con estrazione del pacchetto viscerale e prelievo dell'intestino per le analisi enzimatiche (Figura 20).



Fig.20. Apertura della cavità addominale

In prima istanza, sono stati registrati il peso del pacchetto viscerale e del fegato, necessari per il calcolo degli indici morfometrici corrispondenti (HSI-VSI). A questo punto, dopo aver rimosso e pesato il grasso periviscerale, allo scopo di

calcolare il fattore di adiposità (CF) ed aver disteso integralmente l'intestino, si è proceduto alla misura dello stesso in direzione antero – posteriore (Figura 21).



Fig.21. Misurazione della lunghezza dell'intestino

La terza ed ultima fase ha previsto la conservazione dell'intestino di ciascun esemplare sacrificato a -80°C , al fine di determinare i livelli di attività enzimatica (proteasi alcaline, lipasi ed amilasi) e lo stoccaggio degli esemplari eviscerati, posti sottovuoto a -20°C , per indagini successive.

Protocollo di estrazione degli enzimi

Porzioni di intestino ancora congelate (2,5 grammi) sono state aggiunte al tampone (100 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA e 0,1% Triton X-100 (v/v), pH 7.8) nel rapporto 1:10 (peso/volume) e omogeneizzate (in ghiaccio) mediante polytron (Kinematica, Switzerland).

Successivamente l'omogenato è stato centrifugato (Allegra™ 21R, Beckman Coulter, USA) a 15000 rpm per 15 min at 4°C . I surnatanti sono stati separati dal pellet aliquotati in eppendorf ed immediatamente conservati a -20°C per le successive analisi.



Fig.22. Omogenizzatore polytron (Kinematica, Switzerland)

Proteasi totali

L'attività delle proteasi alcaline totali viene determinata sulla base del saggio d'idrolisi della caseina descritta da Walter (1984) e adattata da Hidalgo e coll. (1999). Il protocollo sperimentale ha previsto in primo luogo la preparazione delle soluzioni standard da utilizzare nelle varie fasi dell'analisi (Tabella 20).

- Tampone tris HCl 0,1M (pH 9);
- Soluzione di acido tricloroacetico (TCA) all'8% (p/v) in acqua distillata;
- Substrato alcalino: Soluzione di Caseina all'1% in acqua distillata (pH 7)
- Soluzioni standard di Tirosina 0,096% (w/v) in HCl (0.05M)

La determinazione consiste nella comparazione in termini di Assorbanza a 280 nm di tre differenti miscele poste all'interno di eppendorf:

	Bianco	Standard	Test
Caseina bovina	250 μ L	-	250 μ L
buffer	250 μ L	-	250 μ L
Campione	-	-	100 μ L
Soluzione di tirosina	-	900 μ L	-

Tab.20. Soluzioni analitiche

Il passaggio successivo ha previsto l'incubazione, in bagno termostato, delle eppendorf a 37°C per 1h. Al termine dell'incubazione è stato aggiunto l'estratto enzimatico (100 μ L) alla serie di campioni bianchi, prima di inibire l'attività enzimatica mediante aggiunta del TCA (600 μ L), capace di far precipitare le proteine non digerite (Tabella 21).

	Bianco	Standard	Test
Caseina bovina	250 µL	-	250 µL
buffer	250 µL	-	250 µL
Campione	100 µL	-	100 µL
Soluzione di tirosina	-	900 µL	-
TCA 8%	600 µL	300 µL	600 µL
Totale	1.2 ml	1.2 ml	1.2 ml

Tab.21. Composizione finale delle soluzioni analitiche

La miscela è stata quindi lasciata raffreddare in ghiaccio per 1h, prima di esser centrifugata (Allegra™ 21R, Beckman Coulter, USA) a 3500 rpm per 10 minuti. L'assorbanza dei campioni è stata registrata in cuvette di quarzo alla lunghezza d'onda di 280 nm tramite spettrofotometro (Unicam UV-Vis, UK).

Parallelamente si è proceduto alla realizzazione di una curva di calibrazione, leggendo allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 280 nm, diluizioni decimali crescenti di DL-Tirosina (Sigma-Aldrich 14572-6), che costituisce l'aminoacido di riferimento per le proteasi.

Dalle letture effettuate si è proceduti alla determinazione dell'attività enzimatica specifica secondo il seguente calcolo:

$$\text{Unità/mg} = \Delta\text{DO } \lambda 280 \text{ nm} / \text{m}/60/0,1/\text{mg proteina}$$

Dove:

$\Delta\text{DO } \lambda 280\text{nm} = (\text{DO campione} - \text{DO bianco})$

m = pendenza della curva di calibrazione

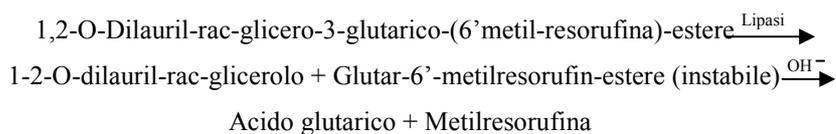
60= minuti di incubazione

0,1= mL di estratto enzimatico

L'unità di attività specifica definisce la quantità di enzima necessario a produrre 1 µg di tirosina per minuto per mg di proteina solubile di estratto enzimatico (U mg/proteina). Il contenuto di proteina solubile dell'estratto enzimatico è stato misurato in accordo con Bradford (1976) utilizzando un kit contenente Siero Albumina Bovina (BSA) come standard, alla concentrazione di 1,4 mg/mL (Bio-Rad TM ,Germany).

Lipasi

L'attività della lipasi è stata valutata mediante kit commerciale (Lipase – LQ, Enzymatic. Kinetic-Colorimetric, Spinreact), che si basa sulla reazione della lipasi pancreatica, la quale in presenza di colipasi, desossicolato e ioni di Ca^{++} , idrolizza il substrato acido 1,2-O-Dilauril-rac-glicerolo-3-glutarico-(6'-metil-resorufina)-estere. Il principio del test si basa sulla seguente reazione chimica:



La velocità di formazione della Metilresorufina misurata fotometricamente è proporzionale alla concentrazione catalitica della lipasi presente nel campione. I reagenti utilizzati per questa analisi sono riportati in Tabella 22.

Reagenti	Composizione	Concentrazione
R1	Tris pH 8.3	40 mmol/L
	Colipasi	> 0 = 1 mg/L
	Desossicolato	1.8 mmol/L
	Taurodesossicolato	7.2 mmol/L
R2	Tartrato pH 4.0	15 mmol/L
	Lipasi	> 0.7 mmol/L
	Cloruro di Ca	0.1 mmol/L
Cal. Lipasi	Std. Siero umano liofilizzato	-

Tab.22. Reagenti kit lipasi

La metodica utilizzata viene così schematizzata:

1. Settaggio dello spettrofotometro a 580 nm e a 37°C;
2. Azzeramento dello strumento con acqua distillata in cuvette con cammino ottico di 1 cm;
3. Preparazione delle soluzioni da analizzare;

	Bianco	Standard	Campione
R1 (ml)	1.0	1.0	1.0
R2 (µl)	200	200	200
H ₂ O dist. (µl)	10	-	-
Standard (µl)	-	10	-
Campione (µl)	-	-	10

Tab.23. Soluzioni analitiche

4. Omogeneizzazione del campione ed incubazione a 37°C per 1 minuto;
5. Lettura assorbanza iniziale del campione; lettura ad intervalli di 1 minuto per 2 minuti;
6. Calcolo della differenza tra le assorbanze e le differenze per intervallo tra assorbanze medie ($\Delta A/\text{min}$)

Dalle letture effettuate si è proceduti alla determinazione dell'attività enzimatica specifica secondo le seguenti formule

$$\begin{aligned}
 (\Delta A/\text{min}) \text{ Campione} - (\Delta A/\text{min}) \text{ Bianco} &= (\Delta A/\text{min}) \text{ netto Campione} \\
 (\Delta A/\text{min}) \text{ Standard} - (\Delta A/\text{min}) \text{ Bianco} &= (\Delta A/\text{min}) \text{ netto Standard}
 \end{aligned}$$

$$\left[\frac{(\Delta A/\text{min}) \text{ netto Campione}}{(\Delta A/\text{min}) \text{ netto Standard}} \right] \times \text{Attività Calibr.} = \text{U/L Lipasi nel Campione}$$

Una unità internazionale (IU) è la quantità di enzima che trasforma 1 µmol di substrato per minuto, in condizioni standards. La concentrazione è espressa in unità per litro di campione (U/L).

Amilasi

L'attività dell'amilasi è stata valutata mediante kit commerciale (Amylase – LQ, CNPG₃ - Kinetic, Spinreact), che si basa sulla reazione dell'amilasi con il CNPG₃ (2-cloro-4-nitrofenil- α -maltotrioside) che per idrolisi viene trasformato in polimeri del glucosio e p-nitrofenil-oligosaccaridi a catena corta, con formazione di 2-cloro-4-nitrofenolo. La velocità di formazione di 2-cloro-4-nitrofenolo, misurata fotometricamente, è proporzionale alla concentrazione catalitica di amilasi presente nel campione. La reazione chimica è così riportata:



Il reagente utilizzato per questa analisi è riportato in Tabella 24

Reagenti	Composizione	Concentrazione
R	Tampone MES pH 6.0	100 mmol/L
	CNPG ₃	2.25 mmol/L
	NaCl	350 mmol/L
	Acetato di Ca	6 mmol/L
	Tiocianato di K	900 mmol/L
	Azoturo di sodio	0.95 g/L

Tab.24. Reagenti kit amilasi

La metodica utilizzata viene così schematizzata:

3. Settaggio dello spettrofotometro a 405 nm e a 37°C;
3. Azzeramento dello strumento con acqua distillata in cuvette con cammino ottico di 1 cm;
3. Preparazione delle soluzioni da analizzare;
3. Omogeneizzazione del campione ed incubazione per 30 secondi;
3. Lettura assorbanza iniziale del campione; lettura ad intervalli di 1 minuto per 3 minuti;
3. Calcolo della differenza tra le assorbanze e le differenze per intervallo tra assorbanze medie ($\Delta A/\text{min}$)

Dalle letture effettuate si è proceduti alla determinazione dell'attività enzimatica specifica secondo la formula:

$$\Delta A/\text{min} \times 3954 = \text{U/L AMS}$$

Una unità internazionale (IU) è la quantità di enzima che trasforma 1 μmol di substrato per minuto, in condizioni standards. La concentrazione è espressa in unità per litro di campione (U/L).

3.2 ANALISI DELLA DIGERIBILITÀ

Il materiale fecale è stato raccolto quotidianamente dal fondo delle vasche di allevamento, attraverso l'ausilio di un sifone. Il protocollo ha previsto la pulizia giornaliera della vasca al termine della somministrazione della razione e raccolta delle feci il mattino successivo. Pertanto, dopo aver rilevato i parametri chimico fisici dell'acqua, il materiale fecale veniva raccolto e concentrato in volumi decrescenti fino a 50 ml circa, prima di essere sottoposto a centrifugazione (7500 rpm per 10 minuti), in modo da eliminare l'acqua in eccesso. Al termine, il materiale fecale raccolto da ogni replica è stato stoccato separatamente a -20 °C, fino al raggiungimento di un peso complessivo di 100g di sostanza umida.



Fig.23. Materiale fecale raccolto e stoccato a -20°C

Il calcolo dei differenti Coefficienti di utilizzazione digestiva (CUD) per ciascun nutriente è stato effettuato secondo la formula di Maynard & Loosly (1969):

$$100 - \left[\frac{\% \text{ indicatore alimento}}{\% \text{ indicatore feci}} * \frac{\% \text{ nutriente feci}}{\% \text{ nutriente alimento}} * 100 \right]$$

Parametri chimici

Le analisi centesimali sono state eseguite su campioni di feci e mangime, secondo i metodi ufficiali dell'AOAC (1995), in modo da poter calcolare la digeribilità dei singoli nutrienti ed il confronto tra i vari trattamenti alimentari.

Sostanza secca

I campioni sono stati pesati e posti in capsule ceramiche all'interno di un liofilizzatore (X2MS2000, 5 Pascal, Milano) per 48h di tempo. Al termine del processo, le capsule sono state poste in essiccatore e quindi pesate. Il valore di sostanza secca espresso come percentuale (%) è stato calcolato mediante la formula:

$$\text{s.s. \%} = (P_i - P_f/N) * 100$$

Dove:

P_i = Peso iniziale + tara (lordo)

P_f = Peso del campione liofilizzato + tara (lordo liofilizzato)

N = Peso iniziale del campione (netto)



Fig.24. Liofilizzatore utilizzato per il trattamento dei campioni

Ceneri acido insolubili

La determinazione delle Ceneri Acido Insolubili (C.A.I.), utilizzate nella determinazione della digeribilità delle diete, prevedeva la combustione del campione, pesati in crogioli con setto poroso, in muffola a 450°C per 8h e successivamente il trattamento con HCL 2N portato ad ebollizione su piastra riscaldante per 15 minuti. Lo step successivo consisteva nella filtrazione dell'acido non evaporato mediante l'ausilio di una pompa sottovuoto e conseguente risciacquo con acqua distillata bollente. I crogioli contenenti le ceneri

acido-trattate venivano nuovamente incenerite in muffola a 450°C per 8h e successivamente pesate. Facendo la differenza del peso del campione prima e dopo la seconda combustione e applicando la formula delle ceneri si è ottenuta la percentuale di ceneri acido insolubili.



Fig.25. Trattamento delle ceneri con HCL 2N; Muffola utilizzata per combustione del campione

Proteina grezza

La determinazione del contenuto proteico è stata effettuata mediante metodo Kjeldahl, in cui ogni campione liofilizzato è stato pesato in una quantità compresa tra gli 0,2 e 0,5 g e sottoposto a completa mineralizzazione tramite l'impiego di 20 ml di acido solforico al 96% e 10 ml di perossido di idrogeno in presenza di un catalizzatore, rappresentato da selenio. I campioni a questo punto hanno subito un processo di distillazione in cui l'azoto mineralizzato veniva raccolto in una beuta da 250 ml nella quale sono stati aggiunti precedentemente 30 ml di acido bórico al 4% (peso/volume). Il distillato raccolto nella beuta è stato titolato con una soluzione di acido cloridrico 0,1 N fino al raggiungimento di pH 5.0. La quantità d'acido cloridrico 0,1 N utilizzato è proporzionale alla concentrazione di azoto, quindi, il contenuto proteico è stato espresso mediante la formula:

$$PG\% = \frac{0,875 \cdot \text{ml HCl titolati}}{\text{peso campione (g)}} \cdot 100$$

Dove:

PG % = Percentuale proteina grezza

0.875 = fattore di conversione in percentuale di proteina

Estratto etereo

La determinazione della concentrazione lipidica espressa in estratto etereo è stata effettuata mediante estrazione con solvente (etere dietilico) utilizzando lo strumento Soxtec System HT (Tecator, Sweden). Il campione liofilizzato è stato pesato nell'ordine di 0,6 – 1g ed introdotto in un ditale di cellulosa siglato e tappato con un batuffolo di cotone sgrassato, il quale è stato poi fissato, tramite un anello adattatore, all'unità d'estrazione. Al di sotto dell'unità di estrazione sono stati posti dei becher metallici, precedentemente pesati, contenenti 50 mL di etere dietilico in cui veniva raccolto l'estratto. L'analisi ha avuto una durata di 90 minuti, al termine dei quali i becher metallici sono stati posti in stufa alla temperatura di 100 C° per eliminare l'acqua presente e successivamente posti in essiccatore per essere poi pesati. Il contenuto in estratto etereo espresso in percentuale è stato calcolato per differenza tra i pesi lordi e le tare mediante la formula:

$$EE\% = \frac{\text{peso lordo becher} - \text{tara becher}}{\text{peso del campione}} \cdot 100$$

Dove:

EE% = estratto etereo

Energia grezza

La determinazione dell'energia grezza dei campioni è stata effettuata tramite l'utilizzo di una bomba calorimetrica adiabatica (IKA7000, Germany) calibrata con acido benzoico (1 g di acido possiede un valore energetico pari a circa 26,462 Mj/kg). Il campione (0,5 – 1 g) è stato posto in crogioli metallici a loro volta collocati all'interno del cilindro della bomba calorimetrica dove avviene una combustione completa in atmosfera saturata di O₂. Il calore prodotto durante la combustione è stato rilevato dall'apparecchiatura e confrontato con quello di calibrazione. La differenza fra le due, rapportata al peso del campione, ha fornito, tramite visualizzazione sul display, il valore di energia grezza del campione (valore espresso come Mj/kg).



Fig.26. Cilindro utilizzato per la combustione in atmosfera satura di O₂ ; bomba calorimetrica adiabatica (IKA7000, Germany)

ANALISI STATISTICA

Tutti i dati concernenti le varie determinazioni analitiche sono stati sottoposti ad elaborazione statistica mediante analisi della varianza (ANOVA) ad una via, in cui la variabile dipendente era costituita dalla dieta, utilizzando il pacchetto software GLM-SPSS (1999) secondo il modello:

$$Y_{ij} = \mu + D_i + \varepsilon_{ij}$$

dove:

Y_{ij} : rappresenta le osservazioni;

μ : rappresenta la media generale;

D_i : rappresenta l'effetto della dieta (CTRL, HI25, HI50, HI75) ;

ε_{ij} : la variabilità dell'errore, con calcolo dell'interazione di massimo grado.

I confronti multipli, e cioè le differenze tra le medie, sono stati effettuati con il test di Duncan che si situa in una posizione intermedia tra i vari test di differenze tra le medie con un livello di significatività del 5% ($P \leq 0.05$) al fine di valutare l'effetto della dieta su ciascun parametro preso in considerazione.

Capitolo IV

4. RISULTATI

4.1 PERFORMANCES DI CRESCITA

I risultati riguardanti gli indici zootecnici, gli incrementi ponderali e la sopravvivenza percentuale degli esemplari alimentati con le diete sperimentali sono mostrati nelle Tabelle 29 e 30.

L'incremento di peso ed i principali indici di *performances* sono stati calcolati per un periodo di ingrasso della durata complessiva di 120 giorni, periodo durante il quale le diete sperimentali contenenti la farina di *Hermetia illucens* parzialmente degrassata, sono risultate appetibili e ben tollerate da tutti gli esemplari al pari della dieta di controllo. Inoltre, durante la somministrazione delle diete, i vari gruppi sperimentali hanno mostrato tassi di crescita sovrapponibili.

Le orate, che ad inizio prova presentavano un peso medio di $181,6 \pm 13,5$ g, hanno raggiunto al termine della stessa un peso medio di $416,30 \pm 10,85$ g, con un incremento medio di peso compreso tra 223 e 245 g. L'analisi effettuata fra i gruppi sperimentali, non ha evidenziato differenze statisticamente significative tra i gruppi. Nello specifico HI25 e HI50 ($238,9 \pm 3,82$ e $231,1 \pm 16,67$ g, rispettivamente) sono apparsi lievemente inferiori rispetto alla dieta controllo ($245,7 \pm 3,13$ g), mentre la dieta a più alto livello di inclusione di farina di *Hermetia illucens* (HI75), ha mostrato il minor incremento in termini di peso, raggiungendo solamente i $223 \pm 22,15$ g, (Grafico 6, Tabella 25).

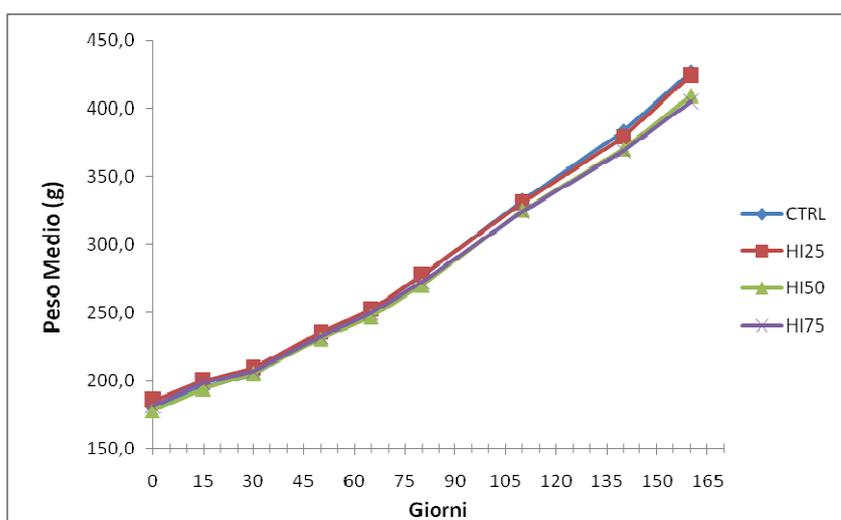


Grafico.6. Incrementi ponderali di orata durante la prova di ingrasso

Il Tasso di Accrescimento Specifico (TAS), ha mostrato valori simili nelle diete HI25 e HI50 (0,69), seppur leggermente inferiore alla dieta controllo (0,71), ma significativamente ($P < 0,005$) superiori rispetto alla dieta HI75 (0,64) (Tabella 25). L'Indice di Conversione Alimentare (ICA), il Rapporto di Efficienza Proteica (PER) mostrano un trend simile, con un progressivo e significativo peggioramento di tali indici all'aumentare del livello di inclusione di farina di *Hermetia illucens*. L'analisi statistica non ha mostrato differenze significative ($P > 0.05$) per ciò che concerne il rapporto alimentare (FR) e il tasso di assunzione giornaliera (DIR).

	CTRL	HI25	HI50	HI75	SEM	P value
Incremento (g)	245.7	238.9	231.1	223	4.288	0.294
TAS	0.71a	0.69a	0.69a	0.64b	0.008	0.003
ICA	1.59b	1.64b	1.65b	1.74a	0.018	0.007
PER	1.46a	1.41a	1.41a	1.34b	0.014	0.007
FR (% gg⁻¹)	1.16	1.16	1.17	1.15	0.005	0.635
DIR (%)	22.64	23.03	23.07	22.87	0.090	0.350

Tab.25. Performances di crescita di orate allevate con le differenti diete sperimentali (media \pm s.e; n=3). Diverse lettere in apice in ciascuna riga indicano differenze significative tra i trattamenti alimentari (test Duncan, $P \leq 0.05$).

TAS: Tasso di accrescimento specifico= $(\ln(\text{Peso finale}) - \ln(\text{Peso iniziale}))/\text{giorni esperienza} * 100$;

ICA: Indice di conversione= $\text{Alimento secco}/\text{incremento umido}$;

PER: Efficienza proteica= $\text{Incremento umido}/\text{proteine assunte (peso secco)}$;

FR: Rapporto di alimentazione= $[(\text{mangime ingerito}(\text{g.SS})/\text{giorni di alimentazione}/0.5 \exp(\ln \text{Peso finale} - \ln \text{Peso iniziale})) * 100$;

DIR: $[(\text{g SS}/ \text{Peso medio finale}) * 100]/\text{giorni di alimentazione}$

Al termine della prova è stata calcolata la sopravvivenza percentuale degli esemplari appartenenti ad ogni gruppo sperimentale, come mostrato in Tabella 26. I risultati mostrano come vi sia un'omogeneità tra le diete HI25 – HI50 e CTRL, in cui il valore è superiore al 95%, con un picco medio massimo nella dieta con il 25% di sostituzione della farina di pesce (HI25), in cui al tempo stesso è presente una minore variabilità all'interno delle repliche sperimentali. Al contrario, il risultato peggiore, ma che non ha raggiunto la significatività statistica, è osservabile nella dieta HI75, in cui il valore medio è 84,5%, e che non ha mai raggiunto il 90% di sopravvivenza in nessuna delle repliche sperimentali.

	CTRL	HI25	HI50	HI75
Sopravvivenza %	95.24±4.12	97.70±1.99	95.15±5.69	84.50±4.45
Peso iniziale (g)	181.0±5.16	185.6±7.55	178.2±15.11	181.8±14.94
Peso finale (g)	426.62±5.21	424.42±9.0	409.32±30.13	404.81±37.32

Tab.26. Percentuale di sopravvivenza e peso medio (iniziale e finale) di orate allevate con le differenti diete sperimentali (media ± s.d)

4.2 INDICI MORFOMETRICI E BIOMETRICI

Gli indici morfometrici e biometrici degli esemplari di orata alimentati con le diete sperimentali sono stati calcolati al termine della sperimentazione, su un campione di 15 esemplari per ciascun trattamento e sono riportati in Tabella 27. I risultati mostrano che i gruppi sperimentali presentano caratteristiche morfologiche sovrapponibili e l'analisi statistica non ha evidenziato differenze significative tra essi, per nessuno degli indici morfometrici e biometrici considerati.

In dettaglio, come riportato in Tabella 27, tra gli indici morfometrici, l'epatosomatico (HSI) risulta più basso in valore assoluto nella dieta controllo, con un valore di 5,49, rispetto alle diete sperimentali, nelle quali i valori oscillano tra 5,77 (HI25) e 5,97 (HI50). Al contrario, l'analisi dell'indice viscerosomatico (VSI) mostra una tendenza differente, dato che il valore minore (1,30) è stato registrato nella dieta HI50. Seguono la dieta controllo con 1,31, la dieta HI25 con 1,33 ed infine la dieta HI75 con 1,37. L'ultimo indice morfometrico considerato è il coefficiente di adiposità, in cui è chiaramente visibile un trend di crescita positiva partendo dalla dieta controllo (1,35), per arrivare a valori più elevati nelle diete sperimentali che oscillano tra 1,61 (HI25) e 1,88 (HI50). In questo caso, come per l'indice viscerosomatico la dieta a più alto livello di inclusione di *Hermetia illucens* (HI75) mostra un valore intermedio tra le diete sperimentali (1,75).

Infine, l'analisi biometrica (fattore di condizione K) ha mostrato una maggiore omogeneità tra i gruppi sperimentali. In particolare il valore minore è stato registrato nella dieta HI50 (1,58), seguita dalla dieta controllo e HI75, dove il valore registrato è stato 1,61; in questo caso il valore maggiore è presente nella dieta HI25 (1,63).

	CTRL	HI25	HI50	HI75	SEM	P value
VSI	5.49	5.77	5.97	5.85	0.023	0.222
HSI	1.31	1.33	1.30	1.37	0.053	0.774
CF	1.35	1.61	1.88	1.75	0.143	0.066
K	1.61	1.63	1.58	1.61	0.163	0.480

Tab.27. Indici morfometrici di orate allevate con le differenti diete sperimentali (media \pm s.e; n=15)

HSI: Indice Epatosomatico=[Peso del fegato (g)/peso totale del corpo (g)]*100;

VSI: Indice Viscerosomatico= [Peso dei visceri (g) /peso del corpo (g)]*100;

CF Coefficiente di adiposità =[Peso del grasso (g) /peso del corpo (g)]*100;

% Carcassa= [Peso pesce sviscerato/peso corporeo]*100;

K:Fattore di Condizione= Peso finale *100 /lunghezza³ .

4.3 ANALISI ENZIMATICA

L'attività enzimatica intestinale degli esemplari allevati è stata misurata nelle sue componenti principali, come Proteasi Alcaline totali, Amilasi e Lipasi. I valori sono riportati in Tabella 28. Come si può osservare dai risultati, non appaiono differenze statistiche a carico di nessuna delle classi enzimatiche determinate nell'intestino delle orate appartenenti ai gruppi sperimentali. Ciò che però si nota è come nelle proteasi alcaline i valori più bassi registrati corrispondano alle diete HI25 e HI75 (389,30 e 390,89 U/mg proteina, rispettivamente), mentre nella dieta controllo e in HI50 i valori siano più elevati (419,17 e 464,23 U/mg proteina, rispettivamente). L'analisi delle amilasi e lipasi mostra un quadro sovrapponibile per quanto concerne una disposizione dei gruppi sperimentali su una scala di valori crescente. In particolare in entrambe le classi enzimatiche i valori più bassi sono presenti nella dieta controllo (2,95 e 7,95 U/mg proteina, rispettivamente), seguiti dalla dieta HI75 con valori leggermente più elevati (3,12 e 8,32 U/mg proteina). Infine, le diete HI50 (3,53 e 8,56 U/mg proteina) e HI25 (4,18 e 9,30 U/mg proteina) registrano i valori più elevati, anche se non hanno raggiunto la significatività statistica.

	CTRL	HI25	HI50	HI75	SEM	P value
Proteasi alcaline	419.17	389.30	464.23	390.89	21.234	0.575
Amilasi	2.95	4.18	3.53	3.12	0.353	0.623
Lipasi	7.95	9.30	8.56	8.32	0.340	0.563

Tab.28. Attività enzimatiche (media \pm s.e; n=15), espresse in U/mg proteina, determinate in intestino di orate alimentate con le diete sperimentali.

4.4 ANALISI DELLA DIGERIBILITÀ

L'analisi della digeribilità è stata condotta mediante inclusione nel mangime di un marcatore inerte (celite) all'1% in peso, per un periodo di tempo della durata di un mese circa in cui è stata effettuata la raccolta del materiale fecale. I dati relativi ai coefficienti di Utilizzazione Digestiva (CUD) degli esemplari di orata alimentati con le diete contenenti farina di *Hermetia illucens* sono riportati in Tabella 29. I risultati mostrano che i gruppi sperimentali presentano CUD sovrapponibili e l'analisi statistica non ha evidenziato differenze significative ($P \leq 0.05$) tra essi, per nessuno dei nutrienti considerati.

Nel dettaglio, i dati riportati in tabella mostrano come la digeribilità della sostanza secca aumenti progressivamente all'aumentare della percentuale di inclusione della farina di HI, e che il valore minimo è presente nella dieta controllo (59,63%), a fronte del valore massimo presente nella dieta a massima sostituzione di farina di pesce HI75 (68,63%).

CUD						
	CTRL	HI25	HI50	HI75	SEM	P value
SS (%)	59.63	63.31	66.97	68.33	1.555	0.189
PG (%)	86.51	87.43	88.78	86.94	0.410	0.298
EE (%)	93.97	94.57	95.17	95.18	0.220	0.146

Tab.29. Coefficienti di Utilizzazione Digestiva (CUD) (media \pm s.e, n=3) delle orate alimentate con le diete a differente livello di inclusione di farina di *Hermetia illucens*.

SS: sostanza secca;
PG: proteina grezza;
EE: estratto etereo.

Per quanto concerne la digeribilità della proteina grezza i dati mostrano un aumento del valore fino ad un livello di sostituzione della farina di pesce del 50% (CTRL: 86,51%; HI25: 87,43%; HI50: 88,78%), mentre la dieta a massima sostituzione (HI75) mostra un valore leggermente superiore alla dieta controllo (86,94) ma minore rispetto alle diete HI25 e HI50.

Infine i CUD relativi all'estratto etereo, seguono l'andamento mostrato per la sostanza secca, ovvero un aumento progressivo all'aumentare della percentuale di inclusione della farina di HI nelle diete sperimentali. Il valore minimo registrato nella dieta CTRL (93,97%) mentre il valore massimo nella dieta HI75 (95,18%).

Capitolo V

5. DISCUSSIONI

Indici zootecnici

L'attenzione scientifica mostrata sulla sostituzione della farina di pesce con farine di *Hermetia illucens*, in mangimi destinati all'acquacoltura, ha condotto nell'ultima decade alla produzione di una grande varietà di lavori, nei quali vengono indagati differenti aspetti relativi all'effetto che queste materie prime hanno sulle specie allevate.

In questo contesto, il lavoro svolto all'interno del progetto di tesi assume un carattere di novità, dal momento che allo stato attuale, la presente ricerca costituisce l'unica prova sperimentale effettuata su esemplari adulti di *Sparus aurata* utilizzando una farina di larve di *Hermetia illucens* (HI) parzialmente degrassata in sostituzione della farina di pesce.

Le diete sperimentali contenenti la suddetta farina (HI 25-50-75%), utilizzate durante la prova, sono risultate appetibili, ben tollerate da tutti gli esemplari al pari della dieta controllo (CTRL), sostenendo tassi di crescita paragonabili.

I risultati ottenuti al termine della prova mostrano come gli indici zootecnici non siano stati negativamente influenzati dall'inclusione di HI fino ad una percentuale del 18,4%, corrispondente ad una sostituzione del 50% di farina di pesce (HI50).

Questi risultati sono in accordo con quanto riportato da Karapanagiotidis e coll. (2014), in cui l'inclusione di HI fino al 27,6% in giovanili di *Sparus aurata* non ha mostrato differenze significative negli indici di performances.

A causa della carenza di studi disponibili in letteratura sull'utilizzo di farine di insetto come fonte proteica alternativa nell'alimentazione di *Sparus aurata*, il confronto risulta difficile.

I risultati ottenuti sono in contrasto con quanto ottenuto da Kroeckel e coll. (2012), che, in giovanili di rombo (*Psetta maxima*), pesce marino carnivoro, hanno evidenziato come gli indici di crescita abbiano subito un effetto negativo all'aumentare del livello di inclusione di farina di HI, mostrando come i valori più alti del tasso di crescita specifico (TAS) e dell'incremento di peso siano stati ottenuti nella dieta controllo, rispetto alle diete con farina di HI.

In termini di conversione alimentare, Kroeckel e coll. (2012) hanno osservato che i valori più alti sono stati registrati nei gruppi sperimentali alimentati con diete a più alto livello di inclusione di HI (49-64 e 76%), evidenziando un generale effetto negativo di questa fonte proteica alternativa. Inoltre, così come emerso nel nostro studio, l'efficienza di utilizzazione proteica è stata negativamente influenzata nei trattamenti alimentari, diminuendo progressivamente in valore assoluto, all'aumentare del livello di HI presente. Kroeckel e coll. (2012) concludono con l'ipotesi che gli esemplari di rombo potrebbero avere difficoltà nella digestione della chitina naturalmente presente nell'esoscheletro delle larve e che di conseguenza, solo limitate percentuali di *Hermetia illucens* possono sostituire la farina di pesce in diete commerciali per la suddetta specie.

In *Cyprinus carpio* var. Jian, l'inclusione di HI fino al 10,6% non ha mostrato effetti negativi sull'indice di conversione alimentare, TAS ed efficienza di utilizzazione proteica (Li *et al.*, 2017). Al contrario, Zhou e coll. (2018) hanno raggiunto la sostituzione totale (100%) senza effetti sulle performances di crescita. Nello studio di Lock e coll. (2016), la sostituzione di farina di pesce con farina di HI fino al 50% in salmoni adulti (*Salmo salar*) non ha influenzato l'ICA fino al 25% di sostituzione.

Risultati simili sono stati ottenuti da Magalhaes e coll. (2017) su giovanili di *Dicentrarchus labrax*, in cui l'inclusione fino al 19.5% non ha mostrato effetti negativi sugli indici di crescita. Allo stesso modo nel pesce gatto americano (*Pelteobagrus fulvidraco*), il 48% di sostituzione non ha comportato un peggioramento degli indici di crescita. In particolare l'incremento di peso, il TAS, il PER e l'ICA non hanno mostrato differenze significative (Xiao *et al.*, 2018).

La farina di *Hermetia illucens* è stata ampiamente testata anche su esemplari di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*), a differenti taglie (giovanili e adulti) mostrando risultati positivi anche a livelli di inclusione elevati. Nelle ricerche di St. Hilaire e coll. (2007); Sealey e coll. (2011) e Renna e coll. (2017), l'inclusione di HI fino al 40% non ha mostrato effetti negativi sugli indici di performances.

Il massimo livello di inclusione di HI utilizzato nel nostro studio (27,6%) corrispondente alla dieta HI75, ha tuttavia mostrato un peggioramento dei principali indici di crescita ed utilizzazione dei nutrienti, limitando l'incremento di peso medio aumentando l'indice di conversione alimentare e riducendo in

maniera significativa sia il tasso di accrescimento specifico sia l'efficienza di utilizzazione proteica. Questi risultati sono in accordo con St. Hilaire e coll. (2007) e Xiao e coll. (2018) dove l'inclusione di HI al 29,8% in trota iridea ed al 46% in pesce gatto americano, rispettivamente, mostrano un peggioramento nell'incremento di peso, nell'ICA, nel TAS e nel PER rispetto alla dieta controllo. Nel nostro studio inoltre, non è stato condotto un bilanciamento aminoacidico delle diete, di conseguenza si potrebbe spiegare il peggioramento significativo degli indici di performances tra la dieta controllo e quella alla massima inclusione di HI (HI75), poiché la minore concentrazione di farina di pesce comporta una deficienza nelle diete di alcuni aminoacidi essenziali come la metionina che a sua volta compromette il corretto utilizzo dei restati aminoacidi, per questa ragione i valori più bassi dell'efficienza di utilizzazione proteica sono presenti nella dieta con il maggior livello di inclusione di HI75.

Probabilmente questo trend negativo potrebbe essere attribuito sia alla presenza di chitina nella farina e alla relativa difficoltà di digestione della stessa da parte della specie indagata, come ipotizzato in rombo da Kroeckel e coll. (2012), sia alla deficienza in metionina come descritto in precedenza. Riguardo la difficoltà di digestione della chitina, c'è però da precisare che in ambiente naturale, l'orata, una specie prevalentemente carnivora, si nutre di molluschi e piccoli crostacei, che presentano elevate percentuali di chitina nel proprio esoscheletro, di conseguenza il pool enzimatico dovrebbe contenere le chitinasi necessarie alla degradazione di questo polimero.

In ambito zootecnico, esiste però la possibilità di adattamento delle specie carnivore dopo diverse generazioni di selezione artificiale, all'utilizzo di proteine di origine diversa da quelle utilizzate in natura. Questo ad esempio succede per le proteine vegetali (Le Boucher *et al.*, 2011; 2012). In orata, diversi studi condotti suggeriscono come la quasi totale sostituzione della farina di pesce con farine di origine vegetale non influenza negativamente la crescita e l'utilizzazione dei nutrienti (Pereira e Oliva-Teles, 2003; Kissil e Lupatsch, 2004; Gomez-Requeni *et al.*, 2004; Watson *et al.*, 2013).

Invece, Sitja-Bobadilla e coll. (2005) mostrano come la totale sostituzione della farina di pesce con una miscela di proteine vegetali (glutine di grano, glutine di

mais, farina di pisello estruso, farina di colza, ecc.) riduca le performances di crescita ed in particolare il tasso di accrescimento specifico del 21,6%.

Da ciò si evince come, con tutta probabilità, l'utilizzo di mangimi commerciali a base di farina di pesce, e successivamente anche di proteine vegetali, abbia in una certa misura modificato la risposta enzimatica della specie allevata, dopo generazioni di selezione artificiale. Di conseguenza è importante proseguire con ricerche mirate nell'ambito della sostituzione proteica, per ottenere ulteriori risultati relativi all'adattamento, dopo diverse generazioni, alle farine di HI.

Infine non è poi da sottovalutare la necessità di migliorare le condizioni di allevamento, visto quanto descritto in letteratura (Saroglia e Ingle, 1992; Guillaume *et al.*, 2001; Stead e Laird, 2002). In particolare in un sistema a circuito aperto non termostato come quello utilizzato durante la prova sperimentale, vista la naturale fluttuazione della temperatura, sarebbe preferibile condurre le prove durante i mesi primaverili ed autunnali, evitando temperature troppo basse tipiche dei mesi invernali (poco tollerate dalle orate) e temperature troppo alte tipiche dei mesi estivi, in cui si ha una sensibile riduzione della concentrazione di ossigeno disciolto che può senz'altro influenzare negativamente i tassi di crescita e di conversione alimentare, come ampiamente dimostrato dalla letteratura scientifica.

Indici Morfometrici e Biometrici

L'analisi statistica dei risultati relativi agli indici morfometrici (epatosomatico, viscerosomatico e coefficiente di adiposità) e biometrici (fattore di condizione) ha mostrato l'assenza di differenze statisticamente significative tra le diete a base di HI e la dieta controllo.

In particolare, l'analisi dell'indice epatosomatico permette di valutare l'effetto dell'alimentazione sulla funzionalità del fegato, il quale riveste un ruolo chiave del metabolismo corporeo (Dernekbaşı, 2012). In tal senso un valore di tale indice maggiore del range fisiologico (tra 1-2 %) mostra come l'alimentazione possa causare problemi a livello metabolico, in particolare nell'utilizzo di carboidrati e lipidi, per la presenza ad esempio di alimenti ossidato nella dieta, o per un probabile eccesso di carboidrati, nonché per una carenza vitaminica (Munshi e Dutta, 1996). Relativamente agli esemplari oggetto della sperimentazione, il valore di HSI si attesta in tutti i gruppi sperimentali ad un valore medio all'interno del range fisiologico. Da questo punto di vista le diete sperimentali non sembrano aver causato problemi metabolici a carico del fegato, risultando ben bilanciate nella composizione nutrizionale in macro e micromolecole.

Confrontando i risultati con i dati disponibili in letteratura, i valori ottenuti per l'HSI sono minori rispetto a quelli osservati da Piccolo e coll. (2017) su esemplari di orata alimentati con farina di *Tenebrio molitor* a differente percentuale di inclusione e con peso finale minore (240 g circa) contro i 400 g circa degli esemplari oggetto della tesi. Per l'indice viscerosomatico, i valori, se confrontati con Piccolo e coll. (2017) risultano maggiori rispetto alla dieta con il 35% di sostituzione della farina di pesce (5,53 vs 5,86±0.10), ma sensibilmente minori rispetto alla dieta con il 71% di sostituzione di FM (6,77 vs 5,86±0.10). Infine, il fattore di condizione (K) si discosta leggermente rispetto a quello osservato da Piccolo e coll. (2017).

Tuttavia, vista la carenza di dati disponibili in letteratura relativi all'effetto delle farine di insetto sugli indici morfometrici e biometrici in *Sparus aurata*, il confronto risulta difficile. Di conseguenza appare evidente l'esigenza di confrontare i dati con altre specie sia marine che dulcicole, in modo da ottenere un quadro generale dato dall'utilizzo di queste fonti proteiche alternative.

Da questo punto di vista la presenza in letteratura di dati relativi ad una specie appartenente alla stessa famiglia (Sparidae) risulta utile nel confronto degli indici. Negli studi di Iaconisi e coll. (2017), esemplari adulti di *Pagellus bogaraveo* (110-246g) alimentati con diete a percentuale crescente di sostituzione di FM con farina di *Tenebrio molitor* non degrassata (25-50%) mostrano valori di HSI e VSI rispettivamente tra l'11 e il 25% e tra il 29 e il 33% maggiori rispetto ai dati da noi ottenuti. Analogamente in Gasco e coll. (2016), esemplari giovanili di spigola (*Dicentrarchus labrax*) alimentati con diete al 25% di inclusione di farina di *Tenebrio molitor* non degrassata mostravano una tendenza simile. Lock e coll. (2016) in esemplari adulti di salmone atlantico (*Salmo salar*) in cui la farina di pesce veniva sostituita con due tipi di farina di *Hermetia illucens* a percentuali crescenti (25-50-100%) e (25-100%) rispettivamente, hanno osservato un valore medio del VSI maggiore del 17%, mentre un valore medio dell'HSI e del CF minore del 9 e del 43% rispettivamente, rispetto a quanto da noi osservato. Prove effettuate su esemplari adulti di trota iridea (*Oncorhynchus Mykiss*) utilizzando farina di *Hermetia illucens* parzialmente degrassata (20-40%) e farina di *Tenebrio molitor* non degrassata (25-50%), mostravano anche in questi casi valori maggiori (Renna *et al.*, 2017; Belforti *et al.*, 2015), rispetto ai nostri dati. In Taufek e coll. (2016) esemplari giovanili di pesce gatto africano (*Clarias gariepinus*) alimentati con diete a percentuali crescenti di sostituzione della farina di pesce (50-100%) con farina di grillo (*Gryllus bimaculatus*), mostrano un valore medio dell'indice epatosomatico più basso del 10% rispetto al valore da noi ottenuto.

Attività enzimatica

L'utilizzo dei nutrienti a livello metabolico dipende dall'attività delle singole classe enzimatiche coinvolte nella degradazione delle macromolecole organiche e dagli organi in cui esse svolgono la loro funzione biochimica. In questo contesto, l'utilizzo delle proteine, che rappresentano la componente organica più importante nelle diete destinate a pesci allevati, dipende dall'attività enzimatica delle proteasi (Natalia *et al.*, 2004). Non bisogna però dimenticare come anche le altre classi enzimatiche svolgano un ruolo importante nella fisiologia dell'apparato digerente. Per questa ragione, la caratterizzazione e quantificazione dell'attività enzimatica può contribuire a comprendere meglio la fisiologia digestiva delle specie indagate. In questo studio, l'analisi dell'attività enzimatica è stata condotta a livello intestinale su tre classi di enzimi quali: proteasi alcaline totali, lipasi ed amilasi.

A livello statistico non sono state evidenziate differenze significative tra i vari trattamenti alimentari. Tuttavia è presente una disomogeneità tra le singole classi enzimatiche, riconducibili a valori più alti tra le proteasi, rispetto a quelli delle lipasi ed amilasi. Questo è spiegabile con una ricerca di base effettuata sulle abitudini alimentari della specie indagata (*Sparus aurata*), visto che il *pattern* degli enzimi digestivi e la loro relativa attività riflette solitamente le abitudini alimentari della specie ed il livello trofico a cui essa appartiene (Sabapathy e Teo 1993; Munilla-Moran e Saborido-Rey, 1996; Hidalgo *et al.*, 1999; Fernandez *et al.*, 2001; Castro *et al.*, 2013). In quest'ottica, l'orata è una specie prevalentemente carnivora, appartenente al livello trofico 3.7 (FishBase), che si nutre prevalentemente di molluschi e piccoli crostacei (Bauchot *et al.*, 1990; Ferrari e Chiericato, 1981; Wassef e Eisawy, 1985; Andrade *et al.*, 1996).

Tralasciando il confronto tra l'attività delle singole classi enzimatiche nelle diverse specie ittiche, che è direttamente correlata alle proprie abitudini alimentari, è importante soffermarsi sull'analisi delle variazioni dovute alla sostituzione della farina di pesce con proteine alternative di diverso tipo. Nel nostro studio, nonostante l'assenza di differenze significative tra i gruppi sperimentali, in accordo con Magalhes e coll. (2017), Mamauag e coll. (2011), l'attività delle proteasi totali presenta il valore minore in HI25 (389,3 U/mg proteina), il quale tende a salire, seppur di poco nella dieta al 75% di sostituzione (390,9 U/mg proteina), per raggiungere i valori massimi nelle diete controllo e

HI50 (419,1 e 464,2 U/mg proteina, rispettivamente). Questo è parzialmente in accordo con Ji e coll. (2013) in cui la sostituzione della farina di pesce con farina di baco da seta fino all'80% in Jian Carp (*Cyprinus carpio* var. Jian), ha mostrato una *trend* negativo dell'attività proteasica al crescere della sostituzione della farina di pesce, raggiungendo però il picco massimo di attività nella dieta al 50% di sostituzione. La sostituzione di FM con farina di *Imbrasia belina* (larva del mopane) a percentuali crescenti (10-20-40-60%) in esemplari giovanili di tilapia del Mozambico (*Oreochromis mossambicus*), ha mostrato un'attività delle proteasi maggiore al massimo livello di sostituzione (60%), mentre il valore minore nella dieta controllo (Rapatsa *et al.*, 2017).

L'attività delle amilasi e delle lipasi a livello dell'intestino, al contrario di quanto osservato per le proteasi, diminuisce all'aumentare del livello d'inclusione nella dieta di HI. Le attività di questi enzimi nell'orata riflettono il regime alimentare di questa specie appartenente alla famiglia degli Sparidi che essendo prevalentemente carnivora, si nutre raramente di vegetali. Infatti come mostrato da Fernandez e coll. (2001), le attività specifiche delle amilasi, mostrano chiare differenze tra specie principalmente erbivore come la boga (*Boops boops*) e specie tradizionalmente più carnivore come il Pagellus erithrinus o il sarago sparaglione (*Diplodus annularis*). Dal nostro studio è emerso come l'attività amilolitica, seppur inferiore rispetto a specie onnivore ed erbivore quali lo storione Adriatico (*Acipenser naccarii*) e l'anguilla europea (*Anguilla anguilla*) (Hidalgo *et al.*, 1999, Furné *et al.*, 2005), ha comunque fornito dati interessanti riguardo l'utilizzo dei carboidrati da parte della specie indagata. In particolare si è evidenziata l'assenza di differenze statisticamente significative tra i gruppi sperimentali, nonostante siano presenti valori maggiori nelle diete con HI rispetto alla dieta controllo, in parziale accordo con Rapatsa e coll. (2017), in cui i valori maggiori si registrano alle percentuali maggiori di farina di mopane, ma in contrasto con quanto osservato da Magalhes e coll. (2017) in esemplari di spigola (*Dicentrarchus labrax*). Tuttavia i valori tendono a decrescere all'aumentare della percentuale di inclusione della stessa (HI25>HI50>HI75).

Infine, l'analisi dell'attività delle lipasi ha mostrato un andamento sovrapponibile a quello delle amilasi, evidenziando l'assenza di differenze statisticamente significative tra i gruppi sperimentali, in contrasto con Magalhes e coll. (2017). Al

contempo, i valori maggiori sono presenti nelle diete a base di farine di HI rispetto alla dieta controllo, con la tendenza a diminuire all'aumentare della percentuale di sostituzione della farina di pesce (HI25>HI50>HI75), mostrando un *trend* differente rispetto a Rapatsa e coll. (2017). Questo risultato appare anomalo in quanto le diete sono state formulate per essere isolipidiche e la componente principale è rappresentata dall'olio di pesce presente nelle stesse quantità in tutte le diete. Ciò non dovrebbe comportare la riduzione delle attività lipolitiche in un pesce prevalentemente carnivoro come l'orata (Chakrabarti *et al.*, 1995). Una possibile spiegazione potrebbe evincersi dal differente contenuto in farina di pesce, apportatrice anch'essa di lipidi grezzi, nelle diete sperimentali oppure in una possibile interferenza da parte della componente lipidica contenuta nella farina *Hermetia illucens* nei confronti delle lipasi dell'orata, nonostante la farina utilizzata sia parzialmente degrassata e con un contenuto lipidico pari all'8,5%. Tuttavia, vista la carenza di dati disponibili in letteratura relativi all'effetto dato dall'utilizzo di farine di insetto sull'attività enzimatica intestinale di specie acquatiche ed in particolare *Sparus aurata*, il confronto risulta difficile.

Digeribilità

L'analisi statistica dei risultati relativi ai Coefficienti di utilizzazione digestiva (CUD) ha mostrato l'assenza di differenze statisticamente significative tra le diete a base di HI e la dieta controllo. Tra le diete sperimentali contenenti farina di *Hermetia illucens*, è comunque presente una differenza nei valori dei CUD relativi ai singoli nutrienti. In particolare la digeribilità relativa alla sostanza secca e all'estratto etereo aumenta in funzione del maggiore livello di inclusione nella dieta di HI, nonostante per la sostanza secca il valore non superi il 70%, che confrontato con dati presenti in letteratura relativi all'utilizzo di farine di insetto risulta maggiore rispetto a Jabir e coll. (2012), in cui giovanili di tilapia venivano alimentati con dieta al 30% di sostituzione di FM con farina di coleottero (*Zophobas morio*) e mostravano un valore inferiore al 50%. Risulta invece in linea con i dati ottenuti da Magalhaes e coll. (2017) in cui giovanili di spigola (*Dicentrarchus labrax*) venivano alimentati con diete a livelli di inclusione del 6,5 - 13 e 19,5% di farina di HI, mentre appaiono minori rispetto a Iaconisi e coll. (2017), in esemplari adulti di *Pagellus bogaraveo* alimentati con diete a percentuali crescenti di farina di *Hermetia illucens*. Gasco e coll. (2016), hanno osservato in esemplari giovanili di spigola (*Dicentrarchus labrax*) alimentati con farina di *Tenebrio molitor* al 25% di inclusione, un valore dell'80%, in linea con Renna e coll. (2017) in cui il valore era di poco al di sotto dell'80% in esemplari adulti di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) alimentati ad inclusioni crescenti di farina di *Hermetia illucens* parzialmente degrassata (20-40%). Taufek e coll. (2016) hanno evidenziato valori intorno al 74% in esemplari di pesce gatto africano (*Clarias gariepinus*), alimentati con farina di grillo al 100% di sostituzione di FM.

Per l'estratto etereo il valore si attesta al di sopra del 90%, dimostrando un'ottima digeribilità della frazione lipidica, che nel caso specifico proviene principalmente dall'olio di pesce, addizionato al mangime durante la miscelazione delle materie prime, ma in parte proveniente anche dalla farina di HI, nonostante quest'ultima abbia subito un processo meccanico di degrassatura ed il contenuto lipidico sia intorno al 8,5%. Rispetto ai dati presenti in letteratura il valore risulta maggiore rispetto a quanto ottenuto da Jabir e coll. (2012), in cui giovanili di tilapia venivano alimentati con dieta al 30% di sostituzione di FM con farina di

coleottero (*Zophobas morio*) e da Taufek e coll. (2016) in cui il valore si attesta intorno al 89% in esemplari di pesce gatto africano (*Clarias gariepinus*), alimentati con farina di grillo al 100% di sostituzione di FM. I nostri dati appaiono in linea con Renna e coll. (2017) in cui il valore supera il 90% in esemplari adulti di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) alimentati ad inclusioni crescenti di farina di *Hermetia illucens* parzialmente degrassata (20-40%) e con Magalhaes e coll. (2017) dove il valore è tra il 91 e il 92%. Infine il valore risulta leggermente minore rispetto a quanto ottenuto da Gasco e coll. (2016), il cui risultato è del 97%.

Relativamente alla digeribilità della frazione proteica, i valori ottenuti mostrano una tendenza differente, tenendo conto che il valore aumenta nella dieta al 25% di sostituzione e in quella al 50% (87,43 vs 88,78), per poi diminuire nella dieta al 75% di sostituzione (86,94), raggiungendo un valore inferiore della dieta al 25%. I valori raggiunti, tutti al di sopra dell'85%, mostrano chiaramente una buona digeribilità della frazione proteica nella dieta, che, se confrontata con dati presenti in letteratura relativi all'utilizzo delle farine di insetto, risulta maggiore rispetto a Jabir e coll. (2012), in cui il valore supera di poco il 50% e Taufek e coll. (2016), in cui il valore non supera l'81%, appaiono invece in linea con Renna e coll. (2017), in cui il valore oscilla tra l'87 e il 91%, dove tende a diminuire all'aumentare del tenore di farina di *Hermetia illucens* nella dieta; risultano minori rispetto a quanto ottenuto da Magalhaes e coll. (2017) dove il valore è tra il 91 e il 93%, e si riduce all'aumentare della percentuale di inclusione della farina di HI nelle diete, e rispetto a quanto osservato da Gasco e coll. (2016), in cui il valore si attesta al 92% e da Belforti e coll. (2016) in cui esemplari adulti di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) venivano alimentati con diete ad inclusione crescente di farina di *Tenebrio molitor* (25-50%), mostrando un coefficiente di digeribilità intorno al 90%, e con tendenza a diminuire all'aumentare della percentuale di inclusione della farina di HI nelle diete.

Infine, analizzando i coefficienti di digeribilità della frazione proteica relativi alla specie oggetto della sperimentazione (*Sparus aurata*), come riportato in letteratura, è possibile effettuare un confronto tra le materie prime comunemente utilizzate nella formulazione dei mangimi commerciali (farina di pesce) e quelle alternative sia di origine vegetale che animale. Nengas e coll. (1995) evidenziano

CUD rispetto ai dati ottenuti nel nostro studio: maggiori con diete contenenti farina di aringhe (95,8), farina di pollo (89,9), farina di latte scremato (95,5), farina di soia (90,9) e glutine di mais (90), sovrapponibili con diete contenenti farina di semi di girasole (86,2), minori con diete contenenti alcune farine di origine animale come la farina di sangue (46,3), farina di carne ed ossa (35/72%) e farina di piume (24,9/57,5%) ed alcune farine di origine vegetale come la farina di mais (65%), fiocchi di mais (60,3%) e la polpa di pomodoro (20,1%). Da questo studio emerge come i risultati ottenuti per le farine di insetto ed in particolare per la farina di *Hermetia illucens* parzialmente degrassata risultino positivi, pur tenendo conto del fatto che le diete sperimentali erano formulate a percentuali di inclusione della farina di HI fino ad un massimo del 27,6%, mentre nel lavoro sopra citato la percentuale di inclusione era stata del 50%.

Capitolo VI

6. CONCLUSIONI

La rapida crescita dell'acquacoltura ha posto un serio interrogativo sulla sostenibilità ambientale di questa pratica zootecnica. In particolare sull'utilizzo delle risorse ambientali, gli impatti generati sull'ambiente, la biodiversità e l'ecosistema.

Secondo la FAO, a seguito di un'analisi comparativa sulla sostenibilità ambientale dell'acquacoltura rispetto ad altre pratiche zootecniche, essa risulta tra i sistemi agroalimentari più efficienti come rapporto input/output. In particolare l'utilizzo di biorisorse ed il limitato impatto appaiono di grande interesse nei sistemi di produzione ittica. Tutto ciò si ripercuote sul costo potenziale del prodotto finale, che dimostra la sostenibilità economica di tale pratica zootecnica. Inoltre, in tempi in cui viene data grande enfasi all'importanza del valore nutrizionale degli alimenti, il pesce assume notevole interesse. Secondo questa analisi, la FAO auspica l'aumento del consumo dei prodotti dell'acquacoltura nei prossimi anni, considerando che rappresenta la fonte di proteine ad uso umano con il minore impatto ambientale. Se a questa analisi, si aggiunge che i prodotti ittici provenienti dall'attività di pesca hanno raggiunto, se non addirittura sorpassato la massima sostenibilità produttiva dell'ambiente marino, intaccando in modo irreparabile gli stock naturali, appare chiaro come vi sia un progressivo sviluppo della ricerca sull'implementazione di sistemi di acquacoltura finalizzati alla produzione di proteine animali destinate al consumo umano.

Tuttavia, la progressiva espansione di questo settore ha causato un forte aumento della domanda di mangimi destinati all'allevamento intensivo, che si è ripercosso sulla richiesta di materie prime (principalmente fonti proteiche) destinate alla loro produzione che ha portato al conseguente sovrasfruttamento degli stock ittici. Appare quindi evidente come la dipendenza da tali materie prime sia un limite per la crescita di un settore che ne rappresenta attualmente il maggiore consumatore. Pertanto, alla luce di ciò, se l'acquacoltura si vuole realmente porre come attività dalla connotazione fortemente ecosostenibile, preservando gli stock ittici naturali dall'eccessivo impoverimento diretto ed indiretto, permettendo allo stesso tempo l'accesso a proteine dall'alto valore biologico anche ai paesi in via di sviluppo,

diventa indispensabile diminuire la dipendenza da tali materie prime, investendo sulla ricerca di fonti alternative per rispettare l'equilibrio ecologico e i principi dello sfruttamento sostenibile.

Le fonti proteiche alternative alla farina di pesce sono molteplici ognuna delle quali presenta punti di forza e di debolezza riguardo all'inclusione nei mangimi commerciali. Le caratteristiche principali sulle quali puntare sono sicuramente la reperibilità delle materie prime, la sostenibilità produttiva ed allo stesso tempo un'elevata qualità nutrizionale, paragonabile a quella della farina di pesce.

Pertanto, al fine di rendere le filiere *feed* più sostenibili, la ricerca scientifica ha spostato l'attenzione verso alternative proteiche innovative, in grado di esaltare la biodiversità, garantendo la sostenibilità ambientale, di rilevanza fondamentale nell'era delle risorse finite, e socio-economica delle produzioni animali terrestri ed acquatiche.

Attualmente, fra le materie prime di maggiore interesse vi sono gli insetti, indicati dalla FAO come una valida fonte di proteine ed amminoacidi destinati alla formulazione di mangimi commerciali. Tra le caratteristiche peculiari che gli insetti mostrano vi è il basso impatto ambientale rispetto ad altre specie allevate e il loro intervento in un concetto di "economia circolare" poiché possono essere utilizzati per decomporre e bioconvertire rifiuti organici, senza entrare in competizione alimentare con gli stessi esseri umani. Tenendo conto di tutte queste caratteristiche, la FAO sottolinea come gli insetti quale fonte di proteine alternative, provenienti da risorse sostenibili ed ecologicamente rispettose dell'ambiente, possano rivestire un ruolo cruciale all'interno delle filiere produttive in campo mangimistico.

In quest'ottica di ricerca scientifica applicata all'ecosostenibilità, e in seguito al parere scientifico dell'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) sull'utilizzo degli insetti come alimento e mangime, il Comitato permanente per le piante, gli animali, gli alimenti e i mangimi ha recentemente approvato il Regolamento che modifica gli allegati I e IV del Regolamento (CE) 999/2001 e degli allegati X e XV del Regolamento (CE) 142/201, per quanto concerne le disposizioni sulle proteine di origine animale trasformate. L'utilizzo di proteine provenienti da insetti nella formulazione di mangimi destinati all'acquacoltura, è

consentita in Europa dal luglio del 2017 (Regolamento della Commissione EU; 2017/893 del 24 Maggio 2017).

Nell'utilizzo degli insetti in acquacoltura oltre alle caratteristiche chimico-nutrizionali, adeguate all'utilizzo in campo mangimistico, esistono altri aspetti da considerare, di natura prettamente industriale come il potenziale per essere prodotte su larga scala e riuscire così a soddisfare le richieste di mercato.

Tra le varie specie autorizzate nella formulazione di mangimi destinati all'acquacoltura, la mosca soldato nera (*Hermetia illucens*) è quella che ha destato più interesse sia perché rappresenta da un punto di vista nutrizionale una valida alternativa alla farina di pesce che in un'ottica di sostenibilità poiché le larve possono crescere su differenti rifiuti organici, tra cui scarti dell'industria agroalimentare e dei processi agricoli, reflui zootecnici, rifiuto umido urbano, biotrasformandoli sia da un punto di vista quantitativo che qualitativo, assumendo un ruolo di fondamentale importanza nello smaltimento dei rifiuti di natura biologica.

Per tale ragione la ricerca scientifica sta prendendo in seria considerazione l'utilizzo di questo dittero come valida alternativa proteica alle materie prime comunemente utilizzate nella formulazione di mangimi destinati alle specie ittiche.

In questo contesto si inserisce il progetto di tesi che ha visto come scopo generale di questo studio la valutazione di una farina parzialmente degrassata di *Hermetia illucens* come fonte proteica alternativa alla farina di pesce in diete destinate ad esemplari adulti di orata, una delle specie ittiche più pregiate del Mediterraneo, e nello specifico l'analisi della risposta in termini di crescita ed utilizzazione dei nutrienti da parte degli esemplari allevati.

Dallo studio sono emersi importanti spunti di riflessione riguardo la potenzialità applicativa di questa materia prima in ambito mangimistico. In particolare:

- I livelli crescenti di sostituzione di farina di pesce (25-50-75%) con farina di *Hermetia illucens*, corrispondenti a livelli di inclusione della stessa del 9,2 – 18,4 e 27,6%, non hanno mostrato effetti negativi sugli indici di performances fino ad un livello di inclusione del 18,4%, mentre alla percentuale massima (27,6%) si evidenzia un peggioramento di alcuni indici quali tasso di crescita specifico, indice di conversione alimentare ed

efficienza di utilizzazione proteica. Questi dati non sono però supportati da una significatività statistica riguardo l'attività enzimatica intestinale degli esemplari campionati, poiché non sono emerse differenze a carico di nessuna della classe enzimatiche analizzate (proteasi totali, lipasi ed amilasi).

- L'analisi degli indici morfometrici e biometrici non ha evidenziato la presenza di differenze tra i gruppi sperimentali. Tuttavia nell'analisi della digeribilità dei nutrienti, nonostante l'assenza di differenze statisticamente significative tra i gruppi sperimentali, è evidente la diminuzione del coefficiente di utilizzazione digestiva della frazione proteica tra la dieta al 18,4% e la dieta alla percentuale massima di inclusione (27,6%) di HI. Questo potrebbe essere dovuto ad un effetto negativo della farina di HI sulla crescita degli esemplari allevati. Tuttavia questi risultati dovranno essere confermati o meno da altre analisi in corso, in particolare la valutazione isto-patologica di fegato ed intestino, che potrà fornire importanti informazioni circa l'eventuale presenza di alterazioni a carattere istologico delle strutture deputate all'assorbimento dei nutrienti o comunque dell'architettura del sistema gastrointestinale.

Al fine di completare il quadro relativo sugli effetti che l'inclusione della farina di HI ha portato, gli esemplari campionati verranno sottoposti ad un'indagine chimico nutrizionale e sensoriale dei filetti, in modo da valutare se il prodotto rispecchia le caratteristiche qualitative richieste dal mercato e di conseguenza dai consumatori.

Nonostante ciò restano ancora da valutare effetti a lungo termine sull'allevamento intensivo delle specie allevate, in modo da ottenere dati ad ampio spettro sui livelli di sostituzione ed inclusione ottimali. In questa prospettiva, il progetto ha puntato a comprendere le potenzialità di questa fonte proteica alternativa sia da un punto di vista produttivo, che di salute generale degli individui allevati, puntando alla sostenibilità ambientale con l'intento di testare ed eventualmente sviluppare nuovi prodotti, sulla scorta di evidenze scientifiche precise, caratterizzati da elevati standard produttivi e di qualità come richiesto dal mercato comunitario

affinché i prodotti ittici risultanti siano sicuri, nutrizionalmente adeguati e favorevolmente accettati dai consumatori.

Capitolo VII

7. BIBLIOGRAFIA

AA.VV. (2001). Acquacoltura Responsabile. Cataudella S., Bronzi P. (eds). Unimar-Uniprom, Roma: 683 pp.

Andrade, J. P., Erzini, K., Palma, J. (1996). Gastric evacuation and feeding in the gilthead sea bream reared under semi-intensive conditions. *Aquaculture International*, **4(2)**, 129-141.

Aniebo, A. O., Erondy, E. S., Owen, O. J. (2008). Proximate composition of housefly larvae (*Musca domestica*) meal generated from mixture of cattle blood and wheat bran. *Livestock Research for Rural Development*, **20(12)**, 205.

Aniebo, A. O., Owen, O. J. (2010). Effects of age and method of drying on the proximate composition of housefly larvae (*Musca domestica* Linnaeus) meal (HFLM). *Pakistan Journal of Nutrition*, **9(5)**, 485-487.

AOAC (1995). Official methods of analysis 16th Ed. Association of official analytical chemists. Washington DC, USA.

AOAC (2000) Official Methods of Analysis. 17th Edition, The Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA. Methods 925.10, 65.17, 974.24, 992.16.

AOAC (2003) Official Methods of Analysis. Vol.I.17th ed. Association of Analytical Washington, DC, USA

Arango Gutiérrez, G. P., Vergara Ruiz, R. A., Mejía Vélez, H. (2004). Compositional, microbiological and protein digestibility analysis of the larva meal of *Hermetia illucens* L.(Diptera: Stratiomyiidae) at Angelópolis-Antioquia, Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, **57(2)**, 2491-2500.

Araújo, M., Rema, P., Sousa-Pinto, I., Cunha, L. M., Peixoto, M. J., Pires, M. A., Valente, L. M. (2016). Dietary inclusion of IMTA-cultivated *Gracilaria vermiculophylla* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets: effects on growth, intestinal morphology, tissue pigmentation, and immunological response. *Journal of applied phycology*, **28(1)**, 679-689.

Awoniyi, T. A. M., Adebayo, I. A., Aletor, V. A. (2004). A study of some erythrocyte indices and bacteriological analysis of broiler-chickens raised on maggot-meal based diets. *International Journal of Poultry Science*, **3(6)**, 386-390.

Ayadi, F. Y., Rosentrater, K. A., Muthukumarappan, K. (2012). Alternative protein sources for aquaculture feeds. *Journal of aquaculture feed science and nutrition*, **4(1)**, 1-26.

- Baeza-Ariño, R., Martínez-Llorens, S., Nogales-Mérida, S., Jover-Cerda, M., Tomás-Vidal, A. (2016).** Study of liver and gut alterations in sea bream, *Sparus aurata* L., fed a mixture of vegetable protein concentrates. *Aquaculture research*, **47(2)**, 460-471.
- Barroso, F. G., de Haro, C., Sánchez-Muros, M. J., Venegas, E., Martínez-Sánchez, A., Pérez-Bañón, C. (2014).** The potential of various insect species for use as food for fish. *Aquaculture*, **422**, 193-201.
- Barry, T. (2004).** Evaluation of the economic, social, and biological feasibility of bioconverting food wastes with the black soldier fly (*Hermetia illucens*).
- Bauchot, M. L., Daget, J., Bauchot, R. (1990).** L'ichtyologie en France au début du XIXe siècle: l'histoire naturelle des poissons de Cuvier et Valenciennes. Muséum national d'histoire naturelle.
- Belforti, M., Gai, F., Lussiana, C., Renna, M., Malfatto, V., Rotolo, L., Gasco, L. (2015).** *Tenebrio molitor* meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets: effects on animal performance, nutrient digestibility and chemical composition of fillets. *Italian Journal of Animal Science*, **14(4)**, 4170.
- Bell, J. M., Keith, M. O. (1986).** Nutritional and monetary evaluation of damaged lentils for growing pigs and effect of antibiotic supplements. *Canadian Journal of Animal Science*, **66 (1)**, 529-536.
- Belluco, S., Losasso, C., Maggioletti, M., Alonzi, C.C., Paoletti, M.G., Ricci, A., (2013).** Edible insects in a food safety and nutritional perspective: a critical review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **12**, 296-313
- Benedito-Palos, L., Saera-Vila, A., Calduch-Giner, J. A., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J. (2007).** Combined replacement of fish meal and oil in practical diets for fast growing juveniles of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): networking of systemic and local components of GH/IGF axis. *Aquaculture*, **267(1-4)**, 199-212.
- Benedito-Palos, L., Navarro, J. C., Sitjà-Bobadilla, A., Bell, J. G., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J. (2008).** High levels of vegetable oils in plant protein-rich diets fed to gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): growth performance, muscle fatty acid profiles and histological alterations of target tissues. *British Journal of Nutrition*, **100(5)**, 992-1003.
- Bondari, K., Sheppard, D. C. (1981).** Soldier fly larvae as feed in commercial fish production. *Aquaculture*, **24**, 103-109.
- Bondari, K., Sheppard, D. C. (1987).** Soldier fly, *Hermetia illucens* L., larvae as feed for channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), and blue tilapia, *Oreochromis aureus* (Steindachner). *Aquaculture Research*, **18(3)**, 209-220.

- Botsford, L. W., Castilla, J. C., Peterson, C. H. (1997).** The management of fisheries and marine ecosystems. *Science*, **277(5325)**, 509-515.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, **72(1-2)**, 248-254.
- Bureau, D. P., Harris, A. M., Cho, C. Y. (1999).** Apparent digestibility of rendered animal protein ingredients for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, **180(3-4)**, 345-358.
- Bureau, D. P., Harris, A. M., Bevan, D. J., Simmons, L. A., Azevedo, P. A., Cho, C. Y. (2000).** Feather meals and meat and bone meals from different origins as protein sources in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets. *Aquaculture*, **181(3-4)**, 281-291.
- Bureau, D. P. (2006).** Rendered products in fish aquaculture feeds. In: Meeker DL (ed) *The National Renderers Association*, Alexandria, pp 179-184
- Caballero, M. J., Izquierdo, M. S., Kjorsvik, E., Fernandez, A. J., Rosenlund, G. (2004).** Histological alterations in the liver of sea bream, *Sparus aurata* L., caused by short-or long-term feeding with vegetable oils. Recovery of normal morphology after feeding fish oil as the sole lipid source. *Journal of Fish Diseases*, **27(9)**, 531-541.
- Calvert, C. C., Martin, R. D., Morgan, N. O. (1969).** House fly pupae as food for poultry. *Journal of Economic Entomology*, **62(4)**.
- Carter, C. G., Houlihan, D. F. (2001).** Protein synthesis. *Fish physiology*, **20**, 31-75.
- Castro, C., Pérez-Jiménez, A., Coutinho, F., Pousão-Ferreira, P., Brandão, T. M., Oliva-Teles, A., Peres, H. (2013).** Digestive enzymes of meagre (*Argyrosomus regius*) and white seabream (*Diplodus sargus*). Effects of dietary brewer's spent yeast supplementation. *Aquaculture*, **416**, 322-327.
- Cavallarín, L., Antoniazzi, S., Borreani, G., Tabacco, E. (2005).** Effects of wilting and mechanical conditioning on proteolysis in sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop) wilted herbage and silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **85(5)**, 831-838.
- Cerezuela, R., Fumanal, M., Tapia-Paniagua, S. T., Meseguer, J., Morínigo, M. Á., Esteban, M. Á. (2013).** Changes in intestinal morphology and microbiota caused by dietary administration of inulin and *Bacillus subtilis* in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) specimens. *Fish & shellfish immunology*, **34(5)**, 1063-1070.

- Chakrabarti, I., Gani, M. A., Chaki, K. K., Sur, R., Misra, K. K. (1995).** Digestive enzymes in 11 freshwater teleost fish species in relation to food habit and niche segregation. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **112A**, 167–177.
- Cho, C. Y., Kaushik, S., Woodward, B. (1992).** Dietary arginine requirement of young rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, **102(1)**, 211-216.
- Chou, R. L., Her, B. Y., Su, M. S., Hwang, G., Wu, Y. H., Chen, H. Y. (2004).** Substituting fish meal with soybean meal in diets of juvenile cobia *Rachycentron canadum*. *Aquaculture*, **229(1-4)**, 325-333.
- Clark, J., McNaughton, J. E., Stark, J. R. (1984).** Metabolism in marine flatfish. I. Carbohydrate digestion in Dover sole (*Solea solea* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology*, **77B**, 821-827.
- Collins, G. M., Ball, A. S., Qin, J. G., Bowyer, J. N., Stone, D. A. (2014).** Effect of alternative lipids and temperature on growth factor gene expression in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). *Aquaculture research*, **45(7)**, 1236-1245.
- Commission Regulation (EU) 2017/893 of 24 May 2017** amending Annexes I and IV to Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council and Annexes X, XIV and XV to Commission Regulation (EU) No 142/2011 as regards the provisions on processed animal protein. *C/2017/3399*
- Daprà, F., Gai, F., Costanzo, M. T., Maricchiolo, G., Micale, V., Sicuro, B., Palmegiano, G. B. (2009).** Rice protein-concentrate meal as a potential dietary ingredient in practical diets for blackspot seabream *Pagellus bogaraveo*: a histological and enzymatic investigation. *Journal of fish biology*, **74(4)**, 773-789.
- Delgado, C. L. (2003).** *Fish to 2020: Supply and demand in changing global markets* (Vol. 62). WorldFish.
- DeFoliart, G. (1992).** Insect as human food; Gene DeFoliart discusses some nutritional and economic aspects. *Crop Prot*, **11**, 395-399.
- de Haro, C., Ramos Bueno, R. P., Barroso, F. G., Sánchez Muros, M. J., Rincón Cervera, M. Á., Guil-Guerrero, J. L. (2016).** Insect larvae as feed ingredient selectively increase arachidonic acid content in farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture research*, **47(9)**, 2881-2887.
- Desai, A. R., Links, M. G., Collins, S. A., Mansfield, G. S., Drew, M. D., Van Kessel, A. G., Hill, J. E. (2012).** Effects of plant-based diets on the distal gut microbiome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, **350**, 134-142.

Dias, J., Conceição, L. E., Ribeiro, A. R., Borges, P., Valente, L. M., Dinis, M. T. (2009). Practical diet with low fish-derived protein is able to sustain growth performance in gilthead seabream (*Sparus aurata*) during the grow-out phase. *Aquaculture*, **293(3-4)**, 255-262.

Diener, S., Gutiérrez, F. R., Zurbrügg, C., Tockner, K. (2009). Are larvae of the black soldier fly *Hermetia illucens* a financially viable option for organic waste man-agement in Costa Rica. In Proceedings Sardinia.

Directive, C. (2001). 102/EC of 27 November 2001 amending Directive 1999/29/EC on the undesirable substances and products in animal nutrition. Official Journal of the European Communities L, **6**, 10-1.

Dong, G. F., Yang, Y. O., Song, X. M., Yu, L., Zhao, T. T., Huang, G. L., Zhang, J. L. (2013). Comparative effects of dietary supplementation with maggot meal and soybean meal in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) and darkbarbel catfish (*Pelteobagrus vachelli*): growth performance and antioxidant responses. *Aquaculture Nutrition*, **19(4)**, 543-554.

Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S., Oliva-Teles, A. (2011). Dietary carbohydrate utilization by European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) juveniles. *Reviews in Fisheries Science*, **19(3)**, 201-215.

Erickson, M. C., Islam, M., Sheppard, C., Liao, J., Doyle, M. P. (2004). Reduction of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella enterica* serovar enteritidis in chicken manure by larvae of the black soldier fly. *Journal of Food Protection*, **67(4)**, 685-690.

Escaffre, A. M., Kaushik, S., Mambrini, M. (2007). Morphometric evaluation of changes in the digestive tract of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) due to fish meal replacement with soy protein concentrate. *Aquaculture*, **273(1)**, 127-138.

Espe, M., Lemme, A., Petri, A., El-Mowafi, A. (2006). Can Atlantic salmon (*Salmo salar*) grow on diets devoid of fish meal?. *Aquaculture*, **255(1-4)**, 255-262.

European Commission (2013). Commission Regulation (EU) No 56/2013 of 16 January 2013 amending Annexes I and IV to Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council laying down rules for the prevention, control and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies Text with EEA relevance. Official Journal of the European Union, **56**, 21-3.

EU (2001). Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2001 laying down rules for the prevention, control and

eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies. Official Journal of the European Union, **147**, 1-40.

FAO. 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture 2014 Rome. 223 pp.

FAO. 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016 Rome. 223 pp.

Fasakin, E. A., Balogun, A. M., Ajayi, O. O. (2003). Evaluation of full-fat and defatted maggot meals in the feeding of clariid catfish *Clarias gariepinus* fingerlings. Aquaculture Research, **34**, 733-738

Fernandez, I., Moyano, F. J., Diaz, M., Martinez, T. (2001). Characterization of α -amylase activity in five species of Mediterranean sparid fishes (Sparidae, Teleostei). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, **262(1)**, 1-12.

Ferrari, I., Chiericato, A. R. (1981). Feeding habits of juvenile stages of *Sparus aurata* L., *Dicentrarchus labrax* L. and Mugilidae in a brackish embayment of the Po River delta. Aquaculture, **25(2-3)**, 243-257.

Finke, M. D. (2002). Complete nutrient composition of commercially raised invertebrates used as food for insectivores. Zoo Biology: Published in affiliation with the American Zoo and Aquarium Association, **21(3)**, 269-285.

Folke, C., Kautsky, N. (1992). Aquaculture with its environment: prospects for sustainability. Ocean & coastal management, **17(1)**, 5-24.

Francis, G., Makkar, H. P., Becker, K. (2001). Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. Aquaculture, **199 (3-4)**, 197-227.

Franco, D., Gilberto, F., Laura, G., Francesco, G., Benedetto, S., Battista, G. (2005). Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed rice protein concentrate meal: histological pattern. In European Aquaculture Society Conference (pp. 23-23). Research Council of Norway.

Gai, F., Gasco, L., Daprà, F., Palmegiano, G. B., Sicuro, B. (2012). Enzymatic and Histological Evaluations of Gut and Liver in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, Fed with Rice Protein Concentrate-based Diets. Journal of the World Aquaculture Society, **43(2)**, 218-229.

Garcia, S. M., Moreno, I. D. L. (2000). Trends in world fisheries and their resources. FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture. Rome, Italy: FAO.

García-Ortega, A., Kissinger, K. R., Trushenski, J. T. (2016). Evaluation of fish meal and fish oil replacement by soybean protein and algal meal from

Schizochytrium limacinum in diets for giant grouper *Epinephelus lanceolatus*. Aquaculture, **452**, 1-8.

Gasco, L., Henry, M., Piccolo, G., Marono, S., Gai, F., Renna, M., Chatzifotis, S. (2016). *Tenebrio molitor* meal in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) juveniles: growth performance, whole body composition and in vivo apparent digestibility. Animal Feed Science and Technology, **220**, 34-45.

Gasco, L., Schiavone, A., Tommaso, M., Meneguz, M., Gariglio, M., Caimi, C., Montagnani, M. (2017). Effect of black soldier fly (*Hermetia illucens*) meal in sturgeon (*Acipenser baerii*) juveniles feeds: preliminary results. In Aquaculture America 2017-International Conference & Exposition (pp. 142-142). Aquaculture America 2017.

Gatlin III, D. M., Barrows, F. T., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T. G., Hardy, R. W., Overturf, K. (2007). Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. Aquaculture research, **38(6)**, 551-579.

Goda, A. M., El-Haroun, E. R., Kabir Chowdhury, M. A. (2007). Effect of totally or partially replacing fish meal by alternative protein sources on growth of African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) reared in concrete tanks. Aquaculture Research, **38(3)**, 279-287.

Gómez-Requeni, P., Mingarro, M., Calduch-Giner, J. A., Médale, F., Martin, S., Houlihan, D. F., Pérez-Sánchez, J. (2004). Protein growth performance, amino acid utilisation and somatotropic axis responsiveness to fish meal replacement by plant protein sources in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Aquaculture, **232(1-4)**, 493-510.

Guerreiro, I., Couto, A., Machado, M., Castro, C., Pousão-Ferreira, P., Oliva-Teles, A., Enes, P. (2016). Prebiotics effect on immune and hepatic oxidative status and gut morphology of white sea bream (*Diplodus sargus*). Fish & shellfish immunology, **50**, 168-174.

Guillaume, J., Kaushik, S. J., Bergot, P. (2001). Composition and nutritive value of raw materials. Appendix B. In: Nutrition and feeding of fish and crustaceans. Praxis Publishing Ltd, Chichester

Harder, W. (1975). Anatomy of fishes. Part I. Text. Part 2. Figures and plates. Stuttgart. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Pt.1:612 p., Pt.2:132 p. 13 pl.

Hardy, R. W., Tacon, A. G. (2002). Fish meal: historical uses, production trends and future outlook for sustainable supplies. Responsible marine aquaculture, 311-325.

Hardy, R. W. (2010). Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquaculture Research*, **41**, 770-776.

Haylor, G. S., Beveridge, M. C. M., Jauncey, K. (1988). Phosphorus nutrition of juvenile *Oreochromis niloticus*. In *The Second International Symposium on Tilapia in Aquaculture*, **15**, 341-345. Department of Fisheries, Bangkok and ICLARM Manila.

Henry, M., Gasco, L., Piccolo, G., Fountoulaki, E. (2015). Review on the use of insects in the diet of farmed fish: past and future. *Animal Feed Science and Technology*, **203**, 1-22.

Hidalgo, M. C., Urea, E., Sanz, A. (1999). Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture*, **170(3-4)**, 267-283.

Hites, R. A., Foran, J. A., Carpenter, D. O., Hamilton, M. C., Knuth, B. A., Schwager, S. J. (2004). Global assessment of organic contaminants in farmed salmon. *Science*, **303(5655)**, 226-229.

Iaconisi, V., Marono, S., Parisi, G., Gasco, L., Genovese, L., Maricchiolo, G., Piccolo, G. (2017). Dietary inclusion of *Tenebrio molitor* larvae meal: Effects on growth performance and final quality traits of blackspot sea bream (*Pagellus bogaraveo*). *Aquaculture*, **476**, 49-58.

Inaoka, T., Okubo, G., Yokota, M., Takemasa, M. (1999). Nutritive value of house fly larvae and pupae fed on chicken feces as food source for poultry. *Journal of Poultry Science*, **36**, 174-180

ISPRA, 2011. Annuario dei dati ambientali

Izquierdo, M. S., Turkmen, S., Montero, D., Zamorano, M. J., Afonso, J. M., Karalazos, V., Fernández-Palacios, H. (2015). Nutritional programming through broodstock diets to improve utilization of very low fishmeal and fish oil diets in gilthead sea bream. *Aquaculture*, **449**, 18-26.

Jabir, M. D., Razak, S. A., & Vikineswary, S. (2012). Chemical Composition and Nutrient Digestibility of Super Worm Meal in Red Tilapia Juvenile. *Pakistan Veterinary Journal*, **32(4)**.

Jackson, J. B., Kirby, M. X., Berger, W. H., Bjorndal, K. A., Botsford, L. W., Bourque, B. J., Hughes, T. P. (2001). Historical overfishing and the recent collapse of coastal ecosystems. *science*, **293(5530)**, 629-637.

Jackson, A. (2012). Fishmeal and fish oil and its role in sustainable aquaculture. *International aquafeed*, **15(1)**, 18-21.

Jalili, R., Tukmechi, A., Agh, N., Noori, F., Ghasemi, A. (2013). Replacement of dietary fish meal with plant sources in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*); effect on growth performance, immune responses, blood indices and disease resistance. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, **12(3)**, 577-591.

Ji, H., Zhang, J. L., Huang, J. Q., Cheng, X. F., Liu, C. (2015). Effect of replacement of dietary fish meal with silkworm pupae meal on growth performance, body composition, intestinal protease activity and health status in juvenile Jian carp (*C yprinus carpio* var. Jian). *Aquaculture Research*, **46(5)**, 1209-1221.

Józefiak, D., Józefiak, A., Kierończyk, B., Rawski, M., Świątkiewicz, S., Długosz, J., & Engberg, R. M. (2016). 1. Insects A Natural Nutrient Source for Poultry A Review. *Annals of Animal Science*, **16(2)**, 297-313.

Kader, M. A., Bulbul, M., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., Nguyen, B. T., Komilus, C. F. (2012). Effect of complete replacement of fishmeal by dehulled soybean meal with crude attractants supplementation in diets for red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture*, **350**, 109-116.

Kalová, M., Borkovcová, M. (2013). Voracious larvae *Hermetia illucens* and treatment of selected types of biodegradable waste. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, **61(1)**, 77-83.

Karapanagiotidis, I. T., Daskalopoulou, E., Vogiatzis, I., Rumbos, C., Mente, E., Athanassiou, C. G. (2014). Substitution of fishmeal by fly *Hermetia illucens* prepupae meal in the diet of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Hydromedit 2014*, Volos, Greece, 13-15 November, 2014, 110-114.

Kaushik, S. J., Cravedi, J. P., Lalles, J. P., Sumpter, J., Fauconneau, B., Laroche, M. (1995). Partial or total replacement of fish meal by soybean protein on growth, protein utilization, potential estrogenic or antigenic effects, cholesterolemia and flesh quality in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, **133(3-4)**, 257-274.

Kaushik, S. J., Coves, D., Dutto, G., Blanc, D. (2004). Almost total replacement of fish meal by plant protein sources in the diet of a marine teleost, the European seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, **230(1-4)**, 391-404.

Kissil, G. W., Lupatsch, I. (2004). Successful replacement of fishmeal by plant proteins in diets for the gilthead seabream, *Sparus aurata* L.

Kohla, U., Saint-Paul, U., Friebe, J., Wernicke, D., Bfa, V. H., Bravm, E., Gropp, J. (1992). Growth, digestive enzyme activities and hepatic glycogen levels in juvenile *Colossoma macropomum* Cuvier from South America during feeding, starvation and refeeding. *Aquaculture research*, **23(2)**, 189-208.

Kokou, F., Rigos, G., Henry, M., Kentouri, M., Alexis, M. (2012). Growth performance, feed utilization and non-specific immune response of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed graded levels of a bioprocessed soybean meal. *Aquaculture*, **364**, 74-81.

Kris-Etherton, P. M., Grieger, J. A., Etherton, T. D. (2009). Dietary reference intakes for DHA and EPA. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, **81(2-3)**, 99-104.

Krogdahl, A. (1990). Alternative protein sources from plants contain antinutrients affecting digestion in salmonids. In: TAKEDA, M. & WATANABE, T. (eds.) *The Current Status of Fish Nutrition in Aquaculture. The Proceedings of the Third International Symposium on Feeding and Nutrition in Fish.* August 28 September 1, 1989, Toba, Japan.

Krogdahl, A., Penn, M., Thorsen, J., Refstie, S., Bakke, A. M. (2010). Important antinutrients in plant feedstuffs for aquaculture: an update on recent findings regarding responses in salmonids. *Aquaculture Research*, **41**, 333-344.

Le Boucher, R., Quillet, E., Vandeputte, M., Lecalvez, J. M., Goardon, L., Chatain, B., Dupont-Nivet, M. (2011). Plant-based diet in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum): Are there genotype-diet interactions for main production traits when fish are fed marine vs. plant-based diets from the first meal?. *Aquaculture*, **321(1-2)**, 41-48.

Le Boucher, R., Dupont-Nivet, M., Vandeputte, M., Kerneis, T., Goardon, L., Labbe, L., Quillet, E. (2012). Selection for adaptation to dietary shifts: towards sustainable breeding of carnivorous fish. *PloS one*, **7(9)**, e44898.

Li, Q., Zheng, L., Qiu, N., Cai, H., Tomberlin, J. K., Yu, Z. (2011). Bioconversion of dairy manure by black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) for biodiesel and sugar production. *Waste management*, **31(6)**, 1316-1320.

Li, Y., Ai, Q., Mai, K., Xu, W., Deng, J., Cheng, Z. (2014). Comparison of high-protein soybean meal and commercial soybean meal partly replacing fish meal on the activities of digestive enzymes and aminotransferases in juvenile Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus* (Cuvier, 1828). *Aquaculture research*, **45(6)**, 1051-1060.

Li, S., Ji, H., Zhang, B., Zhou, J., Yu, H. (2017). Defatted black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal in diets for juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian): Growth performance, antioxidant enzyme activities, digestive enzyme activities, intestine and hepatopancreas histological structure. *Aquaculture*, **477**, 62-70.

Lin, S., Luo, L. (2011). Effects of different levels of soybean meal inclusion in replacement for fish meal on growth, digestive enzymes and transaminase activities in practical diets for juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Animal Feed Science and Technology*, **168(1-2)**, 80-87.

Lin, Y. H., Mui, J. J. (2017). Evaluation of dietary inclusion of housefly maggot (*Musca domestica*) meal on growth, fillet composition and physiological responses for barramundi, *Lates calcarifer*. *Aquaculture Research*, **48(5)**, 2478-2485.

Lindner, P. (1919). *Technical Biology*, **7**, 213

Lindsay, G. J., Walton, M. J., Adron, J. W., Fletcher, T. C., Cho, C. Y., Cowey, C. B. (1984). The growth of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) given diets containing chitin and its relationship to chitinolytic enzymes and chitin digestibility. *Aquaculture*, **37(4)**, 315-334.

Liener, I. E. (1980). *Toxic constituents of plant foodstuffs*. New York, Academic Press.

Lock, E. J., Arsiwalla, T., Waagbø, R. (2014). Insect meal: A promising source of nutrients in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*). In 1st International Conference “Insects to Feed the World (p. 67).

Lock, E. R., Arsiwalla, T., Waagbø, R. (2016). Insect larvae meal as an alternative source of nutrients in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*) postsmolt. *Aquaculture Nutrition*, **22(6)**, 1202-1213.

Magalhães, R., Coutinho, F., Pousão-Ferreira, P., Aires, T., Oliva-Teles, A., Peres, H. (2015). Corn distiller's dried grains with solubles: Apparent digestibility and digestive enzymes activities in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) and meagre (*Argyrosomus regius*). *Aquaculture*, **443**, 90-97.

Magalhães, R., Sánchez-López, A., Leal, R. S., Martínez-Llorens, S., Oliva-Teles, A., Peres, H. (2017). Black soldier fly (*Hermetia illucens*) pre-pupae meal as a fish meal replacement in diets for European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, **476**, 79-85.

Makkar, H. P. S. (1993). Antinutritional factors in foods for livestock. In: GILL, M., Owen, E., Pollot, G. E., Lawrence, T. L. J. (eds.) *Animal Production in Developing Countries*. England: British Society of Animal Production.

Makkar, H. P., Tran, G., Heuzé, V., Ankers, P. (2014). State-of-the-art on use of insects as animal feed. *Animal Feed Science and Technology*, **197**, 1-33.

Malette, W. G., Quigley Jr, H. J. (1986). U.S. Patent No. 4,605,623. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Mamauag, R. E. P., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., Gao, J., Nguyen, B. T., Ragaza, J. A. (2011). Soy peptide inclusion levels influence the growth performance, proteolytic enzyme activities, blood biochemical parameters and body composition of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, **321(3-4)**, 252-258.

Manzano-Agugliaro, F., Sanchez-Muros, M. J., Barroso, F. G., Martínez-Sánchez, A., Rojo, S., Pérez-Bañón, C. (2012). Insects for biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **16(6)**, 3744-3753.

Marono, S., Piccolo, G., Loponte, R., Di Meo, C., Attia, Y. A., Nizza, A., Bovera, F. (2015). In vitro crude protein digestibility of *Tenebrio molitor* and *Hermetia illucens* insect meals and its correlation with chemical composition traits. *Italian Journal of Animal Science*, **14(3)**, 3889.

Martínez-Llorens, S., Baeza-Ariño, R., Nogales-Mérida, S., Jover-Cerdá, M., Tomás-Vidal, A. (2012). Carob seed germ meal as a partial substitute in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) diets: Amino acid retention, digestibility, gut and liver histology. *Aquaculture*, **338**, 124-133.

Martínez-Llorens, S., Vidal, A. T., Moñino, A. V., Torres, M. P., Cerdá, M. J. (2007). Effects of dietary soybean oil concentration on growth, nutrient utilization and muscle fatty acid composition of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture Research*, **38(1)**, 76-81.

Maurer, V., Holinger, M., Amsler, Z., Früh, B., Wohlfahrt, J., Stamer, A., Leiber, F. (2016). Replacement of soybean cake by *Hermetia illucens* meal in diets for layers. *Journal of Insects as Food and Feed*, **2(2)**, 83-90.

Maynard L.A., Loosli, J.K. (1969). *Animal Nutrition*. McGraw-Hill, New York.

Mérida, S. N., Tomás-Vidal, A., Martínez-Llorens, S., Cerdá, M. J. (2010). Sunflower meal as a partial substitute in juvenile sharpsnout sea bream (*Diplodus puntazzo*) diets: amino acid retention, gut and liver histology. *Aquaculture*, **298(3-4)**, 275-281.

Merrifield, D. L., Bradley, G., Harper, G. M., Baker, R. T. M., Munn, C. B., Davies, S. J. (2011). Assessment of the effects of vegetative and lyophilized *Pediococcus acidilactici* on growth, feed utilization, intestinal colonization and health parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*). *Aquaculture Nutrition*, **17(1)**, 73-79.

Messina, M., Piccolo, G., Tulli, F., Messina, C. M., Cardinaletti, G., Tibaldi, E. (2013). Lipid composition and metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) fed diets containing wheat gluten and legume meals as substitutes for fish meal. *Aquaculture* **376**, 6-14.

- Ming J., Ye J., Zhang Y., Yang X., Wu C., Shao X., Liu P. (2013).** The influence of maggot meal and l-carnitine on growth, immunity, antioxidant indices and disease resistance of black carp (*Mylopharyngodon piceus*). J. Chinese Cereals Oils Association, **28**, 80-86.
- Monge-Ortiz, R., Martínez-Llorens, S., Márquez, L., Moyano, F. J., Jover-Cerdá, M., Tomás-Vidal, A. (2016).** Potential use of high levels of vegetal proteins in diets for market-sized gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Archives of animal nutrition, **70(2)**, 155-172.
- MiPAAF (2008).** Azione di monitoraggio delle produzioni ittiche dell'acquacoltura italiana - Relazione Finale Produzioni Anni 2002-2006 - IDROCONSULT Srl: 289 pp.
- MiPAAF (2014).** Piano Strategico per l' Acquacoltura in Italia (2014-2020). pp.282.
- Montero, D., Kalinowski, T., Obach, A., Robaina, L., Tort, L., Caballero, M. J., Izquierdo, M. S. (2003).** Vegetable lipid sources for gilthead seabream (*Sparus aurata*): effects on fish health. Aquaculture, **225(1-4)**, 353-370.
- Moutinho, S., Martínez-Llorens, S., Tomás-Vidal, A., Jover-Cerdá, M., Oliva-Teles, A., Peres, H. (2017).** Meat and bone meal as partial replacement for fish meal in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles: Growth, feed efficiency, amino acid utilization, and economic efficiency. Aquaculture, **468**, 271-277.
- Munilla-Morán, R., Saborido-Rey, F. (1996).** Digestive enzymes in marine species. II. Amylase activities in gut from seabream (*Sparus aurata*), turbot (*Scophthalmus maximus*) and redfish (*Sebastes mentella*). Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, **113(4)**, 827-834.
- Muzzarelli, R. A., Xia, W., Tomasetti, M., Ilari, P. (1995).** Depolymerization of chitosan and substituted chitosans with the aid of a wheat germ lipase preparation. Enzyme and Microbial Technology, **17(6)**, 541-545.
- Nagayama, F., Saito, Y. (1968).** Distribution of amylase- and β -glucosidase and β -galactosidase in fish. Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish, **34**, 944-949.
- Nakagaki, B. J., Defoliart, G. R. (1991).** Comparison of diets for mass-rearing *Acheta domesticus* (Orthoptera: Gryllidae) as a novelty food, and comparison of food conversion efficiency with values reported for livestock. Journal of Economic Entomology, **84(3)**, 891-896.

Natalia, Y., Hashim, R., Ali, A., Chong, A. (2004). Characterization of digestive enzymes in a carnivorous ornamental fish, the Asian bony tongue *Scleropages formosus* (Osteoglossidae). *Aquaculture*, **233(1-4)**, 305-320.

Newton, G. L., Booram, C. V., Barker, R. W., Hale, O. M. (1977). Dried *Hermetia illucens* larvae meal as a supplement for swine. *Journal of Animal Science*, **44(3)**, 395-400.

Newton, G. L., Sheppard, D. C., Watson, D. W., Burtle, G. J., Dove, C. R., Tomberlin, J. K., Thelen, E. E. (2005). The black soldier fly, *Hermetia illucens*, as a manure management/resource recovery tool. In Symposium on the state of the science of Animal Manure and Waste Management (pp. 5-7).

Newton, L., Sheppard, C., Watson, D. W., Burtle, G., Dove, R. (2005). Using the black soldier fly, *Hermetia illucens*, as a value-added tool for the management of swine manure. Animal and Poultry Waste Management Center, North Carolina State University, Raleigh, NC, 17.

Ng, W. K., Liew, F. L., Ang, L. P., Wong, K. W. (2001). Potential of mealworm (*Tenebrio molitor*) as an alternative protein source in practical diets for African catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture Research*, **32**, 273-280.

Nguyen, T. T., Tomberlin, J. K., Vanlaerhoven, S. (2013). Influence of resources on *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) larval development. *Journal of Medical Entomology*, **50(4)**, 898-906.

Ogunji, J. O. (2004). Alternative protein sources in diets for farmed tilapia. In Nutrition Abstracts and Reviews, Series B, Livestock Feeds and Feeding, (Vol. **74**, No. 9). CAB International.

Ogunji, J. O., Kloas, W., Wirth, M., Neumann, N., Pietsch, C. (2008). Effect of housefly maggot meal (maggot meal) diets on the performance, concentration of plasma glucose, cortisol and blood characteristics of *Oreochromis niloticus* fingerlings. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, **92(4)**, 511-518.

Oliva-Teles, A., Enes, P., Peres, H. (2015). Replacing fishmeal and fish oil in industrial aquafeeds for carnivorous fish. In Feed and Feeding Practices in Aquaculture (pp. 203-233).

Oonincx, D. G., De Boer, I. J. (2012). Environmental impact of the production of mealworms as a protein source for humans—a life cycle assessment. *PLoS one*, **7(12)**, e51145.

Oonincx, D. G., Van Broekhoven, S., Van Huis, A., van Loon, J. J. (2015). Feed conversion, survival and development, and composition of four insect species on diets composed of food by-products. *PLoS One*, **10(12)**, e0144601.

- Palmegiano, G. B., Daprà, F., Forneris, G., Gai, F., Gasco, L., Guo, K., Zoccarato, I. (2006).** Rice protein concentrate meal as a potential ingredient in practical diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, **258(1-4)**, 357-367.
- Papatryphon, E., Soares, J. H. (2001).** The effect of phytase on apparent digestibility of four practical plant feedstuffs fed to striped bass, *Morone saxatilis*. *Aquaculture Nutrition*, **7(3)**, 161-168.
- Pereira, T. G., Oliva-Teles, A. (2003).** Evaluation of corn gluten meal as a protein source in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) juveniles. *Aquaculture Research*, **34(13)**, 1111-1117.
- Peres, H., Oliva-Teles, A. (1999).** Effect of dietary lipid level on growth performance and feed utilization by European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, **179(1-4)**, 325-334.
- Piccolo, G., Marono, S., Gasco, L., Iannaccone, F., Bovera, F., Nizza, A. (2014).** Use of *Tenebrio molitor* larvae meal in diets for Gilthead seabream *Sparus aurata* juveniles. In 1st International conference “Insects to Feed the World” (pp. 68-68).
- Piccolo, G., Iaconisi, V., Marono, S., Gasco, L., Loponte, R., Nizza, S., Parisi, G. (2017).** Effect of *Tenebrio molitor* larvae meal on growth performance, in vivo nutrients digestibility, somatic and marketable indexes of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Animal Feed Science and Technology*, **226**, 12-20.
- Rana, K. J., Siriwardena, S., Hasan, M. R. (2009).** Impact of rising feed ingredient prices on aquafeeds and aquaculture production (No. 541). Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Rapatsa, M. M., Moyo, N. A. (2017).** Evaluation of *Imbrasia belina* meal as a fishmeal substitute in *Oreochromis mossambicus* diets: Growth performance, histological analysis and enzyme activity. *Aquaculture Reports*, **5**, 18-26.
- Reimer, G. (1982).** The influence of diet on the digestive enzymes of the Amazon fish Matrinxã, *Brycon cf. melanopterus*. *Journal of Fish Biology*, **21(6)**, 637-642.
- Renna, M., Schiavone, A., Gai, F., Dabbou, S., Lussiana, C., Malfatto, V., De Marco, M. (2017).** Evaluation of the suitability of a partially defatted black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) larvae meal as ingredient for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) diets. *Journal of animal science and biotechnology*, **8(1)**, 57.

- Roncarati, A., Gasco, L., Parisi, G., Terova, G. (2015).** Growth performance of common catfish (*Ameiurus melas* Raf.) fingerlings fed mealworm (*Tenebrio molitor*) diet. *Journal of Insects as Food and Feed*, **1(3)**, 233-240.
- Rozin, P. (2008).** Hedonic "adaptation": Specific habituation to disgust/death elicitors as a result of dissecting a cadaver. *Judgment and Decision Making*, **3(2)**, 191.
- Sabapathy, U., Teo, L. H. (1993).** A quantitative study of some digestive enzymes in the rabbitfish, *Siganus canaliculatus* and the sea bass, *Lates calcarifer*. *Journal of Fish Biology*, **42(4)**, 595-602.
- Salze, G., McLean, E., Battle, P. R., Schwarz, M. H., Craig, S. R. (2010).** Use of soy protein concentrate and novel ingredients in the total elimination of fish meal and fish oil in diets for juvenile cobia, *Rachycentron canadum*. *Aquaculture*, **298(3-4)**, 294-299.
- Sánchez-Muros, M. J., Barroso, F. G., Manzano-Agugliaro, F. (2014).** Insect meal as renewable source of food for animal feeding: a review. *Journal of Cleaner Production*, **65**, 16-27.
- Sánchez-Muros, M., De Haro, C., Sanz, A., Trenzado, C. E., Villareces, S., Barroso, F. G. (2016).** Nutritional evaluation of *Tenebrio molitor* meal as fishmeal substitute for tilapia (*Oreochromis niloticus*) diet. *Aquaculture Nutrition*, **22(5)**, 943-955.
- Saroglia, M., Ingle, E. (1992).** *Tecniche di acquacoltura*. Edagricole, Bologna, 290.
- Schiavone, A., Cullere, M., De Marco, M., Meneguz, M., Biasato, I., Bergagna, S., Dalle Zotte, A. (2017).** Partial or total replacement of soybean oil by black soldier fly larvae (*Hermetia illucens* L.) fat in broiler diets: effect on growth performances, feed-choice, blood traits, carcass characteristics and meat quality. *Italian Journal of Animal Science*, **16(1)**, 93-100.
- Sealey, W. M., Gaylord, T. G., Barrows, F. T., Tomberlin, J. K., McGuire, M. A., Ross, C., St-Hilaire, S. (2011).** Sensory analysis of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, fed enriched black soldier fly prepupae, *Hermetia illucens*. *Journal of the World Aquaculture Society*, **42(1)**, 34-45.
- Sheppard, D. C., Newton, G. L., Thompson, S. A., Savage, S. (1994).** A value added manure management system using the black soldier fly. *Bioresource technology*, **50(3)**, 275-279.

- Sicuro, B., Piccinno, M., Daprà, F., Gai, F., Vilella, S. (2015).** Utilization of rice protein concentrate in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt) nutrition. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **15**, 313-319.
- Siemianowska, E., Kosewska, A., Aljewicz, M., Skibniewska, K. A., Polak-Juszczak, L., Jarocki, A., Jędras, M. (2013).** Larvae of mealworm (*Tenebrio molitor* L.) as European novel food. *Agricultural Sciences*, **4(06)**, 287.
- Simões-Nunes, C. (1987).** Factores antinutricionais nos alimentos. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, **82**, 151-168.
- Sitjà-Bobadilla, A., Peña-Llopis, S., Gómez-Requeni, P., Médale, F., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J. (2005).** Effect of fish meal replacement by plant protein sources on non-specific defence mechanisms and oxidative stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, **249(1-4)**, 387-400.
- Smith, A. G., Gangolli, S. D. (2002).** Organochlorine chemicals in seafood: occurrence and health concerns. *Food and Chemical Toxicology*, **40(6)**, 767-779.
- Smith, B. W., Lovell, R. T. (1973).** Determination of apparent protein digestibility in feeds for channel catfish. *Transactions of the American Fisheries Society*, **102(4)**, 831-5.
- Sogbesan, O. A. (2006).** Nutritive potentials and utilization of garden snail (*Limicolaria aurora*) meat meal in the diet of *Clarias gariepinus* fingerlings. *African Journal of Biotechnology*, **5(20)**.
- Spackman, D. H., Stein, W. H., Moore, S. (1958).** Automatic recording apparatus for use in chromatography of amino acids. *Analytical chemistry*, **30(7)**, 1190-1206.
- Stead, S. M., Laird, L. (2002).** *The handbook of salmon farming*. Springer Science & Business Media.
- St-Hilaire, S., Cranfill, K., McGuire, M. A., Mosley, E. E., Tomberlin, J. K., Newton, L., Irving, S. (2007a).** Fish offal recycling by the black soldier fly produces a foodstuff high in omega-3 fatty acids. *Journal of the World Aquaculture Society*, **38(2)**, 309-313.
- St-Hilaire, S., Sheppard, C., Tomberlin, J. K., Irving, S., Newton, L., McGuire, M. A., Sealey, W. (2007b).** Fly prepupae as a feedstuff for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of the World Aquaculture Society*, **38(1)**, 59-67.
- Sturmbauer, C., Mark, W., Dallinger, R. (1992).** Ecophysiology of Aufwuchs-eating cichlids in Lake Tanganyika: niche separation by trophic specialization. *Environmental Biology of Fishes*, **35(3)**, 283-290.

Subasinghe, R., Soto, D., Jia, J. (2009). Global aquaculture and its role in sustainable development. *Reviews in Aquaculture*, **1**, 2-9.

Suominen, K., Hallikainen, A., Ruokojärvi, P., Airaksinen, R., Koponen, J., Rannikko, R., Kiviranta, H. (2011). Occurrence of PCDD/F, PCB, PBDE, PFAS, and organotin compounds in fish meal, fish oil and fish feed. *Chemosphere*, **85(3)**, 300-306.

Surendra, K. C., Olivier, R., Tomberlin, J. K., Jha, R., Khanal, S. K. (2016). Bioconversion of organic wastes into biodiesel and animal feed via insect farming. *Renewable energy*, **98**, 197-202.

Tacon, A. G. (1993). Feed ingredients for warmwater fish, fish meal and other processed feedstuffs. *FAO Fisheries Circular (FAO). no. 856*.

Tacon, A. G. (1995). Feed ingredients for carnivorous fish species: alternatives to fishmeal and other fishery resources. *Sustainable fish farming*, 89-114.

Tacon, A. G. (1997). Feeding tomorrow's fish: keys for sustainability. *Feeding Tomorrow's Fish (AGJ Tacon and B. Basurco, editors). Cahiers Options Mediterraneennes*, **22**, 11-33.

Tacon, A. G., Hasan, M. R., Metian, M. (2011). Demand and supply of feed ingredients for farmed fish and crustaceans: trends and prospects. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*, **(564)**, I.

Takagi, M., Shoji, E., Taniguchi, N. (1999). Microsatellite DNA polymorphism to reveal genetic divergence in ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Fisheries science*, **65(4)**, 507-512.

Tangendjaja, B. (2015). Quality control of feed ingredients for aquaculture. In *Feed and Feeding Practices in Aquaculture* (pp. 141-169).

Taufek, N. M., Aspani, F., Muin, H., Raji, A. A., Razak, S. A., Alias, Z. (2016). The effect of dietary cricket meal (*Gryllus bimaculatus*) on growth performance, antioxidant enzyme activities, and haematological response of African catfish (*Clarias gariepinus*). *Fish physiology and biochemistry*, **42(4)**, 1143-1155.

Tomberlin, J. K., Sheppard, D. C. (2002). Factors influencing mating and oviposition of black soldier flies (Diptera: Stratiomyidae) in a colony. *Journal of Entomological Science*, **37(4)**, 345-352.

Tran, G., Heuzé, V., Makkar, H. P. S. (2015). Insects in fish diets. *Animal frontiers*, **5(2)**, 37-44.

- Trenzado, C., Hidalgo, M. C., García-Gallego, M., Morales, A. E., Furné, M., Domezain, A., Sanz, A. (2006).** Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in sturgeon *Acipenser naccarii* and trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. *Aquaculture*, **254(1-4)**, 758-767.
- Tschirner, M., Simon, A. (2015).** Influence of different growing substrates and processing on the nutrient composition of black soldier fly larvae destined for animal feed. *Journal of Insects as Food and Feed*, **1(4)**, 249-259.
- Van Huis, A. (2013).** Potential of insects as food and feed in assuring food security. *Annual Review of Entomology*, **58**, 563-583.
- Walter, H. E. (1984).** Proteases and their inhibitors. 2. 15. 2 Method with haemoglobin, casein and azocoll as substrate. *Methods of enzymatic analysis*, 270-277.
- Wassef, E., Eisawy, A. (1985).** Food and feeding habits of wild and reared glithead bream *Sparus aurata* L. *Cybum*, **9(3)**, 233-242.
- Wassef, E. A., Wahby, O. M., Sakr, E. M. (2007).** Effect of dietary vegetable oils on health and liver histology of gilthead seabream (*Sparus aurata*) growers. *Aquaculture Research*, **38(8)**, 852-861.
- Watson, A. M., Barrows, F. T., Place, A. R. (2013).** Taurine supplementation of plant derived protein and n-3 fatty acids are critical for optimal growth and development of Cobia, *Rachycentron canadum*. *Lipids*, **48(9)**, 899-913.
- Watson, A. M., Barrows, F. T., Place, A. R. (2013).** Taurine supplemented plant protein based diets with alternative lipid sources for juvenile gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, **4**, 59-66.
- Welch, A., Hoenig, R., Stieglitz, J., Benetti, D., Tacon, A., Sims, N., O'Hanlon, B. (2010).** From fishing to the sustainable farming of carnivorous marine finfish. *Reviews in Fisheries Science*, **18(3)**, 235-247.
- Whitley, S. N., Bollens, S. M. (2014).** Fish assemblages across a vegetation gradient in a restoring tidal freshwater wetland: diets and potential for resource competition. *Environmental biology of fishes*, **97(6)**, 659-674.
- Wilson, R.P. (2002).** Amino acids and proteins. J.E. Halver and R.W. Hardy, (Ed.), *Fish Nutrition*, Third Edition, Academic Press, San Diego: 144-175.
- Xiao, X., Jin, P., Zheng, L., Cai, M., Yu, Z., Yu, J., Zhang, J. (2018).** 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*). *Aquaculture Research*, **49(4)**, 1569-1577.

Yu, D. H., Gong, S. Y., Yuan, Y. C., Lin, Y. C. (2013). Effects of replacing fish meal with soybean meal on growth, body composition and digestive enzyme activities of juvenile Chinese sucker, *Myxocyprinus asiaticus*. *Aquaculture Nutrition*, **19(1)**, 84-90.

Zhou, Q. C., Wu, Z. H., Tan, B. P., Chi, S. Y., Yang, Q. H. (2006). Optimal dietary methionine requirement for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture*, **258(1-4)**, 551-557.

Zhou, J. S., Liu, S. S., Ji, H., Yu, H. B. (2018). Effect of replacing dietary fish meal with black soldier fly larvae meal on growth and fatty acid composition of Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquaculture Nutrition*, **24(1)**, 424-433.

Zuidhof, M. J., Molnar, C. L., Morley, F. M., Wray, T. L., Robinson, F. E., Khan, B. A., Goonewardene, L. A. (2003). Nutritive value of house fly (*Musca domestica*) larvae as a feed supplement for turkey poults. *Animal feed science and technology*, **105(1-4)**, 225-230.

WEB REFERENCE

FAO Fishstat: <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en>

Aquall: <https://yourstory.com/2015/09/innasoft-aquall/>

Feedipedia: <https://www.feedipedia.org/node/16388>

Indexmundi: <https://www.indexmundi.com/>