



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE

**LARVE DI MOSCA SOLDATO NERA
ALLEVATE SU SOTTOPRODOTTI DELLA
TORREFAZIONE DEL CAFFÈ ARRICCHITI
CON MICROALGHE**

**Black soldier fly larvae reared on coffee by-product
enriched with microalgae**

TIPO TESI: Sperimentale

Studente:
BENEDETTA MONTEFIORE

Relatore:
PROF. SSA PAOLA RIOLO

Correlatore:
DOTT. NINO LORETO

ANNO ACCADEMICO 2018-2019

A mia madre Adelina e a mio padre Gabriele.
Grazie.

ELENCO DELLE TABELLE.....	5
ELENCO DELLE FIGURE	6
ELENCO DEI GRAFICI.....	7
ACRONIMI E ABBREVIAZIONI.....	8
1. INTRODUZIONE	9
1.1 Gli insetti.....	9
1.2 Perché gli insetti nei mangimi.....	9
1.3 Normative vigenti	11
1.4 Insetti come ingredienti di mangimi destinati all'acquacoltura.....	15
1.5 Tipologie di mangimi.....	17
1.5.1 Le materie prime e gli additivi	18
1.5.2 Mangimi tradizionali.....	19
1.5.3 Mangimi alternativi.....	20
1.6 Produzione e lavorazione del caffè.....	22
1.6.1 La coltivazione del caffè.....	22
1.6.2 Scarti e sottoprodotti dell'industria del caffè.....	22
1.6.3 Coffee Silverskin.....	25
1.6.4 Il chicco di caffè.....	25
1.6.5 La composizione chimica del chicco di caffè.....	26
1.7 Microalghe.....	27
2. HERMETIA ILLUCENS.....	29
2.1 Distribuzione e habitat.....	29
2.2 Ciclo di sviluppo.....	30
2.3 Prepupa.....	32
2.4 Pupa.....	32
2.5 Adulto.....	32
2.6 <i>Hermetia illucens</i> come bioconvertitore di sostanza organica.....	33

2.7 <i>Hermetia illucens</i> come alimento animale.....	34
3. SCOPO DELLA TESI.....	35
4. MATERIALI E METODI	36
4.1 Composizione dei substrati di crescita larvale.....	36
4.2 Le prove sperimentali.....	37
4.3 Analisi statistica.....	39
5. RISULTATI.....	40
5.1 Tempo di sviluppo lavale.....	40
5.2 Incremento ponderale delle larve sulle diverse diete sperimentali.....	40
5.3 Peso dell'ultima età larvale.....	41
5.4 Tasso di mortalità.....	42
6. CONCLUSIONI.....	44
RINGRAZIAMENTI.....	46
BIBLIOGRAFIA.....	48
SITOGRAFIA	57

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1: Preparazione delle diete sperimentali.....	36
Tabella 2: Specifiche relative alla composizione delle diete.....	37
Tabella 3: Specifiche delle diete impiegate per la prima fase di produzione di insetti.....	40
Tabella: Performance larvali di <i>Hermetia illucens</i> allevate sulle diverse diete sperimentali	40

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1: Drupa di caffè.....	25
Figura 2: Ciclo di sviluppo di <i>Hermetia illucens</i>	31
Figura 3: Camera climatica con all'interno i box in cui avviene la crescita.....	38

ELENCO DEI GRAFICI

Grafico 1: Incremento ponderale larvale nel tempo sulle cinque diete.....	41
Grafico 2: Peso medio delle prepupe allevate sulle diverse diete sperimentali.....	42
Grafico 3: Sopravvivenza di larve di <i>Hermetia illucens</i> su diverse diete composte da CS e diversa percentuale di alga <i>Schizochytrium</i> sp.....	43

ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

SIGLA1	SOA – SOTTOPRODOTTI DI ORIGINE ANIMALE
SIGLA2	PAT – PROTEINE ANIMALE TRASFORMATE
SIGLA3	TSE – ENCEFALOPATIE SPONGIFORMI TRASMISSIBILI
SIGLA4	EFSA – ENTE EUROPEO SULLA SICUREZZA ALIMENTARE
SIGLA5	IPIFF – INTERNATIONAL PRODUCERS OF INSECTS FOR FOOD AND FEED
SIGLA6	BSF – BLACK SOLDIER FLY
SIGLA7	CAGR – TASSO ANNUO DI CRESCITA COMPOSTO
SIGLA8	CS – COFFEE SILVERSKIN
SIGLA9	SCG – FONDI DI CAFFÈ ESAUSTI
SIGLA 10	CM – MELANOIDINE DEL CAFFÈ
SIGLA 11	UR – UMIDITÀ RELATIVA
SIGLA 12	PUFA – ACIDI POLINSATURI GRASSI
SIGLA 13	DHA - ACIDO DOCOSAESAENOICO
SIGLA 14	EPA - ACIDO EICOSAPENTAENOICO

1. INTRODUZIONE

1.1 Gli insetti

La parola “insetto” deriva dal termine latino *insectum*, ovvero “con un corpo diviso”, dovuto alla tripartizione del corpo. Gli insetti o entomi (Linnaeus, 1758), sono una classe di animali appartenenti al phylum degli Arthropoda. Questa classe costituisce il più grande tra i raggruppamenti di animali che popolano la Terra, annoverando oltre un milione di specie. Il rinvenimento di fossili di insetti risalenti al Devoniano ha permesso di classificarli come i più antichi colonizzatori delle terre emerse. L'eterogeneità nella morfologia, nell'anatomia, nella biologia e nell'etologia ha conferito agli insetti, da oltre 300 milioni di anni, un ruolo di primo piano nella colonizzazione della Terra, in qualsiasi ambiente in cui vi sia sostanza organica, con manifestazioni di una notevole capacità di competizione. Sono organismi che, in positivo o in negativo, hanno una stretta relazione con l'uomo e le sue attività, fino a condizionarne, più o meno direttamente, l'economia, l'alimentazione, le abitudini e la salute. L'elevato numero di specie presenti in questa classe ha portato all'evoluzione di una branca specifica della Zoologia, detta Entomologia, a sua volta suddivisa in differenti rami di specializzazione.

La grande diffusione e differenziazione degli insetti ha permesso il loro utilizzo:

- come organismi ausiliari nella lotta biologica o nella lotta biotecnica;
- per ricavarne sostanze utilizzate per vari scopi, come coloranti, lacca, seta, cera, soprattutto in passato prima dell'avvento della chimica industriale;
- nell'alimentazione umana e animale (<http://www.food-insects.com>).

1.2 Perché gli insetti nei mangimi

Con l'aumento della popolazione mondiale, che secondo la FAO nel 2050 supererà i 9 miliardi di persone, è previsto un incremento della domanda di alimenti di origine animale e, di conseguenza, di materie prime convenzionali destinate alla produzione

di mangimi. Secondo la Federazione Internazionale dei Produttori di Mangimi, la produzione mondiale è stata di 720 milioni di tonnellate solo nel 2010. L'aumento riscontrato nel consumo di prodotti di origine animale richiede un approccio innovativo all'alimentazione animale e alla ricerca di nuove fonti proteiche con lo scopo di sviluppare mangimi ecosostenibili per garantire la sostenibilità delle produzioni zootecniche e la salvaguardia delle risorse naturali (Sogari *et al.*, 2019). Poiché le materie prime usate come fonti proteiche e lipidiche, fino ad oggi, provengono in maggior parte dalle coltivazioni industriali (soia, colza, girasole, cotone, ecc.) e dalla pesca (farina e olio di pesce) incrementarne ulteriormente l'utilizzo sarebbe insostenibile da un punto di vista sia economico sia ambientale. Consapevoli che il comparto delle produzioni animali rappresenta l'8% del consumo globale di acqua, principalmente per l'irrigazione delle colture destinate alla produzione di materie prime per alimenti zootecnici (FAO, 2009; Foley *et al.*, 2011, Makkar *et al.*, 2014), che il settore zootecnico è il responsabile del 15% dell'emissione dei gas serra (Gerber *et al.*, 2013) e che l'alimentazione animale incide per circa il 60% sui costi di produzione, la crescita della zootecnia dipenderà dalla disponibilità e dalla sostenibilità economico-ambientale delle materie prime. Dunque, si è reso necessario un cambiamento di rotta per scongiurare un ulteriore depauperamento delle risorse del pianeta. Per sviluppare mangimi ecosostenibili, la ricerca scientifica ha ricercato delle alternative proteiche innovative in grado di esaltare la biodiversità e di garantire la sostenibilità delle produzioni terrestri ed acquatiche. Tutte queste qualità, per la FAO, sono racchiuse nelle farine di insetti (o dalle loro forme larvali) che, mentre in svariate parti del mondo possono essere integrate negli alimenti zootecnici, all'interno della Comunità Europea il loro possibile impiego è oggetto di forte discussione (vedere Reg. UE 575/2011 e Reg. UE 56/2013) (van Huis *et al.*, 2013; Halloran *et al.*, 2015) ed è consentito solo per alcune specie, ed in pochi paesi. L'utilizzo degli insetti presenta numerosi vantaggi (Veldkamp *et al.*, 2012; van Huis *et al.*, 2013), che possono essere schematizzati come segue:

- fonte di nutrienti:
 - ottima alternativa nutritiva ad alimenti di origine animale;
 - alcuni insetti sono ricchi in proteine, grassi, vitamine e sali minerali (Bukkens, 2005; Rumpold e Schlüter, 2013);

- eco-sostenibilità:
 - producono quantitativi esigui di gas climalteranti;
 - il loro allevamento non necessita di grandi estensioni di terreno;
 - le emissioni di ammoniaca associate alla crescita degli insetti sono inferiori di quelle raggiunte da altri allevamenti (es. suini e bovini);
 - indice ottimale di conversione degli alimenti in proteine e peso corporeo;
 - basso consumo idrico;
- fattori economici e sociali:
 - l'allevamento di insetti può essere molto o poco meccanizzato, dipende dal livello di investimento;
 - l'allevamento di insetti offre guadagni anche alla parte più povera della società, richiede bassi investimenti e bassa tecnologia;
 - gli allevamenti su piccola scala offrono mezzi di sussistenza sia alla popolazione urbana che rurale.

Recentemente è stata dimostrata la possibilità di un loro allevamento massale (Veldkamp *et al.*, 2012) e a livello mondiale si stanno sviluppando realtà industriali per quanto riguarda questo comparto (van Huis *et al.*, 2013; Drew, 2014; Jeong, 2014; Roos *et al.*, 2014).

1.3 Normativa vigenti

L'utilizzo degli insetti come FOOD (cibo) e FEED (mangime) è regolamentato sia a livello nazionale che europeo da diverse normative. Queste chiariscono le modalità di allevamento e uso di tale materia prima e ne definiscono i caratteri distintivi.

Si parte dalla definizione data dal Ministero della salute per cui "I novel food, cioè i nuovi alimenti o i nuovi ingredienti alimentari, disciplinati dalla legislazione alimentare comunitaria con il Regolamento (CE) 258/97, sono tutti quei prodotti e sostanze alimentari per i quali non è dimostrabile un consumo "significativo" al 15 maggio 1997 all'interno dell'Unione Europea (UE), data di entrata in vigore del regolamento medesimo", si può far riferimento ad altre normative.

Il Regolamento CE 999/2001 reca disposizioni per la prevenzione, il controllo e l'eradicazione delle Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (TSE) nei bovini, negli

ovini e nei caprini. Esso si applica alla produzione e all'immissione sul mercato di animali vivi e di prodotti di origine animale e, in taluni casi specifici, all'esportazione degli stessi. L'articolo 7 del regolamento vieta la somministrazione ai ruminanti di proteine di origine animale (PAT). In diversi Stati membri è iniziato l'allevamento di insetti per la produzione di proteine animali da essi derivate e di altri derivati (olii) di insetti destinati agli alimenti per animali da compagnia. Tale produzione è effettuata nel quadro dei piani di controllo nazionali delle autorità competenti degli Stati membri. Nelle more dell'emanazione e pubblicazione nella Gazzetta ufficiale dell'Unione Europea (UE) della modifica del regolamento, l'uso delle PAT derivate da insetto è ammesso solo per le specie alle quali il FEEDBAN non si applica (animali da compagnia, animali da pelliccia e animali diversi dagli animali da allevamento).

Il Regolamento CE 183/2005 stabilisce i requisiti per l'igiene dei mangimi, a partire dalla produzione primaria fino alla somministrazione agli animali destinati alla produzione di alimenti, con lo scopo di assicurare un elevato livello di protezione della salute degli animali e dei consumatori mediante un controllo dei mangimi lungo tutta la filiera alimentare. Gli operatori dei mangimi sono direttamente responsabili della sicurezza dei mangimi stessi mediante l'attuazione di procedure basate sull'analisi dei rischi e sul controllo dei punti critici, mediante l'applicazione di buone pratiche igieniche (Ministero della Salute).

Il Regolamento CE 767/2009 entrato in vigore il 21 settembre 2009, fissa le norme che si riferiscono all'immissione sul mercato e all'uso dei mangimi per animali destinati alla produzione di alimenti e animali da compagnia e stabilisce inoltre i requisiti legati all'etichettatura, all'imballaggio e alla presentazione. Modifica il regolamento (CE) n. 1831/2003 e abroga le direttive 79/373/CEE del Consiglio, 80/511/CEE della Commissione, 82/471/CEE del Consiglio, 83/228/CEE del Consiglio, 93/74/CEE del Consiglio, 93/113/CE del Consiglio e 96/25/CE del Consiglio e la decisione 2004/217/CE della Commissione. Il Regolamento copre tutte le sostanze o i prodotti, inclusi gli additivi, siano essi lavorati, parzialmente lavorati o non lavorati, destinati all'alimentazione degli animali per via orale. Si applica indipendentemente dalle altre normative dell'UE vigenti in materia di alimentazione animale e senza avere alcun effetto su di esse. Il regolamento contempla: mangimi medicati; sostanze indesiderabili; sottoprodotti di origine animale

non destinati al consumo umano; alimenti e mangimi geneticamente modificati; la tracciabilità e l'etichettatura degli organismi geneticamente modificati; additivi; la produzione e l'etichettatura dei prodotti biologici. I mangimi devono soddisfare le prescrizioni in materia di sicurezza e di commercializzazione. In particolare, essi devono essere: sicuri; privi di effetti nocivi diretti sull'ambiente o sul benessere degli animali; sani, genuini, di qualità leale, adatti all'impiego previsto e di natura commerciabile; etichettati, imballati e presentati conformemente alla legislazione applicabile. Non devono contenere materiali la cui immissione sul mercato sia soggetta a restrizioni o vietata. Deve essere possibile tracciare i mangimi in tutte le fasi della produzione, della lavorazione e della distribuzione. Gli operatori del settore dei mangimi devono essere in grado di identificare chi ha fornito loro: mangimi; animali destinati alla produzione di alimenti; sostanze destinate o possibilmente destinate a essere aggiunte ai mangimi. I mangimi destinati o possibilmente destinati all'immissione sul mercato dell'UE devono essere etichettati o identificati in maniera tale da poter essere tracciati. Il Regolamento stabilisce le disposizioni generali relative all'etichettatura e alla presentazione di tutti i mangimi, come ad esempio l'obbligo di indicare: il tipo di mangime; il nome e l'indirizzo dell'operatore del settore dei mangimi; il numero di riferimento della partita o del lotto; le quantità nette; l'elenco degli additivi usati; il tenore di umidità. L'etichettatura e la presentazione devono essere chiaramente leggibili e indelebili. Non devono indurre l'utilizzatore in errore per quanto concerne l'uso previsto o le caratteristiche dei mangimi. Le materie prime per mangimi e i mangimi composti devono essere immessi sul mercato all'interno d'imballaggi o recipienti sigillati.

Nel Regolamento CE 1069/2009 i sottoprodotti di origine animale (SOA) sono classificati, ai sensi del regolamento (CE) n.1069/2009 in materiali di categoria 1, materiali di categoria 2 e materiali di categoria 3. Sulla base di questa categorizzazione i diversi tipi di SOA possono essere destinati ad utilizzi diversi. È possibile utilizzare alcune tipologie tal quali (non trasformate) per l'alimentazione degli animali d'affezione, degli animali da pelliccia e per alcuni tipi di animali definiti all'articolo 18 del regolamento stesso. L'articolo 18 del regolamento disciplina gli impieghi speciali dei SOA nei mangimi e prevede che i materiali di categoria 2 possano essere utilizzati, sulla base di norme autorizzative nazionali, per l'alimentazione di animali

da giardino zoologico, animali da circo, rettili e uccelli da preda, animali da pelliccia, animali selvatici, cani e gatti in asili, larve e vermi destinati a essere utilizzati come esche da pesca. I materiali di categoria 1 possono essere utilizzati, sempre nel caso che lo Stato Membro dell'UE ritenga opportuno regolamentarne l'autorizzazione, per l'alimentazione delle specie minacciate di estinzione o protette di uccelli necrofagi e degli animali da giardino zoologico. Per quanto riguarda l'utilizzo dei SOA nell'alimentazione degli animali da affezione è importante escludere l'utilizzo di materiali diversi dai materiali di categoria 3. Altre misure obbligatorie sono il divieto del cannibalismo e dell'utilizzo di rifiuti di cucina nell'alimentazione degli animali d'affezione (<http://www.veterinariaalimenti.marche.it/>). Nel regolamento (CE) 1069/2009 e (UE) 142/2011 sono definiti i parametri di trasformazione dei prodotti destinati alla produzione di mangimi destinati agli animali da affezione, i criteri per il riconoscimento e registrazione degli operatori, gli obblighi in tema di rintracciabilità e i criteri microbiologici che devono essere rispettati.

Il Regolamento UE 142, del 25 febbraio 2011, recante disposizioni di applicazione del regolamento (CE) n. 1069/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio (<https://www.coldiretti.it>), riporta norme sanitarie relative ai sottoprodotti di origine animale e ai prodotti derivati non destinati al consumo umano, e della direttiva 97/78/CE del Consiglio per quanto riguarda taluni campioni e articoli non sottoposti a controlli veterinari.

Con il Regolamento europeo 575/2011 è stato istituito il catalogo delle materie prime per mangimi e abrogato il Reg. Ue 242/2010 che ha stabilito la prima versione del catalogo. Permette agli operatori del settore mangimistico di utilizzare nomi/diciture più precisi per i mangimi immessi sul mercato. Si va incontro ad un perfezionamento dell'etichettatura dei mangimi al fine di incrementare trasparenza e rintracciabilità e perciò perfezionare la sicurezza dei prodotti. Le modifiche apportate riguardano sia voci nuove relative a processi di trattamento e a materie prime per mangimi che il miglioramento di voci esistenti relative, in particolare, a derivati di oli e grassi. Interessano inoltre il tenore massimo di impurità chimiche derivanti dal processo di fabbricazione e dai coadiuvanti tecnologici. Agli ex prodotti alimentari, come eccedenze di produzione, prodotti o alimenti che hanno superato la data di scadenza, se fabbricati in conformità alla legislazione alimentare, si devono applicare norme

specifiche.

Con il Regolamento (UE) N. 56/2013 del 16 gennaio 2013, la Commissione Europea ha disposto la sostituzione dell'allegato IV (Alimentazione degli animali) del regolamento (CE) n. 999/2001, con un nuovo allegato. La Commissione ha ritenuto "opportuno autorizzare nuovamente le PAT ottenute da specie non ruminanti e gli alimenti per animali contenenti tali proteine per l'alimentazione delle specie d'acquacoltura, fatta eccezione per le farine di pesce e per i mangimi composti contenenti farina di pesce, che sono già autorizzate nella produzione di mangimi per non ruminanti". Questa misura - applicata a partire dal 1° giugno 2013 - ha consentito ai pesci di allevamento di essere alimentati con farine animali. Le PAT di animali terrestri ruminanti restano invece vietate per qualsiasi animale da allevamento, ad eccezione degli animali da pelliccia.

1.4 Insetti come ingredienti di mangimi destinati all'acquacoltura

L'acquacoltura è l'allevamento di organismi acquatici attraverso l'utilizzo di tecniche che implicano forme di intervento umano variabili a seconda della tipologia di allevamento prescelta. Ad oggi è il settore di produzione alimentare in più rapida crescita in tutto il mondo e si stima che entro il 2030 fornirà il 62% del cibo richiesto (FAO, 2018). Il motivo di questa crescita dipende principalmente dal declino della pesca in cattività, dall'aumento della domanda globale di prodotti ittici, dai 9 miliardi di persone che si prevede cammineranno sulla Terra entro i prossimi 30 anni e dal conseguente raddoppio della produzione agricola (Gerland *et al.*, 2014; Guillen *et al.*, 2015). Inoltre, all'aumento della popolazione mondiale è associato un aumento significativo della produzione di rifiuti e sottoprodotti di diversa tipologia, e la Direttiva CE n. 2008/98, che stabilisce l'ordine di priorità nella scelta del trattamento dei rifiuti (il primo è il loro riutilizzo e l'ultimo è la loro discarica), vuole svolgere un ruolo centrale per un ulteriore sviluppo di un'economia circolare a livello europeo. Con queste consapevolezza, l'acquacoltura deve essere più responsabile, sostenibile e innovativa, basata sul concetto di economia circolare, in grado di fornire maggiori volumi di alimenti sani utilizzando ingredienti rispettosi dell'ambiente, promuovendo nel contempo le esigenze e il benessere dei pesci (Merino *et al.*, 2012; Tlusty e Thorsen, 2017; Stevens *et al.*, 2018; Bohnes e Laurent, 2019). L'acquacoltura da molti

anni si basa sull'uso di farina e olio di pesce come ingredienti principali in aquafeed (Tacon e Metian, 2008; Shepherd e Jackson, 2013); tuttavia, per il suo ulteriore sviluppo, gli ingredienti nutritivi e sostenibili devono essere identificati e testati (Alhazaa *et al.*, 2018; Sarker *et al.*, 2018; Vargas *et al.*, 2018). Tra questi ingredienti, ne sono già stati studiati diversi e grande attenzione è stata rivolta ai sottoprodotti di origine animale, fonti vegetali o microalghe (Ayadi *et al.*, 2012; Cardinaletti *et al.*, 2018), ma purtroppo ciascuno di questi ingredienti ha mostrato alcuni aspetti negativi per la loro applicazione in ambienti acquatici (Francis *et al.*, 2001; Manceron *et al.*, 2014; Bandara, 2018; Daniel e Cross, 2018). Per promuovere la circolarità nel settore dell'acquacoltura una soluzione è rappresentata dalla conversione della grande quantità di scarti e sottoprodotti organici prodotti sulla terra in una biomassa preziosa da utilizzare nell'ambiente acquatico. Puntando su organismi di bio-conversione, gli insetti rappresentano un esempio promettente (Barroso *et al.*, 2014; Belghit *et al.*, 2019) essendo considerati una fonte proteica alternativa promettente per l'alimentazione animale. Per tali ragioni, dal primo luglio 2017 in acquacoltura si possono utilizzare gli insetti per l'alimentazione e la produzione di mangimi. A deciderlo è stata la Commissione europea che, dopo aver avuto il via libera dell'EFSA (Ente Europeo sulla Sicurezza Alimentare), ha consentito con il Regolamento UE 893/2017 l'utilizzo di proteine provenienti da insetti per la produzione di mangimi. Riguardo alla riforma legislativa, il presidente dell'*IPIFF* (International Producers of Insects for Food and Feed), Antoine Hubert, si è detto *“particolarmente soddisfatto, dato che questa nuova visione costituisce una pietra miliare per lo sviluppo del settore europeo degli insetti. Pensiamo che questa normativa porti nuove opportunità per il settore europeo dell'acquacoltura, in quanto gli insetti dovrebbero rappresentare una fonte promettente di proteine per i pesci d'allevamento: come componente naturale delle diete di alcune specie di pesci carnivori, combinando alti livelli proteici, compresi tra il 55% e il 75%, e una eccellente digeribilità, gli insetti sono adatti a completare la formula alimentare degli animali dell'acquacoltura”* (<https://www.unaitalia.com>). A favore dell'utilizzo di farine di insetto sono stati condotti diversi studi su pesci. I risultati ottenuti sono stati variabili a seconda della specie di insetto utilizzato, del suo stato (intero, macinato, sgrassato), del processo di ottenimento degli stessi e della specie ittica oggetto della sperimentazione. Ad

esempio, alcuni studi hanno focalizzato l'attenzione sull'esame post-mortem degli organi principali di alcune specie di pesci alimentate con farina di larve di *Hermetia illucens* (L.) (Diptera, Stratiomyidae). Dagli studi non sono state riscontrate patologie a carico di milza, fegato e intestino, il che porta a dedurre che gli insetti non influenzino negativamente lo stato di salute degli animali (Bruni *et al.*, 2018; Henry *et al.*, 2018). Inoltre, la mucosa intestinale dei pesci non ha mostrato né alterazioni di forma, né modificazioni a carico delle mucine. In definitiva, la somministrazione di queste farine ha contribuito a migliorare l'assorbimento dei nutrienti, una crescita ottimale del pesce e una protezione efficace nei confronti di potenziali agenti patogeni a livello intestinale (Vargas *et al.*, 2018; Zarantoniello *et al.*, 2019).

L'EFSA, in collaborazione con alcuni studiosi, ha elaborato una lista di specie di insetti che potranno essere usate per la produzione di PAT destinate ad animali da allevamento:

- *Hermetia illucens* (L.) (Diptera, Stratiomyidae), (mosca soldato nero);
- *Musca domestica* L. (Diptera, Muscidae), (mosca domestica);
- *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera, Tenebrionidae), (verme della farina);
- *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera, Tenebrionidae), (verme della farina minore);
- *Acheta domesticus* (L.) (Orthoptera, Gryllidae), (grillo domestico);
- *Grylloides sigillatus* (Walker) (Orthoptera, Gryllidae), (grillo domestico tropicale);
- *Gryllus assimilis* (Fabricius) (Orthoptera, Gryllidae), (grillo silente).

1.5 Tipologie di mangimi

Secondo il nuovo rapporto di Markets and Markets, il mercato della trasformazione dei mangimi per animali salirà a 26,62 miliardi di dollari entro il 2023 miliardi (<https://www.unaitalia.com>). Secondo quanto riportato nella relazione, nel periodo di previsione il settore della trasformazione dei mangimi dovrebbe crescere a un tasso di crescita annuale (CAGR) del 4,3%. Il mercato è guidato da diversi fattori tra cui la

crescente consapevolezza dell'importanza dell'alimentazione, i progressi tecnologici nel settore delle attrezzature, i servizi personalizzati e l'aumento della domanda di mangimi in tutto il mondo. A questi dati si accompagna la sempre più vasta scelta di tipologie di mangimi presenti sul mercato, per meglio soddisfare abitudini e richieste. Per gli animali da produzione alimentare generalmente sono in forma di sfarinati, pellet o spezzati; nel caso degli animali da compagnia, le presentazioni sono le più svariate, crocchette, paté, snack o bocconcini (<https://www.assalzoo.it>). Si distinguono: mangimi semplici, le materie prime di origine vegetale o animale possono essere destinate all'alimentazione degli animali, allo stato fresco o conservato; mangimi complementari, per la loro composizione soddisfano la razione giornaliera dell'animale solo se associati ad altri mangimi; mangimi completi, soddisfano le esigenze nutrizionali giornaliere dell'animale; mangimi destinati a particolari fini nutrizionali, in grado di soddisfare un particolare fine nutrizionale degli animali, le cui funzionalità (processo digestivo, di assorbimento o metabolismo) rischiano di essere alterati momentaneamente o sono alterati temporaneamente in forma irreversibile; mangimi medicati, sono addizionati di farmaci per la terapia di animali, si somministrano in casi di necessità testimoniati da prescrizione veterinaria; mangimi biologici, le norme per la produzione biologica riguardano modalità di produzione e caratteristiche delle materie prime vegetali ed animali e degli additivi (<https://www.assalzoo.it>).

1.5.1 Le materie prime e gli additivi

La Norma mangimistica, diversamente da quella alimentare, non parla di ingredienti ma individua e suddivide i costituenti di un mangime in materie prime ed additivi. Le materie prime sono i prodotti di origine vegetale o animale, in grado di soddisfare le esigenze nutrizionali degli animali, allo stato naturale, freschi o conservati, nonché i derivati della loro trasformazione industriale, destinati all'alimentazione degli animali per via orale, in quanto tali o previa trasformazione, oppure alla preparazione di mangimi composti oppure ad essere usati come supporto di additivi (Reg. CE n. 767/2009) (<https://www.efsa.europa.eu>). Le materie prime utilizzate in alimentazione animale vengono suddivise a seconda della loro natura in vegetali, animali e minerali. Le specie vegetali maggiormente utilizzate sono i cereali come fonte di carboidrati per

le differenti caratteristiche nutrizionali; i legumi, il lino e il girasole ricchi in proteine ed altri prodotti (crusca, avena e foraggi) come fonte di grassi ed energia. Mentre, le materie prime di origine animale derivano principalmente dall'utilizzo di sottoprodotti non destinati al consumo umano per motivi commerciali. Sono molto diversificate ma ognuna deve soddisfare determinati requisiti sanitari e di utilizzo correlati alla specie di provenienza, ai trattamenti cui sono state sottoposte, alla modalità di impiego ed alla conformità legale (Reg. CE n. 1069/2009 e Reg. UE n. 142/2011 sui sottoprodotti di origine animale). In relazione all'utilizzo di alcune materie prime di origine animale nell'alimentazione degli animali d'allevamento, ancora sono attuati alcuni divieti a tutela della salute umana ed animale per il manifestarsi dell'Encefalopatia spongiforme trasmissibile anni addietro (Reg. CE n. 999/2001). Tutte le materie prime di origine animale devono obbligatoriamente derivare da animali dichiarati idonei alla macellazione per consumo umano (<https://www.efsa.europa.eu>); fra queste, con alcune eccezioni, hanno maggiore impiego nell'alimentazione degli animali destinati alla produzione alimentare i fosfati, le proteine idrolizzate, le farine di pesce, gli oli ed i grassi, il latte ed i prodotti derivati (<https://www.efsa.europa.eu>). L'uso per gli animali da compagnia, invece, è notevolmente più vario e comprende numerosi altri sottoprodotti di origine animale ed ex prodotti alimentari non più destinati al consumo umano.

1.5.2 Mangimi tradizionali

Per assicurare il benessere all'animale devono essere forniti i principi nutritivi necessari alla crescita e alla salute. Questo obiettivo viene raggiunto tramite la somministrazione di mangimi costituiti da nutrienti controllati, selezionati, bilanciati ed esenti da fattori anti-nutrizionali che sono presenti in numerose materie prime di origine vegetale. Come per alcuni alimenti destinati al consumo umano, i trattamenti termici (cottura, fiocatura, tostatura, liofilizzazione) sono metodi che permettono di ottenere mangimi facilmente metabolizzabili, digeribili e salubri, poiché rendono l'alimento più efficace per l'organismo e conferiscono stabilità microbiologica al prodotto (<https://www.assalzo.it>).

Nella formulazione e produzione di un mangime, è fondamentale attuare alcune accortezze per ottenere il miglior prodotto possibile. Si interviene eliminando le

sostanze che potrebbero dare effetti indesiderati per la dieta, sostituendo un nutriente al cui eccesso di consumo possono ricollegarsi degli effetti patogeni (es. alcuni lipidi o acidi, privilegiando quelli a catene lunghe ed insaturi), favorendo la concentrazione di composti naturalmente presenti, che apportano notevoli benefici (vitamine, oligoelementi, aminoacidi, ecc.) e se fosse necessario, sostenere gli arricchimenti strutturali con semplici integrazioni. La Legislazione comunitaria definisce e individua diverse tipologie di mangimi sulla base di numerosi aspetti che riguardano il soddisfacimento dei fabbisogni energetici e nutrizionali, ad alcune funzionalità desiderate, a peculiarità di natura degli ingredienti inclusi nella ricetta o di processo produttivo. Oltre alle materie prime vegetali o animali destinate all'alimentazione animale, definite dalla norma vigente (Reg. CE n. 767/2009) come mangimi e alimenti semplici, è stabilita legalmente una classificazione in base al soddisfacimento della razione giornaliera dell'animale. La razione giornaliera indica la quantità di uno specifico mangime di cui necessita al giorno un animale di una data specie, categoria di età e stile di vita o attività per soddisfare i bisogni energetici e nutrizionali.

1.5.3 Mangimi alternativi

Negli ultimi anni sono state oggetto di valutazione scientifica e tecnologica diverse fonti alternative proteiche e non. Oggetto di studio sono le alghe e gli insetti, sia per i valori nutrizionali che per la facilità di approvvigionamento. Le alghe, che contano oltre 800 mila specie, presentano numerose caratteristiche e profili nutrizionali specifici. Ad oggi sono prodotti mangimi che contengono microalghe al posto della farina di mais o soia; rispetto ai mangimi tradizionali forniscono un maggiore apporto di acidi grassi e ferro, nutrienti fondamentali, insieme agli acidi grassi omega 3 e omega 6. Gli insetti, che hanno richiamato l'attenzione di molti perché possono rivestire un ruolo importante sia in alimentazione umana sia animale. In seguito alla valutazione scientifica dell'Autorità europea per la Sicurezza alimentare, a livello comunitario è stato recentemente pubblicato un provvedimento che autorizza l'allevamento di alcune specie di insetti a scopi mangimistici, nell'ottica della sicurezza, del benessere animale e della tutela ambientale (Regolamento UE 893/2017).

Ad essere utilizzati nella preparazione dei mangimi sono anche i cosiddetti

“sottoprodotti” ovvero, residui e scarti organici di diversa tipologia, potenzialmente utilizzabili anche per la produzione di energia e di molecole ad alto valore aggiunto attraverso processi biotecnologici. Nella categoria di scarti provenienti dal settore agricolo rientrano le paglie dei cereali, gli steli, le foglie e i residui in genere di varie coltivazioni industriali e ortive di pieno campo; i sottoprodotti derivanti dalla trasformazione industriale delle produzioni vegetali e animali: sanse di olive, bucce di pomodoro, scarti del caffè e altri sfridi di lavorazione delle produzioni orticole, sottoprodotti di origine animale (sangue, carnicci, ecc.). I sottoprodotti agro-industriali sono suddivisibili nelle seguenti categorie: sottoprodotti di origine animale, matrici derivanti dalla lavorazione di prodotti animali caratterizzati da alti livelli di lipidi e proteine; sottoprodotti dell'industria alimentare, categoria molto vasta che racchiude gli sfridi di produzione di diversi prodotti alimentari; scarti o residui vegetali, matrici residuali generate dalla lavorazione dei prodotti ortofrutticoli, della barbabietola e dei residui colturali, di notevole interesse per l'alto livello di sostanza organica e l'assenza di frazioni indesiderate, ma la loro stagionalità di produzione e la notevole variabilità impongono un'adeguata conoscenza della loro composizione. La necessità di un'alimentazione sana e bilanciata per gli animali ha imposto di integrare carenze riscontrate negli ingredienti motivate da diversi fattori, intrinseci o estrinseci alla materia prima di origine vegetale o animale. In parallelo, si è riscontrato il bisogno di fornire agli animali alimenti che compensino le perdite di energia dovute alla loro attività e le eventuali mancanze dovute a stati di malessere. L'aggiunta di oligoelementi, vitamine ed altri principi nutritivi, conosciuto con il termine di additivi, è sufficiente a raggiungere lo scopo prefissato rispondendo alle richieste nutrizionali. Gli additivi sono quindi sostanze o microrganismi o preparati intenzionalmente aggiunti agli alimenti per animali o all'acqua di abbeverata al fine di svolgere una o più funzioni (Reg. CE n. 1831/2003), secondo cui si dividono in categorie specifiche: organolettici, nutrizionali, zootecnici, coccidiostatici ed istomonostatici (<http://www.salute.gov.it>). Ogni additivo per mangimi deve essere autorizzato a livello comunitario dalla Commissione europea che, previa valutazione dell'EFSA, ne consente l'utilizzo a specifiche condizioni determinanti il fine, la specie di destinazione, eventuali tenori minimi e/o massimi, e raccomandazioni d'uso. I macro ed i microminerali normalmente contenuti negli alimenti non sono sempre sufficienti

per il fabbisogno specifico di una data specie o categoria animale; per questo è necessario integrarli nelle razioni secondo criteri ben definiti (<https://www.assalzo.it>)

1.6 Produzione e lavorazione del caffè

1.6.1. La coltivazione del caffè

Il caffè è la bevanda più consumata al mondo e data la grande richiesta, la sua lavorazione porta alla generazione di grandi quantitativi di sottoprodotti. La pianta del caffè appartiene alla famiglia Rubiaceae. I chicchi di caffè sono prodotti dalla pianta del genere *Coffea*, di cui esistono oltre 70 specie. Tuttavia, solo due di queste specie sono esportate in tutto il mondo: *Coffea arabica* (Arabica), considerato come la più pregiata di tutte le piante di caffè che fornisce il 75% di produzione mondiale; e *Coffea canephora* (Robusta), considerato più acido ma più resistente alle piaghe, e fornisce il 25% della produzione mondiale (Belitz *et al.*, 2009; Etienne, 2005). Le sue origini non sono del tutto note, sicuramente si è diffuso prima nel mondo arabo e poi in Europa. Il termine “caffè” per alcuni proviene da Kaffa, regione etiopica montuosa, secondo altri dalla parola araba qahwe, che indica la bevanda fatta con i vegetali. Arrivò in Europa agli inizi del XVII secolo, grazie agli scambi commerciali dei mercanti veneziani, ma anche con la guerra. La crescita del mercato europeo ha favorito l'espansione della piantagione di caffè nei paesi africani, favorendone l'esportazione in Europa tramite i coloni provenienti da Portorico, Cuba, Suriname, Santo Domingo e Guianas (Taunay, 1939). La produzione di caffè si concentra nelle aree comprese tra il tropico del Cancro e il tropico del Capricorno, in un clima caldo umido. Ad oggi, le stime indicano che i paesi maggiori produttori di caffè sono, nell'ordine, il Brasile, il Vietnam, la Colombia e l'Indonesia. Seguono, con ordine variabile secondo le annate, Messico, Guatemala, Honduras, Nicaragua, El Salvador, Etiopia, India, Ecuador (<http://www.ico.org>).

1.6.2 Scarti e sottoprodotti dell'industria del caffè

Grandi quantitativi di scarti e sottoprodotti, sia in forma liquida che solida, vengono prodotti dal settore agro-industriale e alimentare. Il caffè è il secondo bene più prodotto a livello mondiale, subito dopo il petrolio, ed è quindi responsabile della generazione di un grande quantitativo di scarti di lavorazione (Nabais *et al.*, 2008). Il riutilizzo dei prodotti di scarto della lavorazione del caffè è oggetto di studi da circa dieci anni a

questa parte, precedentemente il tutto era bruciato e rilasciato in mare e nelle discariche (Cunha, 1992). Al giorno d'oggi, c'è una grande pressione politica e sociale per ridurre l'inquinamento dovuto alle attività industriali. Quasi tutti i paesi sviluppati e sottosviluppati stanno cercando di adattarsi a questa realtà modificando i processi in modo che i loro residui possano essere riciclati. Di conseguenza, la maggior parte delle grandi aziende non considerano più i residui come rifiuti, ma come materia prima per altri processi (Mussatto *et al.*, 2006). I principali residui dell'industria del caffè sono: i fondi di caffè esauriti (SCG), la cascara e il caffè silverskin (CS). I fondi di caffè esausti, sono dei residui con granulometria fine, elevata umidità ed acidità, ottenuti durante il trattamento della polvere di caffè crudo con acqua calda o vapore per la preparazione del caffè solubile. Sono caratterizzati dall'elevato contenuto in zuccheri, tra cui mannosio e galattosio che sono i più abbondanti (Mussatto *et al.*, 2011). Sebbene, il carattere tossico e la presenza di materiale organico in SCG, la dispersione di questo residuo nell'ambiente è ancora la forma di smaltimento più eseguita al giorno d'oggi, ma si stanno cercando metodi di riutilizzo alternativi per evitare la dispersione nell'ambiente. In alcuni casi, SCG viene utilizzato come combustibile nelle caldaie industriali della stessa industria grazie al suo alto potere calorifico. Però, occorre prestare attenzione alla generazione di particolato, che può influire sulla qualità dell'aria nei pressi della sede di lavorazione dei chicchi di caffè (ABNT, 1987). Altra possibilità è quella di utilizzare SCG come mangime per animali quali ruminanti, maiali, galline e conigli (Claude, 1979; Givens e Barber, 1986), alternativa già verificata ma scartata, dato l'alto contenuto di lignina (oltre il 25%) fattore limitante per la sua applicazione (Cruz 1983). Recentemente, uno studio condotto da Kondamudi *et al.* (2008), ha dimostrato che SCG può essere usato come fonte per la produzione di biodiesel e pellet. Altro sottoprodotto della lavorazione del caffè è la cascara ovvero la buccia della drupa di caffè che è considerata un materiale di scarto, in realtà viene spesso utilizzata come fertilizzante ma se essiccata con cura può produrre un infuso molto diffuso nei paesi arabi. In ultimo c'è il CS, il tegumento dei chicchi di caffè che si ottiene come sottoprodotto del processo di tostatura.

1.6.3 Coffee Silverskin

Il Coffee Silverskin (CS) è un sottoprodotto alimentare che si caratterizza per un alto quantitativo di fibra dietetica solubile (86% delle fibre totali), un'elevata capacità antiossidante, probabilmente a causa della concentrazione di composti fenolici nei chicchi di caffè (Borelli *et al.*, 2004) e per il contenuto di diterpeni, xantine e di vitamine, oltre ad una significativa presenza di caffeina (Rodrigues *et al.*, 2015). Rodrigues *et al.* hanno dimostrato l'attività antimicrobica degli estratti di CS contro agenti patogeni come *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Altri studi hanno mostrato come il CS abbia una attività antiipertensiva (Rufian-Henares e Morales, 2007a, b), antimicrobica (Rufian-Henares e de la Cueva, 2009) e antiossidante (Rufian-Henares e Morales, 2007a). Le melanoidine (MD), inoltre, estratte dai fondi di caffè esauriti hanno mostrato avere una elevata attività antimicrobica (Jiménez-Zamora *et al.*, 2015). In particolare, a seconda della loro concentrazione, le melanoidine del caffè possono avere azione batteriostatica o battericida. Inoltre, i composti naturalmente presenti nel CS, come acidi clorogenici e caffeina (Costa *et al.*, 2014), potrebbero interagire sinergicamente nell'attività antibatterica (Antonio *et al.*, 2010). In breve, CS potrebbe avere un'applicazione promettente nelle malattie delle infezioni della pelle, o anche come conservante per formulazioni cosmetiche. È proprio il settore della cosmesi che negli ultimi anni si è dimostrato interessato ai sottoprodotti della lavorazione del caffè, attratto dalla capacità antiossidante del CS, ora visto come un nuovo potenziale ingrediente funzionale (Borrelli *et al.*, 2004). Gli impieghi del CS sono molteplici, in diversi paesi è utilizzato come combustibile (Saenger *et al.*, 2001), per il compostaggio e per la concimazione del suolo. Rappresenta una buona fonte di numerosi composti bioattivi che possono essere estratti e ulteriormente utilizzati per scopi alimentari, cosmetici e farmaceutici. Inoltre, il CS è stato utilizzato come substrato di crescita per allevare *H. illucens* per la produzione di mangimi a base di insetti per l'alimentazione di ruminanti e volatili (Didana, 2014), e di pesci (Zarantoniello *et al.*, 2018). Nei mangimi a base di larve di *H. illucens*, cresciute su scarti della torrefazione del caffè, si è riscontrato un quantitativo insufficiente di omega 3 e 6, rispetto alle necessità nutritive dei pesci (Vargas *et al.*, 2018).

1.6.4 Il chicco di caffè

Il frutto della pianta del caffè si chiama drupa, è un frutto piccolo, simile a una ciliegia, verde quando acerbo e rosso scuro una volta raggiunta la maturazione. Ogni drupa contiene due semi, posizionati come a combaciare, ognuno dei due protetti da una specie di pellicola argentea e racchiusi dentro una membrana, chiamata pergamino (Fig.1). Solitamente la prima raccolta avviene dopo cinque anni dalla piantagione e una volta che i frutti sono diventati rossi (Arya e Rao, 2007). La lavorazione del caffè prevede la rimozione del pergamino, della buccia e della membrana argentea.



Figura 1: Drupa di caffè.

I metodi di lavorazione usati sono: a secco o ad umido, dipende dal contenuto di acqua e dalle esigenze qualitative. Basandosi sul tipo di metodo con cui vengono processati, i residui solidi che si ottengono vengono indicati con una differente terminologia, rispettivamente: pellicola o buccia (Pandey *et al.*, 2000). Il metodo a secco, utilizzato normalmente per la qualità Robusta, è tecnologicamente comparabile con il metodo in umido, che è generalmente utilizzato per i frutti di qualità Arabica. Con il processo ad umido, la pellicola e il guscio vengono rimossi mentre la polpa resta fresca. Un passaggio fondamentale nella lavorazione del prodotto è la tostatura dei chicchi di caffè, dato che sviluppa le proprietà organolettiche e influenza la qualità del caffè e l'eccellenza della bevanda (Hernández *et al.*, 2008; Franca *et al.*, 2005; Fujioka

e Shibamoto, 2008). È un processo tempo-temperatura dipendente e comporta numerosi cambiamenti nella composizione chimica e nelle attività biologiche del caffè come risultato della trasformazione di costituenti polifenolici presenti in natura in una complessa miscela di prodotti della reazione di Maillard. La tostatura del caffè è un processo complesso considerando il trasferimento del calore al frutto (Franca *et al.*, 2009). Dopo il processo di tostatura, i chicchi di caffè dovrebbero essere rapidamente raffreddati per bloccare le reazioni esotermiche e per prevenire una tostatura eccessiva (Dutra *et al.*, 2001). Successivamente, i chicchi vengono macinati; alcuni sono confezionati e spediti come chicchi interi. Al termine, il caffè macinato è sigillato sottovuoto e spedito.

1.6.5 La composizione chimica dei chicchi di caffè

La componente maggiormente presente nei chicchi di caffè è la caffeina. Nella varietà Arabica il quantitativo di caffeina riscontrato varia dallo 0,8% all'1,4%, mentre in Robusta lo stesso valore è compreso tra l'1,7% e il 4% (Belitz *et al.*, 2009). I chicchi di caffè presentano altre componenti, tra cui ci sono la cellulosa, i minerali, zuccheri, lipidi, tannini e polifenoli. Questi composti si riscontrano nella polpa del caffè (essiccata o no), negli scarti del caffè (umidi o essiccati) e nei fondi di caffè (un sottoprodotto della produzione del caffè istantaneo) e hanno un effetto complessivamente deleterio sugli animali come suini (Hutagalung, 1981; Balogun e Koch, 1975). La ciliegia e le foglie di caffè contengono caffeina, un alcaloide che è un farmaco stimolante psicoattivo, oltre a tannini, polifenoli e elevate quantità di potassio (Bressani, 1982). La presenza di questi fattori contribuisce all'attività antinutrizionale e antifisiologica dei sottoprodotti del caffè osservata sia nei monogastrici che nei ruminanti, che risulta in una bassa appetibilità, scarsa assunzione di alimenti, difficoltosa digeribilità delle proteine e ritenzione di azoto (Mazzafera, 2002; Brand *et al.*, 2000). Quindi le limitazioni all'uso della polpa del caffè nell'alimentazione degli animali sono legate al suo alto contenuto di tannini e caffeina (Clifford e Ramirez-Menezes, 1991). Mentre, tra i minerali inclusi ci sono: potassio, magnesio, calcio, sodio, manganese, zinco, cromo, rubidio, rame, nickel, cobalto, molibdeno, titanio e cadmio. È riscontrata la presenza di vitamine del gruppo B, niacina e acido clorogenico

in proporzioni che vanno dal 7% al 12%, dalle tre alle cinque volte di più della caffeina (Belitz *et al.*, 2009; Trugo, 2003; Trugo e Macrae, 1984). Quest'ultima risulta termostabile e quindi non risente delle alte temperature con cui viene trattato il chicco durante la fase di tostatura. Durante lo stesso processo altre sostanze come proteine, zuccheri, acido clorogenico, trigonellina e grasso possono essere preservati o distrutti e trasformati in prodotti reattivi (Ginz *et al.*, 2000; Lima e Malavolta, 2003; Trugo, 2003; Trugo e Macrae, 1984).

1.7 Microalghe

Le microalghe, anche note come fitoplancton, sono organismi microscopici unicellulari che vivono singolarmente o in colonie, in acque dolci o salate. A seconda della specie, le loro dimensioni individuali possono variare da pochi micrometri a qualche centinaio. La biodiversità delle microalghe è enorme, circa 35.000 sono le specie descritte rispetto alle 800.000 stimate (Barbato *et al.*, 2012). Sono organismi che richiamano l'attenzione di molti ricercatori; facili da coltivare in zone desertiche o in contenitori sigillati, la loro particolare composizione rende queste piante acquatiche molto versatili. Farmaci, cosmetici, alimenti rinforzati, mangimi, carburanti, plastiche biodegradabili, sono solo alcuni dei prodotti che si possono ottenere da esse. Ricche in proteine, carboidrati, sali minerali, vitamine e acidi grassi, le microalghe coltivate vengono raccolte ed essiccate per essere trasformate in polvere e utilizzate poi nella preparazione di integratori alimentari e prodotti di facile consumo come pane, pasta, biscotti e bevande. In particolare, esse sono ricche di micronutrienti come il β -carotene (che viene trasformato nell'organismo in vitamina A), l'astaxantina (carotenoide ad azione antiossidante), la vitamina B12, e gli acidi grassi polinsaturi omega 3 e omega 6, e altre biomolecole ad alto valore nutraceutico (Becker, 2007). I vantaggi nello sfruttamento della produzione massiva di microalghe a scopo alimentare integrato sono:

- Nessuna competizione con altre risorse alimentari;
- Riutilizzo di terreni non coltivabili o contaminati;
- Elevato tasso di crescita;
- Elevato contenuto in proteine, integratori e molecole bioattive;

- Produzione continua durante l'anno;
- Limitata richiesta di acqua;
- Manipolazione della produzione delle sostanze di interesse;
- Non richiedono uso di pesticidi o erbicidi;
- Utilizzo della biomassa per estrazione di numerosi composti e molecole attive (Barbato *et al.*, 2012).

Le specie oggi più coltivate a fini commerciali e nella grande maggioranza dei casi, destinate alla produzione di mangimi per i pesci, appartengono ai generi: *Arthrospira*, *Chlorella*, *Dunaliella*, *Haematococcus*, *Nannochloropsis*, *Nitzschia*, *Cryptocodinium*, *Schizochytrium*, *Tetrasemis*, *Skeletonema*, *Isochrysis* e *Chaetoceros* (Barbato *et al.*, 2012).

Nello specifico, *Schizochytrium* sp. è un genere di eucarioti monocellulari nella famiglia delle Thraustochytriaceae, che si trovano in habitat marini costieri. È una ricca fonte di omega 3 a basso contenuto di iodio. Questa microalga ha una forte concentrazione di acido docosaesaenoico (DHA) ed acido eicosapentaenoico (EPA). Contiene olio ricco di acidi grassi altamente insaturi (PUFA). L'acido docosaesaenoico è il componente PUFA più abbondante dell'olio (circa il 35%). L'olio estratto da *Schizochytrium* sp., ricco in DHA, è destinato all'uso come ingrediente nutrizionale negli alimenti (Hammond *et al.*, 2001).

2. HERMETIA ILLUCENS (L.) (DIPTERA, STRATIOMYIIDAE)

Hermetia illucens (Linnaeus, 1758) (Diptera, Stratiomyidae) è un insetto appartenente all'ordine dei Ditteri, famiglia Stratiomyidae, sottofamiglia Hermetiinae. Questa specie è presente nel Catalogo delle materie prime per mangimi, fornito dal regolamento UE 2017/17, comprende le specie di insetti che possono essere utilizzate per la produzione di ingredienti per la formulazione di mangimi per l'acquacoltura (<http://www.veterinariaalimenti.marche.it>).

2.1 Distribuzione e habitat

Originario delle regioni tropicali, subtropicali e temperate del continente americano, negli ultimi decenni si è diffusa in tutti i continenti diventando cosmopolita. Le migrazioni umane e gli scambi commerciali hanno giocato un ruolo fondamentale nella sua diffusione (James, 1935; Leclerq, 1997). Risulta ampiamente presente negli Stati Uniti, dove l'adulto è conosciuto con il nome comune di Black Soldier Fly (BSF), mosca soldato nera, mentre in Europa è segnalata in Croazia, Malta, Isole Canarie, Italia, Svizzera e in Francia. Nello specifico, in Italia è stata introdotta mediante i trasporti commerciali nel 1956 (Venturi, 1956) e da allora ha colonizzato l'intero territorio nazionale (Adamo, 2008). Nel 2008 la specie veniva segnalata per l'Italia nelle seguenti regioni: Piemonte, Lombardia, Liguria, Veneto, Friuli-Venezia Giulia, Emilia-Romagna, Toscana, Lazio, Sardegna, Sicilia e Puglia, mentre attualmente la sua presenza viene riscontrata su l'intera penisola e nelle isole maggiori. La rapida diffusione che l'ha vista protagonista viene spiegata dalle caratteristiche biologiche; *H. illucens* è descritto come competitore e predatore di altri ditteri in grado di inibire, tramite allomoni, lo sviluppo di altre specie, ha pochi limitatori naturali e mostra resistenza ad agenti chimici e condizioni ambientali avverse

2.2 Ciclo di sviluppo

Hermetia illucens è un insetto olometabolo: lo sviluppo postembrionale passa attraverso 6 stadi. Al sesto stadio si osserva la riduzione delle parti boccali e la accentuazione delle inclusioni di carbonato di calcio sulla cuticola, che si indurisce formando una vera e propria custodia per l'impupamento. Il ciclo vitale di *H. illucens* varia a seconda che la popolazione sia selvatica o allevata e delle condizioni ambientali (temperature, umidità, intensità luminosa, qualità e quantità di cibo disponibile). Le femmine possono deporre tra le 320 e le 1000 uova in ambiente umido (per limitare la perdita di acqua delle stesse) tramite l'uso dell'ovopositore (Olivier, 2004; Kim *et al.*, 2008; Tomberlin *et al.*, 2009) morendo subito dopo l'atto di ovoposizione (Tomberlin *et al.*, 2002). Generalmente le uova sono deposte in interstizi per proteggerle da possibili attacchi di predatori e nelle vicinanze di possibili fonti di cibo. Le uova hanno forma ovoidale e lunghezza che si aggira attorno ad 1 mm. La colorazione vira dal beige al giallo durante il periodo di incubazione, che può durare poco più di 4 giorni, a 27 – 29 °C (Booth e Sheppard, 1984) e a circa 3,5 giorni alla temperatura di 30 °C (Tomberlin e Sheppard, 2002). Nel complesso, il ciclo di vita di BSF (Fig. 2) ha una durata che va da alcune settimane a diversi mesi, in relazione alla temperatura dell'ambiente e la qualità e quantità del substrato alimentare (Veldkamp *et al.*, 2012).

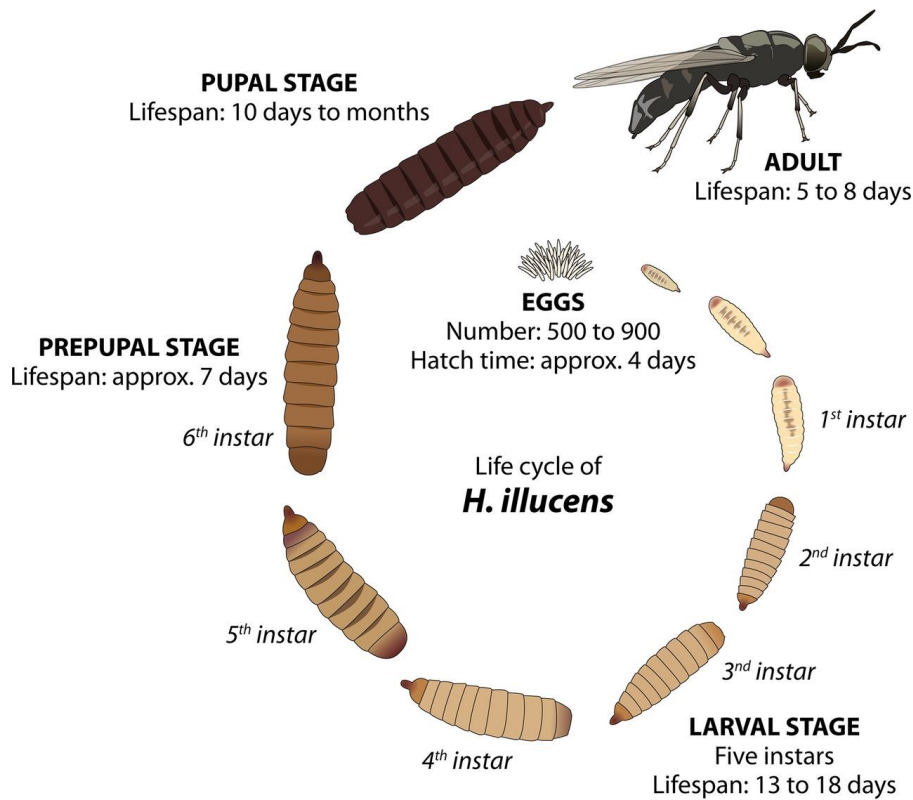


Figura 2: Ciclo di sviluppo di *Hermetia illucens* (Fonte: De Smet, 2018).

Le larve possono raggiungere i 27 mm in lunghezza, 6 mm di diametro e oltre 220 mg in peso nel loro ultimo stadio larvale. Le larve, il cui regime dietetico è prevalentemente saprofago: vivono e si nutrono di materia organica (animale e vegetale) in decomposizione (James, 1935). Singolarmente possono consumare dai 25 ai 500 mg di substrato fresco al giorno, che può essere costituito da frutta e ortaggi, caffè e letame animale (Van Huis *et al.*, 2013; Diener *et al.*, 2010). Esse si presentano opache e di colore biancastro, apode ed eucefale. Il corpo larvale è costituito da 11 segmenti ricoperti da peli e setole. Dato che gli adulti non si nutrono, per il loro mantenimento in vita è necessario che l'insetto accumuli un notevole strato di grasso nello stadio larvale. La durata dello stadio larvale spazia tra le 4 settimane ai 5 mesi, dipende dalla disponibilità di fonti di nutrienti e dalla temperatura dell'ambiente di crescita, l'optimum è compreso tra i 20 – 30 °C (Tomberlin *et al.*, 2009; Everest *et al.*, 2009). La crescita che interessa gli individui nello stadio larvale consta di 5 stadi, al termine dei quali raggiungono nell'arco di due settimane, se in un ambiente ottimale, lo stadio di larve mature (prepupe).

2.3 Prepupa

Morfologicamente, i primi quattro stadi larvali difficilmente sono differenziabili ma lo stadio di prepupa è caratterizzato da una variazione marcata del colore da beige a marrone, dal rallentamento dei movimenti e dalla migrazione fuori dal substrato di allevamento per impuparsi (Sheppard *et al.*, 1994; Diener *et al.*, 2010).

2.4 Pupa

Carattere distintivo delle pupe è l'irrigidimento della cuticola e la presenza di un involucro scuro (exuvia). Generalmente, la metamorfosi è completata in circa due settimane alla temperatura di 27-30 °C (Sheppard *et al.*, 2002), gli individui maschi tendono a sfarfallare prima delle femmine (Tomberlin *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2008). La tempistica della comparsa degli adulti è estremamente variabile in base alla temperatura dell'ambiente, umidità, intensità della luce e quantità del cibo disponibile.

2.5 Adulto

Gli adulti di *H. illucens* sono di colore nero, simili a vespe e possono raggiungere una lunghezza di circa 15-20 mm (Hardouin e Mahoux, 2003). Il capo è largo, con occhi molto sviluppati e le antenne sono lunghe circa il doppio della testa. Le zampe sono nere con tarsi biancastri. Le ali sono membranose, in fase di riposo ripiegate orizzontalmente sull'addome e sovrapposte. I maschi sono più piccoli delle femmine (Tomberlin *et al.*, 2002) e una differenza anatomica sull'ultimo segmento addominale (le femmine posseggono un ovopositore di sostituzione, tubulare retrattile) permette la distinzione tra i generi. Nonostante gli adulti non necessitino di cibo per la loro sopravvivenza, è stato appurato che per assicurarsi un periodo vitale il più lungo possibile è richiesta una fonte d'acqua. Ed è proprio l'accesso alle riserve idriche e la grandezza del corpo (e le riserve energetiche associate) ad influenzare la durata della vita di un individuo adulto, che può protrarsi dai 4 ai 15 giorni (Tomberlin *et al.*, 2002; Olivier, 2004; Tomberlin *et al.*, 2009). Gli adulti della mosca soldato nera rispetto agli altri insetti allevati per produrre biomassa, non richiedono particolari cure che potrebbero rendere difficoltoso l'allevamento.

2.6 *Hermetia illucens* come bioconvertitore di sostanza organica

La rapida crescita e la voracità che distingue le larve di *H. illucens*, fanno sì che venga utilizzata per la conversione di rifiuti organici ad alto impatto ambientale, come ad esempio i liquami degli allevamenti zootecnici intensivi, i reflui dell'industria agroalimentare, i rifiuti solidi urbani. Con il costante aumento di rifiuti da smaltire, la ricerca ha sviluppato sistemi di smaltimento e riciclaggio dei reflui e dei rifiuti solidi basati su biodigestori e impianti di compostaggio che sfruttano allevamenti della mosca soldato nera per ridurre il volume dei rifiuti a costi relativamente bassi (Newton *et al.*, 2005). In un'ottica di sostenibilità della gestione della filiera zootecnica e delle produzioni agrarie, il ricorso a sistemi che possano ridurre da un lato massa e contenuto ammoniacale delle deiezioni e dall'altro il ricorso a fertilizzanti di sintesi, si profila come altamente vantaggioso. Grazie all'attività delle larve di BSF è possibile ridurre del 60% la massa secca delle deiezioni, il tenore di fosforo e azoto, sopprimere la crescita batterica (compresi i batteri nocivi), gli odori sgradevoli e la popolazione di mosche domestiche infestanti. Il residuo risultante è un compost ammendante di buona qualità. Dagli studi condotti, i benefici derivanti da una tecnologia di trattamento basata sull'allevamento di *H. illucens* sono la riduzione del volume dei rifiuti, abbattimento del carico inquinante dei rifiuti e degli odori, facilità di recupero delle pupe grazie alla particolare etologia della specie ed un minor impatto sanitario rispetto a quello registrato per sistemi di digestione che utilizzano ditteri (Turchetto e Vanin, 2004).

Le prepupe e le pupe, facilmente recuperate in quanto non è richiesto l'impiego di tecnologie di separazione sofisticate e non reimpiagate nel digestore possono essere destinate a cicli produttivi esterni, come ad esempio la produzione di biocarburanti o di mangimi. Il trattamento del materiale organico permette il suo reimpiego come fertilizzante e/o l'utilizzo per la produzione di biogas (<http://www.biodieselmagazine.com>). I grassi ricavati dalle larve possono essere invece impiegati per produrre energia o biodiesel e le proteine per produrre mangimi, bioplastiche, colle e così via.

2.7 *Hermetia illucens* come alimento animale

Tra i numerosi insetti adatti all'allevamento la ricerca si è orientata in particolare sulla BSF, le cui larve sono comunemente allevate ed impiegate, vive o trasformate. Le larve di *H. illucens* sono state utilizzate per l'alimentazione sperimentale di diverse specie animali, sia come larve che come prepupe impiegate con il fine di sostituire la farina di soia o di pesce nelle diete formulate. Questi test di alimentazione hanno utilizzato come cavie pollame (Hale, 1973), maiali (Newton et al., 1977), pesci gatto e tilapie (Bondari e Sheppard, 1981, Sheppard e Newton 2000). I risultati raccolti sono stati positivi, dato l'elevato contenuto di proteine adatto a sostituire le fonti convenzionali.

Uno studio recente ha testato, per la prima volta, l'inclusione parziale di larve liofilizzate di *H. illucens* nei mangimi di Zebrafish: la sostituzione del 50% di farina di pesce con farina di BSF ha influenzato la quantità e la qualità dei lipidi contenuti nei pesci (Zarantoniello et al., 2019). . Ulteriori studi sono necessario per comprendere meglio le risposte fisiologiche dei pesci, comprese le sostituzioni molto basse di farina di BSF, che possono svolgere un ruolo immunomodulante nonché eventuali modifiche del substrato di crescita per valutare le variazioni indotte nel profilo lipidico degli insetti. BSF è stato utilizzato anche nei mangimi per pollame in sostituzione parziale dei mangimi a base di mais o di soia, principalmente perché la specie naturalmente colonizza e scompone il letame di pollame ai fini della gestione dei rifiuti e della riduzione dell'inquinamento. Altro esperimento è stato condotto sui polli da carne per determinare gli effetti della somministrazione di mangimi costituiti da larve di BSF sulle performance di crescita. La farina di *H. illucens* ha sostituito la farina di pesce commerciale per il 33% nelle diete per polli da carne. Gli uccelli sono stati nutriti da 3 a 8 settimane di età. Tutti gli uccelli hanno mostrato un aumento omogeneo del peso vivo mostrando un'efficienza di alimentazione (Spranghers *et al.*, 2017).

3. SCOPO DELLA TESI

L'obiettivo dello studio è stato quello di analizzare le performance larvali (tempo di sviluppo, sopravvivenza e peso) di *Hermetia illucens* su cinque diversi substrati di alimentazione. Basandosi sul concetto di economia circolare, eco-sostenibilità ed economicità, i substrati di crescita delle larve dell'insetto sono stati composti da sottoprodotti del processo di torrefazione del caffè, disponibili localmente, arricchiti con diverse percentuali di microalghe (*Scizochytrium* sp.) in modo da ottenere un mangime a base di insetti ricco di acidi grassi polinsaturi.

4. MATERIALI E METODI

4.1 Composizione dei substrati di crescita larvale

Per la preparazione delle diete sono stati utilizzati: campioni di scarto della torrefazione (coffee silverskin, CS) forniti dalla Saccaria Caffè S.r.l. (Marina di Montemarciano, Ancona). Il sottoprodotto deriva dalla lavorazione di una miscela di caffè in proporzione di 80% Robusta e 20% Arabica. Per la formulazione delle diverse diete sperimentali, il CS è stato arricchito con diverse percentuali di microalghe (*Schizochytrium* sp.) liofilizzate, fornite da Alghitaly Società Agricola S.R.L. (Villafranca di Verona) (Tab. 1). Ciascuna dieta è stata formulata in modo tale da avere un tenore di Umidità Relativa (U.R.) pari a circa il 70% (Spranghers *et al.*, 2017) (Tabb. 2 e 3), tenendo conto che i campioni di scarto della torrefazione prelevati dalla Saccaria Caffè srl, presentavano un valore di U.R. pari a circa il 55,3%.

TABELLA 1. PERCENTUALI DI SCARTO TORREFAZIONE E MICROALGHE UTILIZZATE PER LA PREPARAZIONE DELLE DIETE SPERIMENTALI

Dieta	Scarto torrefazione (%)	Alghe (%)
AS	95	5
BS	90	10
CS	80	20
DS	75	25
E	100	0

Tabella 1: Preparazione delle diete sperimentali.

TABELLA 2. COMPOSIZIONE DELLE DIETE COMPOSTE DA SCARTI DELLA TORREFAZIONE DEL CAFFÈ ADDIZIONATI CON MICROALGHE

(-S: diete contenenti *Schizochytrium* sp.; E=scarto torrefazione caffè; g=grammi)

DIETA	REPLICA/SETTIMANA			
	caffè (g)	alghe (g)	acqua (g)	Substrato finale (g)
AS	66.95	1.58	36.48	105
BS	63.42	3.15	38.43	105
CS	56.38	6.30	42.32	105
DS	52.85	7.88	44.27	105
E	70.47	0.00	34.53	105

Tabella 2: Specifiche relative alla composizione delle diete.

TABELLA 3. QUANTITATIVI DI SCARTI DELLA TORREFAZIONE E MICROALGHE UTILIZZATE PER LA PREPARAZIONE DELLE DIETE
(-S: diete contenenti *Schizochytrium* sp.; E=scarto torrefazione caffè; g=grammi)

DIETA	REPLICA/SETTIMANA		DIETA/SETTIMANA		DIETA/MESE	
	caffè (g)	alghe (g)	caffè (g)	alghe (g)	caffè (g)	alghe (g)
AS	66.95	1.58	334.73	7.88	1338.93	31.50
BS	63.42	3.15	317.11	15.75	1268.46	63.00
CS	56.38	6.30	281.88	31.50	1127.52	126.00
DS	52.85	7.88	264.26	39.38	1057.05	157.50
E	70.47	0.00	352.35	0.00	1409.40	0.00
Totale	310.07	18.90	1550.34	94.50	6201.34	378.00

Tabella 3: Specifiche delle diete impiegate per la prima fase di produzione insetti.

4.2 Le Prove sperimentali

Sono state previste cinque diete sperimentali, ognuna delle quali replicata cinque volte. In ciascuna replica sono state poste in allevamento 150 larve di *H. illucens* (750 larve/dieta) per un totale di 3.750 larve. Si è rispettata una densità larvale di 0.3 larve/cm². A ogni larva è stata somministrata una razione di dieta pari a 100 mg/giorno (Diener *et al.*, 2009). Ciascuna replica con le relative larve è stata posizionata in box

di plastica (28x19x14 cm), coperti con mussolina per ridurre le perdite di umidità (Sideris e Tsagkarakis, 2017; Spanghers *et al.*, 2017). Inoltre, un coperchio con un foro di 4,5 cm di diametro è stato posizionato su ogni contenitore. I contenitori sono stati posti in una cella climatica (Fig. 2) con parametri controllati ($27\pm 1^\circ\text{C}$; $65\pm 5\%$ U.R.; 0L:24D) (Spanghers *et al.*, 2017). Il giorno precedente il loro utilizzo, le diete sono state preparate (CS frullato e poi miscelato con le microalghe ed acqua demineralizzata), pesate, suddivise per replica, messe sottovuoto in sacchetti di plastica, codificate e conservate in frigo. Le diete sono state sostituite ogni settimana e le larve contate e trasferite in altri contenitori contenenti la nuova dieta. Ogni settimana 6 larve, prelevate casualmente da ciascuna replica, sono state pesate mediante bilancia analitica (Radwag AS 220.X2) e poi riposte nel loro rispettivo box. Le larve e le prepupe sono state spostate utilizzando delle pinzette metalliche. L'aggiunta di nuova dieta per ogni contenitore è stata interrotta quando il 40% delle larve in quel determinato box/replica avevano raggiunto lo stadio di prepupa. Settimanalmente le nuove prepupe sono state campionate, pesate individualmente e congelate. Le prepupe sono state identificate attraverso il cambiamento di colore del loro tegumento che da bianco passa al nero (May, 1961; Tomberlin *et al.*, 2002).



Figura 2: Camera climatica con all'interno i box in cui avviene la crescita.

4.3 Analisi statistica

Il tasso di mortalità larvale, la durata dello sviluppo larvale e il peso di larve e prepupe sono stati analizzati per ciascuna dieta sperimentale. La normalità dei dati è stata verificata utilizzando Shapiro-Wilk test. Le analisi statistiche sono state eseguite impiegando l'analisi della varianza (ANOVA). Il livello di significatività ($P < 0.05$) è stato valutato attraverso il Kruskal-Wallis test seguito da Dunn post-hoc test e infine applicando la correzione Benjamini-Hochberg. Tutti le analisi sono state eseguite all'interno dell'ambiente statistico R.

5. RISULTATI

5.1 Tempo di sviluppo larvale

Per quanto riguarda il periodo di sviluppo larvale (tempo impiegato dalle larve per raggiungere lo stadio di prepupa) non ci sono state delle differenze significative fra le diete AS, BS, CS e DS. Nelle diete BS e DS esso è stato pari a 35 ± 0.00 mentre è stato maggiore nella dieta E (47.6 ± 3.130) (Tab. 4).

Dieta	Tempi di sviluppo (giorni)	Peso prepupe (g)	Mortalità (%)
AS	39.2 ± 3.834 a	0.095 ± 0.008 ad	6.80 ± 4.31 ab
BS	35 ± 0.00 a	0.101 ± 0.005 a	3.20 ± 1.73 b
CS	36.40 ± 3.130 a	0.143 ± 0.006 b	5.47 ± 3.35 b
DS	35 ± 0.00 a	0.158 ± 0.008 c	7.47 ± 5.72 ab
E	47.6 ± 3.130 b	0.095 ± 0.005 d	14.66 ± 6.88 ab

*Tabella 4: Performance larvali di *Hermetia illucens* allevate sulle diverse diete sperimentali. Lettere diverse indicano differenze significative per $p < 0,05$.*

5.2 Incremento ponderale delle larve sulle diverse diete sperimentali

I risultati ottenuti hanno evidenziato che le larve di *H. illucens* alimentate con la dieta contenente scarti della torrefazione del caffè addizionato con la percentuale maggiore di alghe (DS -25% di *Schizochytrium* sp.) hanno ottenuto le migliori prestazioni per quanto riguarda l'accrescimento ponderale (Tab. 4).

Le larve alimentate con le diete E (solo scarti della torrefazione) e AS (5% di *Schizochytrium* sp.) sono quelle che hanno dato origine a delle prepupe con il minor peso. Valori interessanti di accrescimento ponderale delle prepupe sono stati raggiunti anche con la dieta CS (20% di *Schizochytrium* sp.) e BS (10% di *Schizochytrium* sp.) (Tab. 4). Dal grafico 1 si evince che la dieta che ha portato a maggior accrescimento

in peso delle larve nelle cinque settimane di studio è la DS, con un peso di oltre 0,15 mg, raggiunto tra la quarta e la quinta settimana. In parallelo è avvenuto lo sviluppo nella dieta CS (80% di CS e 20% di alga), in cui le larve hanno avuto un incremento costante fino alla quarta settimana. Seguono la dieta BS, AS ed E con accrescimento costante solo nella prima settimana. La dieta, E caratterizzata da un accrescimento sempre basso nel tempo, ha raggiunto il peso minore essendo priva di microalga *Schizochytrium* sp., in cui il peso larvale ha raggiunto lo 0,06 mg \pm .

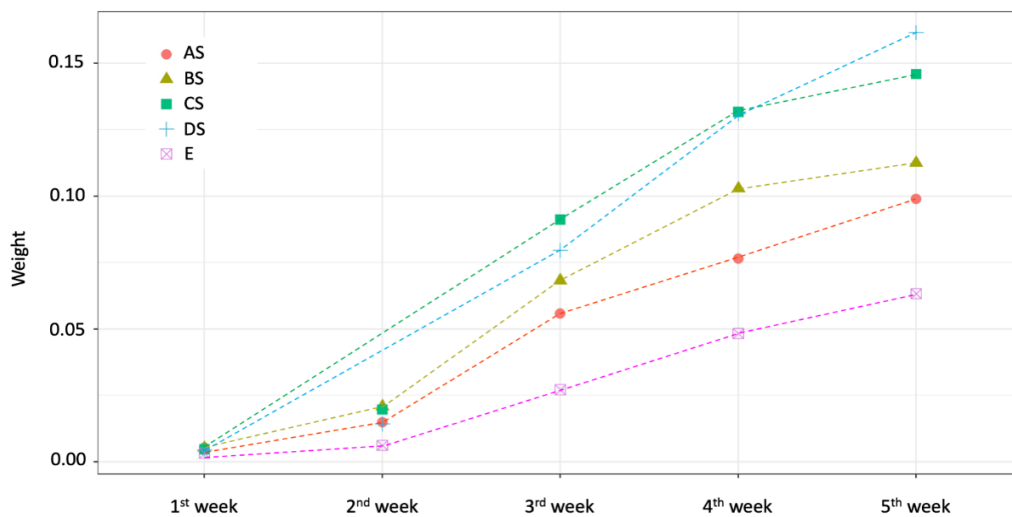


Grafico 1: Incremento ponderale larvale nel tempo sulle cinque diete. [AS = 95 % di CS e 5 % di microalga, BS = 90 % di CS e 10 % di microalga, CS = 80 % di CS e 20 % di microalga, DS = 75 % di CS e 25 % di microalga e E = 100 % di CS].

5.3 Peso dell'ultima età larvale

Le larve alimentate con le diete E (0.095 ± 0.005) e AS (0.095 ± 0.008) sono quelle che hanno dato origine a delle prepupe con il minor peso. Valori interessanti di accrescimento ponderale delle prepupe sono stati raggiunti anche con la dieta CS (0.143 ± 0.006) e BS (0.101 ± 0.005). I risultati migliori sono quelli della dieta DS in cui il peso medio raggiunto dalle prepupe è pari a 0.158 ± 0.008 (Tab. 4; Graf. 2).

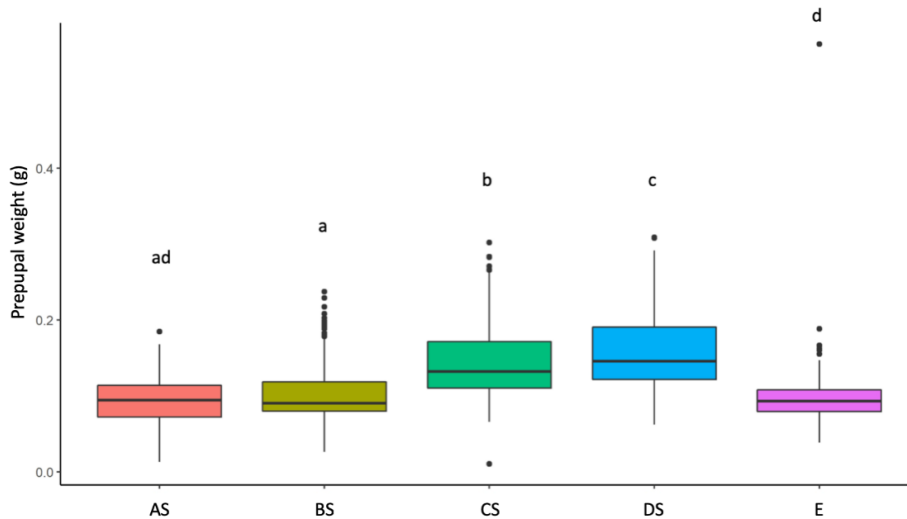


Grafico 2: Peso medio delle prepupe allevate sulle diverse diete sperimentali. [AS = 95 % di CS e 5 % di microalga, BS = 90 % di CS e 10 % di microalga, CS = 80 % di CS e 20 % di microalga, DS = 75 % di CS e 25 % di microalga e E = 100 % di CS]. Lettere diverse indicano differenze significative per $p < 0,05$.

5.4 Tasso di mortalità

Infine, nella Tabella 4 vengono riportati i tassi medi di mortalità osservati nelle varie diete sperimentali. I risultati più bassi di mortalità sono stati registrati nella dieta BS (10% di *Schizochytrium* sp.) con una percentuale pari a 3.20 ± 1.73 . Al contrario il tasso di mortalità più elevato (14.66 ± 6.88) è stato rilevato nelle larve alimentate con la dieta E (priva di *Schizochytrium* sp.). Alti livelli di mortalità ($7.47 \% \pm 5.72 \%$) sono stati rilevati anche nella dieta DS (25% di *Schizochytrium* sp.).

La percentuale di sopravvivenza delle larve di *H. illucens* è stata pari al 100% nei primi sette giorni di sperimentazione, per poi mostrare un crollo che ha interessato tutte e cinque le diete. La dieta BS è quella con un tasso di sopravvivenza superiore. Il tasso di sopravvivenza più basso è quello riscontrato nella dieta E, che ha mostrato una mortalità elevata nei primi 15 giorni di allevamento. Le diete AS e DS hanno mostrato una percentuale di sopravvivenza identica nei primi 21 giorni di sperimentazione, dopodiché nella dieta DS è aumentato il tasso di mortalità. La maggior parte della

mortalità si è verificata durante il primo, secondo e terzo stadio larvale (entro i primi 10-15 giorni dopo l'inizio dell'allevamento) in tutti i trattamenti (Grafico 3).

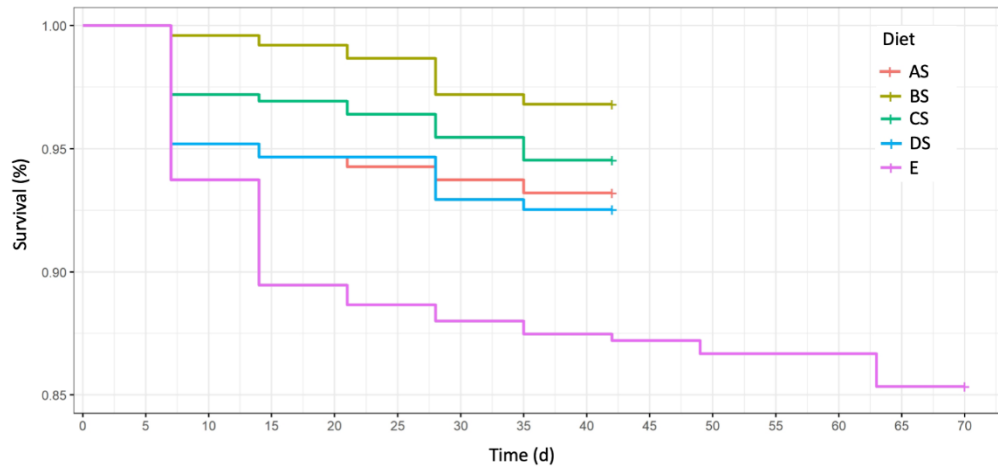


Grafico 3: Sopravvivenza di larve di *Hermetia illucens* su diverse diete composte da CS e diversa percentuale di alga *Schizochytrium* sp. [AS = 95 % di CS e 5 % di microalga, BS = 90 % di CS e 10 % di microalga, CS = 80 % di CS e 20 % di microalga, DS = 75 % di CS e 25 % di microalga e E = 100 % di CS]

6. CONCLUSIONI

In questo studio è stata analizzata l'influenza sulle performance e sul benessere delle larve di *Hermetia illucens* alimentate con cinque diverse diete sperimentali, composte da scarti del processo di torrefazione del caffè arricchiti di diverse percentuali della microalga *Scizochytrium* sp. In particolare, i parametri che si sono registrati durante le prove sperimentali sono stati tre: l'incremento ponderale nel tempo, il peso raggiunto nell'ultimo stadio larvale e il tasso di sopravvivenza. I risultati ottenuti hanno evidenziato come la dieta DS (95% di coffee silverskin e 25% di microalga) sia risultata essere la dieta migliore. Infatti, in questa dieta le larve hanno raggiunto un peso finale significativamente maggiore rispetto alle altre, in un periodo tempo più breve. Per quanto riguarda il tasso di sopravvivenza la dieta BS è risultata essere quella in cui le larve hanno mostrato un valore significativamente più alto di sopravvivenza, seppure ottimi valori si sono registrati nella dieta CS e DS. La dieta E è risultata essere invece la peggiore in termini di incremento ponderale nel tempo, peso finale larvale e tasso di sopravvivenza. Questo potrebbe essere causato dalla presenza di fattori anti-nutrizionali conosciuti come inibitori nell'assunzione delle proteine a livello dell'apparato digerente degli insetti, come inibitori della tripsina, (Opstvedt *et al.*, 2003). Inoltre, l'elevata concentrazione di fenoli nel coffee silverskin potrebbe aver inibito la crescita delle larve provocando alte mortalità e incrementi ponderali limitati e prolungati nel tempo. In conclusione, si può affermare che le diete con una percentuale di inclusione di microalghe più alta (DS e CS), siano i substrati di crescita migliori per *H. illucens*. In queste diete, le larve hanno evidentemente trovato il miglior rapporto tra nutrienti e sostanze necessarie per un loro sviluppo ottimale, incrementando i tempi di sviluppo larvale, raggiungendo pesi soddisfacenti e mantenendo un tasso di sopravvivenza comunque elevato nel tempo. Questo studio

mette in luce come le diete influenzino in maniera significativa le performance larvali, in particolare in termini di peso e sopravvivenza. Allo stesso tempo ulteriori studi sono necessari per comprendere meglio l'influenza dei substrati alimentari nell'ottimizzazione delle performance larvali e del loro contenuto nutrizionale.

RINGRAZIAMENTI

A quanto pare anche io sono arrivata al traguardo finale del percorso universitario, sembrava molto lontano ma alla fine sono qui a scrivere i ringraziamenti. Facendo un bilancio complessivo di questo viaggio posso affermare che i lati positivi e le soddisfazioni sono state decisamente maggiori delle delusioni e difficoltà incontrate. L'insegnamento che porterò per sempre con me è che con l'impegno e la forza di volontà si può fare qualsiasi cosa si voglia, basta credere in se stessi. Consapevole che questo è stato l'inizio della mia vita da adulta

Vorrei ringraziare la Professoressa Paola Riolo, relatrice di questa tesi, per avermi dato la possibilità di fare la mia prima esperienza di studio in laboratorio, permettendomi di entrare in contatto con una realtà universitaria diversa da quella a cui ero abituata. Per avermi seguita e fatto avvicinare al mondo dell'entomologia, fino a poco fa sconosciuto.

Grazie a Nino, mio correlatore, abruzzese come me. Sei stato prezioso in questi mesi.

Se sono arrivata fin qui il grazie più grande va ai miei genitori, mia mamma Adelina e mio papà Gabriele, che in questi anni mi hanno sostenuto in ogni modo, le loro parole e i loro sacrifici sono stati la molla che mi ha dato la spinta ogni qualvolta mi sono sentita incerta riguardo ciò che stavo facendo. Mi hanno spronato a credere in me stessa e nelle mie capacità, invogliandomi a cercare di ottenere di più e a puntare in alto. Sono stati fondamentali.

Grazie a mio sorella che anche se non lo ha mai detto, so che ha fatto il tifo per me.

E che dire dei nonni? Non vedevano l'ora che arrivasse questo giorno.

Una dedica speciale alle mie amiche di sempre: parlare con voi mi ha dato sempre la carica di cui avevo bisogno, probabilmente avete creduto più voi in me che io stessa.

Ad Alessandra e Luca con cui abbiamo affrontato il percorso dell'università. Abbiamo riso, chiacchierato e abbiamo dispensato consigli gli uni agli altri (non sempre inerenti agli studi), quando ripenserò a questi anni voi sarete il motivo per cui mi spunterà il sorriso sulle labbra.

Ed infine un ringraziamento a me stessa, per averci messo l'impegno e la volontà. Posso dire di essere arrivata fin qui attraverso un percorso fatto di alti e bassi, ma per cui ne è valsa la pena, il senso di appagamento è tale da farmi sorridere talmente tanto da aver male alle guance e allo stesso tempo piangere, ma di Gioia. Per alcuni questa laurea potrebbe sembrare roba da poco, ma per me è qualcosa di indescrivibile. Mi sento come Neil Armstrong, il primo uomo a mettere piede sul suolo lunare; un sogno che diventa realtà, il frutto di numerosi sacrifici, il primo di tanti traguardi che spero di raggiungere in futuro.

Quindi grazie. Grazie, sia a coloro che sono stati lì costantemente sia a quelli che anche con una sola frase mi hanno saputo dimostrare affetto e dato sostegno durante questo importante percorso che mi ha portato a tale traguardo che è laurea. Primo traguardo di un viaggio, spero, ricco di soddisfazioni.

Benedetta Montefiore

BIBLIOGRAFIA

- ABNT—Associação Brasileira de Normas Técnicas 1987. - Resíduos Sólidos—Classificação—NBR 10.004. ABNT, Rio de Janeiro, Brazil.
- Adamo I. 2008. - Prima segnalazione faunistica per la Basilicata di *Hermetia illucens* (Linné, 1758) (Diptera: Stratiomyidae). - *Il Naturalista Campano*, 2008 (2), 1–3.
- Alsager O. A., Alnajrani M. N., Alhazzaa, O. 2018. - Decomposition of antibiotics by gamma irradiation: Kinetics, antimicrobial activity, and real application in food matrices. - *Chemical Engineering Journal*, 338, 548-556.
- Ansoff H. I., Kipley D., Lewis A. O., Helm-Stevens R., Ansoff R. 2018. - *Implanting strategic management*. – Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- Arya M., Rao L. J. M. 2007. - An impression of coffee carbohydrates. - *Critical reviews in food science and nutrition*, 47(1), 51-67.
- Antonio, A. G., Moraes, R. S., Perrone, D., Maia, L. C., Santos, K. R. N., Iório, N. L., & Farah, A. 2010. - Species, roasting degree and decaffeination influence the antibacterial activity of coffee against *Streptococcus mutans*. - *Food Chemistry*, 118(3), 782-788.
- Ayadi R., Arbak E., Pieter De Groen W. 2012. - *Regulation of European banks and business models: towards a new paradigm?*. - Centre for European Policy Studies, Brussels.
- Bandara T. 2018. - Alternative feed ingredients in aquaculture: Opportunities and challenges. - *Journal of Entomology and Zoology Studies*; 6(2), 3087-3094.
- Barbato F., Campiotti C., Giagnacovo G., Pignatelli V., Tumminelli D., Viola C., Diorato E. 2012. - Sfruttamento delle microalghe: tra realtà e prospettive, 19-28.
- Becker E.W. 2007. - Micro-algae as a source of protein.- *Biotechnology advances*, 25(2), 207-210.
- Belghit I., Liland N.S., Gjesdal P., Biancarosa I., Menchetti S., Li Y., Waagbø R., Krogdahl A., Jan Lock E. 2019. - Black soldier fly larvae meal can replace fish meal in diets of sea-water phase Atlantic salmon (*Salmo salar*). - *Aquaculture*, 503, 609-619.

- Belitz H. D., Grosch W., Schieberle P. 2009. - Coffee, tea, cocoa. In: Belitz H.D., Grosch W., Schieberle P. *Food chemistry*, 938-970.
- Bohnes F. A., Laurent A. 2019. - LCA of aquaculture systems: methodological issues and potential improvements. - *The International Journal of Life Cycle Assessment*, 24(2), 324-337.
- Booth D.C., Sheppard. C., 1984. - Oviposition of the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae): eggs, masses, timing, and site characteristics. - *Environmental Entomology*, 13, 421-423.
- Bondari K., Sheppard D.C. 1981. - Soldier fly larvae as feed in commercial fish production.- *Aquaculture*, 24, 103-109.
- Borrelli R.C., Esposito F., Napolitano A., Ritieni A., Fogliano V. 2004. - Characterization of a new potential functional ingredient: coffee silverskin. - *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1338–1343.
- Bruni L., Pastorelli R., Viti C., Gasco L., Parisi G. 2018. - Characterisation of the intestinal microbial communities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed with *Hermetia illucens* (black soldier fly) partially defatted larva meal as partial dietary protein source. - *Aquaculture*, 487, 56-63.
- Bukkens S.G.F. 2005. - Insects in the human diet: nutritional aspects. In M.G. Paoletti, (Ed.) Ecological implications of minilivestock; role of rodents, frogs, snails, and insects for sustainable development. - *New Hampshire Science Publishers*, 545–577.
- Claude B. 1979. - Étude bibliographique: utilisation des sous-produits du café. - *Café Cacao Thé*, 23, 146–152
- Cunha M.R. 1992. - Apêndice estatístico. In E. L. Bacha, R. Greenhill (Eds.), *150 anos de café*. - Rio de Janeiro: Martins M., Johnston E., 286-388.
- Costa A.S., Alves R.C., Vinha A.F., Barreira S.V., Nunes M.A., Cunha L.M., Oliveira M.B.P.P. 2014. - Optimization of antioxidants extraction from coffee silverskin, a roasting by-product, having in view a sustainable process. - *Industrial Crops and Products Journal*, 53, 350–357.
- Dahiya S., Kumar A. N., Sravan J. S., Chatterjee S., Sarkar O., Mohan S. V. 2018. - Food waste biorefinery: sustainable strategy for circular bioeconomy. - *Bioresource technology*, 248, 2-12.

- Daniel W.W., Cross C.L. 2018. - *Biostatistics: a foundation for analysis in the health sciences*. - Wiley.
- Cruz G.M. 1983. - Resíduos de cultura e indústria. - *Informe Agropecuario*, 9, 32–37.
- de Melo Pereira G. V., Soccol V. T., Pandey A., Medeiros A.B.P., Lara J.M.R.A., Gollo A. L., Soccol C.R. 2014. - Isolation, selection and evaluation of yeasts for use in fermentation of coffee beans by the wet process. - *International journal of food microbiology*, 188, 60-66.
- De Smet J., Wynants E., Cos P., van Campenhout L. 2018. - Microbial community dynamics during rearing of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) and impact on exploitation potential.- *Appl. Environ. Microbiol.*, 84(9), 2722-17.
- Didanna H.L. 2014. - A critical review on feed value of coffee waste for livestock feeding. - *World Journal of Biology and Biotechnology*, 2, 072-86.
- Diener S., Zurbrügg C., Tockner K. 2009. - Conversion of organic material by black soldier fly larvae – Establishing optimal feeding rates. - *Waste Management & Research*, 27, 603-610.
- Drew D. 2014. - AgriProtein: Building the worlds’ largest insect rearing protein farm – a history and vision. In: Vantomme P., Munke C., van Huis A. (Eds.), *1st International conference “Insects to Feed the World”*. - Wageningen University, Ede-Wageningen, The Netherlands.
- Dutra E.R, Franca A.S., Oliveira L.S., Ferraz V. 2001. - A preliminary study on the feasibility of using composition of coffee roasting exhaust gas for the determination of the degree of roast. - *Journal of Food Engineering*, 47 (3), 241–246.
- Etienne H. 2005. - Somatic embryogenesis protocol: coffee (*Coffea arabica* L. and *C. canephora* P.). In: Jain S.M., Gupta P.K., *Protocol for somatic embryogenesis in woody plant*, 167–168.
- Everest Canary G., 2009. - Diseño y gestion de un proceso para reciclar desechos organicos con la larva *Hermetia illucens* para producir harina de larva. - Tesis de Maestria, Facultad de ingeniera Chia, Universidad de la Sabana, 106 pp.
- FAO 2009. - How to feed the world in 2050. Technical papers from the Expert Meeting on How to Feed the World in 2050, Rome, Italy, 12–13 October.

- FAO 2018. - The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals. Rome, Italy
- Foley J.A., Ramankutty N., Brauman K.A., Cassidy E.S., Gerbe, J. S., Johnston M., O'Connell C., Ray D.K., West P.C., Balzer C., Bennett E.M., Carpenter S.R., Hill J., Monfreda C., Polasky S., Rockstrom J., Sheehan J., Siebert S., Tilman D., Zaks D.P.M. 2011. - Solutions for a cultivated planet. - *Nature*, 478(7369), 337.
- Franca A.S., Gouvea B.M., Torres C., Oliveira L.S., Oliveira E.S. 2009. - Feasibility of ethanol production from coffee husks. - *Biotechnology letters*, 31(9), 1315-1319.
- Franca A.S., Mendonça J.C., Oliveira S.D. 2005. - Composition of green and roasted coffees of different cup qualities. - *LWT-Food Science and Technology*, 38(7), 709-715.
- 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.
- Fujioka K., Shibamoto T. 2008. - Chlorogenic acid and caffeine contents in various commercial brewed coffees. - *Food Chemistry Journal*, 106(1), 217-221.
- Gerber P. J., Steinfeld H., Henderson B., Mottet A., Opio C., Dijkman J., Faluccci A., Tempio, G. 2013. - Tackling climate change through livestock: a global assessment of emissions and mitigation opportunities. - Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome.
- Gerland P., Raftery A.E., Ševčíková H., Li Nan, Gu D., Spoorenberg T., Alkema L., Fosdick B. K., Chunn J., Lalic N., Bay G., Buettner T., Heilig G. H., Wilmoth J. 2014. - World population stabilization unlikely this century. - *Science*, 346 (6206), 234-237.
- Ginz M., Balzer H.H., Bradbury A. G., Maier H.G. 2000. - Formation of aliphatic acids by carbohydrate degradation during roasting of coffee. - *European Food Research and Technology*, 211(6), 404-410.
- Givens D.I., Barber W.P. 1986. - In vivo evaluation of spent coffee grounds as a ruminant feed. - *Agricultural Wastes*, 18, 69-72.
- Guillén J., Macher C., Merzéréaud M., Boncoeur J., Guyade, O. 2015. - Effects of the Share Remuneration System on Fisheries Management Targets and Rent Distribution. - *Marine Resource Economics*, 30 (2), 123-138.
- Hale O. M. 1973. - Dried *Hermetia illucens* larvae (Diptera: Stratiomyidae) as a feed additive for poultry. - *Journal of the Georgia Entomological Society*, 8, 16-20.

- Halloran A., Vantomme P., Hanboonsong Y., Ekesi S. 2015. Regulating edible insects: the challenge of addressing food security, nature conservation, and the erosion of traditional food culture. - *Food Security*, 7(3), 739-746.
- Hammond B. G., Mayhew D.A., Holson J. F., Nemeč M.D., Mast R.W., Sander W.J. 2001. - Safety assessment of DHA-Rich microalgae from *Schizochytrium* sp.: II. Developmental toxicity evaluation in rats and rabbits.- *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 33(2), 205-217.
- Hardouin J., Mahoux G. 2003. - Zootechnie d'insectes-Elevage et utilisation au bénéfice de l'homme et de certains animaux. - In: Bureau pour l'Echange et la Distribution de l'Information sur le Mini-élevage (BEDIM), 164 p.
- Henry M.A., Gai F., Enes P., Pérez-Jiménez A., Gasco L. (2018). Effect of partial dietary replacement of fishmeal by yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) larvae meal on the innate immune response and intestinal antioxidant enzymes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). - *Fish & shellfish immunology*, 83, 308-313.
- Hernández J.A., Heyd B., Trystram G. 2008. - Prediction of brightness and surface area kinetics during coffee roasting. - *Journal of Food Engineering*, 89 (2), 156-163.
- James M.T. 1935. - The genus *Hermetia* in the United States (Diptera: Stratiomyidae). - *Bulletin Brooklyn Entomological Society*. 30, 165–170.
- Jeong J. 2014. – Perspectives of insects industry in South Korea: Government policies and R&D strategies. In: *1st International conference "Insects to Feed the World"* (Vantomme P., Munke C., van Huis A. Eds.). - Wageningen University, Ede-Wageningen, The Netherlands.
- Jiménez-Zamora A., Pastoriza S., Rufián-Henares J.A. 2015. - Revalorization of coffee by-products. Prebiotic, antimicrobial and antioxidant properties. - *LWT-Food Science and Technology*, 61(1), 12-18.
- Kim J.G., Choi Y.C., Choi J.Y., Kim W.T., Jeong G.S., Park K.H., Hwang S.J. 2008. - Ecology of the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera; Stratiomyidae) in Korea. - *Korean Journal of Applied Entomology*, 47, 337–343.
- Kondamudi N., Mohapatra S. K., Misra M. 2008. - Spent coffee grounds as a versatile source of green energy. - *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 11757–11760.

- Leclercq M. 1997. - Á propos de *Hermetia illucens* (Linnaeus, 1758) ("soldier fly") (Diptera Stratiomyidae: Hermetiinae). - *Bulletin et Annales de la Societe Royale Belge d'Entomologie*, 133, 275-282.
- Lima Filho O. D., Malavolta E. 2003. - Studies on mineral nutrition of the coffee plant (*Coffea arabica* L. cv. *Catuai Vermelho*): LXIV. Remobilization and re-utilization of nitrogen and potassium by normal and deficient plants. - *Brazilian journal of biology*, 63 (3), 481-490.
- Machado E.S.M. 2009. - Reaproveitamento de resíduos da indústria do café como matéria-prima para a produção de etanol. – Master of Science thesis, Department of Biological Engineering, University of Minho, Braga, Portugal.
- 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.
- Manceron S., Ben Ari T., Dumas P. 2014. - Feeding proteins to livestock: global land use and food vs. feed competition. OCL. - *Oilseeds and Fats, Crops and Lipids*, 21(4), 408.
- May B.M. 1961. - The occurrence in New Zealand and the life-history of the soldier fly *Hermetia illucens* (L.) (Diptera: Stratiomyidae). - *New Zeland Journal of Scienze*, 4, 55–65.
- Merino G., Barange M., Blanchard J.L., Harle J., Holmes R., Allen I., Allison E.H., Badjeck M.C., Dulvy N.K., Holt J., Jennings S., Mullon C., Rodwell L.D. 2012. - Can marine fisheries and aquaculture meet fish demand from a growing human population in a changing climate?. - *Global Environmental Change Journal*, 22(4), 795-806.
- Mussatto S. I., Carneiro L. M., Silva J. P. A., Roberto I. C., Teixeira J. A. 2011. - A study on chemical constituents and sugars extraction from spent coffee grounds. - *Carbohydrate Polymers*, 83, 368–374.
- Mussatto S. I., Dragone G., Roberto I. C. 2006. - Brewer's spent grain: generation, characteristics and potential applications. - *Journal of Cereal Science*, 43, 1–14.
- Mussatto S. I., Machado E. M., Martins S. Teixeira, J. A. 2011. Production, composition, and application of coffee and its industrial residues - *Food and Bioprocess Technology*, 4(5), 661.
- Nabais J. M. V., Nunes P., Carrott P. J., Carrott M., García A. M., Díaz-Diez M. A. 2008. - Production of activated carbons from coffee endocarp by CO₂ and steam activation. - *Fuel Processing Technology*, 89(3), 262-268.

- 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 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.
- Opstvedt J., Nygård E., Samuelsen T.A., Venturini G., Luzzana U., Mundheim H. 2003 - Effect on protein digestibility of different processing conditions in the production of fish meal and fish feed. - *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83 (8) 2003, 775-782
- Rodrigues F., Palmeira-de-Oliveira A., das Neves J., Sarmiento B., Amaral M. H., Oliveira M. B. P. 2015. - Coffee silverskin: a possible valuable cosmetic ingredient. - *Pharmaceutical biology*, 53(3), 386-394.
- Roos N., Owino V., Kinyuru J., Ekesi S., Courtwright G., Drew D., Hanboonsong Y., Vantomme P., Chamnan C., Olsen S.B., Jensen A.B., Ayienko M. 2014. GREEiNSECTS: a multidisciplinary research project on potentials and barriers for insect-farming for food and feed in Kenya. In: Vantomme P., Munke C., van Huis A. (Eds.), *1st International conference "Insects to Feed the World"*. - Wageningen University, Ede-Wageningen, The Netherlands.
- Rufián-Henares J.A., Cueva, S.P.D.L. 2009. Antimicrobial activity of coffee melanoidins – a study of their metal-chelating properties. - *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 432-438.
- Rufián-Henares, J.A., Morales, F.J. 2007a. Antimicrobial activity of melanoidins. - *Journal of Food Quality*, 30, 160-168.
- Rufián-Henares J.A., Morales F.J. 2007b. Functional properties of melanoidins: In vitro antioxidant, antimicrobial and antihypertensive activities. - *Food Research International Journal*, 40, 995-1002.
- Rumpold B. A., Schlüter O. K. 2013. - Nutritional composition and safety aspects of edible insects. - *Molecular nutrition & food research Journal*, 57, 802-823.
- Saenger M., Hartge E.-U., Werther J., Ogada T., Siagi Z. 2001. - Combustion of coffee husks. - *Renewable Energy Journal*, 23, 103–121.

- 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.
- Sheppard C.D., Newton L., Thompson S.A., Savage S. 1994. - A value added manure management system using the black soldier fly. - *Bioresource Technology Journal*, 50, 275-279.
- Sheppard D. C., Newton G. L. 2000. - Valuable byproducts of a manure management system using the black soldier fly. A literature review with some current results. In: *Proceedings of the 8th international symposium of animal, agricultural and food processing wastes*. - American Society of Agricultural Engineers. St. Joseph, 35-39.
- Sheppard C., Tomberlin J.K., Joyce J.A., Kiser B.C., Sumner S.M. 2002. - Rearing methods for the black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae). - *Journal of Medical Entomology*, 39, 695-698.
- Shepherd C.J., Jackson A.J. 2013. - Global fishmeal and fish oil supply: inputs, outputs and markets. - *Journal of fish biology*, 83(4), 1046-1066.
- Silva M.A., Nebra S. A., Machado Silva M.J., Sanchez C.G. 1998. - The use of biomass residues in the Brazilian soluble coffee industry. - *Biomass and Bioenergy*, 14, 457-467.
- Sideris V.F., Tzagkarakis A. E. 2017. - Immature Development Time of *Hermetia illucens* L. in Different Varieties of Feed. - *Advances in Entomology*, 5(3), 109.
- Sogari G., Amato M., Biasato I., Chiesa S., Gasco L. 2019. The Potential role of insects as feed: A Multi-Perspective Review. - *Animals*, 9(4), 119.
- Sprangers T., Ottoboni M., Klootwijk C., Ovynd A., Deboosere S., De Meulenaer B., Michielis J., Eeckhout M., De Clercq P., De Smet S. 2017. - Nutritional composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) prepupae reared on different organic waste substrates. - *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(8), 2594-2600.
- Tacon A. G., Metian M. 2008. - Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. - *Aquaculture*, 285 (1-4), 146-158.
- Taunay A.E. 1939. - História do café no Brasil. No Brasil Imperial 1822-1872. - Departamento Nacional do Café, Rio de Janeiro, Brazil.
- Thruston M.F., Thorsen Ø. 2017. - Claiming seafood is 'sustainable' risks limiting improvements. - *Fish and fisheries*, 18 (2), 340-346.

- Tomberlin J.K., Sheppard DC., Joyce J.A., Kiser B.C., Sumner S.M. 2002. - Rearing methods for the black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae). - *Journal of Medical Entomology*, 39(4), 695-698.
- Tomberlin J.K., Adler P.H., Myers H.M. 2009. - Development of the black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) in relation to temperature. - *Environmental Entomology*, 38(3), 930-934.
- 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, 345-352.
- Trugo L. 2003. - Coffee. In B. Caballero, L. Trugo, P. Finglas (Eds.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. - London: Academic.
- Trugo L.C., Macrae R. 1984. - A study of the effect of roasting on the chlorogenic acid composition of coffee using HPLC. - *Food Chemistry Journal*, 15, 219-227.
- Turchetto M., Vanin S. 2004. - Forensic entomology and globalisation. - *Parassitologia*, 46(1-2), 187-190.
- Van Huis, A., Van Itterbeeck, J., Klunder, H., Mertens, E., Halloran, A., Muir, G., Vantomme P. 2013. *Edible insects: future prospects for food and feed security* (171). - Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Vargas A., Randazzo B., Riolo P., Truzzi C., Gioacchini G., Giorgini E., Loreto N., Ruschioni S., Zarantoniello M., Antonucci M., Polverini S., Cardinaletti G., Sabbatini S., Tulli F., Olivotto I. 2018. - Rearing Zebrafish on Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*): Biometric, Histological, Spectroscopic, Biochemical, and Molecular Implications. - *Zebrafish*, 15(4), 404-419.
- Veldkamp T., Van Duinkerken G., van Huis A., Lakemond C. M. M., Ottevanger E., Bosch G., Van Boekel T. 2012. - Insects as a Sustainable Feed Ingredient in Pig and Poultry Diets: a Feasibility Study= Insecten als duurzame diervoedergrondstof in varkens-en pluimveevoeders: een haalbaarheidsstudie. - *Wageningen Livestock Research*, 638.
- Venturi F. 1956. - Notulae Dipterologiche X. Specie nuove per l'Italia. - *Bollettino della Società Entomologica Italiana*, 3-4, 56.

Zarantoniello M., Randazzo B., Truzzi C., Giorgini E., Marcellucci C., Vargas-Abúndez J. A., Zimbelli A., Annibaldi A., Parisi G., Tulli F., Riolo P., Olivotto I. 2019. A six-months study on Black soldier Fly (*Hermetia illucens*) based diets in zebrafish. - *Scientific reports*, 9(1), 8598.

Zarantoniello M., Bruni L., Randazzo B., Vargas A., Giocachini G., Truzzi C., Annibaldi A., Riolo P., Parisi G., Cardinaletti G., Trulli F., Olivoto I. 2018. - Partial dietary inclusion of *Hermetia illucens* (black soldier fly) full fat prepupae in zebrafish feed: biometric histological biochemical and molecular implications. - *Zebrafish* 5: 519–532.

SITOGRAFIA

“*Agroalimentare e ricerca*”. Progetto AGER. Tratto il 27 luglio 2019, 11.12 da <https://progettoager.it>

“Additivi e premiscele di additivi” *Ministero della Salute*. Tratto il 30 agosto 2019, 13.04 da <http://www.salute.gov.it>

“Additivi e prodotti o sostanze usati nei mangimi” *Efsa. European Food Safety Authority*. Tratto il 28 agosto 2019, 21.37 da <http://www.efsa.europa.eu>

“Coffee producers” *International Coffee Organization*. Tratto il 19 settembre 2019, 19.04 da <http://www.ico.org>

“Cos’è un mangime” *ASSALZOO. Associazione Nazionale tra i Produttori di Alimenti Zootecnici*. Tratto il 28 agosto 2019, 17.46 da <https://www.assalzoo.it>

“EcoSystem Unveils MAGFUEL Feedstock for Biodiesel: Process Converts Food Scrap Waste into Natural Oils with Greater Yields than Soy” *Biodiesel Magazine*. Tratto il 18 settembre 2019, 22.15 da <http://www.biodieselmagazine.com>

“Gli ingredienti di un mangime” *ASSALZOO. Associazione Nazionale tra i Produttori di Alimenti Zootecnici*. Tratto il 28 agosto 2019, 19.52 da <https://www.assalzoo.it>

“Da luglio le proteine di insetti in acquacoltura” *Una Italia. Unione Nazionale Filiere Agroalimentari Carni e Uova*. Tratto il 27 luglio 2019, 12.17 da <https://www.unaitalia.com>

- “*Hermetia illucens*” *Wikipedia, L'enciclopedia libera*. Tratto il 3 agosto 2019, 10:09 da <https://it.wikipedia.org/wiki/>
- “Insetti e mangimi animali” *Veterinaria e sicurezza alimentare*. Tratto il 18 agosto 2019, 14.33 da <http://www.veterinariaalimenti.marche.it/>
- “La lavorazione del chicco di caffè” *S-caffè*. Tratto il 31 agosto 2019, 21.33 da <https://www.s-caffe.com>
- “L'utilizzo dei sottoprodotti di origine animale nel settore dei mangimi” *Veterinaria e sicurezza alimentare*. Tratto il 29 agosto 2019, 14.37 da <http://www.veterinariaalimenti.marche.it/>
- “Nuovo catalogo materie prime per mangimi, il Regolamento” *Coldiretti*. Tratto il 30 agosto, 12.03 da <https://www.coldiretti.it>
- “The Human Use of Insects as a Food Resource: A Bibliographic Account in Progress” *Food Insects*. Tratto il 13 giugno 2019, 10.31 da <http://www.food-insects.com>
- “Tipologie di mangimi” ASSALZOO. Associazione Nazionale tra i Produttori di Alimenti Zootecnici. Tratto il 30 agosto 2019, 22.34 da <https://assalzo.it>

