



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale

In
BIOLOGIA MARINA

**Analisi della composizione di acidi grassi nel modello sperimentale
Danio rerio in relazione all'inclusione di *Hermetia illucens* in
mangimi per l'acquacoltura**

**Analysis of fatty acids composition in the experimental model *Danio
rerio* in relation to the inclusion of *Hermetia illucens* in
aquaculture feeds**

Tesi di Laurea Magistrale di:

Relatore: Prof.ssa **Cristina Truzzi**

Michela Ninni

Correlatore: Dott. **Matteo Antonucci**

Anno Accademico 2018-2019

SOMMARIO

1	INTRODUZIONE.....	1
1.1	Lipidi.....	1
1.1.1	Acidi grassi.....	2
1.1.1.1	Ruolo fisiologico degli acidi grassi	6
1.1.1.2	Biosintesi degli acidi grassi	9
1.1.2	Assorbimento, mobilizzazione e trasporto degli acidi grassi nei vertebrati.....	13
1.1.3	Assorbimento e trasporto degli acidi grassi nei pesci	18
1.2	Gli acidi grassi essenziali.....	20
1.2.1	Fonti alimentari di acidi grassi omega-3	26
1.3	Acquacoltura e sostenibilità.....	27
1.3.1	Gli insetti	30
1.3.2	<i>Hermetia illucens</i>	34
1.4	Danio rerio	39
2	SCOPO DELLA TESI	43
3	MATERIALI E METODI.....	45
3.1	Strumentazione utilizzata.....	45
3.2	Reagenti e materiali utilizzati	46
3.3	Disegno sperimentale.....	50
3.4	Analisi del campione	51
3.4.1	Preparazione	51
3.4.2	Liofilizzazione.....	52
3.4.3	Estrazione lipidica.....	53
3.4.4	Transesterificazione	55

3.4.5	<i>Determinazione del profilo lipidico mediante GC-MS</i>	55
3.4.6	<i>Espressione dei risultati</i>	61
3.4.7	<i>Controlli analitici</i>	61
3.4.8	<i>Biometrie</i>	62
3.5	Analisi statistica.....	63
4	RISULTATI.....	64
4.1	Profilo lipidico dei mangimi.....	64
4.2	Profilo lipidico delle larve di zebrafish a 20 giorni.....	69
4.2.1	<i>Biometrie</i>	86
4.3	Profilo lipidico di giovanili di zebrafish.....	86
4.3.1	<i>Biometrie</i>	100
4.4	Confronto della composizione di acidi grassi nelle diete e nelle larve e giovanili di zebrafish.....	101
5	DISCUSSIONE.....	110
6	CONCLUSIONI.....	119
7	BIBLIOGRAFIA.....	122

1 INTRODUZIONE

1.1 Lipidi

I lipidi, comunemente noti come grassi, sono una classe di composti organici costituiti da catene alifatiche la cui scarsa polarità dei legami si riflette nella caratteristica solubilità in solventi apolari ma non in fase acquosa.

I lipidi sono classificabili in saponificabili e insaponificabili sulla base, rispettivamente, della presenza e dell'assenza di una funzione esterea. I primi comprendono gliceridi, cere, fosfolipidi e glicolipidi: la loro idrolisi basica porta alla formazione di saponi (sali alcalini degli acidi grassi). I secondi, invece, comprendono terpeni, steroidi e vitamine liposolubili (Stryer et al., 2012).

Sulla base della funzione biologica che i lipidi svolgono, possono essere classificati in tre classi:

- Lipidi di riserva, come i trigliceridi che, accumulandosi negli adipociti, forniscono energia chimica;
- Lipidi strutturali, come i fosfolipidi, costituenti le membrane biologiche;
- Lipidi regolatori, precursori di ormoni e vitamine liposolubili.

1.1.1 Acidi grassi

Per acidi grassi intendiamo acidi monocarbossilici alifatici contenenti un numero variabile di atomi di carbonio, che in natura è in genere pari e compreso tra 4 e 24. La presenza del gruppo carbossilico all'estremità della catena idrocarburica rende queste molecole anfipatiche. È possibile classificare gli acidi grassi in saturi e insaturi sulla base, rispettivamente, dell'assenza e della presenza di almeno un doppio legame. La formula generale di un acido grasso saturo con n atomi di carbonio è $C_nH_{2n}O_2$. Le catene non ripiegate che contraddistinguono gli acidi grassi saturi permettono un'aggregazione tra queste molecole che genera strutture fortemente stabilizzate da interazioni di non-legame. Gli acidi grassi insaturi sono a loro volta classificabili in monoinsaturi (MUFA, Mono-Unsaturated Fatty Acid) caratterizzati da un solo doppio legame) e in polinsaturi (PUFA, Poly-Unsaturated Fatty Acid, caratterizzati da due o più doppi legami). Gli acidi grassi insaturi possono esistere in configurazione *cis* o *trans* in funzione dell'orientamento degli idrogeni impegnati nel doppio legame. Gli isomeri *cis*, più abbondanti nei grassi naturali, sono caratterizzati da un angolo rigido all'interno della catena idrocarburica che si ripercuote in un impacchettamento lasso e meno compatto rispetto agli acidi grassi saturi; al contrario, la configurazione di tipo *trans* (che si ottiene in genere a seguito di trasformazioni tecnologiche) determina una

piegatura di minore ampiezza nella regione del doppio legame con la conseguenza che gli acidi grassi si impacchettano tra loro in modo più stretto dei tipici acidi grassi insaturi naturali (Lehninger, 2005).

Le proprietà degli acidi grassi dipendono strettamente dalla lunghezza della catena carboniosa e dal grado di insaturazione: quanto più lunga e satura è la catena, tanto è maggiore il punto di fusione.

Gli acidi grassi animali sono caratterizzati da catene idrocarburiche quasi mai ramificate; in ogni caso, le analisi del profilo lipidico degli organismi prendono in considerazione solo quelli non ramificati.

Per identificare gli acidi grassi si ricorre a due tipi di nomenclatura oltre che al nome comune (ottenuto aggiungendo il suffisso *ico* alla radice del termine che può fare riferimento o alla fonte naturale o ad una particolare proprietà attribuita all'acido grasso in questione): la nomenclatura IUPAC e quella semplificata. La nomenclatura IUPAC sostituisce il suffisso dell'alcano corrispondente con il suffisso *oico*, numera i carboni a partire dall'estremità carbossilica, e specifica inoltre se la molecola sia in configurazione *cis* o *trans*; quella abbreviata numera i carboni a partire dall'estremità metilica e identifica il primo carbonio insaturo con la lettera ω o n (Berg et al., 2012).

Considerando ad esempio l'acido linoleico riportato in Fig. 1.1, per la nomenclatura IUPAC è un acido *cis* 9-12 octadecadienoico, mentre secondo la nomenclatura semplificata è un 18:2n-6.

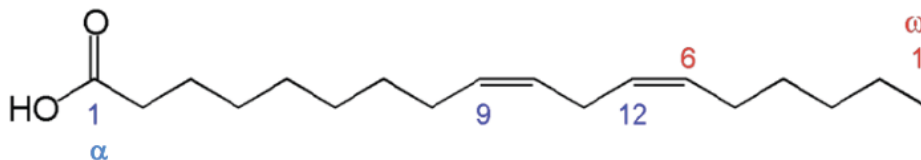


Figura 1.1 Acido linoleico

La tabella 1.1 indica i tipi di nomenclatura utilizzati per nominare gli acidi grassi. A pH fisiologico gli acidi grassi si trovano in forma ionica, pertanto è più corretto riferirsi alla loro forma carbossilata: nella figura 1.2 si riporta ad esempio la struttura della forma ionica dell'acido palmitico: palmitato o esadecanoato.

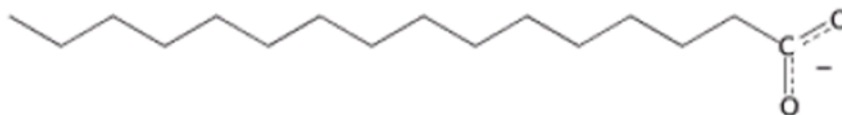


Figura 1.2 Forma ionica dell'acido palmitico (Berg et al., 2012).

Tabella 1.1 Nomenclatura acidi grassi

Nomenclatura IUPAC	Nomenclatura semplificata	Nomenclatura comune
Acido dodecanoico	12:0	Acido laurico
Acido tridecanoico	13:0	Acido tridecanoico
Acido tetradecanoico	14:0	Acido miristico
Acido <i>cis</i> -9-tetradecanoico	14:1n5	Acido miristoleico
Acido pentadecanoico	15:0	Acido pentadecanoico
Acido <i>cis</i> -10 pentadecanoico	15:1n5	
Acido esadecanoico	16:0	Acido Palmitico
Acido <i>cis</i> - 9-esadecanoico	16:1n7	Acido palmitoleico
Acido <i>cis, cis</i> - 5,8-esadecanoico	16:2n7	
Acido eptadecanoico	17:0	Acido margarico
Acido <i>cis</i> -10-eptadecanoico	17:1n7	Acido margaroleico
Acido ottadecanoico	18:0	Acido stearico
Acido <i>cis</i> -9-ottadecanoico	18:1n9	Acido oleico
Acido <i>cis</i> -11-ottadecanoico	18:1n7	Acido vaccenico
Acido <i>cis, cis</i> - 9,12 octadecadienoico	18:2n6	Acido linoleico
Acido <i>cis, cis, cis</i> -3,9,12-ottadecatrienoico	18:3n6	Acido γ -linolenico
Acido <i>cis, cis, cis</i> - 9,12,15- ottadecatrienoico	18:3n3	Acido α -linolenico (ALA)
Acido eicosanoico	20:0	Acido arachico
Acido <i>cis</i> -11-eicosenoico	20:1n9	Acido gondoico
Acido 11,14- eicosadienoico	20:2n6	Acido eicosadienoico
Acido 8,11,14- eicosatrenoico	20:3n6	Acido diomo- γ linolenico
Acido eneicosanoico	21:0	Acido einecosilico
Acido 5,8,11,14- eicosatetraenoico	20:4n6	Acido arachidonico
Acido <i>cis</i> -11,14,17-eicosatrienoico	20:3n3	Acido 11-14-17 eicosatrienoico
Acido <i>cis</i> -5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	20:5n3	Acido eicosapentaenoico (EPA)
Acido docosanoico	22:0	Acido beenico
Acido <i>cis</i> -13-docosenoico	22:1n9	Acido erucico
Acido tricosanoico	23:0	Acido tricosilico
Acido tetracosanoico	24:0	Acido lignocerico
Acido <i>cis</i> -4,7,10,13,16,19-docosaesaenoico	22:6n3	Acido docosaesaenoico (DHA)
Acido <i>cis</i> -15- tetracosenoico	24:1n9	Acido nervonico

1.1.1.1 Ruolo fisiologico degli acidi grassi

Gli acidi grassi svolgono diversi ruoli fisiologici:

- Funzione energetica. Gran parte del fabbisogno energetico delle cellule viene soddisfatto dall'ossidazione dei trigliceridi (TAG, TriAcilGliceroli, Fig. 1.3), esteri neutri del glicerolo in cui gli atomi di idrogeno delle tre funzioni alcoliche sono stati sostituiti dalle catene di tre acidi grassi tramite reazioni di condensazione. I trigliceridi si accumulano negli adipociti e costituiscono un'importante riserva di energia metabolica: la loro completa ossidazione produce infatti circa 9 kcal/g a fronte delle 4 kcal generate dall'ossidazione dei carboidrati e delle proteine (Stryer et al., 2012). Questa differenza in termini di resa energetica si spiega con il fatto che i lipidi, differentemente da carboidrati e proteine, sono ridotti e pressoché anidri: mentre i TAG sono apolari e quindi vengono accumulati sotto forma sostanzialmente anidra, i carboidrati sono polari e quindi molto più idratati (1g di glicogeno lega circa 2 grammi di acqua), con la conseguenza che la resa energetica dell'ossidazione lipidica sia, a parità di massa, significativamente maggiore rispetto alla resa energetica dell'ossidazione glucidica. Non a caso, dunque, l'evoluzione ha selezionato i grassi anziché i carboidrati come forma principale di accumulo di energia.

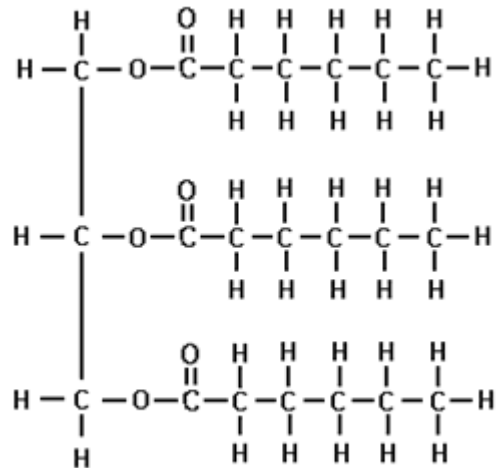


Figura 1.2 Struttura di un trigliceride

- Ruolo strutturale. Gli acidi grassi sono importanti componenti delle membrane biologiche nelle quali essi sono presenti sottoforma di fosfolipidi e di glicolipidi. I fosfolipidi sono abbondanti in tutte le membrane biologiche e sono distinti in fosfogliceridi e in sfingolipidi sulla base della funzione alcolica in essi più rappresentativa: glicerolo e sfingosina, rispettivamente. Nei fosfogliceridi, i fosfolipidi prevalenti nella maggior parte delle membrane, i primi due atomi di carbonio del glicerolo sono esterificati a due acidi grassi, mentre il terzo è esterificato ad un acido ortofosforico. A meno di ulteriori sostituzioni si forma, così, l'acido fosfatidico o il diacilglicerolo-3-fosfato che rappresenta il fosfogliceride più semplice e meno abbondante nelle membrane biologiche. La maggior parte dei fosfogliceridi deriva dall'acido fosfatidico il cui fosfato viene esterificato alla funzione alcolica di vari composti, più comunemente serina, colina, etanolamina, glicerolo

o inositolo. La presenza di una testa molto polare e di due lunghe code non polari conferisce ai fosfogliceridi la caratteristica natura anfipatica che fa sì che gli stessi si associno a formare il doppio strato lipidico.

Negli sfingolipidi lo scheletro molecolare è rappresentato dalla sfingosina, un ammino-alcol contenente una lunga catena idrocarburica con un singolo sito di insaturazione localizzato vicino all'estremità polare. In seguito al legame ammidico tra un acido grasso e al gruppo $-NH_2$ sull'atomo C-2 della sfingosina si forma un ceramide, l'unità fondamentale comune a tutti gli sfingolipidi.

I glicolipidi sono molecole costituite dal legame tra un lipide ed un glucide; essi sono localizzati principalmente sulla membrana plasmatica e, nelle cellule animali, derivano dalla sfingosina. Nei glicolipidi il gruppo ossidrilico primario è legato ad uno zucchero, quello amminico ad un acido grasso. Il cerebroside è il glicolipide più semplice che contiene un solo glucide che può essere glucosio o galattosio.

- Ruolo nella comunicazione intracellulare. Il fosfatidilinositolo e i derivati della sfingosina agiscono da segnali intracellulari. I fosfolipidi contenenti inositolo servono anche come punti di nucleazione per l'organizzazione di complessi sopramolecolari implicati nella trasmissione del segnale e nell'esocitosi. Infine, gli sfingolipidi di membrana fungono da sorgente di messaggeri intracellulari;

sia il ceramide che la sfingomieline sono potenti regolatori di alcune proteine chinasi. Il ceramide ed i suoi derivati sono coinvolti nella regolazione della divisione e del differenziamento cellulare e dell'apoptosi (Lehninger, 2005).

1.1.1.2 Biosintesi degli acidi grassi

Con il termine lipogenesi si intende l'insieme delle reazioni biosintetiche attraverso le quali si producono lipidi endogeni. La sintesi degli acidi grassi ha luogo nel citosol delle cellule epatiche.

In tutti gli organismi le catene carboniose degli acidi grassi vengono sintetizzate mediante la ripetizione di quattro tappe catalizzate da un sistema multienzimatico chiamato acido grasso sintasi (FAS). Le fasi che si susseguono determinando l'allungamento della catena idrocarburica alla volta sono le seguenti (Fig. 1.4):

- 1) Condensazione
- 2) Riduzione
- 3) Deidratazione
- 4) Riduzione

L'acido grasso sintasi esiste in due isoforme principali: la I, tipica di vertebrati e funghi, e la II, rinvenibile in batteri e piante.

Le reazioni si susseguono in modo da allungare la catena crescente di due unità carboniose alla volta; i carboni provengono dall'Acetyl CoA, intermedio chiave

del metabolismo cellulare che, tuttavia, non partecipa alla sintesi degli acidi grassi tal quale, ma dev'essere precedentemente attivato a malonil CoA. L'acetile iniziale, così come ogni gruppo acile prodotto da un ciclo di reazioni, si trova legato a un gruppo SH di una delle subunità del complesso, la proteina condensante, mentre ogni successivo gruppo malonile e i vari intermedi della via restano legati al gruppo SH di un altro componente del complesso multienzimatico, la proteina trasportatrice di acili (ACP). La prima reazione della via è una condensazione tra acetil-ACP e malonil-ACP che produce una molecola di acetoacetil-ACP con liberazione di CO₂ e del gruppo -SH della proteina (Berg et al., 2012).

Le successive reazioni di riduzione avvengono sul gruppo acile legato all'ACP. La seconda reazione è una riduzione NADPH-dipendente a carico del gruppo carbonilico presente sul C-3 dell'acetoacetil-ACP. Nella terza reazione l'idrossiderivato così prodotto viene deidratato con formazione di un doppio legame C-C nel prodotto. La quarta reazione è un'altra riduzione NADPH-dipendente del doppio legame appena formato con produzione del prodotto del

primo ciclo di reazioni, il butirril-ACP, contenente un acido grasso saturo a 4 atomi di carbonio.

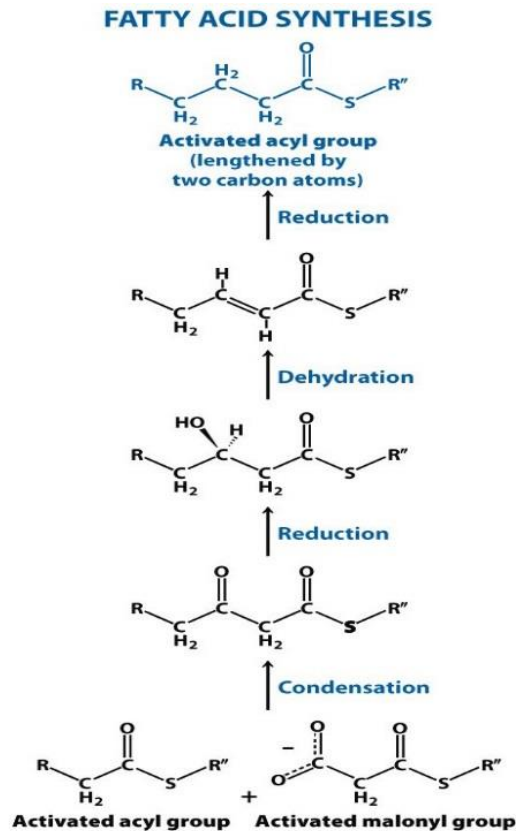


Figure 1.4 Processo di sintesi degli acidi grassi

La sintesi si arresta dopo sette cicli, quando è stata prodotta una molecola di palmitoil CoA (a 16 atomi di carbonio), che si stacca dal complesso enzimatico, mentre quest'ultimo così liberato può iniziare la biosintesi di una nuova molecola di acido grasso. Negli eucarioti superiori il complesso dell'acido grasso sintasi è presente esclusivamente nel citosol; questa localizzazione consente di separare spazialmente i processi degradativi degli acidi grassi, molti dei quali avvengono nella matrice mitocondriale.

Il palmitato è il principale prodotto del complesso dell'acido grasso sintasi negli animali ed è il precursore degli acidi grassi a catena lunga: esso può essere allungato con produzione di stearato (18:0) o acidi grassi a catena ancora più lunga mediante l'aggiunta successiva di unità acetiliche, reazione catalizzata dal sistema di allungamento degli acidi grassi localizzato nel reticolo endoplasmatico liscio, più attivo, e nei mitocondri.

Il palmitato (16:0) e lo stearato (18:0) sono i precursori dei più comuni acidi grassi insaturi presenti nei tessuti animali: il palmitoleato, 16:1 (Δ^9) e l'oleato, 18:1 (Δ^9); il doppio legame presente tra il C-9 ed il C-10 viene introdotto nella catena dell'acido grasso da una reazione ossidativa catalizzata dall'acil-CoA desaturasi attraverso una via che coinvolge il citocromo b_5 ed una flavoproteina NADH-citocromo b_5 reduttasi (Berg et al., 2012).

Anche nei teleostei, i principali acidi grassi sintetizzati *de novo* sono il 16:0 e il 18:0; fanno eccezione i pesci marini che naturalmente consumano una dieta ricca di lipidi quali i *top predators* nei quali i depositi di grasso derivano principalmente, se non esclusivamente, dai lipidi assunti con la dieta; la situazione potrebbe essere differente nei pesci dulcicoli in quanto in ambiente d'acqua dolce prede ricche in lipidi sono meno comuni da trovare (Tocher D. R 2003).

1.1.2 Assorbimento, mobilizzazione e trasporto degli acidi grassi nei vertebrati

Le cellule possono ottenere l'energia di cui necessitano dagli acidi grassi presenti in tre forme: grassi esogeni, assunti con la dieta; lipidi depositati in cellule specializzate (gli adipociti) sottoforma di gocce insolubili ben visibili nel citoplasma, e lipidi depositati in un organo ed esportati in un altro. I vertebrati attuano tutte e tre le vie ingerendo grassi con l'alimentazione, mobilizzando i lipidi dal tessuto adiposo e convertendo i carboidrati in eccesso nel fegato, per poi esportarli in altri organi e tessuti. In media, il 40% o più del fabbisogno energetico giornaliero dell'uomo dei paesi industrializzati proviene dall'ossidazione dei trigliceridi assunti con la dieta. I triacilgliceroli forniscono più della metà dell'energia consumata da alcuni organi, in particolare fegato, cuore e muscolo scheletrico.

Affinché possano essere assorbiti dalla parete intestinale, i triacilgliceroli assunti con la dieta devono essere convertiti da particelle di grasso macroscopiche ed insolubili in micelle microscopiche finemente disperse. Al processo di solubilizzazione partecipano i sali biliari, come l'acido taurocolico, che sono sintetizzati nel fegato a partire dal colesterolo, accumulati nella colecisti e rilasciati nell'intestino tenue dopo un pasto ricco di grassi. La formazione delle micelle rende i grassi assunti con la dieta accessibili alle lipasi

intestinali che scindono i trigliceridi in monogliceridi (MAG), digliceridi (DAG), acidi grassi liberi (FFA) e glicerolo. I prodotti della degradazione lipidica diffondono nelle cellule epiteliali della mucosa intestinale dove vengono riconvertiti in trigliceridi e uniti al colesterolo esogeno e a specifiche apolipoproteine formando i chilomicroni, complessi lipoproteici. La porzione proteica della particella, detta apoproteina, oltre a rendere solubili i lipidi idrofobici contiene segnali di riconoscimento cellulare. Combinazioni di apolipoproteine e di lipidi diversi formano diverse classi di complessi lipoproteici con differente densità che può variare da quella delle lipoproteine a densità molto bassa (VLDL) a quella delle lipoproteine a densità molto alta (VHDL). I chilomicroni che contengono l'apolipoproteina C-II (apo-CII) vengono trasferiti dalla mucosa intestinale al sistema linfatico e, attraverso il flusso ematico, raggiungono il muscolo, il cuore ed il tessuto adiposo; nei capillari di questi tessuti l'enzima extracellulare lipoproteina lipasi, attivato da apo-CII, idrolizza i trigliceridi ad acidi grassi e glicerolo, composti che raggiungono le cellule dei tessuti bersaglio: nel muscolo gli acidi grassi vengono ossidati per ricavare energia, nel tessuto adiposo sono nuovamente esterificati a trigliceridi per essere conservati (Lehninger, 2005)

Quando la dieta contiene più acidi grassi rispetto al fabbisogno energetico momentaneo questi vengono convertiti nuovamente in trigliceridi nel fegato e

trasferiti a specifiche apolipoproteine formando le VLDL. La perdita di trigliceridi converte le VLDL in lipoproteine a densità intermedia (IDL) che per metà vengono captate dal fegato e ulteriormente modificate, mentre l'altra metà è convertita in lipoproteine a bassa densità (LDL) a seguito di un'ulteriore rimozione di trigliceridi. Le LDL rappresentano il maggior trasportatore del colesterolo nel sangue, trasferendolo dal fegato ai tessuti periferici. Infine, abbiamo le lipoproteine ad alta densità (HDL), che legano il colesterolo rilasciato nel plasma dalle cellule per restituirlo al fegato (Fig. 1.5).

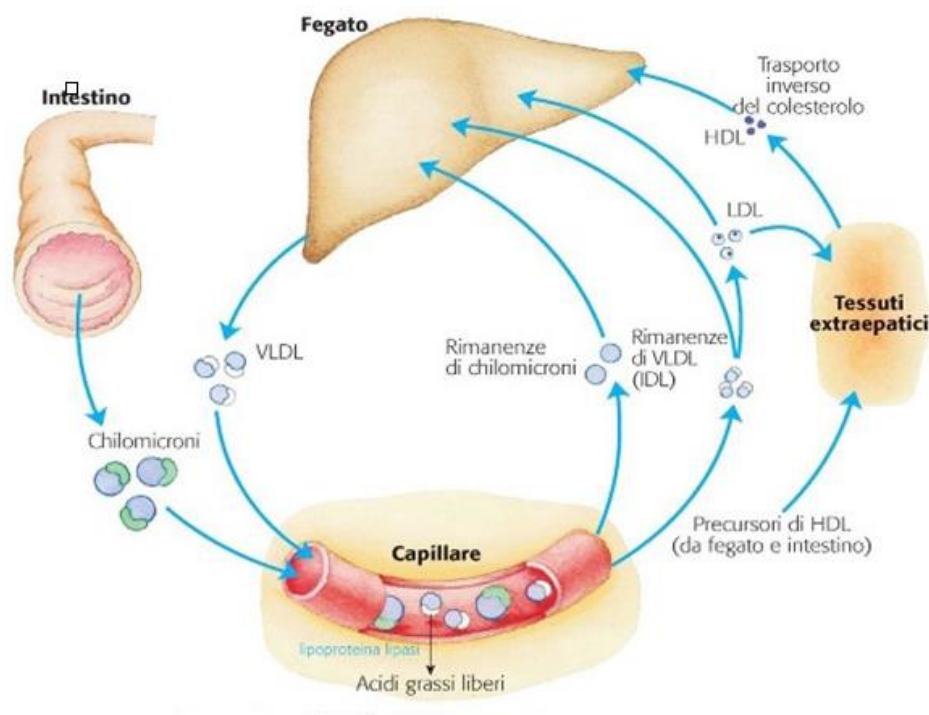


Figura 1.5 Trasporto dei lipidi.

Come sottolineato, i lipidi neutri in eccesso vengono accumulati negli adipociti (e nelle cellule steroidogeniche) sottoforma di goccioline lipidiche all'interno delle quali gli esteri del colesterolo, i trigliceridi e i fosfolipidi si dispongono

in modo da minimizzare le repulsioni idrofobiche. Quando gli ormoni segnalano una carenza di energia metabolica viene attivata una cascata di eventi di fosforilazione al termine della quale la lipasi-ormone sensibile viene trasferita dal citosol alla superficie della goccia lipidica: i trigliceridi vengono così idrolizzati in FFA e glicerolo. Gli FFA diffondono fuori dall'adipocita nel sangue e trovano la sieralbumina, una proteina che rappresenta circa la metà di tutte le proteine del siero e che lega fino a 10 acidi grassi per monomero proteico tramite interazioni non covalenti. Gli acidi grassi, altrimenti insolubili in mezzo acquoso, vengono così trasportati ai tessuti quali muscolo scheletrico, cardiaco e corteccia renale per poi dissociarsi dal *carrier* ed essere internalizzati da specifici trasportatori di membrana localizzati sulle cellule di cui sosterranno il fabbisogno energetico. Circa il 95% dell'energia contenuta nei trigliceridi risiede nelle code di acidi grassi, solo il restante 5% è contenuta nel glicerolo che, dopo essere stato fosforilato a glicerolo 3-fosfato, viene destinato alla via glicolitica.

Una volta all'interno delle cellule, gli acidi grassi sono attivati sulla membrana mitocondriale esterna per essere convertiti nei tioesteri acil-CoA. Gli enzimi deputati all'ossidazione degli acidi grassi sono localizzati, nelle cellule animali, nella matrice mitocondriale; gli acidi grassi caratterizzati da 12 atomi di carbonio al massimo possono attraversare la membrana mitocondriale senza

l'aiuto di trasportatori; gli acidi grassi caratterizzati da 14 atomi di carbonio o più che, come già detto, sono i più diffusi tra quelli rilasciati dal tessuto adiposo e tra quelli esogeni devono subire una serie di reazioni enzimatiche che prende il nome di *shuttle* della carnitina.

L'ossidazione mitocondriale degli acidi grassi saturi a numero pari di carbonio consta di tre fasi: la prima, la β ossidazione, consiste nella rimozione ossidativa di unità bicarboniose sottoforma di acetil-CoA a partire dall'estremità carbossiterminale dell'acido grasso. Ad esempio, nel caso della β ossidazione del palmitato (16:0) si producono 8 molecole di acetil-CoA e, durante la formazione di ciascuna, si ha anche la rimozione di 4 atomi di idrogeno dal gruppo acilico da parte di una deidrogenasi. La seconda fase prevede l'ossidazione dell'unità acetilica di ogni molecola di acetil-CoA a CO_2 attraverso il ciclo dell'acido citrico. Infine, gli elettroni ottenuti dalle precedenti ossidazioni vengono trasferiti all' O_2 tramite la catena respiratoria fornendo l'energia necessaria alla sintesi di ATP attraverso la fosforilazione ossidativa.

L'ossidazione degli acidi grassi insaturi richiede altri due enzimi: l'enoil-CoA isomerasi e la 2,4-dienoil-CoA reduttasi.

Infine, gli acidi grassi con un numero dispari di atomi di carbonio vengono ossidati attraverso a la β -ossidazione producendo, nell'ultimo *step* della

reazione, acetyl-CoA e propionil-CoA che viene convertito in succinil-CoA per poi entrare nel ciclo dell'acido citrico (Lehninger, 2005; Erdman, 2012).

1.1.3 Assorbimento e trasporto degli acidi grassi nei pesci

I lipidi sono, insieme alle proteine, il principale componente organico nei pesci e, in alcuni casi, il loro contenuto può significativamente superare quello proteico. Ciò riflette l'importanza che i lipidi e, in particolare, gli acidi grassi rivestono come fonte di energia metabolica volta a sostenere la crescita somatica, la riproduzione e il nuoto e, dunque, comportamenti quali la predazione, i rituali d'accoppiamento e le migrazioni (Tocher D. R 2003).

I TAG rappresentano la principale classe di lipidi assunti con la dieta dai pesci, sia marini che dulcicoli. Normalmente i trigliceridi presenti nei pesci sono caratterizzati dalla presenza di acidi grassi saturi e MUFA, solitamente esterificati rispettivamente alla prima e alla terza funzione alcolica del glicerolo, e di PUFA a lunga catena (LC PUFA), esterificati nella posizione centrale.

Laidlaw e collaboratori (2014) riportano che la posizione nella quale gli n3 PUFA sono esterificati nei TAG gioca un importante ruolo nel loro assorbimento: gli n3 PUFA in posizione sn-2 sono preferibilmente assorbiti come MAG tramite diffusione passiva dopo la rimozione dei LC FA dalle posizioni sn-1 e sn-3 che, al contrario, necessitano di un trasportatore proteico.

Ciò si traduce in una maggiore biodisponibilità di n3 PUFA negli oli di pesce (Shahidi and Ambigaipalan 2018).

Analogamente al pancreas nei mammiferi, l'epatopancreas è la fonte principale di lipasi nei pesci. La digestione dei grassi inizia nello stomaco dove le lipasi scindono i TAG in DAG e FA; al processo di emulsione a cui partecipano i sali biliari segue la digestione completa attuata dalle lipasi pancreatiche. I FA e i MAG così prodotti diffondono passivamente negli enterociti.

L'assorbimento generalmente procede ad un tasso minore nei pesci rispetto a quanto accada nei mammiferi come risultato di una temperatura corporea più bassa. Come nei mammiferi, l'assorbimento coincide con il massimo di attività lipolitica e, dunque, avviene maggiormente nella porzione prossimale dell'intestino (Tocher D. R 2003).

A questo punto si ha il trasporto dei lipidi dall'intestino attraverso le lipoproteine. La riesterificazione degli acidi grassi avviene principalmente nel reticolo endoplasmatico delle cellule della mucosa intestinale producendo *chylomicron-like* e *very-low density lipoprotein (VLDL)-like particles*; si è osservato che il tenore lipidico ed il grado di insaturazione influiscono sulla formazione delle lipoproteine: un alto contenuto di grassi e di PUFA si traduce nella produzione di chilomicroni più grandi, mentre una dieta ricca di acidi grassi saturi si traduce nella formazione di VLDL più piccole. Similmente a

quanto accade nei mammiferi, le lipoproteine nei pesci vengono trasportate attraverso il sistema linfatico e, secondariamente, dal flusso ematico; una porzione di lipoproteine potrebbe raggiungere direttamente il fegato tramite un sistema portale. Per quanto esistano delle differenze, la struttura e la composizione complessiva delle lipoproteine plasmatiche è comparabile tra le differenti classi di vertebrati; nonostante la variabilità intraspecifica presente nei pesci, la composizione lipidica delle lipoproteine è simile a quella dei mammiferi (Tocher D. R 2003).

1.2 Gli acidi grassi essenziali

Gli epatociti di mammifero non dispongono degli enzimi necessari ad introdurre doppi legami oltre il Δ^9 ; il linoleato, 18:2 ($\Delta^{9,12}$), e l' α -linolenato, 18:3 ($\Delta^{9,12,15}$) sono, pertanto, considerati acidi grassi essenziali (Essential Fatty Acid, EFA) che, non potendo essere sintetizzati *de novo* dall'organismo, devono essere necessariamente assunti con la dieta. Una volta ingeriti, questi possono essere convertiti in altri acidi grassi polinsaturi (PUFA). Il grado in cui gli animali possono effettuare queste conversioni dipende dal grado di attività delle elongasi e delle desaturasi, in particolare le Δ^5 e le Δ^6 ; a loro volta il grado di attività di questi enzimi dipende da quanto la specie in questione può contare su prede naturali ricche nei prodotti finali della conversione. Ad esempio, il fatto che la conversione del 18:3n-3 in 20:5n-3 e, poi, in 22:6n-3 avvenga in

molte specie ittiche d'acqua dolce e in modo significativamente ridotto in quelle marine riflette che il 20:5n-3 ed il 22:6n-3 sono abbondanti in mare dove vengono prodotti dalle microalghe (diatomee e flagellate, rispettivamente) che, essendo alla base della rete trofica, li veicolano allo zooplancton e, infine, ai pesci. Al contrario, le prede naturali dei pesci d'acqua dolce, invertebrati in particolare, sono ricchi in 18:2n-6, 18:3n-3 e, in misura minore, in 20:5n-3, ma sicuramente non in 22:6n-3. Nonostante la comune origine in oceano, i pesci marini sarebbero rimasti in un ambiente dove non è necessario possedere gli enzimi atti a completare la conversione; quelli dulcicoli, non potendo contare su un giusto apporto di acidi grassi a catena lunga tramite la rete trofica, hanno dovuto mantenerli (Tocher D. R 2003).

Di particolare interesse tra gli acidi grassi insaturi c'è la famiglia dei polinsaturi a catena lunga (LC-PUFA) che può essere suddivisa in due sottogruppi: gli acidi grassi n3 e gli acidi grassi n6, distinguibili sulla base della posizione del primo doppio legame a partire dall'estremità metilica (Zárate et al. 2017; Wall et al. 2010).

Le reazioni per la sintesi degli acidi grassi n3 avvengono principalmente nel fegato: l'acido alfa-linoleico è convertito in acido stearidonico dalla Δ^6 -desaturasi, che viene allungato in acido eicosatetraenoico, e successivamente desaturato dalla Δ^5 -desaturasi per ottenere EPA (Tóth-Markus 2014).

Gli acidi grassi n3 di maggior interesse biologico sono principalmente tre: ALA (acido alfa-linolenico), DHA (acido docosaesanoico) ed EPA (acido eicosapentenoico (Bent et al., 2009). L'ALA è l'acido grasso n3 più semplice, sintetizzato a partire dall'acido linoleico ad opera dell'enzima Δ^{15} desaturasi.

Un altro percorso biosintetico importante è quello che porta alla sintesi degli acidi grassi n6 a partire dall'acido linoleico (LA) il cui prodotto principale è l'acido arachidonico (AA). Come si può osservare in Fig. 1.6, i due percorsi biosintetici condividono gli stessi enzimi: il pathway di conversione dell'acido α -linolenico ad EPA è in diretta competizione con quello che porta alla formazione di AA a partire dall'acido linoleico. La reazione catalizzata dalla Δ^6 desaturasi è lo step limitante; poiché i livelli di ALA sono in genere più bassi nella dieta rispetto a quelli del LA nell'uomo, i livelli plasmatici e cellulari di acidi grassi n6 tendono ad essere più alti rispetto a quelli degli acidi grassi n3 (Shahidi and Ambigaipalan 2018).

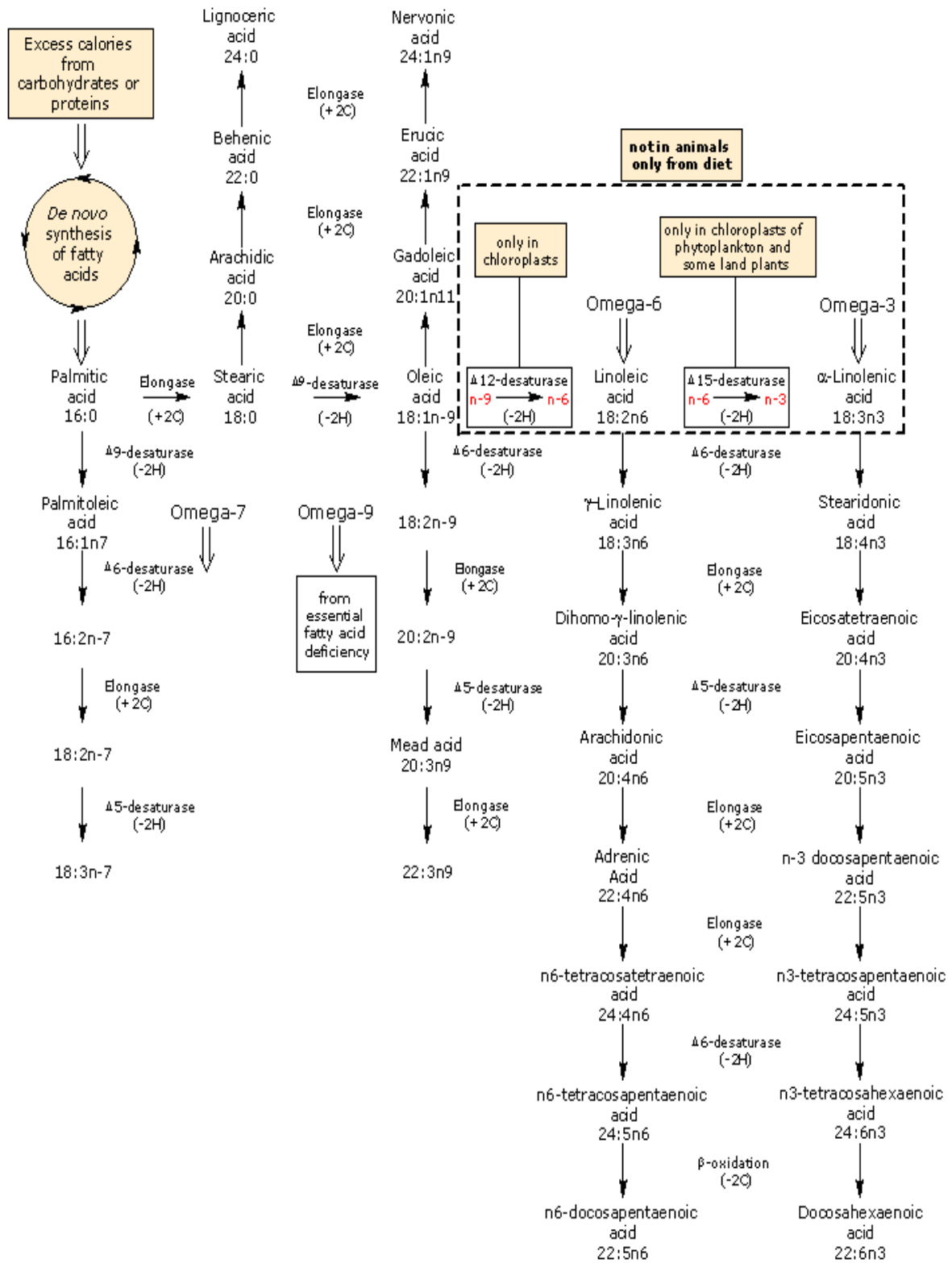


Figura 1.6 Processo di sintesi degli acidi grassi a catena lunga

L'attenzione che sempre maggiormente viene posta sui PUFA è legata agli effetti biologici che essi svolgono all'interno della cellula; ciò deriva non solo dalla lunghezza delle loro catene idrocarburiche, ma anche dal numero di doppi legami presenti e dal loro posizionamento che impartisce loro proprietà fisiche e biochimiche uniche. Ricordiamo che i PUFA sono componenti fondamentali dei fosfolipidi di membrana e che, dunque, la loro concentrazione influenza le proprietà biofisiche del doppio strato fosfolipidico (Deckelbaum and Torrejon 2007).

La seconda funzione principale degli acidi grassi n3 e n6 è quella di agire come ligandi endogeni per i recettori attivati da proliferatori perossisomiali (PPARs). I PPARs sono recettori nucleari e funzionano come fattori di trascrizione che regolano l'espressione genica nei processi metabolici riguardanti sviluppo e differenziamento cellulare. Infine, i PUFA sono precursori di una serie di molecole coinvolte nei processi infiammatori, come gli eicosanoidi, le prostaglandine e le interleuchine. I PUFA n6 sono precursori proinfiammatori, mentre gli n3 sono precursori anti-infiammatori (Wall et al. 2010).

Il DHA è specificamente conservato nei pesci alimentati con diete a basso tenore di EFA, probabilmente a causa dei minori tassi di ossidazione cellulare a cui è soggetto rispetto ad altri acidi grassi (Madsen et al. 1999).

La particolare struttura del DHA lo rende il più efficace tra gli LC-PUFA nel regolare la fluidità e la funzionalità delle membrane biologiche e, in particolare, di quelle neuronali, essendo un importante componente della fosfatidiletanolamina; esso viene attivamente assimilato dal cervello ed è fondamentale nello sviluppo della retina. Ciò fa sì che deficienze di DHA si ripercuotano sulle capacità visive e, di conseguenza, su aspetti comportamentali dell'animale che vanno dalla capacità di formare banchi, come osservato nella ricciola *Seriola quinqueradiata* (Masuda et al. 1999) all'attitudine alla fuga nell'orata *Sparus aurata* (Rodriguez et al. 1998).

Anche l'EPA è particolarmente importante per lo sviluppo larvale e per la fertilità dei riproduttori e, pur essendo incorporato nelle membrane biologiche, questo acido grasso espleta una funzione strutturale meno rilevante se comparato al DHA. Un'assunzione moderata di EPA amplifica l'incorporazione del DHA nella fosfatidilcolina. È un substrato per alcune cicloossigenasi e per alcune lipoossigenasi e, quindi, è il precursore di alcuni prostinoidi e di alcuni leucotrieni. La sua competizione con l'ARA per questi due importanti enzimi lo rende un importante regolatore della sintesi degli eicosanoidi (Izquierdo 2005). I ruoli svolti dagli eicosanoidi nei pesci sono pressoché vari, includendo la modulazione della riproduzione, del rilascio

ormonale, delle funzioni nervose e cardiovascolari, dell'osmoregolazione e del sistema immunitario (Holt 2011).

L'ARA, in vitro, è il principale substrato di alcune cicloossigenasi e quindi il precursore delle prostaglandine; in vivo, tuttavia, è l'EPA ad essere il principale substrato di questi enzimi, probabilmente per via dei maggiori livelli di EPA assunti normalmente con la dieta di molti pesci (Izquierdo 2005). Il corretto apporto di ARA ha profondi effetti sulla metamorfosi e sulla pigmentazione dei pesci piatti (Holt 2011).

1.2.1 Fonti alimentari di acidi grassi omega-3

È ormai ampiamente riconosciuto che per raggiungere un buon stato di salute un rapporto n6/n3 bilanciato sia più rilevante rispetto al quantitativo assoluto dei singoli acidi grassi: nella dieta occidentale odierna questo rapporto è salito fino a 16:1, nonostante quello ritenuto ottimale sia di 4:1 (Wall et al. 2010).

L'ALA costituisce in genere oltre il 50% della quantità totale degli acidi grassi presenti nei tessuti delle piante a foglie verdi in quanto l'ALA è un componente chiave delle membrane dei tilacoidi nei cloroplasti. Nonostante ciò le piante con foglie verdi non sono una fonte ricca di grassi e quindi non sono la fonte alimentare principale per l'assunzione di questi acidi grassi. L'ALA si trova in quantità significative in diversi semi, oli e noci. I pesci magri (come ad esempio il merluzzo) accumulano grassi nel fegato, mentre i pesci grassi (ad esempio lo

sgombro) accumulano i grassi nella carne. Rispetto ad altri prodotti alimentari, il pesce ed i frutti di mare sono una buona fonte di acidi grassi polinsaturi n3 (EPA, DPA e DHA) (Tóth-Markus 2014).

Anche le microalghe contengono acidi grassi n3. Senanayake & Fichtali (2006) riportano che le alghe marine sono i principali produttori di acidi grassi n3 della biosfera. Numerose specie di alghe sono state identificate come fonti di DHA. Gli acidi grassi n3, specialmente EPA e DHA, sono sintetizzati dal fitoplancton per poi accumularsi nel grasso di pesci e mammiferi marini tramite la catena alimentare (Shahidi and Ambigaipalan 2018).

1.3 Acquacoltura e sostenibilità

La popolazione mondiale, seppur in maniera non uniforme nei diversi Paesi del mondo, è in costante aumento e, con essa, è in costante aumento la richiesta di prodotti alimentari, inclusi quelli ittici. La quasi totalità di questo incremento di richiesta è stato soddisfatto grazie ai prodotti derivanti dall'acquacoltura (Cai et al.,2017). Per quanto concerne le stime di crescita futura, si ipotizza che entro il 2025 la produzione derivante dall'acquacoltura aumenterà di circa 19 milioni di tonnellate rispetto al 2015 e che riguarderà soprattutto le specie di pesce di acqua dolce e le diadrome (72%), mentre le specie marine contribuiranno in modo estremamente modesto (3%) a tale fenomeno. Lo sviluppo dell'acquacoltura reca due importanti potenzialità: innanzitutto, la possibilità

di alleviare la pressione esercitata sugli oceani e, inoltre, quella di far fronte all'aumentata richiesta di proteine animali in quanto gli animali pecilotermi, come appunto i pesci, sono più efficienti nell'utilizzare e nel convertire le proteine assunte con i mangimi in proteine destinate al consumo umano (Martin Tschirner and While 2017).

L'aumento della produzione derivante dall'acquacoltura costituisce una sfida al concetto di sostenibilità ambientale in virtù della quale appare necessario minimizzare l'impatto ambientale di tale pratica. Attualmente, il principale limite nello sviluppo dell'acquacoltura è rappresentato dai mangimi tradizionali, ossia quelli a base di farine ed oli di pesce, i quali vengono prodotti a partire da piccoli pelagici appartenenti a livelli trofici medio-bassi e caratterizzati da un ridotto valore commerciale, come le sardine e le alici (Isaacs 2016). Le farine di pesce vengono ottenute tramite essiccazione e macinazione di pesci interi o di loro parti, mentre gli oli vengono ottenuti dalla loro spremitura (Pauly and Zeller 2017). A prescindere dal prodotto di partenza utilizzato per la produzione di farine ed oli di pesce, il processo di lavorazione determina un volume di prodotto di scarto non indifferente; inoltre, l'uso di piccoli pesci per produrre mangimi da destinare a pesci d'allevamento è ostacolato dalla ridotta disponibilità di piccoli pelagici e, dunque, dal costante aumento del loro valore sul mercato. È importante sottolineare che, di

conseguenza, l'acquacoltura verte sulla risorsa ittica naturale per la creazione di *Fish Meal and Fish Oil Products* (FMFOP) che, pur non essendo direttamente rivolti al consumo umano, sostengono industrie che producono alimenti destinati al consumo umano quali allevamenti a terra e, in particolare, l'acquacoltura (Péron, François Mittaine, and Le Gallic 2010). La produzione annuale di fish-meal richiede tra i 16 e i 17 milioni di tonnellate di pesce pescati con questo scopo, oltre a circa 5 milioni di tonnellate di scarti di pesce; più del 90% del FMFOP prodotto ogni anno è destinato all'acquacoltura (Stamer 2015).

Allo stesso tempo, però, i mangimi tradizionali sono ottimi dal punto di vista nutrizionale in quanto fonte di proteine altamente digeribili e di PUFA, oltre che di minerali, vitamine e di amminoacidi essenziali (Isaacs 2016).

La carenza di piccoli pelagici indotta dal sovrasfruttamento avvenuto nelle ultime decadi, la possibilità che il FMFOP contenga significative quantità di contaminanti quali policlorobifenili (PCB) e diossine e la sempre maggiore attenzione dei consumatori dei Paesi industrializzati verso il concetto di sostenibilità hanno fatto sì che si stiano valutando altre possibili risorse da poter sfruttare per poter ottenere mangimi ricchi in HUFA (Highly Unsaturated Fatty Acid) (Thilsted et al. 2016).

Fonti proteiche non animali quali legumi, semi oleosi e/o cereali sono state introdotte nella mangimistica, nonostante varie limitazioni date da aspetti di palatabilità, dalla presenza di varie sostanze antinutrizionali, di basse concentrazioni di amminoacidi solforati e di alte proporzioni di polisaccaridi non amilacei (Tran, Heuzé, and Makkar 2015).

1.3.1 Gli insetti

Allo stato attuale delle conoscenze le potenzialità degli insetti come fonti sostenibili di proteine sono ben note (Tran, Heuzé, and Makkar 2015): essi non solo risolvono il problema della competizione relativa alla destinazione delle produzioni agrarie ed ittiche tra consumo umano diretto (food) e animale (feed) ma consentono di recuperare nutrienti ed energia da materia organica finora ritenuta priva di valore, producendo biomassa ad alto valore nutrizionale.

Negli ultimi anni sempre maggiore attenzione viene posta sulla possibilità di sfruttare i rifiuti e gli scarti alimentari al fine di trasformarli in alimenti caratterizzati da elevato tenore proteico nell'ottica della cosiddetta economia circolare ("*Blue economy*") (Stamer 2015). Nonostante il suo contenuto energetico, la frazione organica dei rifiuti municipali non viene considerata di pari valore ad altri materiali di scarto comunemente riciclati quali carta, vetro, plastica e metallo, con la conseguenza che viene comunemente abbandonata in discarica dove attrae vettori di malattie e, infine, produce grandi quantità di gas

serra (Park 2016). In quest'ottica, gli insetti sembrano essere degli ottimi candidati come fonte sostenibile di proteine destinate alla mangimistica in quanto, oltre a crescere e a riprodursi velocemente, possono essere cresciuti su scarti organici di vario genere e sono caratterizzati da un alto tasso di conversione cibo-biomassa (Tran, Heuzé, and Makkar 2015).

Il profilo amminoacidico degli insetti è specie-specifico, ma è parzialmente modificabile a livello intra-specifico; le carenze amminoacidiche più frequenti negli insetti sono date dall'assenza di istidina, lisina e triptofano che possono essere incorporati variando il substrato di crescita (Sánchez-Muros, Barroso, and Manzano-Agugliaro 2014).

Tenendo bene in mente l'enorme diversità che caratterizza la classe degli insetti, possiamo dire che il tenore proteico degli insetti è compreso tra il 42% ed il 63%, valori comparabili con quelli tipici della soia e di poco inferiori rispetto a quelli caratteristici di farine ed oli di pesce (Tran, Heuzé, and Makkar 2015). Differentemente dalla soia, le proteine presenti nelle farine di insetto sono qualitativamente migliori in quanto spesso, nella soia, gli amminoacidi essenziali sono poco presenti (Sánchez-Muros, Barroso, and Manzano-Agugliaro 2014).

Relativamente ai lipidi, è stato osservato che queste macromolecole vengono accumulate perlopiù durante le fasi di accrescimento larvale negli insetti. Il loro

quantitativo varia in genere tra l'8.5% e il 36% (Tran, Heuzé, and Makkar 2015).

Per quanto riguarda il profilo lipidico, i lipidi degli insetti sono costituiti in maggior misura da acidi grassi saturi, su tutti l'acido palmitico (16:0) e l'acido stearico (18:0), e MUFA, in particolare l'acido oleico (18:1n9). Rispetto alla soia, la farina di insetto mostra un ridotto contenuto di acido linoleico; è bene fare una differenza tra profilo lipidico di insetti terrestri ed acquatici in quanto i primi mancano in EPA e DHA, mentre i secondi contengono EPA, seppur non in quantità comparabili con quelle presenti nel FMFOP. Questo profilo è probabilmente legato alla presenza negli insetti acquatici di specifici enzimi in grado di modulare il grado di saturazione e la lunghezza delle catene di acidi grassi dato che le alghe di cui essi si nutrono sono in realtà molto povere in HUFA (Sánchez-Muros, Barroso, and Manzano-Agugliaro 2014). Questi stessi enzimi sono anche presenti nei pesci di acqua dolce, come dimostrato da Vargas e collaboratori (2018) nei loro studi su zebrafish (*Danio rerio*), ma non in quelli marini. La diversa distribuzione relativa a questi enzimi è correlata all'abbondanza e al tipo di acidi grassi ritrovabili nei due ambienti. Negli ambienti di acqua dolce gli organismi appartenenti ai livelli trofici inferiori (insetti, fitoplancton, zooplancton) sono molto ricchi in acido α -linolenico, un n3, ma non in EPA e DHA, che devono essere ottenuti mediante modificazioni

enzimatiche. In ambiente marino invece, i pesci possono contare su una fonte diretta di acidi grassi essenziali quali EPA e DHA, dato che le loro prede ne presentano elevate quantità (Martin Tschirner and While 2017). La capacità di poter, in una certa misura, trasformare acidi grassi saturi e MUFA in PUFA rende i pesci dulciacquicoli più plastici dal punto di vista metabolico, motivo per cui la maggioranza degli studi sulle parziali inclusioni di mangimi a base di insetto stanno riguardando proprio questi organismi.

Uno dei fattori che ostacola l'uso degli insetti nella mangimistica è la presenza della chitina, un mucopolisaccaride polimerico costituito da residui di N-acetilglucosamina legati tra loro mediante legami β -1,4. Questo polisaccaride, esclusivamente presente nell'esoscheletro degli artropodi, risulta particolarmente resistente alla degradazione enzimatica e, pertanto, non digeribile dagli animali monogastrici. Differentemente dalla chitina che va a formare l'esoscheletro dei crostacei complessandosi a proteine e minerali, calcio in particolare, nella cuticola negli insetti la chitina si associa a proteine, lipidi ed altri componenti a formare una matrice complessa che risulta meno accessibile agli enzimi gastrici con conseguente ridotta digestibilità non solo della chitina, ma anche della componente proteica e lipidica (Henry et al. 2015). La composizione e la quantità di chitina varia tra specie diverse e tra le diverse fasi di sviluppo. Tra gli effetti negativi più noti associati alla presenza di chitina

nei mangimi vi sono l'infiammazione intestinale, la ridotta digeribilità e il ridotto assorbimento dei nutrienti con gravi ripercussioni sul tasso di crescita (Vargas-Abúndez et al. 2019).

I metodi proposti per aumentare la digeribilità della chitina sono vari, quali l'estrazione alcalina e la digestione chimico-enzimatica a carico del mangime; altri prevedono l'inclusione di enzimi e batteri in grado di degradarla nel mangime; in ogni caso, si tratta di metodi che inficiano sul costo finale del mangime (Henry et al. 2015). In un recente studio (Vargas-Abúndez et al. 2019), l'assenza di infiammazione intestinale osservata in esemplari di pesce pagliaccio (*Amphiprion ocellaris*) alimentati con diverse percentuali di inclusione di farine a base di insetto è stata attribuita alla composizione di acidi grassi dell'insetto e, in particolare, all'abbondanza di acidi grassi saturi (acido laurico, C12, *in primis*), noti per migliorare la salute intestinale, grazie al loro potere antibatterico ed antivirale.

1.3.2 Hermetia illucens

Hermetia illucens (Fig. 1.7) comunemente nota come Black soldier fly (BSF) è, contrariamente a quanto potrebbe far pensare il nome comune, un dittero appartenente alla famiglia degli Stratiomyidae; ampiamente diffusa nelle regioni tropicali e temperate calde (45°N e 40°S), questa mosca sembra essere un candidato ideale per la produzione di mangimi alternativi ai tradizionali.

BSF può raggiungere una lunghezza di 27 mm ed è caratterizzata da dimorfismo sessuale. I maschi sono lievemente più grandi delle femmine ma, allo stesso tempo, presentano ali più piccole. Inoltre, le femmine presentano un numero maggiore di peli cefalici biancastri (Marzouk 2016).

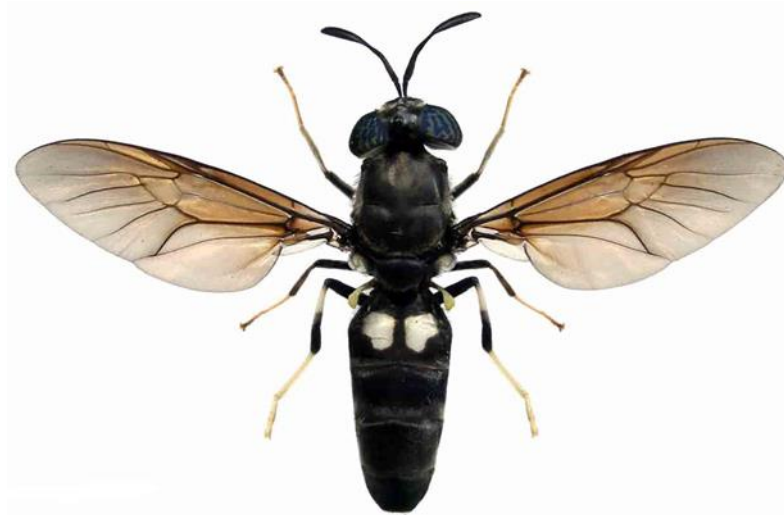


Figura 1.7 Esemplare adulto di *Hermetia illucens*

Le larve tendono a nutrirsi di continuo e, grazie all'efficiente pool di amilasi, lipasi e proteasi di cui dispongono, sono essenzialmente polifaghe. Oltre a crescere su una grande varietà di substrati e, quindi, a fornire la possibilità di recuperare vari materiali di scarto, questo insetto ha un ciclo vitale particolare: ogni femmina rilascia circa mille uova; le larve si accrescono sul substrato a disposizione; l'ultimo stadio larvale, chiamato prepupa, migra dalla fonte alimentare in cerca di un sito asciutto e protetto adatto a compiere la muta che avverrà dopo circa due settimane. L'adulto è piuttosto letargico e vola in modo modesto; le femmine, dopo un paio di giorni, depongono le uova in qualche

fenditura riparata e asciutta che sia adiacente alla fonte di cibo. In questo modo non solo le uova, così come gli adulti, non sono mai a contatto con il materiale in decomposizione, ma il fatto che gli adulti smettano di alimentarsi e ricorrano alle riserve corporee di grasso fa sì che non possano fungere da vettori di malattie. Inoltre, a prescindere dal substrato di crescita scelto, data l'elevata densità larvale e la voracità con cui le larve, subito dopo la schiusa, iniziano a nutrirsi, il substrato di crescita viene processato con una velocità tale da ridurre notevolmente la crescita di batteri responsabili della produzione di cattivi odori; il volume della massa secca del substrato di scarto fornito alle larve viene più che dimezzato. Dopo la raccolta delle larve, infine, il substrato residuo o digestato (anche detto lettiera) potrebbe essere destinato all'agricoltura come *compost* o a strutture per la produzione di biogas. In condizioni ideali le larve maturano in due settimane; altrimenti, in condizioni di scarsità di cibo o di temperatura non ottimale, la fase larvale dura anche quattro mesi. Ciò risulta particolarmente vantaggioso quando si vuole incubare una nuova popolazione. Nella fase di prepupa, che rappresenta quindi l'ultimo stadio immaturo del ciclo vitale, *H. illucens* mostra il più alto contenuto in proteine (36-48%) e in lipidi (31-33%) che andranno a sostenerne la metamorfosi (Park 2016); a trovare applicazione in mangimistica è, appunto, la prepupa in quanto, dopo l'ultima

muta larvale, l'esoscheletro si inspessisce rendendo l'insetto meno digeribile per gli organismi allevati.

Sostituzioni fino ad un massimo del 50% di mangimi a base di farine e oli di pesce con farine a base di *H. illucens* non hanno comportato differenze nella qualità delle carni della trota iridea (*Onkorhynchus mikiss*); tassi di crescita minori rispetto al gruppo di controllo, alimentato cioè con mangimi tradizionali, si osservano negli esemplari alimentati con diverse inclusioni di *H. illucens* cresciuta su substrati di origine terrestre, ma non in quelli alimentati con inclusioni di farina di *H. illucens* cresciuta sullo stesso substrato arricchito da frattaglie di pesce (Sealey et al., 2011).

Belghit e collaboratori (2018) non hanno riportato differenze nei tassi di crescita tra esemplari di *Salmo salar* cresciuti con mangimi commerciali ed esemplari allevati con farine a base di larve di *H. illucens* cresciute su macroalghe marine. Tassi di crescita inferiori sono stati invece osservati in *S. salar* nutrito con larve di insetto cresciute su substrati vegetali terrestri. Nello stesso studio, inoltre, è stata riportata una drastica diminuzione dei livelli di due tipici contaminanti marini: arsenico e mercurio.

All'elevato contenuto lipidico degli insetti non corrisponde, però, una composizione di acidi grassi ottimale per la salute e la nutrizione animale ed umana in quanto caratterizzata da scarse quantità di MUFA e di PUFA. Ciò è

dovuto principalmente ai substrati comunemente impiegati per l'allevamento degli insetti (scarti di frutta e verdura, letame di pollo e di maiale, rifiuti di ristoranti) che sono naturalmente deficienti in LC-PUFA, in quanto la composizione degli acidi grassi degli insetti dipende strettamente dal substrato selezionato per l'allevamento. Considerando l'importanza di riciclare i rifiuti organici al fine di ottenere una biomassa di insetti di maggior valore nutrizionale, un approccio diverso che dovrebbe essere considerato è la procedura di "arricchimento" che consiste nel mischiare, nelle giuste quantità, prodotti naturalmente carenti in PUFA, quali il coffee silverskin, con prodotti naturalmente ricchi in PUFA, come le microalghe marine.

Il coffee silverskin (CS) è un prodotto di scarto del processo di torrefazione del caffè ricco in composti bioattivi quali fibre, carboidrati, antiossidanti (polifenoli) e vitamine; nonostante la sua carenza in PUFA, l'uso del CS come ingrediente per gli alimenti funzionali è raccomandato per via del suo alto contenuto di fibre alimentari solubili (60%) e delle sue attività antiossidanti e prebiotiche potenziali. Ogni anno, in tutto il mondo, si producono grandi quantità di CS (100-200000 tonnellate) che devono essere smaltite, rappresentando non solo uno scarto ma, soprattutto, un costo per le compagnie produttrici di caffè.

Le microalghe marine combinano livelli medio-alti e buona qualità di proteine con alto contenuto di n3 e n6 PUFA, principalmente DHA; possono quindi essere considerati ingredienti ideali ed ecologicamente sani per il miglioramento dei substrati di alimentazione degli insetti (Truzzi et al., 2019), Nell'ambito del progetto NUTRIFISH il CS è stato scelto come substrato di crescita principale per l'allevamento di *H. illucens*, mentre due differenti microalghe (*Schizochytrium sp.* e *Isochrysis sp.*), a diverse percentuali di inclusione, sono state valutate come potenziali ingredienti di "arricchimento" al fine di individuare il mangime che garantisca la miglior composizione di acidi grassi in termini di presenza di PUFA e, in particolare, di n3. Le prepupe allevate sul substrato arricchito con *Schizochytrium* hanno mostrato il profilo lipidico migliore con una diminuzione significativa della percentuale di acidi grassi saturi a favore degli insaturi ed un aumento significativo del rapporto $\frac{n3}{n6}$. Considerando il rapporto costi-benefici, un'inclusione del 10% di *Schizochytrium* nel substrato di crescita sembra essere la più conveniente per allevare *H. illucens* e ottenere una biomassa finale dall'alto valore nutrizionale (Truzzi et al. 2019).

1.4 Danio rerio

Danio rerio, comunemente noto come zebrafish, è uno dei più importanti organismi modello per i vertebrati per vari settori della biologia. Si tratta di un

piccolo pesce (3-4 cm per meno di 1 g di peso) di acqua dolce appartenente alla famiglia Cyprinidae ed originario del Sud-Est Asiatico (Fig.1. 8).



Figura 1.8 Esempio di *Danio rerio*

Morfologicamente mostra un corpo affusolato e compresso lateralmente. La linea laterale è interrotta. La bocca è rivolta verso l'alto con la mascella inferiore che protrude in avanti. Alla sua livrea, caratterizzata dalla presenza di spesse linee orizzontali (da cinque a sette) alternate a linee più sottili di colore bianco, si deve il nome comune dell'animale. La coda e la pinna anale mostrano la stessa colorazione del resto della livrea, mentre le altre pinne hanno una colorazione olivacea; quella dorsale è contornata da una linea bianca (Spence et al. 2008).

I maschi adulti sono in genere più piccoli e più longilinei delle femmine che, inoltre, presentano una piccola papilla genitale di fronte alla pinna anale (Ribas and Piferrer 2014).

In natura, questo animale predilige acque calme e poco profonde ed è spesso ritrovabile associato alle coltivazioni di riso; l'associazione alle coltivazioni di riso è probabilmente correlata all'uso di fertilizzanti che potrebbero promuovere la crescita dello zooplancton, importante componente della dieta di zebrafish. Si tratta di un pesce onnivoro che in natura si nutre primariamente di zooplancton e di insetti, ma anche di fitoplancton, di materiale vegetale di vario genere, di spore e di uova di invertebrati, di detrito e fango. Gli insetti mangiati principalmente sono insetti acquatici o, anche, forme larvali di insetti terrestri come i ditteri; ciò ha portato a pensare che zebrafish possa svolgere un ruolo di controllo sulle mosche. In uno studio condotto nell'arco di un anno si è visto che la composizione della dieta di questo pesciolino varia notevolmente nel corso dei mesi senza un'apparente correlazione alle variazioni stagionali. La grande proporzione di plancton da esso ingerito suggerisce che esso si cibi prevalentemente in colonna d'acqua. Allo stesso tempo però il consumo di insetti terrestri e di aracnidi suggerisce che esso, in natura, si nutra anche in superficie, così come l'ingestione di detrito suggerisce che esso si nutra anche sul fondo (Spence et al. 2008).

In cattività questo pesce viene nutrito con rotiferi, naupli di *Artemia salina* e cibo granulare secco; si è osservato che zebrafish in laboratorio non ingerisce il cibo che sedimenta sul fondo della vasca (Ribas and Piferrer 2014).

La possibilità di usarlo in vari settori della ricerca scientifica è legata ad una serie di caratteristiche favorevoli di questo organismo: facilità di allevamento, bassi costi di mantenimento, semplicità nell'induzione della riproduzione, produzione di uova ed embrioni pressoché trasparenti, raggiungimento dell'età adulta in 3-4 mesi. Gli zebrafish si riproducono in modo asincrono, con la conseguenza che nelle ovaie si ritrovano follicoli in tutti gli stadi di sviluppo. In natura si riproducono per lo più annualmente: la stagione riproduttiva inizia poco prima dei monsoni (ad agosto) quando, cioè, le temperature sono alte e la disponibilità di cibo elevata. In condizioni di laboratorio lo spawning avviene tutto l'anno ad intervalli di 1-6 giorni; la *clutch size* è nota per essere positivamente correlata alla taglia della femmina e alla durata degli intervalli inter-spawning (Spence et al. 2008)

Alle caratteristiche eco-fisiologiche positive si è aggiunto un fattore che ha determinato un aumento nell'utilizzo di questo organismo come modello, ovvero il sequenziamento dell'intero genoma. Questo processo ha messo in evidenza che zebrafish condivide il 70% del genoma con l'uomo e che molti dei geni coinvolti nell'insorgenza di patologie nell'uomo hanno una controparte in questo pesce (Howe et al. 2013).

2 SCOPO DELLA TESI

L'aumento della popolazione mondiale, il miglioramento delle condizioni di vita di Paesi ad alta densità demografica come la Cina e l'*overfishing* dei nostri mari sono i fattori principali che rendono i mangimi tradizionalmente impiegati in acquacoltura non più economicamente vantaggiosi né sostenibili. L'aumento della domanda alimentare e le pratiche di produzione alimentare non sostenibili genereranno un aumento della produzione di rifiuti e di sottoprodotti (van Huis 2012), nonché un depauperamento delle risorse ittiche. La direttiva CE No. 2008-98 stabilisce l'ordine di priorità nella scelta dei trattamenti dei rifiuti nel quale il primo posto è assegnato al loro riutilizzo e l'ultimo allo smaltimento in discarica.

Gli insetti possono rappresentare un prezioso ingrediente alternativo per la produzione di mangimi e alimenti in un nuovo interessante approccio di economia circolare sostenibile, in quanto mostrano un alto tasso riproduttivo, un alto valore nutrizionale e possono crescere su vari sottoprodotti biologici.

Recentemente, l'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA) ha stilato un elenco di specie di insetti potenzialmente utilizzabili nella produzione di mangimi ed alimenti nell'UE includendovi *Hermetia illucens*, uno dei più promettenti (EFSA 2015). Sin dagli anni '90, l'allevamento di *H. illucens* è stato proposto come una via efficiente attraverso la quale convertire rifiuti

organici in biomassa caratterizzata da un alto valore nutrizionale da destinare a vari scopi, tra cui la mangimistica. Non stupisce, dunque, la crescente attenzione che la comunità scientifica e l'industria alimentare rivolgono agli insetti come fonti di proteine con cui sostituire, parzialmente o totalmente, le farine e gli olii di pesce.

Lo scopo di questa tesi è studiare il contenuto di lipidi e la composizione di acidi grassi nel modello sperimentale *Danio rerio* in relazione alla composizione di mangimi dove i tradizionali ingredienti di farine e oli a base di pesce vengono sostituiti con diverse percentuali di inclusione di *Hermetia illucens*. Questo lavoro di tesi si inserisce in un progetto di ricerca, NUTRIFISH, volto a studiare la possibilità di inserire *H. illucens*, cresciuta su substrati opportunamente arricchiti di PUFA, in mangimi utilizzati per la crescita dello storione, pesce normalmente allevato per utilizzo umano, e più in generale in mangimi destinati all'acquacoltura.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Strumentazione utilizzata

Il trattamento dei campioni e l'estrazione lipidica sono stati effettuati in laboratorio decontaminato (*clean room*), ISO 14644-1 Classe 6, con aree ISO Classe 5; tutte le operazioni sono state condotte sotto cappa a flusso laminare.

Di seguito si elenca la strumentazione utilizzata:

- Bilancia analitica, Mettler Toledo (Svizzera), precisione 0.01 mg, ripetibilità: deviazione standard=0.015 mg;
- Omogeneizzatore a lame MZ 4110, potenza 750 w (DCG eltronic, Milano, Italia) e omogeneizzatore ULTRA-TURRAX T25, Janke e Kunkel (IKALabortechnik, Staufen, Germany);
- Micro-centrifuga Eppendorf AG mini Spin 22331(Germany);
- Gascromatografo 6890N (Agilent Technologies, USA), dotato di:
 - Colonna capillare CC-WAX MS (lunghezza 30 m, diametro interno 0.25 mm, film 0.25 μ m), CPS ANALITICA;
 - sistema di iniezione split-splitless;
 - forno programmabile con condizioni di lavoro impostate a seconda del tipo di colonna adottata;
 - rivelatore: spettrometro di massa 5973 (Agilent Technologies, USA); interfacciato direttamente alla colonna cromatografica per mezzo di un

setto a tenuta stagna in Vespel. La ionizzazione delle molecole avviene per frammentazione ad impatto elettronico (70 eV); il selettore di massa è un quadrupolo;

- Siringa manuale con ago rimovibile da 5 μ l (Hamilton);
- Forno a microonde MARS 5 (CEM Corporation, North Carolina, USA) con frequenza standard di 2450 MHz. Il forno è munito di carrello dove possono essere inseriti fino a 14 contenitori in teflon (PFA);
- Stufa da laboratorio Binder (USA) a ventilazione forzata che lavora in un range di temperatura che va da 5 °C sopra la temperatura ambiente fino ad un massimo di 300 °C (precisione ± 0.1 °C a 50 °C).
- Liofilizzatore (Edwards EF4: Crawley, Sussex, England);
- Vortex Velp scientifica (MB, Italia)

3.2 Reagenti e materiali utilizzati

- n-eptano per l'analisi dei residui organici (Baker, Phillipsburg, NJ, USA cod.9338-22);
- estere metilico dell'acido nonadecanoico 99.6%, (Dr. Ehrenstorfer GmbH cod.15622360);
- metanolo (Baker, Phillipsburg, NJ, USA cod. 9263);
- cloroformio per l'analisi dei pesticidi (Carlo Erba, Arese (MI), Italia, cod 438651);

- etere di petrolio 35 - 60 °C per l'analisi dei pesticidi (Carlo Erba, Arese (MI), Italia, cod.447862);
- acetone per l'analisi di pesticidi (Carlo Erba, Arese (MI), Italia, cod.SO01500500);
- sodio metilato per sintesi ~97%, (Merck, Hohenbrunn, Germania, cod.8.06538.0250);
- sodio idrogeno solfato anidro extra puro, (Scharlau, Sentmenat, Spagna, cod.SO01500500);
- elio 6.0, gas carrier per analisi gascromatografiche, grado di purezza $\geq 99.9999\%$ (SOL, Monza, Italia);
- filtri WHATMAN GF/C diametro 90 mm, (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK);
- 37-FAME (Fatty Acid Methyl Esters), mix di standard di Metil Esteri degli Acidi Grassi, (Supelco, Bellefonte, PA, USA, n. di lotto LC04806V), come da certificato allegato al prodotto (Tabella 3.1);

Tabella 3.1 Estratto del certificato di composizione dello standard utilizzato per la preparazione di soluzioni standard diluite per la calibrazione dei 37 acidi grassi.

	Analita		Purezza cromatografica %	Concentrazioni certificate µg/ml
	Nome tradizionale	Nome IUPAC		
1	Acido metil butirrico	Acido metil butanoico	99.9	399.7
2	Acido metil caproico	Acido metil esanoico	99.9	399.5
3	Acido metil caprilico	Acido metil ottanoico	99.9	399.5
4	Acido metil caprinico	Acido metil decanoico	99.9	399.6
5		Acido metil undecanoico	99.9	199.9
6	Acido metil laurico	Acido metil dodecanoico	99.9	399.7
7		Acido metil tridecanoico	98.7	197.4
8	Acido metil miristico	Acido metil tetradecanoico	99.9	399.6
9	Acido metil miristolico	Acido metil tetradecenoico	99.9	199.9
10		Acido metil pentadecanoico	99.9	199.8
11		Acido cis-10-metil pentadecenoico	99.0	198.0
12	Acido metil palmitico	Acido metil esadecanoico	99.9	599.4
13	Acido metil palmitoleico	Acido cis-9-metil esadecenoico	99.9	199.9
14	Acido metil margarico	Acido metil eptadecanoico	99.6	199.2
15		Acido cis-10-metil eptadecenoico	98.4	196.9
16	Acido metil stearico	Acido metil ottadecanoico	99.9	399.6
17	Acido metil elaidnico	Acido trans-9-metil ottadecenoico	99.7	199.4
18	Acido metil oleico	Acido cis-9-metil ottadecenoico	99.9	399.7
19		Acido trans-9,12-metil ottadecadienoico	99.9	199.7
20	Acido metil linoleico	Acido cis-9,12-metil ottadecadienoico	99.9	199.9
21	Acido metil arachico	Acido metil eicosanoico	99.9	399.7
22	Acido metil γ linolenico	Acido cis-6,9,12-metil ottadecatrienoico	99.9	199.8
23	Acido metil gadoleico	Acido cis-11-metil eicosenoico	99.9	199.9
24	Acido metil α linolenico	Acido cis-9,12,15-metil ottadecatrienoico	99.9	199.8
25		Acido metil eicosenoico	99.9	198.8
26	Acido metil eicosadienoico	Acido cis-11,14-metil eicosadienoico	99.9	199.8
27	Acido metil beenico	Acido metil docosanoico	99.7	398.9
28	Acido metil diomo-γ-linolenico	Acido cis-8,11,14-metil eicosatrienoico	99.8	199.8
29	Acido metil erucico	Acido cis-13-metil docosenoico	99.9	199.8
30	Acido metil eicosatrienoico	Acido cis-11,14,17-metil eicosatrienoico	99.9	199.8
31		Acido metiltricosanoico	99.9	199.8
32	Acido metil arachidonico	Acido cis-9,8,11,14-metil eicosatetraenoico	98.7	197.3
33		Acido cis-13,16-metil docosadienoico	99.9	199.8
34	Acido metil lignocericico	Acido metil tetracosanoico	99.9	399.6
35	Acido metil eicosapentaenoico	Acido cis-5,8,11,14,17-metil eicosapentaenoico	99.8	199.5
36	Acido metil nervonico	Acido cis-5-metil tetracosenoico	99.9	199.8
37		Acido cis-4,7,10,13,16,19-metil docosaesaenoico	99.9	199.9

La concentrazione effettiva dei singoli analiti (esteri metilici degli acidi grassi) componenti la miscela nella soluzione madre, è determinata dalla seguente formula:

$$[C] = P(\text{mg})/V(\text{ml})$$

dove:

- [C] = concentrazione effettiva analita (mg/ml);
- P = peso dell'analita come da certificato di composizione (mg);
- V = volume diluizione (ml).

La concentrazione effettiva degli analiti nelle soluzioni standard derivate dalla soluzione madre è determinata dalla seguente formula:

$$[CS] = C (\text{mg} / \text{ml}) \times \text{FD}$$

dove:

- [CS] = concentrazione soluzione
- C = concentrazione soluzione madre
- FD = fattore di diluizione dato dal $\frac{\text{volume soluzione madre}}{\text{volume finale soluzione}}$

Per la preparazione degli standard si applica la metodologia proposta da Truzzi e collaboratori (2017) partendo dal materiale di riferimento a titolo certificato; una volta preparate le sette soluzioni di calibrazione a concentrazione crescente, queste possono essere conservate fino a tre mesi in freezer a -18°C.

3.3 Disegno sperimentale

Nel presente lavoro sono state condotte analisi della composizione di acidi grassi di un set di cinque diete caratterizzate da un livello di sostituzione delle fonti proteiche e lipidiche di origine marina con la farina derivata dalle prepupe di *Hermetia illucens* pari rispettivamente a: 0, 25, 50, 75 e 100%.

Gli insetti in questione sono stati allevati presso la facoltà di Agraria dell'Università Politecnica delle Marche (UNIVPM). Partendo da risultati precedenti sulla composizione degli acidi grassi delle prepupe di *Hermetia illucens* cresciute su differenti substrati e, in particolare, sulla base del rapporto tra acidi grassi n3 e acidi grassi n6, gli insetti ritenuti ottimali per la formulazione dei mangimi sono stati quelli allevati su substrati costituiti da silverskin, (fornito da Saccaria srl) arricchiti con un'inclusione del 10% di *Schizochytrium* sp (prodotte e fornite da Alghitaly) (Truzzi et al. 2019).

La composizione in ingredienti delle diete sperimentali è stata individuata per analogia con le attuali formulazioni presenti sul mercato. Le diete sono state formulate in modo da risultare isoproteiche (CP 51.0 %) e isolipidiche (CL 13.7 %) e sono state prodotte sotto forma di pellet estruso a freddo presso i laboratori del Dipartimento di Scienze Agroalimentari, Ambientali e Animali (Di4A) dell'Università degli studi di Udine. La Tabella 3.2 riporta l'elenco degli ingredienti utilizzati per la preparazione delle diete, con le relative quantità.

Tabella 3.2 Composizione in ingredienti (g/Kg) delle 5 diete formulate per la conduzione della prova sperimentale di alimentazione effettuata con il modello sperimentale *Danio rerio*.

	MS:Hi 100:0	MS:Hi 75:25	MS:Hi 50:50	MS:Hi 25:75	MS:Hi 0:100
Ingredienti (g/kg)					-
Farina di pesce	470	400	250	110	-
Farina Hermetia BS10% (liofilizzata)	-	150	275	350	460
Mix ingredienti vegetali	418	402	418	495	5142
Olio di pesce	80	51	25	10	-
Gli Lecitina di soia	8	8	8	11	4
Intergratore Min. & Vit	14	14	14	14	14
Legante	10	10	10	10	10

esemplari di *Danio rerio* sono stati ottenuti da riproduttori allevati presso lo stabulario dell'UNIVPM, e sono stati alimentati con le diete suddette. I pesci sono stati sacrificati in parte a 20 giorni (stadio larvale) e in parte a 2 mesi (giovanili, 8 esemplari per gruppo). Le larve sono state omogeneizzate tal quali in un pool di x esemplari, mentre i giovanili sono stati eviscerati prima dell'omogeneizzazione, ed analizzati singolarmente.

3.4 Analisi del campione

3.4.1 Preparazione

I campioni, sia di tessuto che di mangimi, vengono conservati a -80°C per evitare la perossidazione lipidica. Prima dell'analisi strumentale, il campione

viene omogeneizzato mediante l'apposito omogeneizzatore a lame MZ 4140 per pochi minuti; a questo punto si preleva l'aliquota destinata all'analisi (generalmente 0.25 g di tessuto per le larve e 0.2 g per i mangimi), mentre la restante parte viene congelata nuovamente a -80 °C in appositi sacchetti con etichetta descrittiva del campione. Per ogni campione vengono prelevate tre aliquote.

3.4.2 Liofilizzazione

Il processo di liofilizzazione, effettuato sul campione omogeneizzato che abbia riposato almeno un'ora a -80 °C, permette la disidratazione del campione in particolari condizioni di temperatura (<0 °C) e di pressione (sottovuoto). La liofilizzazione ci permette di ottenere un campione disidratato, conservabile a lungo poiché sono inibite le trasformazioni chimiche ed enzimatiche. Tale processo è fondamentale, in quanto la presenza di acqua nel campione può interferire sia durante l'estrazione lipidica che durante la transesterificazione, per cui avere campioni disidratati ci permette di ottenere un ambiente favorevole per i processi sopra elencati. Il campione viene posto in provette di vetro portate precedentemente a peso costante. Le provette contenenti il campione sono state pesate per ottenere il peso del campione umido (*wet weight*) e, sigillate con del parafilm su cui è stato effettuato un piccolo foro mediante l'ago di una siringa. Il processo di liofilizzazione necessita di circa

12 ore al fine di far evaporare completamente l'acqua. Il peso secco (*dry weight*) del campione viene determinato per differenza. Si è osservato un contenuto d'umidità compreso, nei mangimi, tra 0.9 e 3% e, nelle larve, tra l'80 e l'85%.

3.4.3 Estrazione lipidica

Un metodo semplice e veloce utilizzato per effettuare l'estrazione lipidica dai mangimi ridotti in polvere è il metodo di Folch (1957). Tradizionalmente impiegato per l'estrazione lipidica da matrici ricche di cellulosa (Aguirre and Bassi 2013), si tratta di un metodo di estrazione a freddo che consiste nell'aggiunta, nella provetta contenente il campione, di una miscela costituita da cloroformio e metanolo in rapporto 2:1. Il solvente più apolare funge da mezzo di estrazione, mentre l'alcol provoca la dissociazione delle interazioni lipidi-proteine nella matrice. Si procede aggiungendo 100 µl di standard interno (l'estere metilico dell'acido nonadecanoico diluito 1:10 con n-eptano) a ciascuna provetta. A questo punto la soluzione viene sottoposta ad agitazione con il vortex per circa 20 secondi. Infine, le provette vengono riposte in una busta sigillata e lasciate riposare per 12 ore a -80°C.

L'estrazione lipidica delle larve, ben sminuzzate e liofilizzate, viene effettuata utilizzando la tecnica Microwave-Assisted Extraction (MAE), una tecnica di estrazione a caldo che, se da un lato consente di evitare di utilizzare un reagente

tossico come il cloroformio, dall'altro implica l'utilizzo di maggiori quantità di reagenti. Il campione viene collocato negli appositi contenitori in teflon PFA per estrazione lipidica e si aggiungono 15 ml di una miscela di etere di petrolio e acetone in rapporto 2:1. Vengono aggiunti 100 µl di standard interno 10 mg/ml e una punta di spatola di Sodio Iposolfito (Na_2SO_4), in modo tale da trattenere l'eventuale acqua che il campione liofilizzato può inglobare durante la conservazione e/o il trattamento (agente anidrificante).

Una sonda inserita nel contenitore specifico per il pilota, contenente quindi la stessa quantità di materia organica presente negli altri, monitora temperatura e pressione durante l'intero processo di estrazione. Dei dischetti in ceramica posti sopra i tappi dei contenitori uniformano la pressione esercitata sugli stessi.

Una volta che i contenitori sono stati inseriti sul carrello e questo inserito nell'apposito alloggiamento all'interno del microonde, viene selezionato il programma per l'estrazione lipidica che prevede: riscaldamento fino a 90 °C in 10 minuti, hold di 20 minuti a 90 °C e raffreddamento in 10 minuti.

Dopo il processo di estrazione, il campione viene sottoposto a una filtrazione effettuata con filtri WHATMAN (GF/C diametro 90 mm) sui quali viene aggiunto Na_2SO_4 . Il filtro viene lavato con 2 aliquote da 2 ml della miscela di etere di petrolio e acetone (2:1). Il filtrato viene raccolto all'interno di un pesafiltri portato a peso costante e il solvente organico viene lasciato evaporare

sotto cappa e successivamente in stufa a 80 °C per un'ora. Otteniamo la quantità di lipidi estratti tramite pesata per differenza.

3.4.4 Transesterificazione

I lipidi estratti presenti nel pesafiltri vengono risospesi:

- in 1 ml di n-eptano nel caso dell'estrazione con metodo di Folch;
- in 0.5 ml nel caso della tecnica MAE

Si aggiungono quindi 25 µl di sodio metilato 2M (in MeOH) per ogni 20 mg di lipidi estratti; se i lipidi estratti sono più di 20 mg, l'agente transesterificante viene aggiunto in rapporto 1:1 alla quantità di lipidi considerando 10 µl di sodio metilato in eccesso. La soluzione viene poi agitata per 3 minuti, quindi centrifugata per 1 minuto a 1000 rpm. Si preleva il surnatante contenente gli esteri metilici degli acidi grassi e si aggiungono 40 mg di sodio metabisolfito per neutralizzare la soluzione; si agita nuovamente per 1 minuto. Si centrifuga di nuovo per 1 minuto a 1000 rpm. Il campione può ora essere analizzato.

3.4.5 Determinazione del profilo lipidico mediante GC-MS

Le analisi sono state eseguite con un gascromatografo Agilent 6890N associato ad uno spettrometro di massa Agilent MSD 5973, (Figura 3.1).

Le analisi sono state effettuate con i seguenti parametri operativi:

- Temperatura d'ingresso: 250 °C;

- Volume di iniezione: 1 μ l;
- Rapporto di split: dipende dalla quantità dei lipidi estratti nel campione considerato;
- Gas di trasporto: elio.
- Pressione: costante (~55 kPa a 50 °C, 34 cm/s a 50 °C);
- Temperatura forno: 100 °C, 1 min, rampa di 25 °C/min fino a 150 °C, rampa di 5 °C/min fino a 200 °C, rampa di 1 °C/min fino a 230 °C;
- Temperatura transfer line 280 °C;
- MSD parametri: scansione (da 40 a 500 amu), soglia 100; MS quad 150°C; MS source 230 °C; Solvent delay: 2 min.

La modalità Total Ion Current (TIC) è stata utilizzata per l'individuazione dei tempi di ritenzione dei singoli acidi grassi operando prima sullo standard FAME mix, poi sul campione. Per la quantificazione degli acidi grassi si è successivamente lavorato in modalità SIM (Single Ion Monitoring). I metodi SIM si basano sull'analisi di tre masse selezionate anziché sull'intero intervallo di massa. Riducendo l'intervallo a pochi ioni, la sensibilità può essere aumentata all'incirca di un fattore di 100 rispetto alle misurazioni in modalità TIC (Vetter and Thurnhofer 2007).

Dallo spettro di massa si ricava l'abbondanza relativa degli ioni in funzione del loro rapporto massa/carica.

Lo spettro di massa è specifico di ogni composto e ne costituisce, quindi, un'impronta digitale. Gli ioni selezionati in letteratura per l'analisi del profilo lipidico sono i seguenti: m/z 74 per gli acidi grassi saturi, m/z 55 per i mono-insaturi, m/z 67 per i di-insaturi e m/z 79 per i poli-insaturi (Zhang et al. 2014). Secondo Hauff and Vetter (2009) gli esteri metilici degli acidi grassi saturi e monoenoici vengono determinati tenendo conto dei rapporti m/z 74 e 87, mentre i polinsaturi vengono determinati usando i rapporti m/z 81 e m/z 79. Partendo da queste due diverse fonti, e facendo diverse prove, gli ioni selezionati in questo lavoro di tesi sono (m/z): 74 e 87 per i saturi, 74 e 55 per i monoinsaturi, 67 e 81 per i di-insaturi e 79 e 81 per i polinsaturi.

Si è preferito assegnare ioni differenti a di-insaturi e polinsaturi poiché questi spesso nel cromatogramma si trovano ad avere tempi di ritenzione molto simili; selezionare ioni differenti permette una migliore differenziazione dei picchi.

Poiché lo strumento non è dotato di un campionatore automatico le iniezioni sono state fatte manualmente tramite l'apposita siringa.

Alla fine dell'analisi si ottiene uno spettro di massa specifico per ogni composto che ne definisce l'impronta digitale.

Per quanto detto è stato possibile associare ogni acido grasso ad un dato tempo di ritenzione (Tabella 3.3).

La quantificazione di ogni singolo acido grasso è stata effettuata attraverso una

specifica retta di taratura per ogni analita, utilizzando le soluzioni standard preparate per diluizione del FAME-mix (Truzzi et al. 2017).

Tabella 3.3 Tempi di ritenzione degli acidi grassi

Acido grasso	Tempo di ritenzione (minuti)	Acido grasso	Tempo di ritenzione (minuti)
12:0	7.0	18:3n3	20.63
13:0	8.3	20:0	23.02
14:0	9.78	20:1n9	23.69
14:1n5	10.35	20:2n6	25.35
15:0	11.36	20:3n6	26.37
15:1n5	11.97	21:0	26.72
16:0	13.07	20:4n6	27.20
16:1n7	13.5	20:3n3	27.87
16:2n7	14.18	20:5n3	29.93
17:0	14.9	22:0	30.96
17:1n7	15.37	22:1n9	31.82
18:0	17.18	23:0	35.63
18:1n9	17.72	24:0	40.71
18:1n7	17.87	22:6n3	41.12
18:2n6	18.82	24:1n9	41.75
18:3n6	19.64		

Viene utilizzato come standard interno l'estere metilico dell'acido nonadecanoico in quanto presenta le stesse proprietà fisiche e chimiche delle componenti del campione esterificato e, inoltre, non è presente in natura.

Analizzando i campioni con la gascromatografia in modalità SIM il rivelatore presenta una sensibilità specifica per ogni componente; ne consegue che il segnale rilevato non sarà proporzionale alle quantità di ogni singola componente tra parti diverse generando così picchi di dimensioni diverse. Per quanto affermato sarebbe necessario fare curve di taratura per ogni singolo acido grasso aumentando enormemente la mole di lavoro e le tempistiche necessarie alla quantificazione delle sostanze. Per ottimizzare i tempi e semplificare il lavoro, la quantificazione è stata effettuata tramite il metodo che

prende in considerazione il fattore di risposta. A tal proposito è stato necessario calcolare la diversa risposta del rivelatore per ogni sostanza nei confronti dello standard interno (SI) preso come sostanza di riferimento. Per calcolare il fattore di risposta dovrebbe essere ottimizzata una retta per ogni singolo estere metilico (dal C4 al C24) riportando l'area sottesa al picco di etere metilico dell'acido grasso rapportata allo standard interno in funzione della concentrazione dell'estere metilico processata e rapportata alla concentrazione di SI (Fig. 3.2). La differenza della risposta del rivelatore al componente x rispetto al SI è rappresentata dalla pendenza della retta di taratura ed espressa come fattore di risposta (RF_x). RF_x lega l'area del picco alla quantità del componente iniettato. La retta di taratura è stata ottenuta attraverso l'utilizzo di soluzione standard a concentrazione nota di acidi grassi (FAME) (Truzzi et al., 2017).

La Tabella 3.4 riporta il valore del RF per ogni metilestere degli acidi grassi presenti nel FAME-mix. Più basso sarà il valore di RF, minore sarà la sensibilità del rivelatore nei confronti di quel dato acido grasso. Possiamo osservare che RF per i saturi (0.68 ± 0.13) è significativamente più alto rispetto al RF per i MUFA (0.30 ± 0.07) e per i PUFA (0.26 ± 0.08).

Tabella 3.4 Fattore di risposta (RF) degli acidi grassi.

	FAME	RF		FAME	RF
1	4:0	0.5883	19	18:2n6c	0.3744
2	6:0	0.5298	20	18:3n6	0.2292
3	8:0	0.6739	21	18:3n3	0.2734
4	10:0	0.7607	22	20:0	0.6360
5	11:0	0.8093	23	20:1n9	0.2559
6	12:0	0.8124	24	20:2n6	0.3374
7	13:0	0.8416	25	20:3n6	0.3387
8	14:0	0.8156	26	21:0	0.5704
9	14:1	0.3178	27	20:4n6	0.1864
10	15:0	0.8242	28	20:3n3	0.2287
11	15:1	0.3251	29	20:5n3	0.1703
12	16:0	0.7834	30	22:0	0.5573
13	16:1	0.3348	31	22:1n9	0.2276
14	17:0	0.7654	32	22:2n6	0.1708
15	17:1	0.3285	33	23:0	0.4989
16	18:0	0.7318	34	24:0	0.4392
17	18:1	0.3972	35	22:6n3	0.1900
18	18:2n6	0.3774	36	24:1n9	0.1956

3.4.6 *Espressione dei risultati*

I risultati vengono espressi come percentuale di ogni singolo acido grasso rispetto al contenuto totale dei lipidi, previa correzione della stessa con il relativo fattore di risposta calcolato; la relativa quantificazione viene espressa in mg/ g dw (*dry weight*).

3.4.7 *Controlli analitici*

Il GC necessita di due controlli importanti, il controllo del bianco e il controllo del buon funzionamento dello strumento (TUNE).

Al fine di accertarsi della pulizia della colonna e/o dell'assenza di picchi

anomali, viene effettuato, all'inizio di ogni serie di analisi o prima della costruzione della retta di taratura, il bianco del GC costituito da n-eptano (1 µl). Lo split utilizzato per l'analisi del bianco dipende da quello usato per il campione successivo da analizzare. Per discriminare tra l'eventuale sporcizia della colonna capillare piuttosto che della siringa è opportuno effettuare anche un bianco strumentale.

Per garantire il buon funzionamento del GC è necessario controllare i tempi di eluizione degli esteri metilici degli acidi grassi presenti nello standard 37 FAME mix che viene iniettato periodicamente.

3.4.8 Biometrie

Per ulteriore completezza sono state inserite nel presente lavoro di tesi le analisi biometriche gentilmente fornite dal laboratorio di Biologia dello sviluppo e della riproduzione dell'UNIVPM. Le analisi sono state effettuate al momento dei campionamenti su 15 esemplari di zebrafish per ciascuna dieta, casualmente selezionati da ciascun gruppo sperimentale.

La misura della lunghezza standard è stata effettuata per mezzo di un calibro con precisione pari a 0.1 mm (Measy 2000 Typ 5921, Swiss); la misura del peso umido è stata effettuata mediante una bilancia analitica con precisione pari a 0.1 mg (OHAUS Europe GmbH, Greifensee, Switzerland).

A 3 dps (*days post spawning*) è stato misurato il peso umido su un pool di

cinque larve. Per ogni gruppo sperimentale è stato poi calcolato lo Specific Growth Rate (SGR) applicando la seguente formula:

$$\text{SGR \%} = \frac{(\ln W_f - \ln W_i)}{t} \times 100$$

dove

W_f = final wet weight,

W_i = initial wet weight,

t = tempo espresso in giorni (17 per le larve, 57 per i giovanili).

Il risultato è espresso in percentuale di incremento giornaliero, un modo pratico per confrontare gruppi di pesci in esperimenti condotti su breve periodo in campo nutrizionale (Lugert et al. 2016).

3.5 Analisi statistica

I dati sono stati elaborati con il programma STATGRAPHICS Centurion 18 (2018, Manugistics Inc., Rockville, Maryland, USA). Il confronto tra gruppi è stato effettuato con il test di ANOVA ad una via, seguito dal Multiple range test (Daniel and Cross, 2013), dopo aver testato l'omogeneità della varianza con il test di Levene. Differenze significative sono state valutate a un livello di confidenza del 95% ($P < 0.05$).

4 RISULTATI

4.1 Profilo lipidico dei mangimi

I mangimi mostrano un contenuto di peso secco (dry weight, dw) molto simile, che varia dal $99\pm 0.1\%$ nella dieta di controllo, al $97.3\pm 0.3\%$ nell'Hi100 (media $98\pm 0.7\%$). Rispetto al peso secco, la percentuale di lipidi totali non mostra differenze statisticamente significative ($P=0.76$) tra le varie diete sperimentali (Fig. 4.1). I risultati analitici confermano che le diete prodotte si caratterizzano per tenori lipidici approssimativamente equivalenti, così come determinato anche dal Dipartimento di Scienze Agroalimentari, Ambientali e Animali (Di4A) dell'Università degli Studi di Udine (~ 13.7 g/100g) che ha preparato le diete sperimentali.

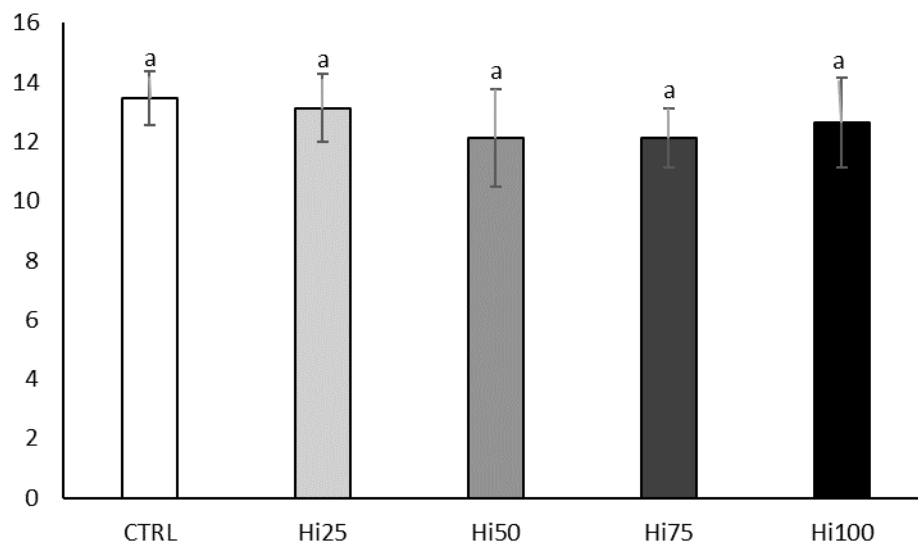


Figura 4.1 Lipidi totali (in % dw) dei mangimi utilizzati nel disegno sperimentale.

La Fig. 4.2 mostra il contenuto percentuale delle diverse classi di lipidi. Le diete ottenute con l'inclusione di farina di insetto mostrano una percentuale di SFA significativamente maggiore (40.9 ± 0.7 , 40.0 ± 2.0 , 35.9 ± 0.7 e 37.6 ± 2.8 % per Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100, rispettivamente) in confronto alla dieta di controllo (27.8 ± 1.3 %); inoltre, le diete Hi25 e Hi50 mostrano una percentuale di SFA significativamente maggiore rispetto alle diete Hi75 e Hi100. Per quanto riguarda i MUFA, si può notare che tutte le diete a base d'insetto sono caratterizzate da una percentuale significativamente minore (19.8 ± 0.3 , 19.0 ± 0.9 , 21.5 ± 0.2 e 20.0 ± 1.0 % per Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100, rispettivamente) rispetto alla dieta di controllo (24.7 ± 0.6 %). Lo stesso risultato si evidenzia per i PUFA: le diete a base di insetto mostrano percentuali significativamente minori (39.3 ± 1.0 , 41.0 ± 1.0 , 42.6 ± 0.3 e 42.2 ± 3.2 % per Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100, rispettivamente) rispetto alla dieta di controllo (47.4 ± 1.4 %). L'aumento della percentuale di inclusione di farina a base di insetto si traduce in un aumento statisticamente significativo della percentuale di acidi grassi n6 (da 8.6 ± 0.1 % nella dieta di controllo fino a 31.3 ± 0.9 % nell'Hi100) e, contemporaneamente, in una diminuzione statisticamente significativa di n3 (da 38.8 ± 1.4 % nella dieta di controllo fino a 11.1 ± 3.1 % nell'Hi100), con la conseguenza che il rapporto $\frac{n6}{n3}$ aumenta all'aumentare delle percentuali di inclusione di insetti nella dieta (da 0.22 ± 0.01 nella dieta di

controllo fino a 2.8 ± 0.2 nella dieta Hi100) (Fig. 4.3). Infine, l'aumento della percentuale di inclusione si riflette anche in aumento statisticamente significativo della percentuale di acidi grassi n9 (10.7 ± 0.2 , 12.1 ± 0.7 , 14.6 ± 0.2 e 15.2 ± 0.7 % per Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100, rispettivamente). La dieta di controllo (13.9 ± 0.3 %) mostra valori intermedi compresi tra le diete Hi25 e Hi50.

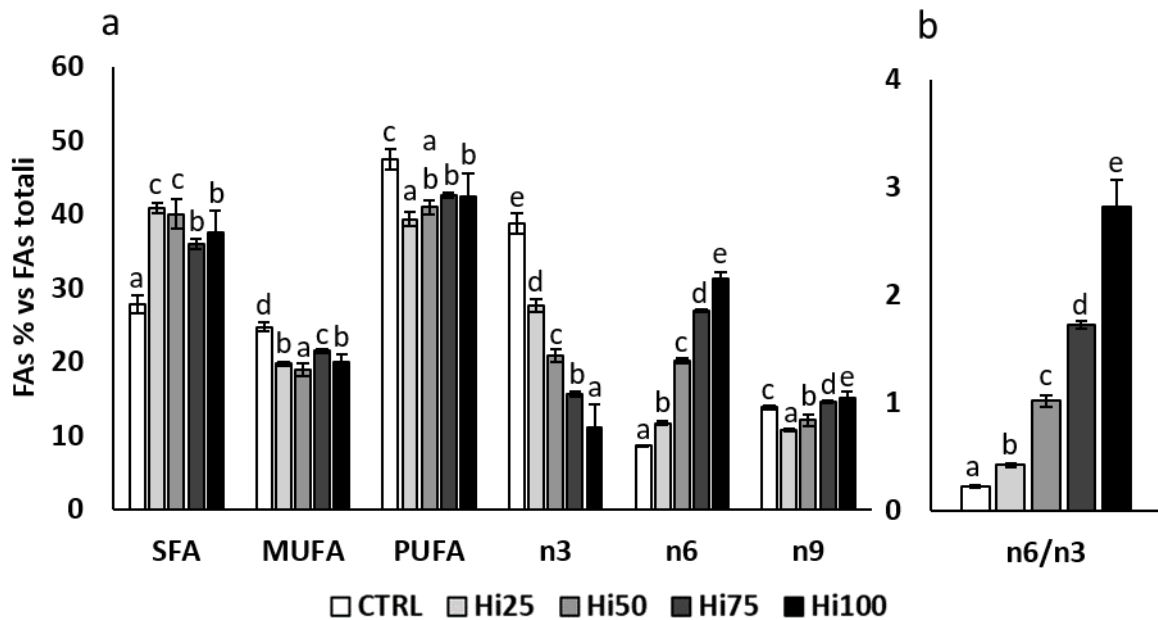


Figura 4.2 Contributo di SFA, MUFA, PUFA, n3, n6 e n9 (espressi come % del totale di FA) nelle diete sperimentali (a); rapporto n6/n3 nelle diete sperimentali (b). Le diete di controllo, Hi25, Hi50; Hi75 e Hi100 sono caratterizzate dallo 0, 25, 50, 75 e 100% di inclusione di farina a base di insetto, rispettivamente. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i gruppi sperimentali all'interno della stessa classe di acidi grassi ($p < 0.05$). I valori sono espressi come media ($n=9$), le barre di errore indicano la deviazione standard.

La tabella 4.1 mostra la composizione di acidi grassi delle diete sperimentali.

Gli acidi grassi più rappresentativi sono 20:5n3 (acido eicosapentaenoico, EPA) e 22:6n3 (acido docosaesaenoico, DHA), seguiti da 16:0, 18:1n9, 18:2n6,

16:1n7, 14:0, e 18:0. L'inclusione di farina d'insetto nella dieta determina, rispetto alla dieta controllo: i) un aumento della percentuale di 12:0, 16:0, 18:0, 20:0, 18:1n9, 18:2n6, 18:3n3, e 20:4n6; ii) un decremento della percentuale di 14:0, 16:1n7, EPA (da 19.1 ± 0.5 % nella dieta Controllo a 1.7 ± 0.1 % nella dieta Hi100), DHA (da 17.8 ± 0.8 % nella dieta Controllo a 4.2 ± 0.3 % nella dieta Hi100), e l'aumento del rapporto $\frac{DHA}{EPA}$ (da 0.9 ± 0.6 nella dieta Controllo a 2.4 ± 0.7 % nella dieta Hi100).

Tabella 4.1 Composizione percentuale degli acidi grassi (% vs FAs totali) delle diete sperimentali. Lettere diverse sulla stessa riga indicano differenze statisticamente significative tra le medie ($p < 0.05$). Gli acidi grassi con percentuale minore del 1% sono stati esclusi dall'analisi statistica perché il loro contenuto è vicino al limite di rivelabilità.

	CTRL	Hi25	Hi50	Hi75	Hi100
10:0	n.d.	0.45±0.01	0.47±0.02	0.42±0.03	0.50±0.04
12:0	0.20±0.01 ^a	7.3±0.1 ^c	6.4±0.1 ^b	6.0±0.6 ^b	6.2±0.3 ^b
14:0	6.9±0.5 ^e	5.7±0.1 ^d	4.0±0.1 ^c	3.0±0.2 ^b	2.0±0.2 ^a
15:0	0.67±0.04	0.52±0.01	0.44±0.02	0.37±0.01	0.29±0.01
16:0	14.9±0.4 ^a	16.4±0.2 ^b	18.2±0.4 ^c	16.5±0.1 ^b	16.9±0.7 ^b
17:0	0.54±0.03	0.38±0.01	0.35±0.03	0.30±0.01	0.29±0.01
18:0	4.2±0.1 ^a	9.4±0.7 ^b	8.9±0.3 ^b	8.3±0.1 ^b	8.9±1.6 ^b
20:0	0.37±0.03 ^a	0.71±0.01 ^b	1.1±0.1 ^c	1.0±0.1 ^c	2.6±0.2 ^d
SFA	27.8±1.3 ^a	40.9±0.7 ^c	40.0±2.0 ^c	35.9±0.7 ^b	37.6±2.8 ^b
16:1n9	0.37±0.04	0.23±0.04	0.27±0.03	0.35±0.08	0.23±0.01
16:1n7	8.0±0.3 ^d	6.9±0.2 ^c	5.1±0.2 ^b	4.8±0.3 ^b	3.2±0.1 ^a
17:1n7	0.44±0.03	0.39±0.03	0.52±0.05	0.73±0.06	0.71±0.01
22:1n9	1.2±0.1 ^b	0.21±0.04 ^a	0.21±0.01 ^a	0.26±0.01 ^a	0.15±0.01 ^a
24:1n9	0.78±0.04	0.50±0.01	n.d.	n.d.	n.d.
18:1n9	11.6±0.1 ^b	9.8±0.3 ^a	12.5±0.7 ^c	14.0±0.1 ^d	14.8±0.7 ^d
18:1n7	2.5±0.1 ^d	1.8±0.1 ^c	1.5±0.2 ^b	1.4±0.1 ^b	1.0±0.1 ^a
MUFA	24.7±0.6 ^d	19.8±0.3 ^b	19.0±0.9 ^a	21.5±0.2 ^c	20.0±1.0 ^b
18:3n3	1.9±0.1 ^b	1.6±0.1 ^a	1.6±0.1 ^a	2.7±0.1 ^c	3.0±0.1 ^d
20:3n3	n.d.	1.2±0.1 ^a	1.0±0.1 ^a	1.3±0.3 ^a	2.2±0.3 ^b
20:5n3	19.1±0.5 ^a	12.9±0.1 ^b	8.7±0.3 ^c	5.5±0.1 ^d	1.7±0.1 ^e
22:6n3	17.8±0.8 ^a	12.0±0.1 ^b	10.0±0.1 ^c	6.1±0.1 ^d	4.2±0.3 ^e
n3-PUFA	38.8±1.4 ^e	27.6±0.9 ^d	20.8±0.9 ^c	15.6±0.3 ^b	11.1±3.1 ^a
18:2n6	8.0±0.1 ^a	10.5±0.1 ^b	17.5±1.2 ^c	25.9±0.1 ^d	28.9±1.8 ^e
18:3n6	0.50±0.03	0.21±0.03	n.d.	n.d.	n.d.
20:4n6	0.19±0.01 ^a	1.0±0.1 ^b	1.2±0.1 ^c	1.1±0.1 ^b	2.3±0.1 ^d
n6-PUFA	8.6±0.1 ^a	11.7±0.3 ^b	20.2±0.4 ^c	26.9±0.1 ^d	31.3±0.9 ^e
n9-PUFA	13.9±0.3 ^c	10.7±0.2 ^a	12.1±0.7 ^b	14.6±0.2 ^d	15.2±0.7 ^d
PUFA	47.4±1.4 ^c	39.3±1.0 ^a	41.0±1.0 ^{a,b}	42.6±0.3 ^b	42.4±3.2 ^b
DHA/EPA	0.93±0.2 ^a	0.93±0.3 ^a	1.1±0.1 ^b	1.1±0.1 ^b	2.4±0.2 ^c
n6/n3	0.2±0.1 ^a	0.4±0.1 ^b	1.0±0.1 ^c	1.7±0.1 ^d	2.8±0.2 ^e

4.2 Profilo lipidico delle larve di zebrafish a 20 giorni

Le larve di zebrafish a 20 giorni mostrano un contenuto medio di peso secco pari a 15.7 ± 0.8 %, e non ci sono differenze statisticamente significative tra i vari gruppi sperimentali. La percentuale di lipidi totali (riferita al peso secco) aumenta significativamente nelle larve alimentate con le diete Hi25 e Hi50 rispetto al gruppo di controllo, mentre si riduce significativamente nelle larve alimentate con la dieta Hi100, rispetto alle larve di controllo (Fig. 4.3).

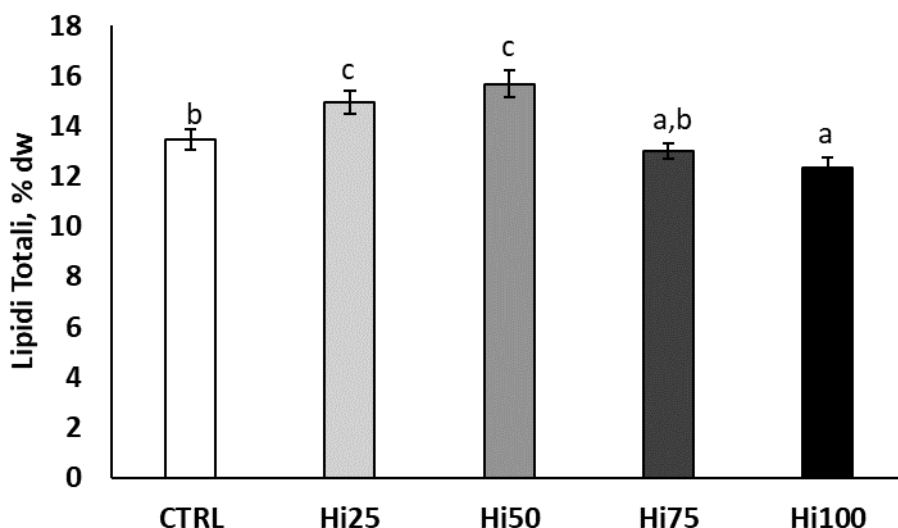


Figura 4.3 Lipidi totali (in % dw) delle larve di zebrafish alimentate con le diverse diete sperimentali.

La percentuale delle classi di acidi grassi delle larve di Zebrafish a 20 giorni è riportata in Fig. 4.4 e in tabella 4.2. Si nota che la composizione di acidi grassi delle larve alimentate con le diverse diete sperimentali è fortemente influenzata dalla percentuale di inclusione di farina d'insetto. In particolare, all'aumentare della percentuale di inclusione degli insetti nella dieta, aumenta

significativamente ($P < 0.05$) la percentuale di SFA (da 27.6 ± 0.6 % del controllo a 34.5 ± 1 % dell'Hi100) e diminuisce significativamente ($P < 0.05$) quella di MUFA e PUFA rispetto alle larve di controllo (Fig. 4.4a).

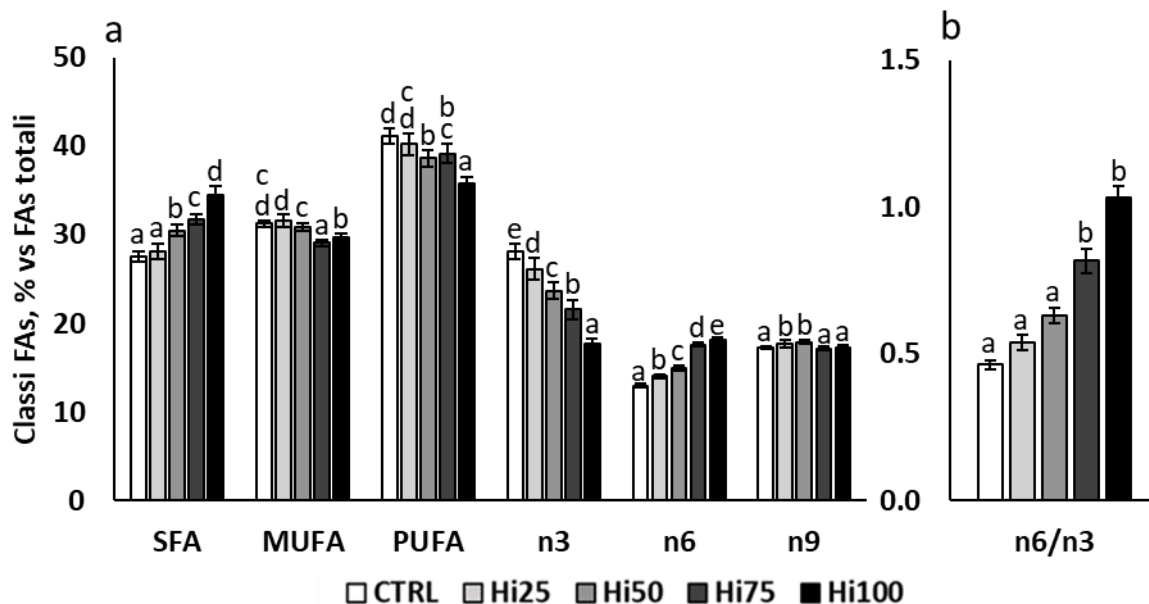


Figura 4.4 Contributo di SFA, MUFA, PUFA, n3, n6 e n9 (espressi come % del totale di FA) nelle larve di zebrafish alimentate con le diverse diete sperimentali (a); rapporto n6/n3 nelle diete sperimentali (b). Le diete di controllo, Hi25, Hi50; Hi75 e Hi100 sono caratterizzate dallo 0, 25, 50, 75 e 100% di inclusione di farina a base di insetto, rispettivamente. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i gruppi sperimentali all'interno della stessa classe di acidi grassi ($p < 0.05$). I valori sono espressi come media ($n=9$), le barre di errore indicano la deviazione standard.

Inoltre, all'aumentare della percentuale di inclusione della farina di insetto nella dieta, la percentuale di n3 (26.1 ± 1.2 , 23.7 ± 0.9 , 21.6 ± 1.1 , 17.6 ± 0.6 % per Hi25, Hi50, Hi75, Hi100, rispettivamente) diminuisce significativamente, e la percentuale di n6 (14.1 ± 0.2 , 14.9 ± 0.3 , 17.6 ± 0.2 , 18.2 ± 0.3 % per Hi25, Hi50, Hi75, Hi100, rispettivamente) aumenta significativamente. Per quanto riguarda il rapporto $\frac{n6}{n3}$ (Fig. 4.4 b) non si osservano differenze significative ($P > 0.05$) tra

il gruppo di controllo ed i gruppi Hi25 e Hi50 (0.5 ± 0.1 , 0.5 ± 0.1 e 0.6 ± 0.1 , rispettivamente), mentre i gruppi Hi75 e Hi100 (0.8 ± 0.1 e 1.0 ± 0.1 , rispettivamente) mostrano un aumento statisticamente significativo rispetto agli altri gruppi sperimentali. Infine, aumenti significativi del contenuto percentuale di acidi grassi n9 rispetto al gruppo di controllo (17.3 ± 0.2 %) si osservano per Hi25 e Hi50 (17.7 ± 0.4 e 17.9 ± 0.3 %, rispettivamente).

La tabella 4.2 mostra la composizione degli acidi grassi delle larve alimentate con le 5 diete sperimentali. La composizione degli acidi grassi delle larve alimentate con la dieta di controllo è caratterizzata da alte percentuali di 16:0, 18:1n9, 22:6n3 (acido docosaesaenoico, DHA), e 20:5n3 (acido eicosapentaenoico, EPA); a seguire troviamo 18:2n6; 16:1n7, e 18:0.

Tabella 4.2 Composizione percentuale degli acidi grassi (% vs FAs totali) delle larve di zebrafish alimentate con le diverse diete sperimentali. Lettere diverse sulla stessa riga indicano differenze statisticamente significative tra le medie ($p < 0.05$). Gli acidi grassi con percentuale minore del 1% sono stati esclusi dall'analisi statistica perché il loro contenuto è vicino al limite di rivelabilità.

FAs	CTRL	Hi25	Hi50	Hi75	Hi100
10:0	0.02±0.01	0.05±0.01	0.10±0.01	0.08±0.01	0.09±0.02
12:0	0.20±0.03 ^a	2.6±0.1 ^b	4.5±0.1 ^c	4.7±0.4 ^c	5.7±0.4 ^d
13:0	0.06±0.01	0.06±0.01	0.07±0.01	0.06±0.01	0.07±0.01
14:0	4.0±0.1 ^{a,b}	4.0±0.1 ^a	4.2±0.1 ^b	3.9±0.2 ^a	4.3±0.2 ^b
15:0	0.86±0.04	0.80±0.03	0.82±0.01	0.79±0.02	0.84±0.04
16:0	14.7±1.0 ^c	14.0±0.7 ^{a,b}	13.8±0.5 ^a	14.6±0.1 ^{b,c}	15.5±0.9 ^d
17:0	1.2±0.1 ^b	1.1±0.1 ^a	1.1±0.1 ^a	1.1±0.1 ^a	1.2±0.1 ^b
18:0	6.3±0.2 ^c	5.5±0.1 ^a	5.8±0.2 ^b	6.3±0.4 ^c	6.7±0.4 ^c
20:0	0.22±0.01	0.18±0.01	0.19±0.01	0.23±0.02	0.21±0.01
SFA	27.6±0.6	28.2±0.9	30.5±0.6	31.7±0.6	34.5±1.0
16:1n9	1.2±0.1 ^a	1.3±0.1 ^b	1.3±0.1 ^c	1.5±0.1 ^d	1.5±0.1 ^d
16:1n7	8.7±0.6 ^c	9.0±0.3 ^c	8.3±0.1 ^b	7.6±0.4 ^a	7.9±0.1 ^a
18:1n9	14.7±0.1 ^a	15.3±0.3 ^b	15.7±0.7 ^c	15.1±0.3 ^b	15.3±0.1 ^b
18:1n7	5.2±0.1 ^d	4.9±0.2 ^c	4.6±0.2 ^b	4.3±0.1 ^a	4.5±0.2 ^b
22:1n9	0.31±0.02	0.28±0.01	0.18±0.02	0.12±0.01	0.04±0.01
24:1n9	0.18±0.02	0.09±0.01	0.08±0.01	0.05±0.01	0.03±0.01
20:1n9	0.90±0.05	0.75±0.01	0.63±0.02	0.48±0.02	0.39±0.02
MUFA ^o	31.3±0.3	31.6±0.7	30.8±0.4	29.1±0.4	29.7±0.5
18:3n3	3.7±0.1 ^c	3.3±0.2 ^b	3.5±0.2 ^c	2.7±0.2 ^a	2.8±0.3 ^a
20:3n3	0.21±0.03	0.19±0.01	0.21±0.01	0.17±0.01	0.17±0.02
20:5n3	10.2±0.2 ^c	8.7±0.7 ^d	7.2±0.3 ^c	4.6±0.1 ^b	3.5±0.2 ^a
22:6n3	14.0±1.3 ^c	13.9±1.2 ^c	12.9±0.8 ^b	14.0±1.3 ^c	11.2±1.0 ^a
n3-PUFA	28.1±0.9	26.1±1.2	23.7±0.9	21.6±1.1	17.6±0.6
18:2n6	9.6±0.1 ^a	10.6±0.2 ^b	11.0±0.2 ^c	12.6±0.3 ^d	12.7±0.7 ^d
18:3n6	0.43±0.01	0.41±0.02	0.50±0.01	0.47±0.03	0.53±0.03
20:2n6	0.29±0.02	0.29±0.01	0.31±0.01	0.35±0.02	0.38±0.02
20:3n6	0.46±0.04 ^a	0.52±0.02 ^b	0.70±0.04 ^c	0.98±0.06 ^d	1.1±0.1 ^e
20:4n6	2.3±0.2 ^a	2.3±0.1 ^a	2.4±0.1 ^b	3.2±0.3 ^c	3.5±0.1 ^d
n6-PUFA	13.0±0.2	14.1±0.2	14.9±0.3	17.6±0.2	18.2±0.3
n9-PUFA	17.3±0.2	17.7±0.4	17.9±0.3	17.2±0.2	17.2±0.3
PUFA	41.1±0.9	40.2±1.2	38.6±1.0	39.2±1.1	35.8±0.7
DHA/EPA	1.4±0.1 ^a	1.6±0.2 ^b	1.8±0.1 ^b	3.0±0.3 ^c	3.2±0.2 ^c
n3/n6	2.2±0.1	1.9±0.1	1.6±0.1	1.2±0.1	1.0±0.0

Andiamo ora a considerare in dettaglio gli andamenti di ogni acido grasso in funzione della dieta somministrata., soffermandoci soltanto su quelli che presentano differenze statisticamente significative tra i gruppi.

- Acido laurico (12:0). Si nota un drastico e significativo aumento della percentuale di acido laurico (fino a ~30 volte) all'aumentare della percentuale di inclusione di insetti nella dieta (0.20 ± 0.03 , 2.6 ± 0.1 , 4.5 ± 0.1 , 4.7 ± 0.4 , 5.7 ± 0.4 % per controllo, Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100, rispettivamente); non si osservano differenze significative tra i gruppi alimentati con il 50% ed il 75% di farina a base di insetto (Fig. 4.5).

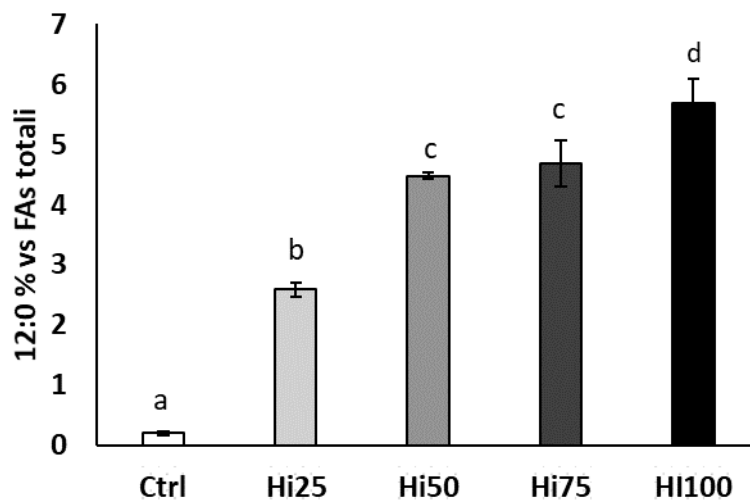


Figura 4.5 Percentuale di acido dodecanoico (vs acidi grassi totali) in larve di zebrafish a 20 giorni.

- Acido miristico (14:0). Per quanto riguarda la percentuale di acido miristico non si osservano differenze statisticamente significative rispetto agli animali alimentati con la dieta di controllo, mentre ci sono differenze statisticamente

significative tra larve Hi25 e Hi75 da una parte, e larve Hi50 e Hi100 dall'altra (Fig. 4.6).

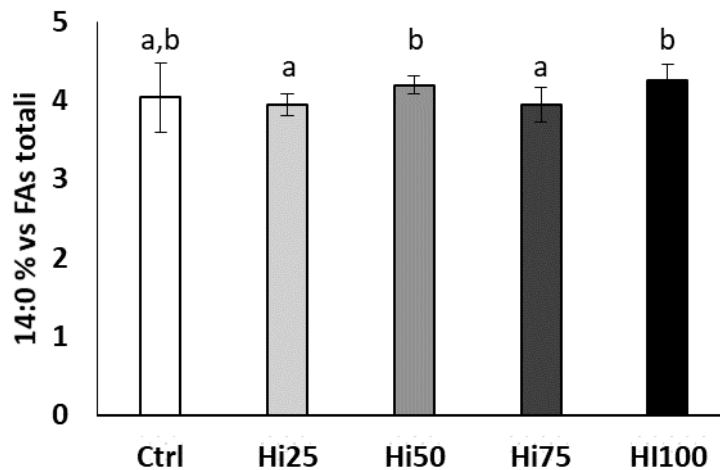


Figura 4.6 Percentuale di acido tetradecanoico (vs acidi grassi totali) in larve di zebrafish a 20 giorni.

- Acido palmitico (16:0). Un aumento statisticamente significativo della percentuale del presente acido grasso rispetto al gruppo controllo si osserva soltanto nel gruppo sperimentale allevato con farina e olio di pesce sostituiti al 100% con farina di BSF (Fig. 4.7). i gruppi Hi25 e Hi50 mostrano al contrario un calo significativo della percentuale di acido palmitico rispetto al gruppo controllo.

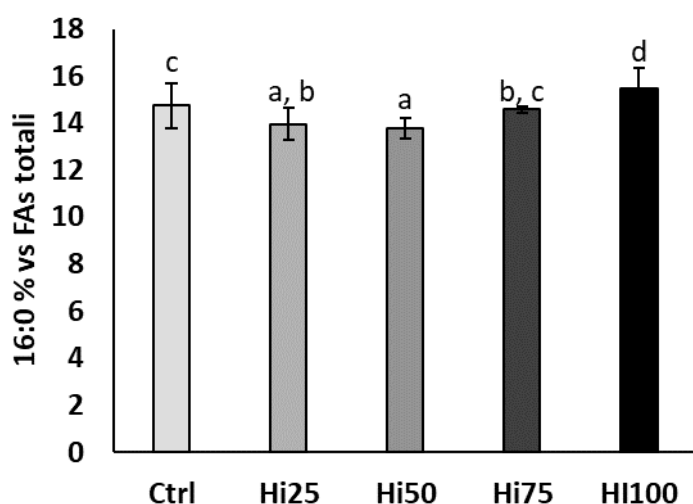


Figura 4.7 Percentuale di acido esadecanoico (vs acidi grassi totali) in larve di zebrafish a 20 giorni.

- Acido margarico (17:0). Non si osservano differenze statisticamente significative tra il controllo e il gruppo alimentato con Hi100, mentre la percentuale decresce significativamente negli altri tre gruppi sperimentali (Fig. 4.8).

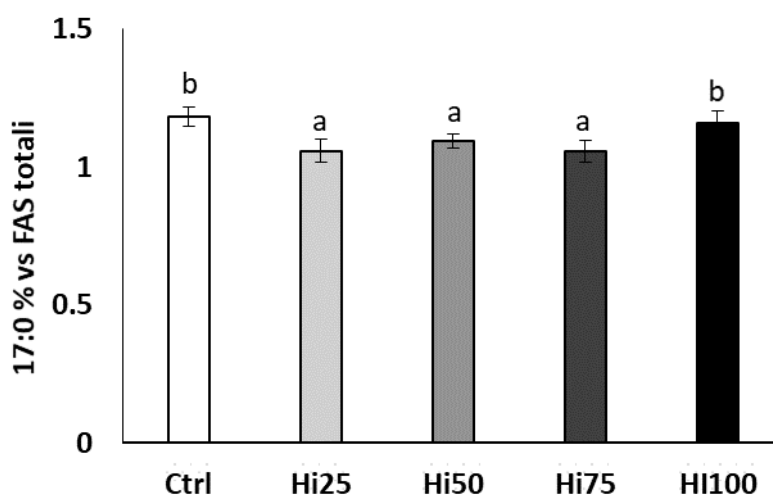


Figura 4.8 Percentuale di acido eptadecanoico (vs acidi grassi totali) in larve di zebrafish a 20 giorni.

- Acido stearico (18:0). All'aumentare della percentuale di inclusione di farina a base di insetto nella dieta si osserva un graduale ma significativo aumento della percentuale di acido stearico (Fig. 4.9). Il gruppo controllo presenta valori statisticamente maggiori rispetto ai gruppi Hi25 e Hi50, statisticamente minori del gruppo Hi100.

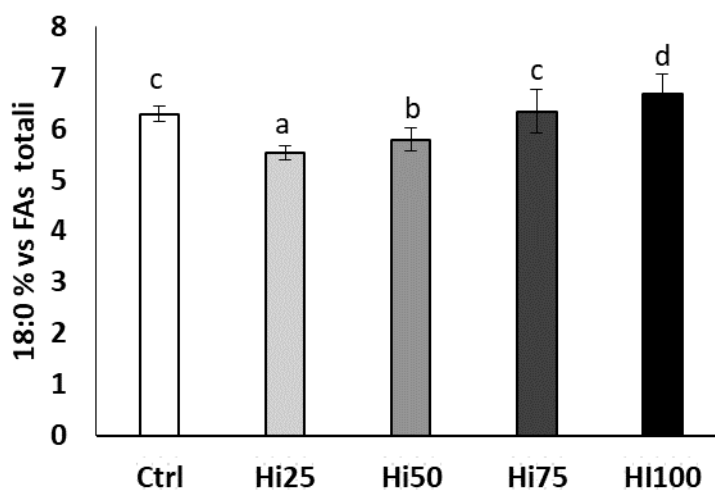


Figura 4.9 Percentuale di acido ottadecanoico (vs acidi grassi totali) in larve di zebrafish a 20 giorni.

- Acido palmitoleico (isomero) 16:1n9. Si nota un progressivo aumento della percentuale di 16:1n9 nelle larve alimentate con diete a percentuale di inclusione di insetti sempre maggiore; non ci sono differenze significative tra Hi75 e Hi100 (Fig. 4.10).

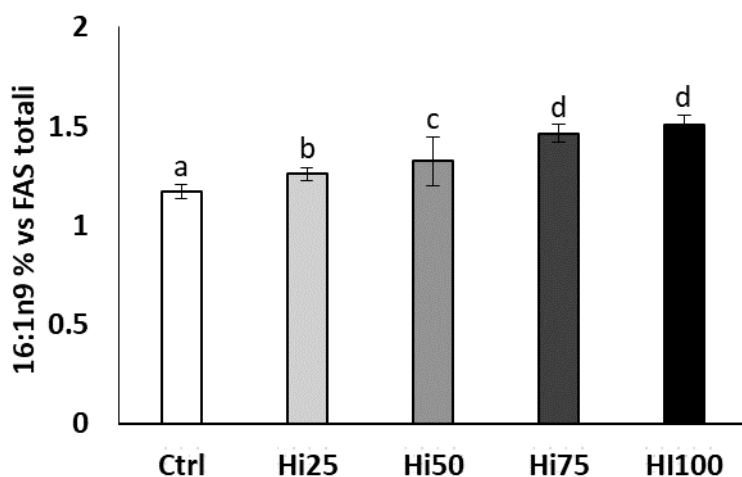


Figura 4.10 Percentuale di acido *cis*-7-esadecanoico (vs acidi grassi totali) in larve di zebrafish a 20 giorni.

- acido palmitoleico (16:1n7). Per quanto riguarda la percentuale di acido palmitoleico, non si osservano differenze significative tra il gruppo controllo e l'Hi25, ma si può comunque notare un significativo calo di quest'acido grasso all'aumentare dell'inclusione di farina a base di insetto nella dieta (Fig. 4.11).

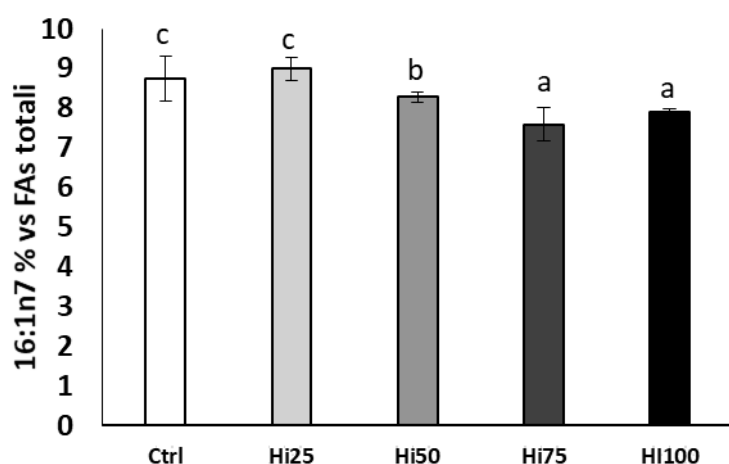


Figura 4.11 Percentuale di acido *cis*-9-esadecanoico (vs acidi grassi totali) in larve di zebrafish a 20 giorni.

- acido oleico (18:1n9). Le larve alimentate con diete dove la farina e olio di pesce sono stati sostituiti in diversa misura con farina di insetto presentano un aumento significativo della percentuale di acido oleico rispetto al gruppo controllo (Fig. 4.12).

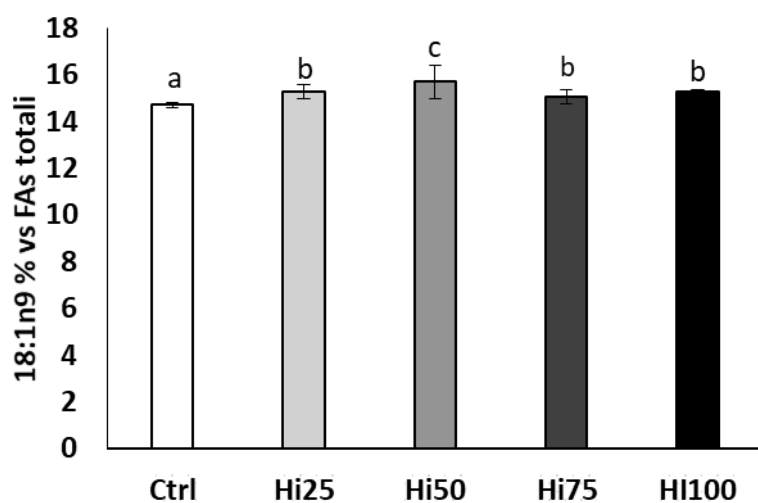


Figura 4.12 Percentuale di acido cis-9-ottadecanoico (vs acidi grassi totali) in larve di zebrafish a 20 giorni.

- Acido vaccenico (18:1n7). I gruppi alimentati con i mangimi sperimentali mostrano una minore percentuale di acido vaccenico rispetto al gruppo alimentato con la dieta di controllo (Fig. 4.13).

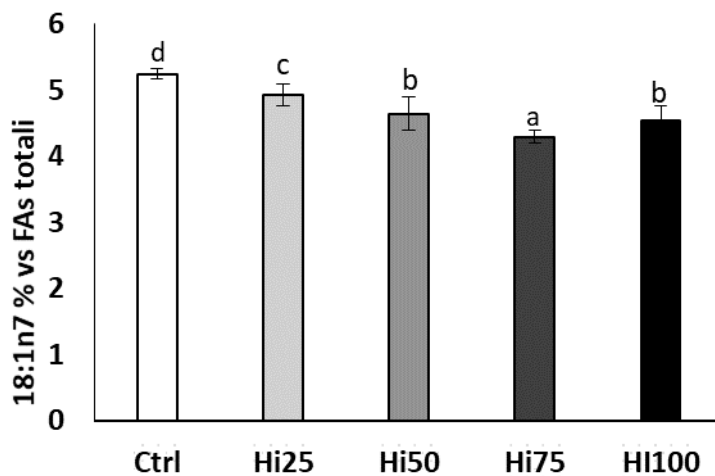


Figura 4.13 Percentuale di acido *cis*-11-ottadecanoico (vs acidi grassi totali) in larve di zebrafish a 20 giorni.

- Acido linoleico (18:2n6). l'acido linoleico aumenta all'aumentare della percentuale di inclusione di BSF nella dieta; non si osservano differenze significative tra Hi75 e Hi100 (Fig. 4.14).

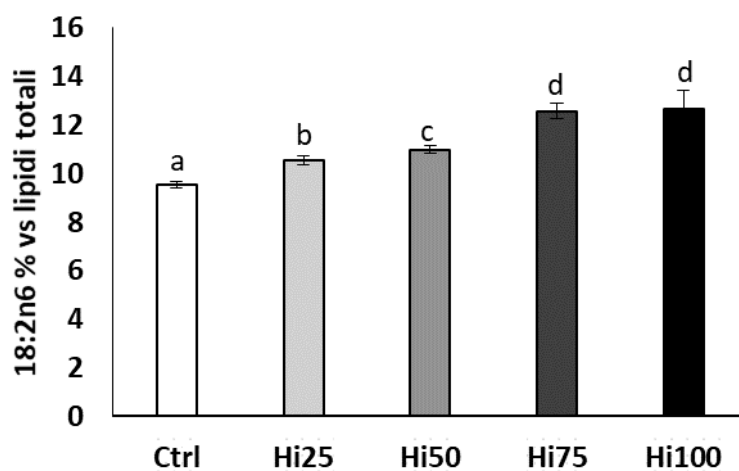


Figura 4.14 Percentuale di acido *cis, cis*- 9,12 ottadecadienoico (vs acidi grassi totali) in larve di zebrafish a 20 giorni.

- Acido α -linolenico (18:3n3). L'unico gruppo che non mostra differenze significative rispetto al controllo per quanto riguarda la percentuale di questo

acido grasso è l'Hi50; in tutti gli altri si osserva una diminuzione statisticamente significativa rispetto al gruppo controllo (Fig. 4.15).

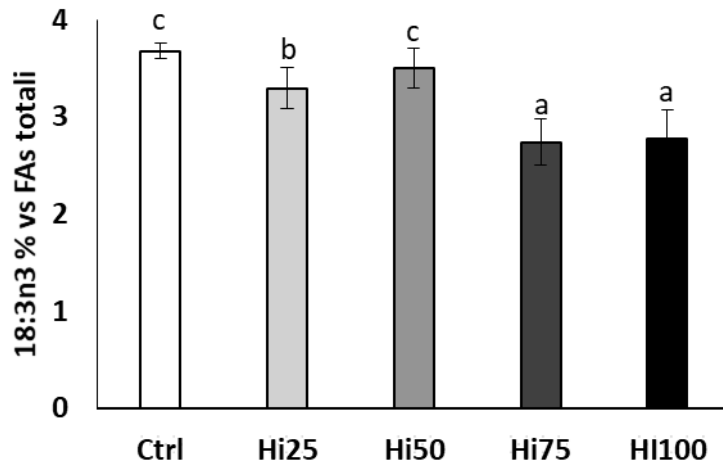


Figura 4.15 Percentuale di acido cis, cis, cis- 9,12,15- ottadecatrienoico (vs acidi grassi totali) in larve di zebrafish a 20 giorni.

- Acido diomo- γ -linolenico (20:3n6). All'aumentare della percentuale di inclusione di BSF nella dieta, si registra un progressivo e significativo aumento della percentuale di questo acido (Fig. 4.16).

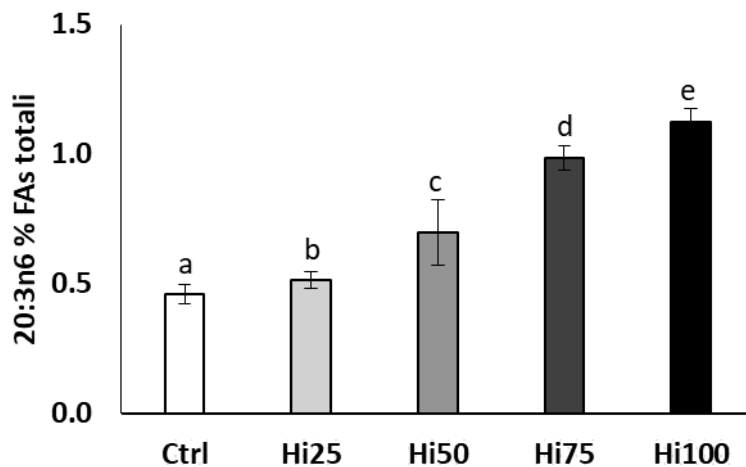


Figura 4.16 Percentuale di acido 8,11,14- eicosatrenoico (vs acidi grassi totali) in larve di zebrafish a 20 giorni.

- Acido arachidonico (20:4n6): a partire dal 50% di inclusione di BSF, si registra un significativo aumento della percentuale di acido arachidonico; non si sono differenze significative tra il gruppo Hi25 ed il controllo (Fig. 4.17).

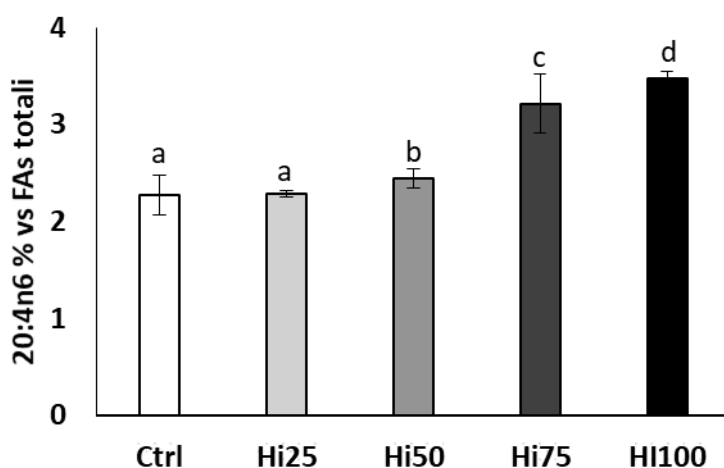


Figura 4.17 Percentuale di acido 5,8,11,14- eicosatrenoico (vs acidi grassi totali) in larve di zebrafish a 20 giorni.

- Acido eicosapentaenoico, EPA (20:5n3). All'aumentare della percentuale di inclusione di BSF nella dieta, si osserva un calo significativo della percentuale di questo importante n3: la quantità di EPA viene più che dimezzata passando dal gruppo di controllo al gruppo Hi100 (Fig. 4.18).

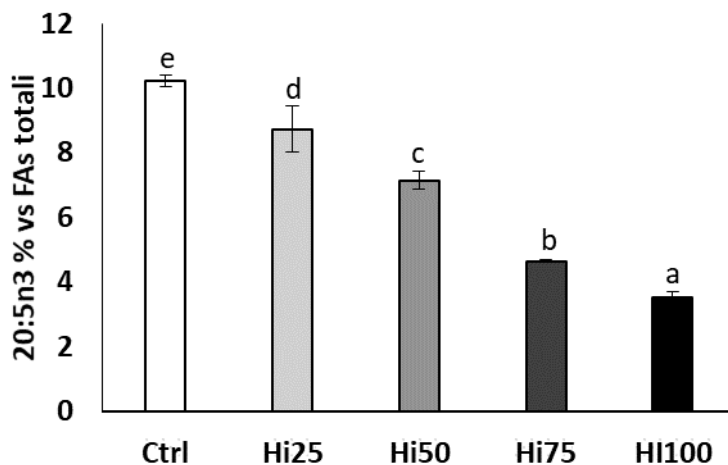


Figura 4.18 Percentuale di acido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (vs acidi grassi totali) in larve di zebrafish a 20 giorni.

- Acido docosaesaenoico, DHA (22:6n3). Il comportamento del DHA non cambia linearmente con l'aumentare dell'inclusione di BSF nella dieta: nel complesso si registra una significativa diminuzione della percentuale di questo importante acido grasso nei gruppi Hi50 e Hi100 rispetto al gruppo controllo, mentre non ci sono differenze significative tra il controllo ed i gruppi Hi25 e Hi75.

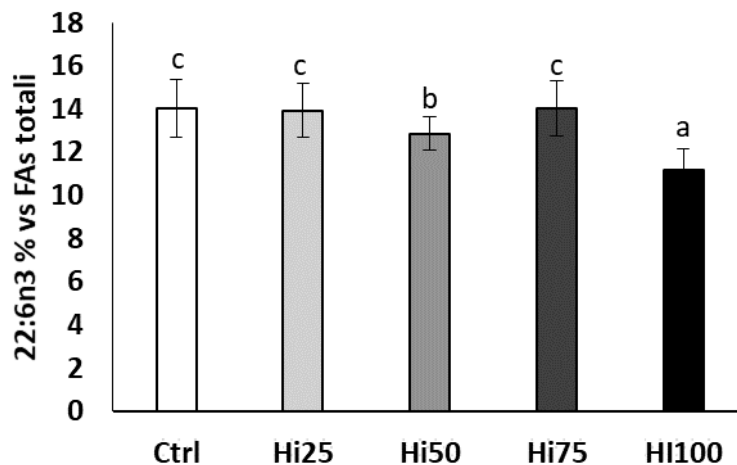


Figura 4.19 Percentuale di acido *cis*-4,7,10,13,16,19-docosaesaenoico (vs acidi grassi totali) in larve di zebrafish a 20 giorni.

La tabella 4.3 esprime la composizione di acidi grassi delle larve alimentate con le diverse diete sperimentali in mg g^{-1} dw. Si osserva un aumento significativo ($P < 0.05$) dei SFA nel gruppo Hi50 ($40.2 \pm 1.8 \text{ mg g}^{-1}$ dw) rispetto al controllo ($37.3 \pm 1.7 \text{ mg g}^{-1}$ dw), e una diminuzione significativa ($P < 0.05$) di questa classe di acidi grassi nei gruppi Hi25, Hi75 e Hi100, rispetto al gruppo controllo. Si nota un drastico e significativo ($P < 0.05$) calo dei MUFA, PUFA e degli n3 nei gruppi Hi75 e Hi100 rispetto al gruppo controllo; si nota inoltre che alla massima percentuale di inclusione di BSF nelle diete non corrisponde un aumento significativo degli n6 rispetto al gruppo controllo. Nel complesso, tuttavia, all'aumentare della percentuale di inclusione di insetti nella dieta, corrisponde un incremento del rapporto $\frac{n6}{n3}$. Infine, i gruppi di larve alimentati

con diete a base di insetto mostrano un aumento significativo del rapporto DHA/EPA rispetto al gruppo controllo.

Tabella 4.3 Contenuto di acidi grassi delle larve di zebrafish alimentate con le diete sperimentali, espresso in mg g⁻¹ dw. Lettere diverse sulla stessa riga indicano differenze statisticamente significative tra le medie (p<0.05).

FAs	CTRL	Hi25	Hi50	Hi75	Hi100
10:0	0.03±0.01	0.06±0.01	0.13±0.01	0.07±0.01	0.09±0.02
12:0	0.27±0.04 ^a	3.2±0.1 ^b	5.8±0.2 ^e	4.1±0.4 ^c	5.3±0.6 ^d
13:0	0.08±0.01	0.08±0.01	0.09±0.01	0.06±0.01	0.07±0.01
14:0	5.4±0.7 ^d	4.9±0.1 ^c	5.5±0.3 ^d	3.5±0.2 ^a	4.0±0.3 ^b
15:0	1.2±0.1	0.98±0.04	1.1±0.1	0.70±0.03	0.80±0.07
16:0	19.9±1.8 ^d	17.3±0.5 ^c	18.2±1.2 ^c	13.1±0.3 ^a	14.6±0.3 ^b
17:0	1.6±0.1 ^e	1.3±0.1 ^c	1.5±0.1 ^d	1.0±0.1 ^a	1.1±0.1 ^b
18:0	8.5±0.4 ^e	6.9±0.2 ^c	7.7±0.6 ^d	5.7±0.3 ^a	6.4±0.2 ^b
20:0	0.29±0.02	0.23±0.01	0.25±0.01	0.20±0.01	0.20±0.02
SFA	37.3±1.7 ^d	34.8±2.0 ^c	40.2±1.8 ^e	28.4±1.0 ^a	32.6±2.1 ^b
16:1n9	1.6±0.1 ^c	1.6±0.1 ^c	1.8±0.2 ^d	1.3±0.1 ^a	1.4±0.1 ^b
16:1n7	11.8±1.0 ^d	11.1±0.3 ^c	10.9±0.3 ^c	6.8±0.5 ^a	7.5±0.3 ^b
18:1n9	20.0±0.8 ^d	19.0±0.8 ^c	20.8±1.6 ^d	13.6±0.5 ^a	14.5±0.5 ^b
18:1n7	7.1±0.3 ^d	6.1±0.3 ^c	6.2±0.2 ^c	3.9±0.1 ^a	4.3±0.4 ^b
20:1n9	1.2±0.1	0.93±0.03	0.83±0.01	0.43±0.02	0.37±0.03
22:1n9	0.43±0.05	0.35±0.01	0.25±0.03	0.11±0.01	0.04±0.01
24:1n9	0.24±0.03	0.12±0.01	0.11±0.02	0.04±0.01	0.03±0.01
MUFA	42.4±1.4 ^d	39.3±1.6 ^c	40.8±1.6 ^{c,d}	26.1±0.7 ^a	28.2±1.3 ^b
18:3n3	5.0±0.1	4.1±0.3	4.6±0.2	2.5±0.3	2.6±0.4
20:3n3	0.29±0.04	0.24±0.01	0.27±0.01	0.15±0.01	0.16±0.02
20:5n3	13.9±0.7 ^e	10.9±1.1 ^d	9.5±0.1 ^c	4.2±0.1 ^b	3.4±0.3 ^a
22:6n3	19.2±2.1 ^d	17.4±1.5 ^c	17.1±0.6 ^c	12.7±1.0 ^b	10.7±0.6 ^a
n3-PUFA	38.3±1.0 ^d	32.7±0.8 ^c	31.5±1.0 ^c	19.5±0.7 ^b	16.8±0.5 ^a
18:2n6	13.0±0.7 ^c	13.1±0.5 ^c	14.6±0.5 ^d	11.3±0.4 ^a	12.1±1.1 ^b
18:3n6	0.59±0.02 ^d	0.51±0.02 ^b	0.66±0.03 ^c	0.43±0.03 ^a	0.50±0.05 ^a
20:2n6	0.40±0.04	0.37±0.02	0.41±0.01	0.32±0.02	0.36±0.02
20:3n6	0.62±0.06 ^a	0.64±0.04 ^a	0.93±0.09 ^b	0.89±0.04 ^b	1.1±0.1 ^c
20:4n6	3.1±0.3 ^b	2.9±0.1 ^a	3.2±0.1 ^{b,c}	2.9±0.2 ^a	3.3±0.1 ^c
n6-PUFA	17.7±0.6 ^b	17.5±0.7 ^b	19.8±0.8 ^c	15.8±0.5 ^a	17.3±0.8 ^b
n9-PUFA	23.5±1.0 ^c	22.0±1.0 ^b	23.8±1.2 ^c	15.5±0.6 ^a	16.4±0.9 ^a
PUFA	56.0±1.2 ^c	50.2±1.1 ^b	51.3±1.3 ^b	35.3±0.8 ^a	34.2±1.0 ^a
DHA/EPA	1.4±0.1 ^a	1.6±0.1 ^b	1.8±0.1 ^b	3.0±0.2 ^c	3.2±0.2 ^c
n6/n3	0.46±0.02 ^a	0.54±0.03 ^b	0.63±0.03 ^c	0.81±0.04 ^d	1.0±0.1 ^e

4.2.1 Biometrie

Come si può osservare in Figura 4.20, il gruppo Hi25 ($25.7 \pm 1.0\%$) non mostra differenze significative dell'SGR (Specific Growth Rate) ($P > 0.05$) rispetto al controllo ($25.4 \pm 0.7\%$); al contrario, i gruppi Hi50, Hi75 e Hi100 (27.6 ± 0.5 , 27.8 ± 0.4 , $28.4 \pm 0.3\%$, rispettivamente) mostrano un significativo aumento ($P < 0.05$) del tasso di crescita specifico.

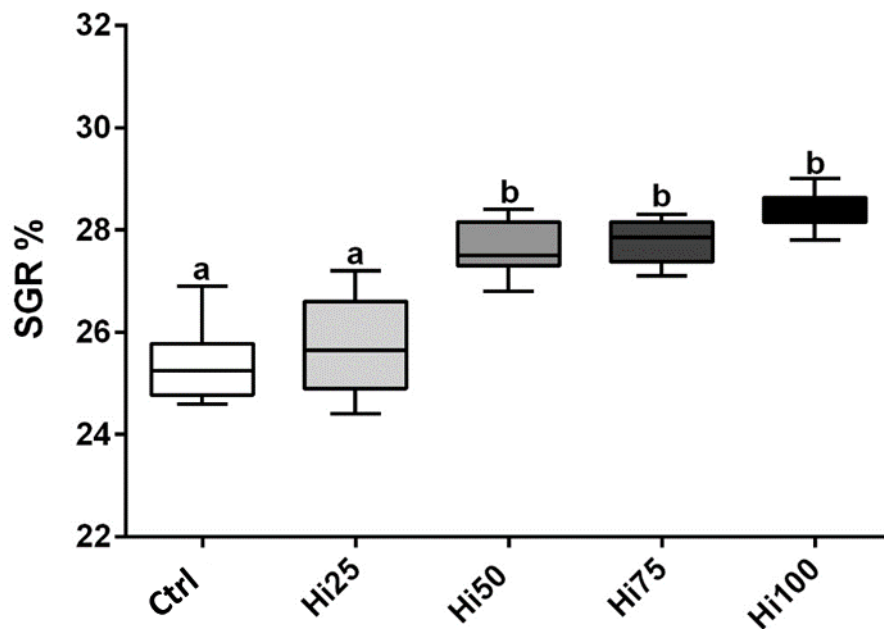


Figura 4.20 Specific Growth rate di larve di zebrafish (crescita % in peso day⁻¹) alimentate con 0%, 25%, 50%, 75% e 100% di farine a base di *H. illucens*. Le barre indicano il valore massimo e il valore minimo. Le scatole indicano il primo ed il terzo quartile. La linea centrale rappresenta la mediana. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative.

4.3 Profilo lipidico di giovanili di zebrafish

I giovanili di zebrafish a due mesi hanno un contenuto medio di peso secco (dry weight, dw) pari a $24.2 \pm 0.9\%$. Rispetto al peso secco, la percentuale di lipidi

totali non mostra differenze statisticamente significative ($P=0.82$) tra i gruppi alimentati con le varie diete sperimentali (Fig. 4.21).

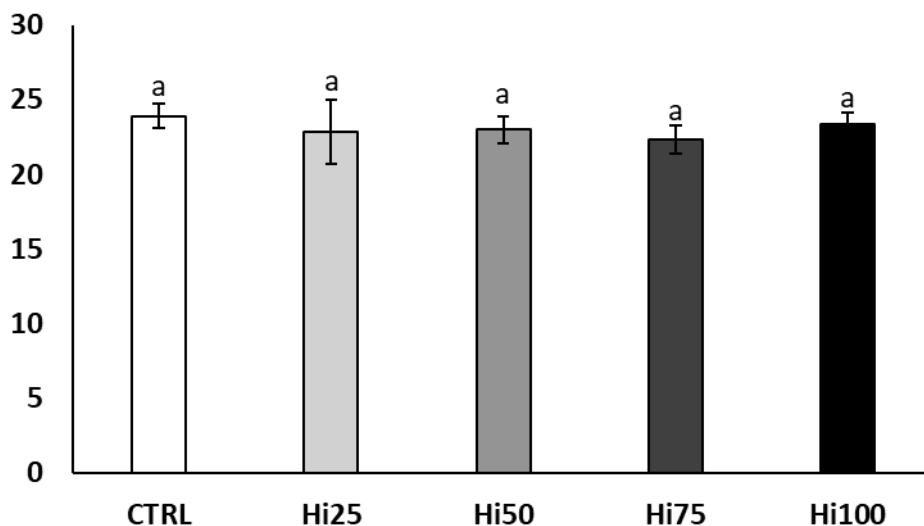


Figura 4.21 Lipidi totali (in % dw) dei giovanili di zebrafish alimentate con le diverse diete sperimentali

Dalle percentuali delle classi di FAs riportate nella Fig. 4.22a, si nota che, analogamente a quanto osservato per le larve, la composizione di acidi grassi dei giovanili è fortemente influenzata dal livello di inclusione di farina di insetto nel mangime a loro destinato. Si osserva un aumento significativo della percentuale di SFA (proporzionale alla percentuale di inclusione di insetti nella dieta, 30 ± 0.5 , 35.2 ± 0.6 , 36.6 ± 0.8 , 39.2 ± 0.4 % per Hi25, Hi50, Hi75, Hi100, rispettivamente) rispetto ai controlli (28.0 ± 0.7 %); la percentuale di MUFA decresce significativamente solo nei giovanili Hi75 rispetto agli altri gruppi, (29.3 ± 0.4 , 29.5 ± 0.3 , 29.2 ± 0.3 , 28.4 ± 0.3 , 28.8 ± 0.2 % per Controllo, Hi25, Hi50, Hi75, Hi100, rispettivamente). Si osserva, inoltre, un progressivo e

significativo decremento del contenuto di PUFA all'aumentare della percentuale di inclusione della farina di insetti nella dieta (42.7±0.7, 40.5±0.8, 35.6±0.8, 35.0±1.1, 31.9±0.8 % per Controllo, Hi25, Hi50, Hi75, Hi100, rispettivamente). Analogamente a quanto osservato nelle larve, all'aumentare della percentuale di inclusione di farina di *H. illucens* nella dieta corrisponde un decremento significativo di acidi grassi n3 (29.3±0.7, 26.5±0.8, 19.7±0.8, 15.7±1.1, 12.3±0.7 % per Hi0, Hi25, Hi50, Hi75, Hi100, rispettivamente) e un aumento significativo di acidi grassi n6 (12.9±0.2, 14.1±0.2, 15.9±0.2, 19.2±0.2, 19.5±0.2 % per Controllo, Hi25, Hi50, Hi75, Hi100, rispettivamente). A ciò corrisponde di conseguenza un aumento significativo del rapporto $\frac{n6}{n3}$ (Fig. 4.22b) passando dal gruppo controllo (0.43±0.01) al gruppo Hi100 (1.6±0.1). Per quanto riguarda gli acidi grassi n9, invece, non si osservano differenze significative (P>0.05) tra i vari gruppi sperimentali.

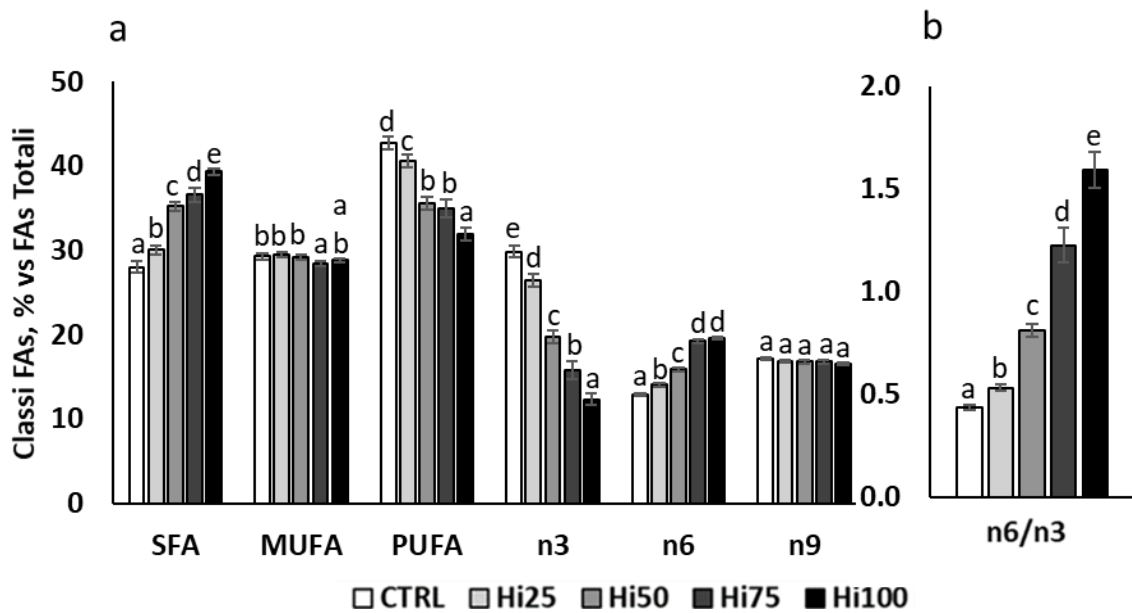


Figura 4.22 Contributo di SFA, MUFA, PUFA, n3, n6 e n9 (espressi come % del totale di FA) nei giovanili di zebrafish alimentati con le diverse diete sperimentali (a); rapporto n6/n3 nei giovanili di zebrafish alimentati con le diverse diete sperimentali (b). lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i gruppi sperimentali all'interno della stessa classe di acidi grassi ($P < 0.05$). I valori sono espressi come media ($n=9$). Le barre di errore indicano la deviazione standard.

La Tabella 4.4 mostra la composizione degli acidi grassi nei giovanili di zebrafish. Gli acidi grassi più rappresentativi nei giovanili alimentati con le diete controllo sono 16:0, 22:6n3, 18:1n9, seguiti da 18:2n6, 20:5n3, 16:1n7, 18:0 ed il 14:0.

Tabella 4.4 Composizione percentuale dei giovanili di zebrafish alimentati con le diverse diete sperimentali.

FAs	CTRL	Hi25	Hi50	Hi75	Hi100
10:0	0.02±0.01	0.04±0.01	0.12±0.01	0.13±0.01	0.15±0.02
12:0	0.27±0.0 ^a	3.0±0.3 ^b	6.2±0.2 ^c	7.2±0.3 ^d	8.3±0.5 ^e
13:0	0.04±0.01	0.05±0.01	0.07±0.01	0.08±0.02	0.08±0.02
14:0	4.3±0.3 ^a	4.5±0.3 ^a	5.1±0.3 ^{b,c}	4.9±0.1 ^b	5.2±0.4 ^c
15:0	0.78±0.03	0.79±0.02	0.81±0.06	0.84±0.13	0.84±0.16
16:0	16.8±1.5 ^b	15.9±0.3 ^a	16.9±0.9 ^b	17.9±1.1 ^c	18.2±0.8 ^c
17:0	0.81±0.03	0.84±0.1	0.75±0.1	0.81±0.1	0.90±0.1
18:0	4.8±0.8 ^a	4.7±0.5 ^a	5.0±1.0 ^a	4.7±0.6 ^a	5.4±1.1 ^a
20:0	0.18±0.01	0.16±0.01	0.18±0.03	0.19±0.02	0.18±0.04
SFA	28.0±0.7 ^a	30.0±0.5 ^b	35.2±0.6 ^c	36.6±0.8 ^d	39.3±0.4 ^e
16:1n9	0.76±0.05	0.78±0.03	0.90±0.17	0.89±0.12	0.87±0.07
16:1n7	7.7±0.2 ^b	7.8±0.3 ^b	7.8±0.1 ^b	7.2±0.3 ^a	7.1±0.1 ^a
17:1n7	0.81±0.12	1.1±0.04	1.2±0.04	1.4±0.11	1.6±0.02
18:1n9	14.6±0.8 ^a	14.7±0.5 ^a	15.1±0.1 ^a	15.3±0.9 ^a	15.4±1.4 ^a
18:1n7	3.4±0.2 ^c	3.5±0.2 ^c	3.0±0.2 ^b	2.7±0.1 ^a	2.9±0.1 ^b
20:1n9	1.0±0.04 ^e	0.83±0.06 ^d	0.56±0.03 ^c	0.43±0.05 ^b	0.33±0.02 ^a
22:1n9	0.51±0.1	0.36±0.02	0.18±0.01	0.11±0.04	0.03±0.01
24:1n9	0.21±0.03	0.13±0.01	0.04±0.01	0.02±0.01	0.01±0.01
MUFA	29.3±0.4 ^b	29.5±0.3 ^b	29.2±0.3 ^b	28.4±0.3 ^a	28.8±0.2 ^{a,b}
18:3n3	2.2±0.2 ^c	2.2±0.1 ^c	2.0±0.2 ^{a,b}	2.1±0.3 ^{b,c}	1.8±0.2 ^a
20:3n3	0.18±0.02	0.16±0.01	0.13±0.02	0.11±0.02	0.13±0.04
20:5n3	10.7±0.7 ^e	9.5±0.8 ^d	6.1±0.8 ^c	3.6±0.4 ^b	2.0±0.5 ^a
22:6n3	16.8±1.8 ^e	14.7±1.1 ^d	11.5±0.8 ^c	10.0±0.2 ^b	8.4±0.7 ^a
n3-PUFA	29.8±0.7 ^e	26.5±0.8 ^d	19.7±0.8 ^c	15.7±1.1 ^b	12.3±0.7 ^a
18:2n6	10.7±0.6 ^a	11.3±0.2 ^b	12.9±0.1 ^c	15.7±1.0 ^e	15.2±0.6 ^d
18:3n6	0.33±0.02	0.38±0.02	0.40±0.04	0.58±0.06	0.52±0.03
20:2n6	0.32±0.03	0.32±0.02	0.32±0.05	0.32±0.01	0.44±0.06
20:3n6	0.38±0.04 ^a	0.50±0.02 ^b	0.68±0.03 ^c	0.85±0.10 ^d	1.2±0.1 ^e
20:4n6	1.2±0.1 ^a	1.5±0.1 ^b	1.6±0.1 ^b	1.8±0.1 ^c	2.2±0.1 ^d
n6-PUFA	12.9±0.2 ^a	14.1±0.2 ^b	15.9±0.2 ^c	19.2±0.2 ^d	19.5±0.2 ^d
n9-PUFA	17.1±0.2 ^a	16.8±0.1 ^a	16.8±0.2 ^a	16.8±0.2 ^a	16.6±0.2 ^a
PUFA	42.7±0.7 ^d	40.5±0.8 ^c	35.6±0.8 ^b	35.0±1.1 ^b	31.9±0.8 ^a
DHA/EPA	1.6±0.1 ^a	1.6±0.1 ^a	1.9±0.1 ^b	2.8±0.3 ^c	4.4±0.4 ^d
n6/n3	0.43±0.01 ^a	0.53±0.02 ^b	0.81±0.03 ^c	1.22±0.09 ^d	1.6±0.1 ^e

Vengono riportati in dettaglio gli andamenti di ogni acido grasso dei giovanili di zebrafish in funzione della dieta somministrata. Sono stati presi in

considerazione solo gli acidi grassi che presentano differenze statisticamente significative tra i gruppi.

- Acido laurico (12:0). Dal grafico (Fig. 4.23) si nota un aumento progressivo e statisticamente significativo di questo acido grasso saturo nei giovanili alimentati con diete con percentuale crescente di inclusione di farine a base di BSF.

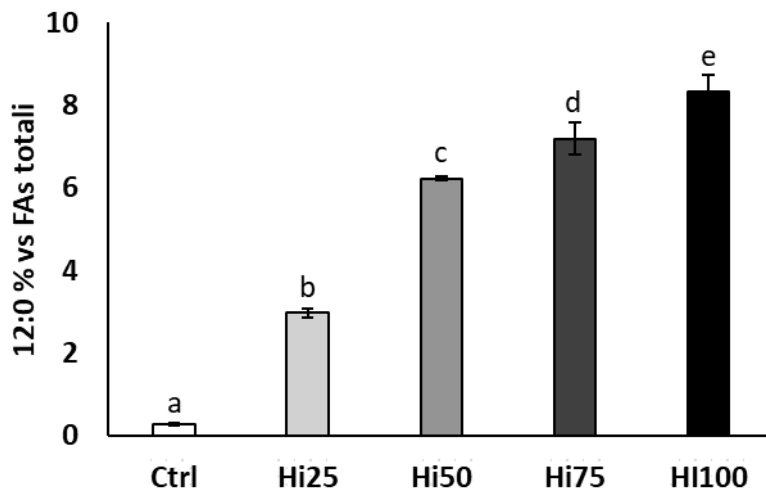


Figura 4.23 Percentuale di acido dodecanoico (vs acidi grassi totali) in giovanili di zebrafish a 2 mesi.

- Acido miristico (14:0). La percentuale di acido miristico aumenta significativamente nei gruppi Hi50, Hi75 e Hi100 rispetto al gruppo di controllo (Fig. 4.24).

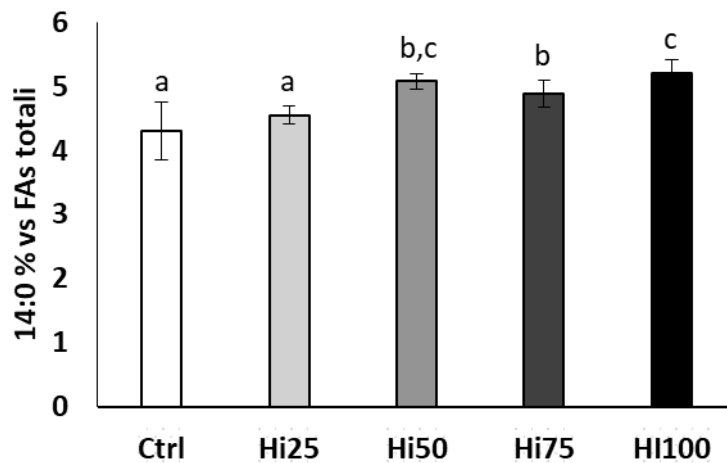


Figura 4.24 Percentuale di acido tetradecanoico (vs acidi grassi totali) in giovanili di zebrafish a 2 mesi.

- Acido palmitico (16:0). Un aumento significativo di acido palmitico rispetto al gruppo controllo si osserva solo nei giovanili appartenenti ai gruppi Hi75 e Hi100 (Fig. 4.25).

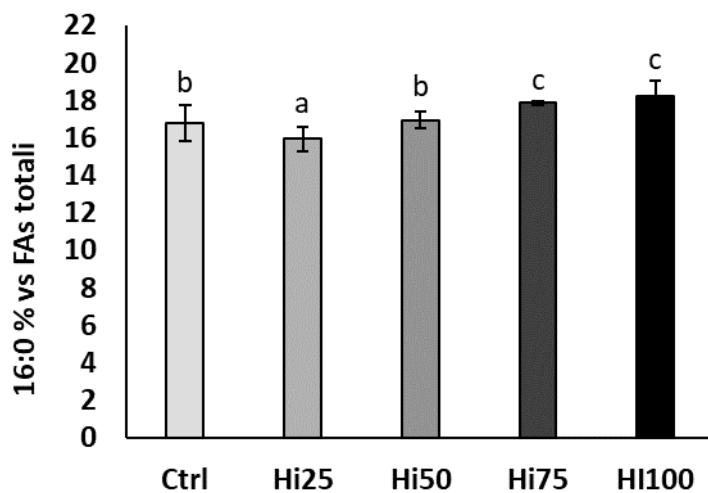


Figura 4.25 Percentuale di acido esadecanoico (vs acidi grassi totali) in giovanili di zebrafish a 2 mesi.

- Acido palmitoleico (16:1n7). Non ci sono differenze significative in termini di 16:1n7 tra i gruppi Hi25, Hi50 e controllo, mentre i gruppi Hi75 e Hi100

mostrano un decremento significativo rispetto al gruppo controllo (Fig. 4.26).

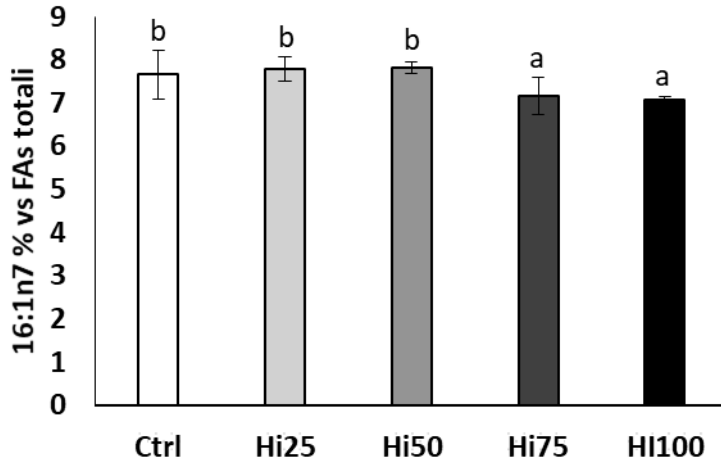


Figura 4.26 Percentuale di acido *cis*-9-esadecanoico (vs acidi grassi totali) in giovanili di zebrafish a 2 mesi.

- Acido linoleico (18:2n6). Si nota un aumento significativo di questo acido in tutti i gruppi alimentati con diete a base di insetti rispetto al gruppo controllo, coerentemente con quanto osservato nelle larve. Tale incremento diventa in genere sempre maggiore all'aumentare della percentuale di inclusione degli insetti nella dieta, tanto che tutti i gruppi alimentati con diete a base di insetti mostrano differenze significative tra loro (Fig. 4.27).

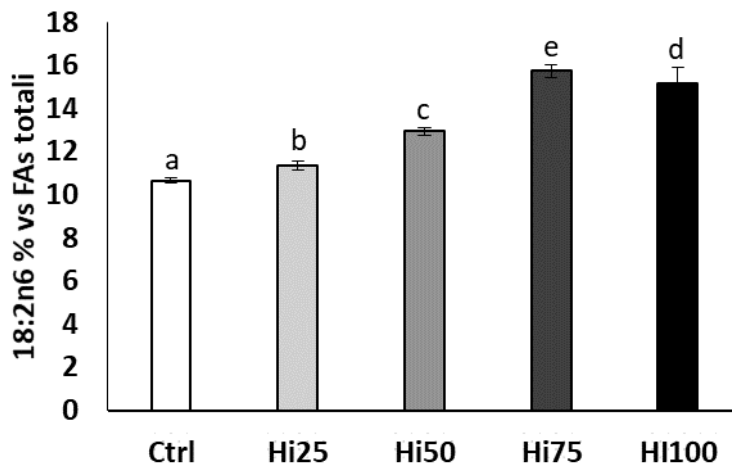


Figura 4.27 Percentuale di acido *cis, cis*-9,12 ottadecadienoico (vs acidi grassi totali) in giovanili di zebrafish a 2 mesi.

- Acido α -linolenico (18:3n3). Per quanto il presente acido grasso mostri un andamento variabile, analogamente a quanto visto per le larve si ha un decremento significativo della sua percentuale nei gruppi Hi50 e Hi100 rispetto agli altri gruppi (Fig. 4.28).

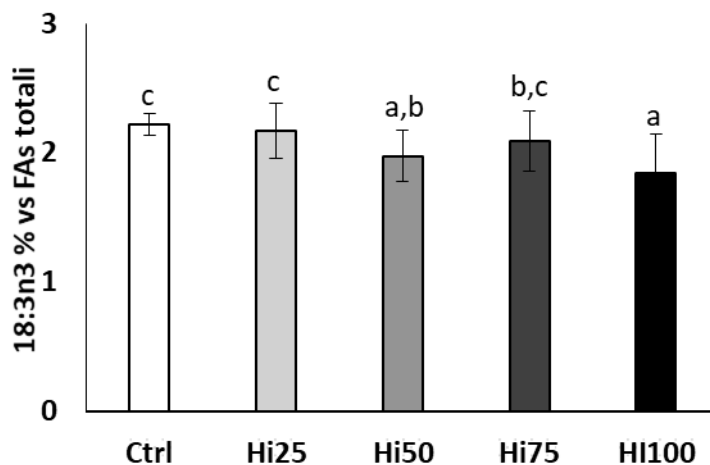


Figura 4.28 Percentuale di acido *cis, cis, cis*-9,12,15- octadecatrienoico (vs acidi grassi totali) in giovanili di zebrafish a 2 mesi.

- Acido gondoico (20:1n9). L'acido gondoico nei giovanili, per quanto presente in concentrazioni prossime al limite di rilevabilità, è soggetto ad una progressiva e significativa diminuzione nei gruppi alimentati con diete contenenti quantità crescenti di farina a base di insetto (Fig. 4.29).

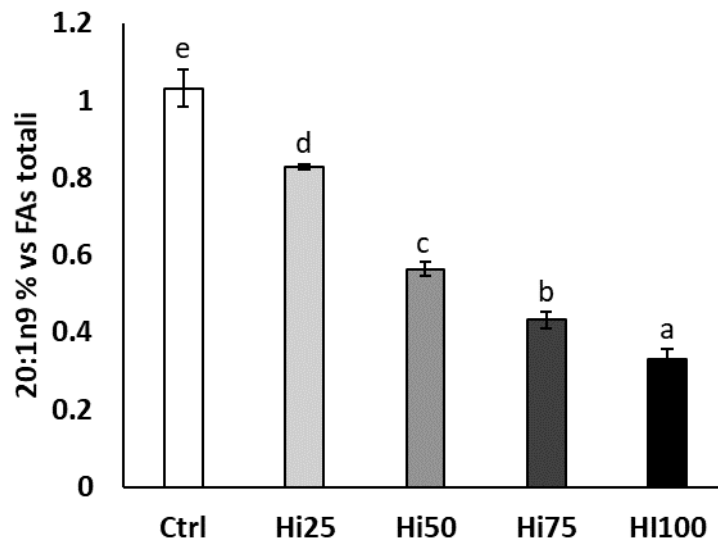


Figura 4.29 Percentuale di acido *cis*-11-eicosenoico (vs acidi grassi totali) in giovanili di zebrafish a 2 mesi

- Acido diomo- γ -linolenico (20:3n6). Il presente acido grasso, analogamente a quanto visto per le larve, è soggetto ad un progressivo e significativo aumento nei giovanili alimentati con diete contenenti quantità crescenti di farina di insetto (Fig. 4.30).

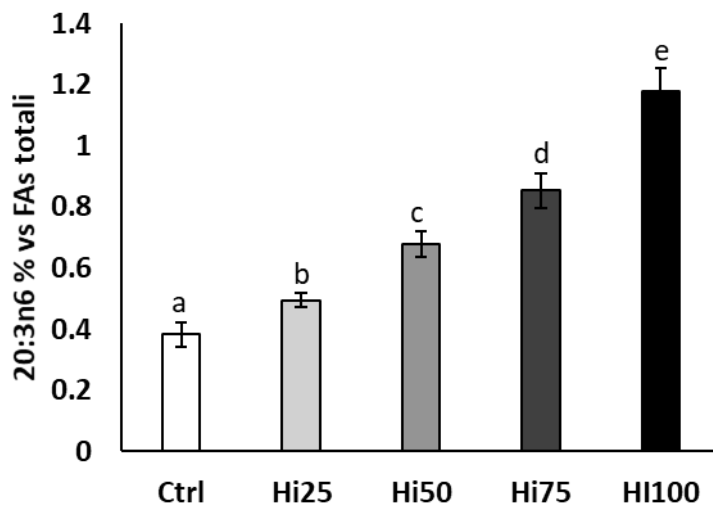


Figura 4.30 Percentuale di acido 8,11,14- eicosatrenoico (vs acidi grassi totali) in giovanili di zebrafish a 2 mesi.

- Acido arachidonico (20:4n6). Si osserva in generale un aumento significativo della percentuale del presente acido grasso nei giovanili all'aumentare della percentuale di inclusione di BSF nelle diete fornite (Fig. 4.31). Non si osservano differenze significative tra i gruppi Hi25 e Hi50,

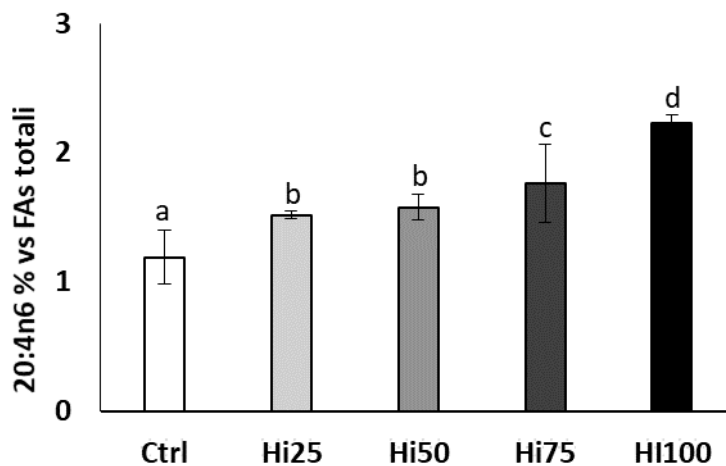


Figura 4.31 Percentuale di 8,11,14- eicosatrenoico (vs acidi grassi totali) in giovanili di zebrafish a 2 mesi.

- Acido eicosapentaenoico, EPA (20:5n3). L'andamento dell'EPA nei giovanili di zebrafish è perfettamente coerente con quanto visto per le larve: si nota un progressivo e significativo calo della percentuale di questo importante n3 nei giovanili alimentati con diete contenenti percentuali crescenti di farina di insetto (Fig. 4.32).

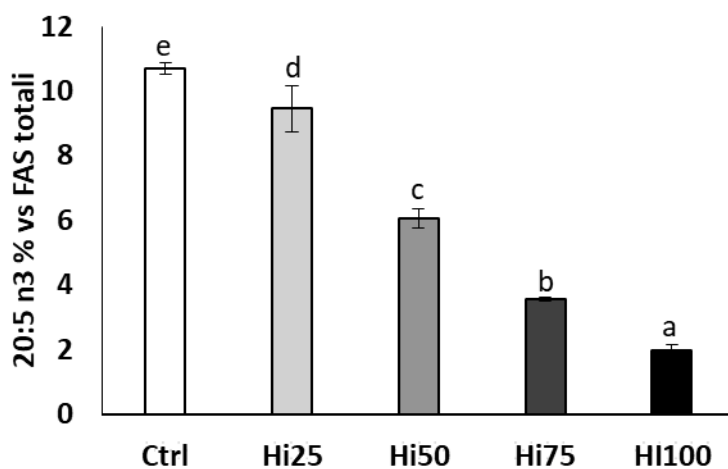


Figura 4.32 Percentuale di acido cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (vs acidi grassi totali) in giovanili di zebrafish a 2 mesi.

- Acido docosaesaenoico, DHA (22:6n3). Come per l'EPA, anche il DHA è soggetto ad un calo progressivo e significativo della percentuale nei giovanili alimentati con diete contenenti percentuali crescenti di farina di insetto (Fig. 4.33).

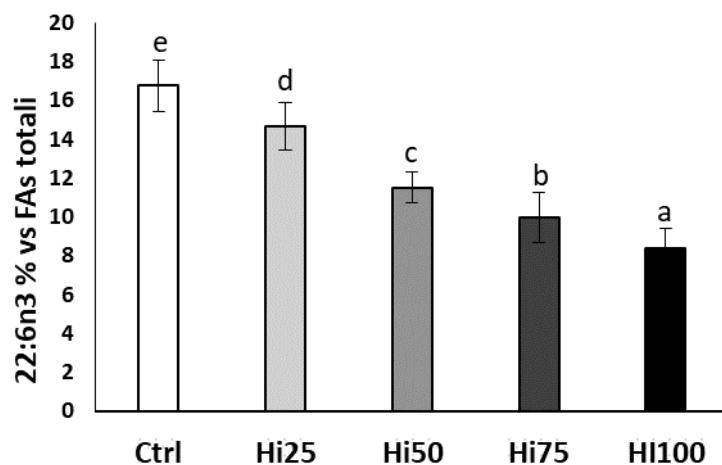


Figura 4.32 Percentuale di acido cis-4,7,10,13,16,19-docosaesaenoico (vs acidi grassi totali) in giovanili di zebrafish a 2 mesi

A seguire viene riportata la composizione di acidi grassi dei giovanili di zebrafish espressa in mg g^{-1} dw (Tabella 4.5). All'aumentare della percentuale di inclusione di BSF nelle diete, si nota: i) un significativo aumento della quantità di SFA, ii) un significativo calo della quantità di MUFA e degli n3 PUFA, iii) gli n6-PUFA mostrano un aumento significativo. Di conseguenza, il rapporto $\frac{n6}{n3}$ aumenta, iv) Il rapporto DHA/EPA aumenta significativamente nei gruppi Hi50, Hi75 e Hi100 rispetto al gruppo controllo, ed aumenta significativamente anche all'aumentare della percentuale di inclusione di farina di BSF nella dieta.

Tabella 4.5 Contenuto di acidi grassi dei giovanili di zebrafish alimentati con le diete sperimentali, espresso in mg g⁻¹ dw. Lettere diverse sulla stessa riga indicano differenze statisticamente significative tra le medie (p<0.05).

FA	CTRL	Hi25	Hi50	Hi75	Hi100
10:0	0.03±0.01	0.10±0.02	0.27±0.02	0.29±0.04	0.32±0.01
12:0	0.72±0.03 ^a	7.4±0.5 ^b	13.9±0.6 ^c	15.8±1.6 ^d	19.6±0.2 ^e
13:0	0.12±0.01	0.13±0.01	0.15±0.02	0.17±0.03	0.16±0.01
14:0	11.2±0.4 ^a	11.3±0.6 ^a	11.3±0.8 ^a	10.8±0.8 ^a	12.2±0.6 ^b
15:0	2.0±0.1	1.9±0.1	1.7±0.2	1.9±0.2	1.8±0.1
16:0	42.7±1.0 ^b	38.3±0.6 ^a	38.2±2.2 ^a	39.8±3.8 ^a	45.7±4.3 ^b
17:0	2.2±0.2	2.0±0.2	1.7±0.2	1.8±0.1	2.2±0.2
18:0	11.8±0.5 ^b	11.4±1.8 ^{a,b}	9.8±0.8 ^a	10.4±1.6 ^{a,b}	14.0±4.4 ^c
20:0	0.49±0.03	0.39±0.05	0.34±0.04	0.42±0.03	0.41±0.11
SFA	71.3±1.3 ^a	72.9±2.1 ^{a,b}	77.3±2.5 ^{b,c}	81.4±3.1 ^c	96.5±1.4 ^d
14:1n5	0.69±0.03	0.75±0.12	0.95±0.15	0.99±0.10	1.4±0.2
16:1n9	2.1±0.2	1.8±0.1	2.5±0.4	2.0±0.3	2.0±0.1
16:1n7	20.2±0.7 ^d	18.7±0.7 ^c	17.6±0.1 ^b	15.9±1.0 ^a	17.5±1.1 ^b
17:1n7	2.3±0.5 ^a	2.5±0.1 ^b	2.8±0.1 ^c	3.0±0.1 ^d	4.1±0.2 ^e
18:1n9	39.5±4.9 ^b	35.0±0.9 ^a	36.7±4.8 ^{a,b}	34.4±3.8 ^a	39.9±4.6 ^b
18:1n7	9.3±1.2 ^d	8.1±0.1 ^c	6.7±0.5 ^b	6.0±0.5 ^a	7.2±0.6 ^b
20:1n9	3.0±0.3 ^e	2.0±0.2 ^d	1.3±0.1 ^c	0.97±0.08 ^b	0.79±0.03 ^a
22:1n9	1.5±0.1	0.85±0.05	0.46±0.06	0.25±0.08	0.08±0.01
24:1n9	0.59±0.05	0.31±0.01	0.10±0.03	0.05±0.02	0.01±0.01
MUFA	79.1±0.9 ^c	70.1±1.5 ^b	69.1±1.8 ^b	63.6±1.9 ^a	73.0±0.9 ^b
18:3n3	6.2±0.8 ^c	5.2±0.1 ^b	4.5±0.4 ^a	4.7±0.5 ^a	4.3±0.2 ^a
20:3n3	0.52±0.07	0.41±0.01	0.32±0.05	0.25±0.04	0.26±0.01
20:5n3	30.3±2.2 ^e	22.6±2.4 ^d	14.8±0.1 ^c	8.0±0.9 ^b	4.3±0.6 ^a
22:6n3	48.8±1.7 ^d	36.0±3.9 ^c	28.4±3.0 ^b	22.5±1.7 ^a	20.6±1.2 ^a
n3-PUFA	85.9±2.2 ^e	64.2±1.2 ^d	48.0±1.3 ^c	35.4±2.4 ^b	29.4±1.5 ^a
18:2n6	28.4±0.7 ^a	27.3±0.6 ^a	28.7±1.1 ^a	35.2±2.3 ^b	36.8±0.7 ^c
18:3n6	0.91±0.01	0.90±0.04	0.93±0.03	1.3±0.2	1.3±0.1
20:2n6	0.95±0.08	0.80±0.02	0.76±0.11	0.73±0.05	1.0±0.1
20:3n6	1.1±0.1 ^a	1.2±0.1 ^a	1.6±0.1 ^b	1.9±0.3 ^c	3.0±0.2 ^d
20:4n6	3.5±0.6 ^a	3.5±0.1 ^a	3.6±0.1 ^a	3.9±0.1 ^b	5.6±0.1 ^c
n6-PUFA	34.9±0.3 ^{a,b}	33.8±1.0 ^a	35.6±1.3 ^b	43.1±1.4 ^c	47.7±0.7 ^d
n9	46.7±0.5 ^c	40.0±1.0 ^{a,b}	41.1±1.5 ^{a,b}	37.6±1.5 ^a	42.8±0.8 ^{b,c}
Poli	120.7±2.2 ^d	98.0±1.6 ^c	83.6±1.8 ^b	78.5±2.8 ^a	77.1±1.6 ^a
DHA/EPA	1.6±0.1 ^a	1.6±0.3 ^a	1.9±0.1 ^b	2.8±0.4 ^c	4.8±0.4 ^d
n6/n3	0.41±0.01 ^a	0.53±0.02 ^b	0.74±0.03 ^c	1.2±0.1 ^d	1.6±0.1 ^e

4.3.1 Biometrie

Come si può osservare in Figura 4.33, relativamente al tasso di crescita specifico (Specific Growth Rate, SGR%), i gruppi Hi25 ($12.7 \pm 0.8\%$) e HI50 ($12.7 \pm 0.8\%$) non mostrano differenze significative rispetto al controllo ($12.3 \pm 0.6\%$); al contrario, i gruppi Hi75 e Hi100 (13.0 ± 0.4 , 13.3 ± 0.5 , rispettivamente) mostrano un significativo aumento ($P < 0.05$) del tasso di crescita specifico rispetto al gruppo controllo.

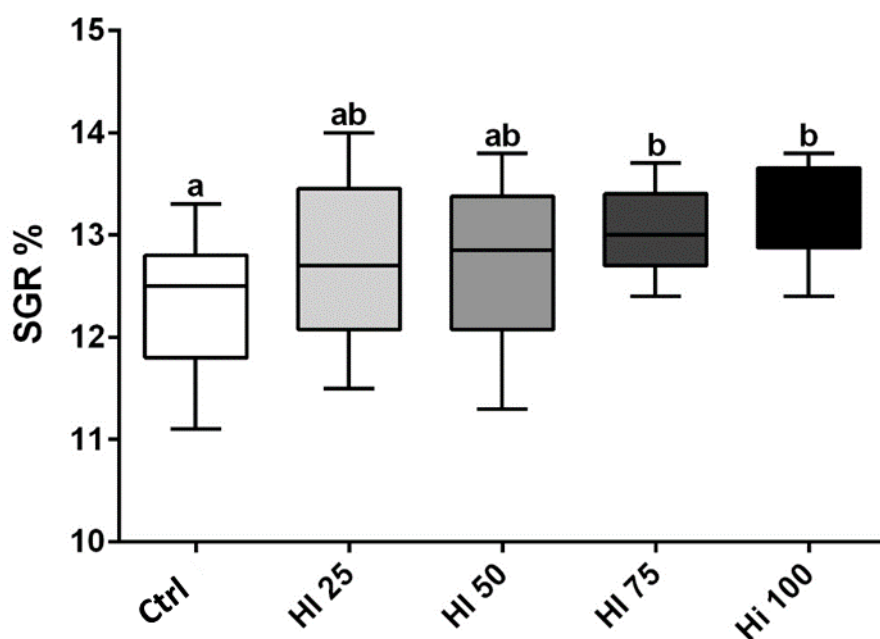


Figura 4.33 Specific Growth rate di giovanili di zebrafish (crescita % in peso day⁻¹) alimentate con 0%, 25%, 50%, 75% e 100% di farine a base di *H. illucens*. Le barre indicano il valore massimo e il valore minimo. Le scatole indicano il primo ed il terzo quartile. La linea centrale rappresenta la mediana. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative.

4.4 Confronto della composizione di acidi grassi nelle diete e nelle larve e giovanili di zebrafish

Per studiare l'influenza del profilo degli acidi grassi nelle diete sulla composizione di acidi grassi nelle larve e giovanili di zebrafish, è stata studiata la correlazione tra questi campioni. Si dimostra una correlazione lineare positiva, statisticamente significativa, tra il profilo degli acidi grassi delle diete, delle larve e dei giovanili di zebrafish (Tabella 4.6).

Tabella 4.6 Indici di correlazione della composizione di acidi grassi tra diete, larve e giovanili di zebrafish.

	CTRL	Hi25	Hi50	Hi75	Hi100
Larve <i>vs</i> diete	0.9191*	0.9025*	0.9135*	0.8467*	0.8215*
Giovanili <i>vs</i> diete	0.9391*	0.9283*	0.9548*	0.9200*	0.8797*
Giovanili <i>vs</i> larve	0.9860*	0.9897*	0.9774*	0.9599*	0.9700*

* P<0.0001

Per studiare meglio gli andamenti del profilo degli acidi grassi nei pesci in relazione alla composizione degli acidi grassi nelle diete, vengono riportati in grafico (Figure 4.34-4.53) i dati relativi alla composizione di acidi grassi di zebrafish a 20 giorni e a due mesi, insieme al profilo degli acidi grassi delle diete. Come si può notare, la composizione di acidi grassi della dieta influenza in modo significativo la composizione di acidi grassi nelle larve e nei giovanili

di zebrafish. In particolare, all'aumentare della percentuale di inclusione della farina di insetto nella dieta, si verificano i seguenti comportamenti:

- un aumento significativo degli SFA, n6 e del rapporto n6/n3, che corrisponde ad un aumento significativo degli stessi nei pesci;
- una diminuzione significativa di MUFA, PUFA, n3, che corrisponde ad una diminuzione significativa degli stessi anche nei pesci;
- un aumento significativo della percentuale degli acidi grassi 12:0, 16:0, 18:1n9, 18:2n6, 20:4n6 nella dieta e del rapporto DHA/EPA, che corrisponde ad un aumento significativo degli stessi nelle larve, o nei giovanili, o in entrambi;
- una diminuzione significativa della percentuale degli acidi grassi 16:1n7, 18:1n7, 20:5n3, 22:6n3 nella dieta, che corrisponde ad una diminuzione significativa degli stessi nei pesci;
- una diminuzione significativa della percentuale di 14:0 nella dieta, mentre non si registrano cambiamenti nei pesci;
- un aumento significativo della percentuale di 18:0 nella dieta, che non corrisponde ad un aumento della stessa nei pesci, se non nelle larve Hi100.
- un aumento significativo di 18:3n3 nella dieta, che corrisponde ad una diminuzione significativa dello stesso nelle larve e nei giovanili.

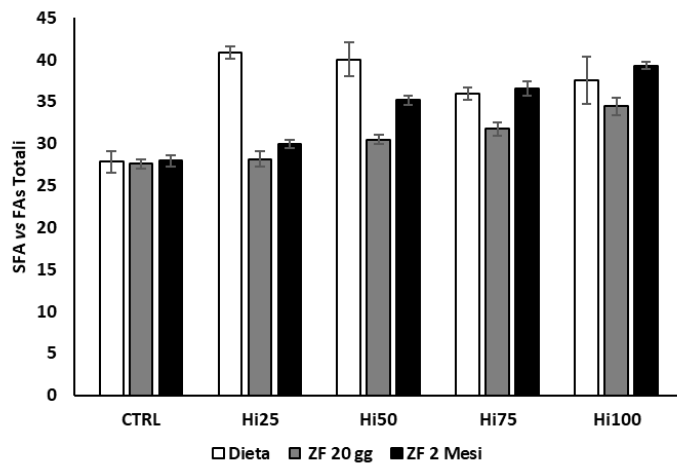


Figura 4.34 Percentuale di SFA, vs acidi grassi totali, nelle diete e nelle larve e giovanili di zebrafish.

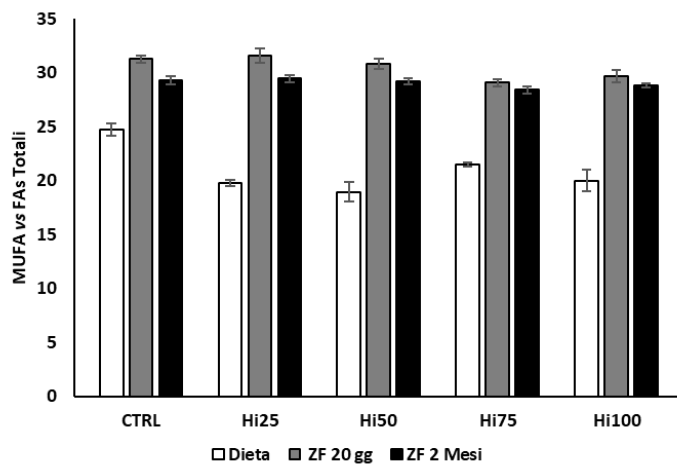


Figura 4.35 Percentuale di MUFA, vs acidi grassi totali, nelle diete e nelle larve e giovanili di zebrafish.

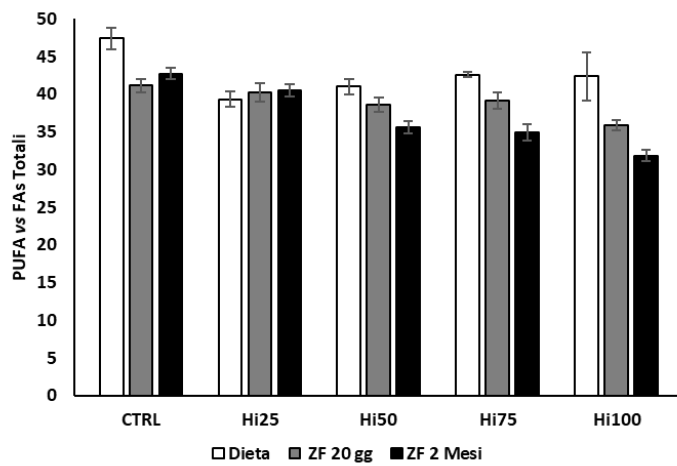


Figura 4.36 Percentuale di PUFA, vs acidi grassi totali, nelle diete e nelle larve e giovanili di zebrafish.

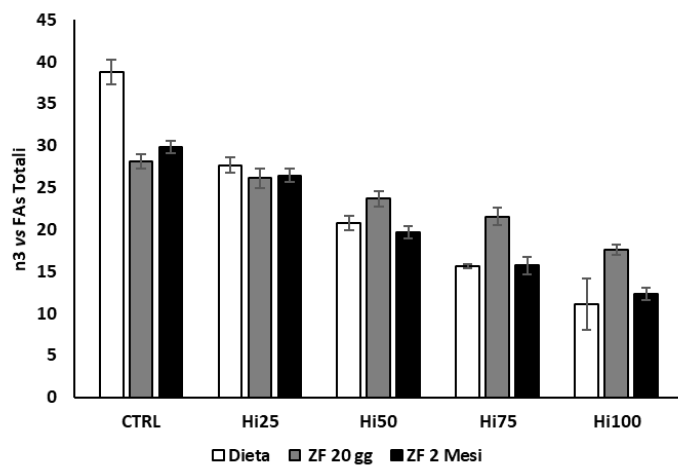


Figura 4.37 Percentuale di n3, vs acidi grassi totali, nelle diete e nelle larve e giovanili di zebrafish.

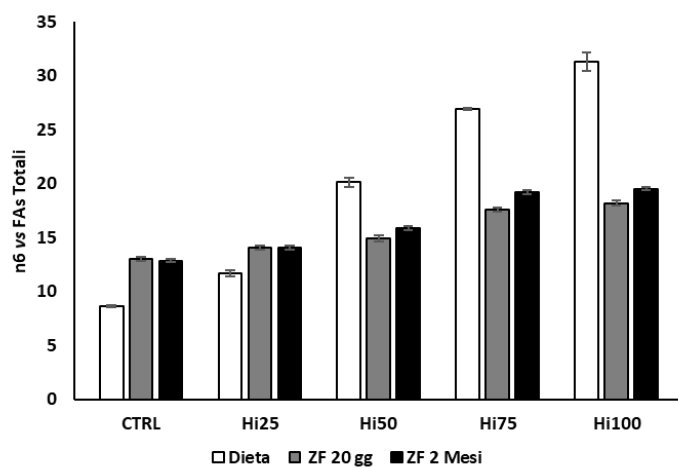


Figura 4.38 Percentuale di n6, vs acidi grassi totali, nelle diete e nelle larve e giovanili di zebrafish.

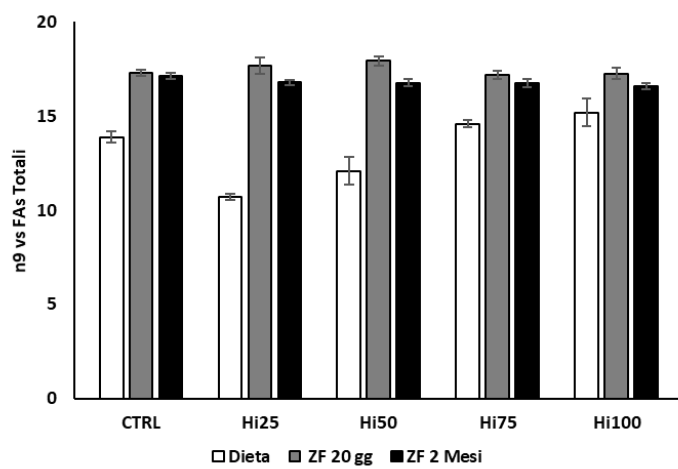


Figura 4.39 Percentuale di n9, vs acidi grassi totali, nelle diete e nelle larve e giovanili di zebrafish.

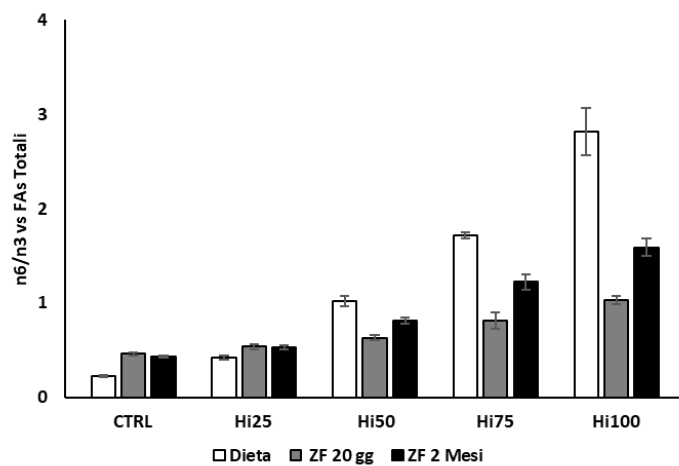


Figura 4.40 Rapporto n6/n3 nelle diete e nelle larve e giovanili di zebrafish.

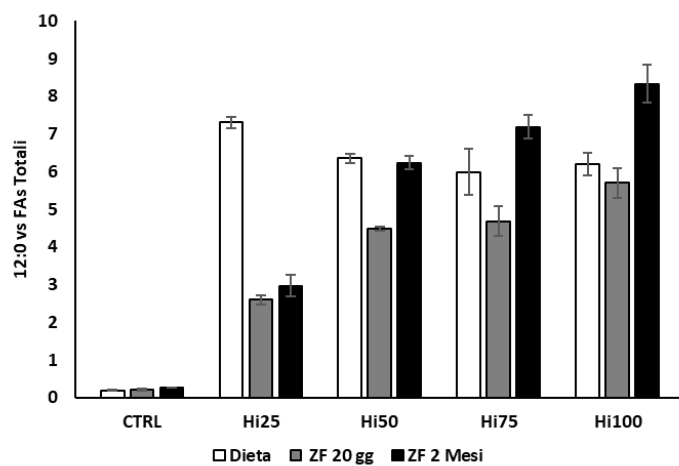


Figura 4.41 Percentuale di 12:0, vs acidi grassi totali, nelle diete e nelle larve e giovanili di zebrafish.

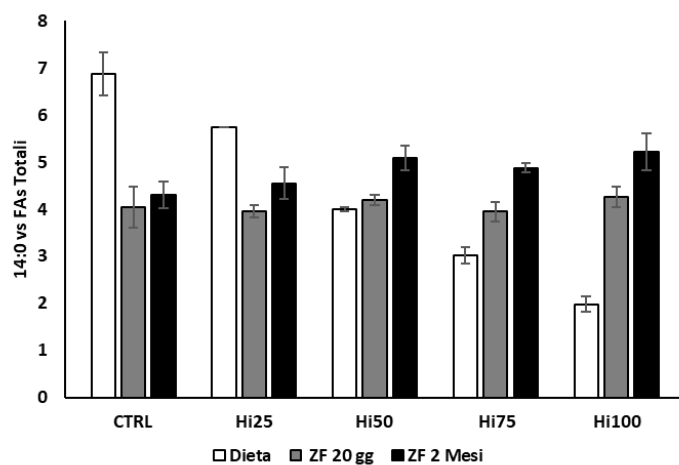


Figura 4.42 Percentuale di 14:0, vs acidi grassi totali, nelle diete e nelle larve e giovanili di zebrafish.

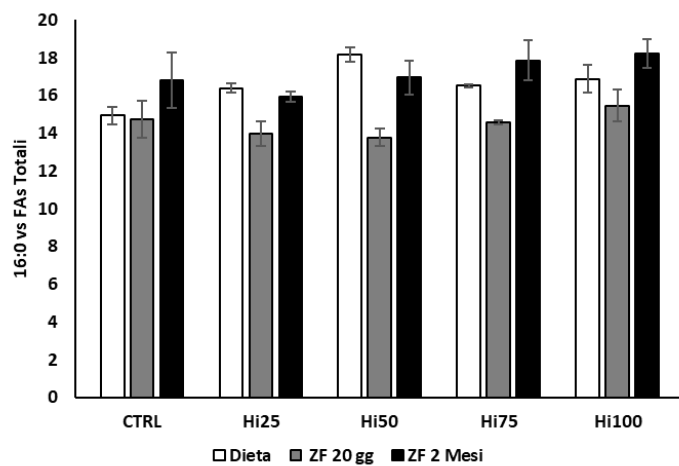


Figura 4.43 Percentuale di 16:0, vs acidi grassi totali, nelle diete e nelle larve e giovanili di zebrafish.

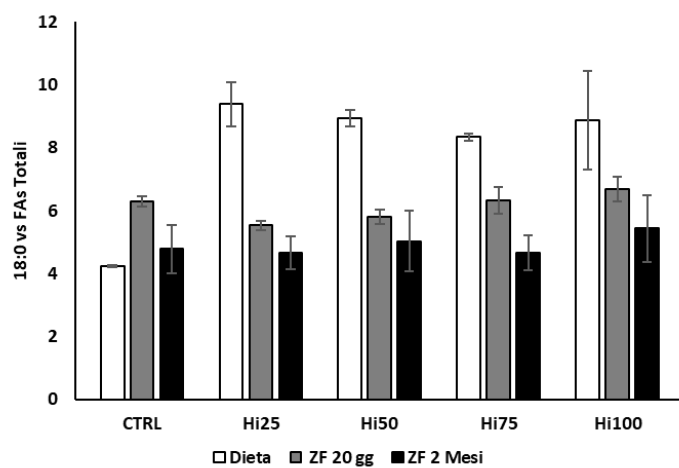


Figura 4.44 Percentuale di 18:0, vs acidi grassi totali, nelle diete e nelle larve e giovanili di zebrafish.

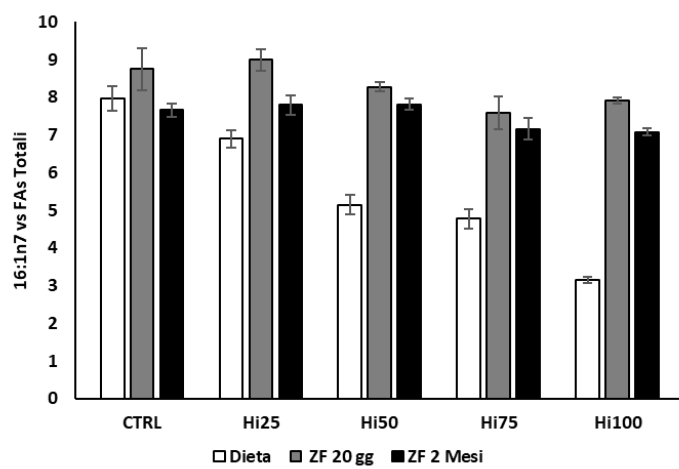


Figura 4.45 Percentuale di 16:1n7, vs acidi grassi totali, nelle diete e nelle larve e giovanili di zebrafish.

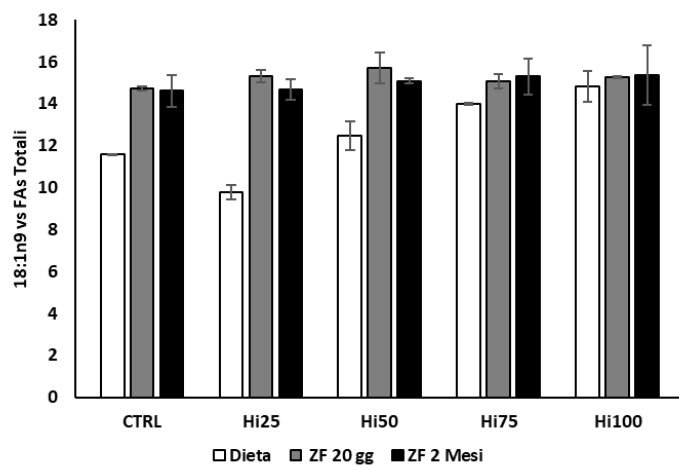


Figura 4.46 Percentuale di 18:1n9, vs acidi grassi totali, nelle diete e nelle larve e giovanili di zebrafish.

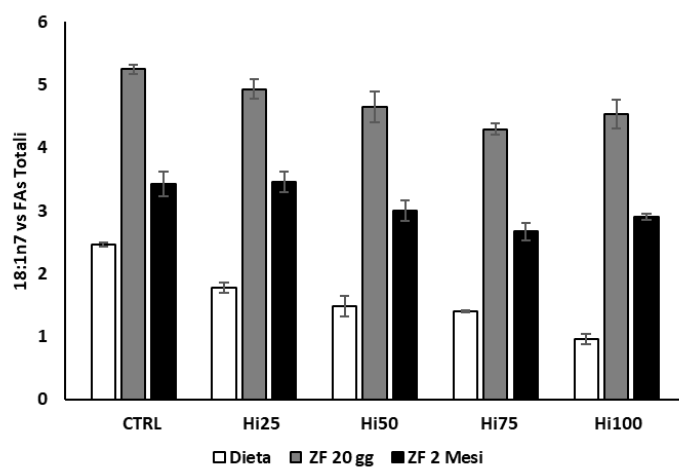


Figura 4.47 Percentuale di 18:1n7, vs acidi grassi totali, nelle diete e nelle larve e giovanili di zebrafish.

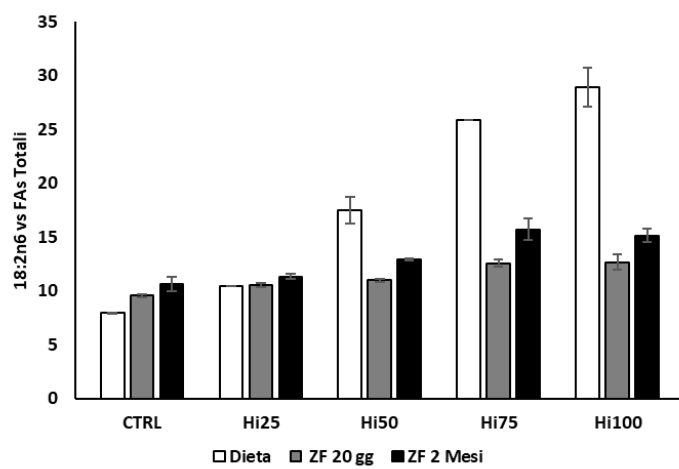


Figura 4.48 Percentuale di 18:2n6, vs acidi grassi totali, nelle diete e nelle larve e giovanili di zebrafish.

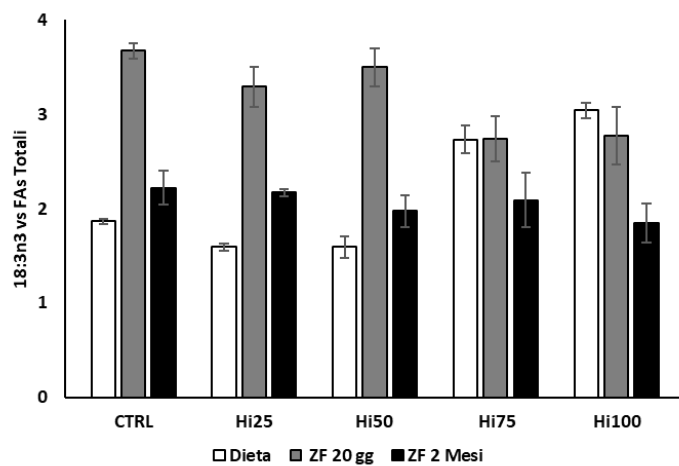


Figura 4.49 Percentuale di 18:3n3, vs acidi grassi totali, nelle diete e nelle larve e giovanili di zebrafish.

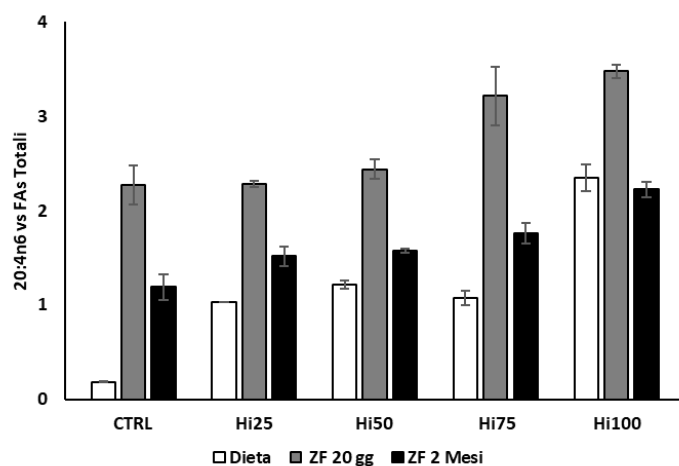


Figura 4.50 Percentuale di 20:4n6, vs acidi grassi totali, nelle diete e nelle larve e giovanili di zebrafish.

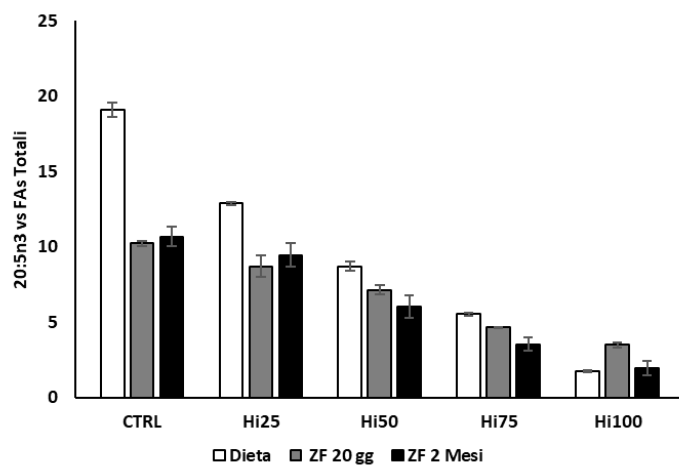


Figura 4.51 Percentuale di 20:5n3, vs acidi grassi totali, nelle diete e nelle larve e giovanili di zebrafish.

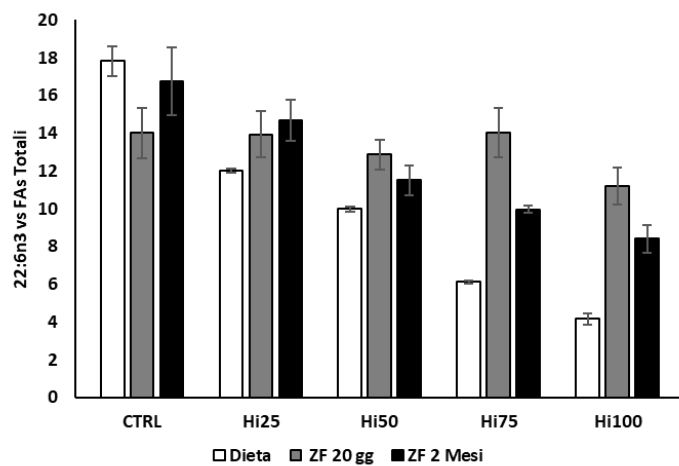


Figura 4.52 Percentuale di 22:6n3, vs acidi grassi totali, nelle diete e nelle larve e giovanili di zebrafish.

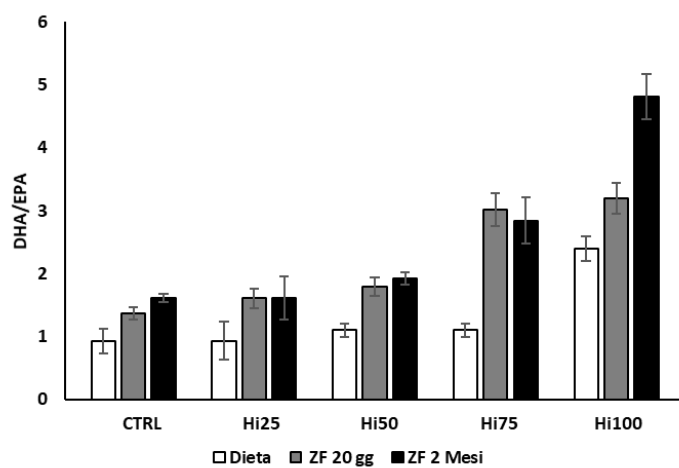


Figura 4.53 Rapporto DHA/EPA nelle diete e nelle larve e giovanili di zebrafish.

5 DISCUSSIONE

L'acquacoltura è il settore per la produzione di cibo in maggior crescita in tutto il mondo: già nel 2015 ha provveduto per oltre il 45% alla richiesta di prodotti ittici (Martin Tschirner and While 2017), e si stima che questa percentuale arriverà al 62% nel 2030 (FAO 2018). La ragione di questa crescita è legata a due fattori importanti: i) nel 2050 la popolazione mondiale arriverà a 9 miliardi, con una conseguente aumentata richiesta di prodotti alimentari, compresi quelli ittici; ii) è in corso una grave riduzione delle risorse ittiche mondiali: basti pensare che secondo la FAO, già nel 2013 è stato pescato il 31.4% degli stock ittici marini, con un grave rischio di depauperamento delle risorse ittiche che a tutt'oggi non è più sostenibile.

Il settore dell'acquacoltura cela, pertanto, due importanti potenzialità: innanzitutto, quella di alleviare la pressione esercitata sugli stock ittici naturali e, inoltre, quella di rispondere prontamente all'aumentata richiesta di proteine animali da parte della popolazione mondiale in crescita. Un ulteriore vantaggio dell'acquacoltura risiede nel fatto che, mentre la composizione nutrizionale del pesce pescato è caratterizzata da una grande variabilità del profilo nutrizionale, essendo quest'ultimo influenzato da vari fattori quali la stagionalità, l'età e la dieta, al contrario, un tenore alimentare standardizzato fa sì che nei pesci

d'allevamento il profilo nutrizionale sia soggetto a minor variabilità (Cahu et al., 2004).

Allo stesso tempo, però, l'utilizzo di ingenti quantità di risorse ittiche naturali per la produzione di farine ed oli di pesce, tradizionalmente impiegati per la formulazione dei mangimi in acquacoltura, appare non più sostenibile. Visto il depauperamento delle risorse ittiche naturali, inoltre, si ritiene che il costo dei mangimi tradizionali diventerà economicamente proibitivo (Gasco et al. 2018).

Da qui emerge la necessità, da parte della comunità mondiale, di individuare ingredienti sostitutivi ai tradizionali farine e oli di pesce per la formulazione di mangimi che non inficino sul profilo nutrizionale del pesce destinato al mercato alimentare (Thilsted et al. 2016).

Tra le varie alternative proposte, la possibilità di impiegare gli insetti come fonti sostenibili di proteine da destinare all'acquacoltura ha ottenuto crescente attenzione, nonostante essi siano caratterizzati da un profilo lipidico non idoneo alle esigenze nutrizionali dei pesci (e di quelli marini in particolare), in quanto ricchi di SFA e carenti in PUFA. Deficienze da PUFA nei pesci sono associate ad una serie di effetti negativi, quali crescita ridotta, steatosi epatiche e miocarditi, aumento della mortalità, pigmentazione errata, disgregazione degli epiteli branchiali, ridotto tasso di fecondità e di fertilizzazione (Tocher 2010). I PUFA hanno effetti benefici anche sulla salute umana, quali prevenzione e

trattamento di malattie neurodegenerative come Alzheimer e Parkinson, di malattie cardiovascolari, ma anche di diabete, cancro, depressione, malattie mentali; non a caso, la loro regolare assunzione è consigliata in particolari categorie di soggetti che differiscono per età e stato fisiologico come, ad esempio, le donne in stato interessante (Zárate et al. 2017; Shahidi and Ambigaipalan 2018). Pertanto, è importante assumere alimenti ricchi di PUFA, e tra gli alimenti più ricchi di questi acidi grassi c'è sicuramente il pesce, che deve essere alimentato quindi con una dieta ricca di acidi grassi insaturi.

Tra gli insetti, un candidato promettente è sicuramente *Hermetia illucens*, che, avendo un profilo lipidico parzialmente modulabile attraverso la dieta (St Hilaire, 2017), consente di utilizzare substrati di scarto di origine vegetale, opportunamente arricchiti di PUFA, come substrato di crescita. Nel lavoro di Truzzi et al. (sottomesso 2019) l'aggiunta del 10% (W/W) di *Schizochytrium sp.* al substrato di crescita delle larve di *Hermetia illucens* si è rivelato un buon metodo di arricchimento di PUFA nel profilo lipidico delle prepupe, che sono state poi utilizzate per sostituire in diversa percentuale (0, 25, 50, 75 e 100 %) la farina e l'olio di pesce nelle diete testate in questo lavoro di tesi.

Nonostante la generale riduzione della percentuale di PUFA nelle diete arricchite con farina di insetto rispetto alla dieta di controllo, si nota un progressivo aumento di questi acidi grassi all'aumentare della percentuale di

inclusione della farina di insetto nelle diete. Questo risultato conferma l'efficace processo di arricchimento di PUFA nelle prepupae di *Hermetia illucens* aggiunte alle diete.

In accordo con dati di letteratura, questo lavoro di tesi dimostra come il profilo di acidi grassi delle larve e dei giovanili di zebrafish sia fortemente influenzato dalla composizione di acidi grassi nella dieta. Esiste infatti una correlazione statisticamente significativa tra composizione di acidi grassi delle diete e delle larve/giovanili di zebrafish. Verranno discussi in dettaglio i risultati più significativi.

L'inclusione di farina di insetto nella dieta (anche solo del 25%), porta ad un contenuto significativamente maggiore di SFA rispetto alla dieta di controllo, come del resto riportato da altri studi (Oonincx, 2015). Tra gli acidi grassi saturi, il più abbondante è l'acido palmitico, ma il cambiamento più rilevante in relazione all'aumento della percentuale di inclusione di BSF nella dieta è quello a carico dell'acido laurico, che aumenta fino a 30 volte.

L'abbondanza di SFA nei mangimi si riflette in un significativo aumento degli stessi sia nelle larve che nei giovanili di zebrafish e, analogamente alla dieta, il cambiamento più consistente avviene a carico dell'acido laurico, che aumenta all'aumentare della percentuale di inclusione della farina di insetto, fino a 20 volte nelle larve e fino a 30 volte nei giovanili. L'acido laurico è noto per avere

attività antibatterica ed antivirale, e dati di letteratura evidenziano la possibilità che un suo aumento potrebbe consentire una riduzione dell'uso degli antibiotici in acquacoltura (Gasco et al. 2018). Inoltre questo acido grasso è in grado di migliorare la salute intestinale e di prevenire processi infiammatori (Aleström, Holter, and Nourizadeh-Lillabadi 2006).

Un punto critico legato al potenziale uso degli insetti nella mangimistica potrebbe essere legato alla presenza dell'esoscheletro chitinoso che, in alcuni casi, potrebbe indurre infiammazione intestinale e ridurre l'assorbimento dei nutrienti con gravi ripercussioni sul tasso di crescita dell'animale (Dumas et al. 2018). Contrariamente a quanto osservato in studi precedenti condotti sulla trota arcobaleno (Sealey et al., 2011), o su zebrafish (Zarantoniello et al., 2019), i dati relativi alle biometrie delle larve mostrano un SGR significativamente più alto nei gruppi alimentati con diete contenenti il 50% o più di farina a base di BSF rispetto al controllo (dato che potrebbe spiegare anche la diminuzione significativa della quantità totale di lipidi nelle larve appartenenti al gruppo Hi100). Allo stesso tempo, anche nei giovanili si osserva un aumento significativo dell'SGR nei gruppi Hi75 e Hi100 rispetto al controllo. Probabilmente questo dato si spiega con l'aumentata disponibilità di SFA a media catena e, in particolare, di acido laurico. Infatti è noto che gli acidi grassi

a media catena (C8-C12) vengono assorbiti, digeriti e ossidati velocemente, rappresentando quindi una fonte di energia prontamente fruibile (Dayrit 2015). Come prevedibile sulla base della letteratura, si nota nelle diete, nelle larve e nei giovanili un decremento significativo di MUFA e di PUFA all'aumentare dell'inclusione di farina di insetto nella dieta. È interessante notare che le differenze in termini di PUFA tra un gruppo e un altro sono più contenute nelle larve rispetto a quanto visto nei giovanili; ciò è coerente con la capacità di zebrafish, in quanto pesce dulcicolo, di sintetizzare LC-PUFA a partire da precursori a catena più corta (Tocher, D.R, 2010); studi analoghi in cui è stata considerata l'espressione di geni (*elov12*, *elov15* e *fads2*) che codificano per le elongasi e le desaturasi necessarie confermano questa supposizione (Zarantoniello et al., 2018); in particolare, il fatto che nei giovanili si attenuino le differenze tra i gruppi sperimentali in termini di crescita e si faccia più marcata la riduzione di PUFA all'aumentare dell'inclusione di BSF nella dieta rispetto alle larve, fa supporre che l'inclusione di farine a base di BSF riesca a soddisfare il fabbisogno di acidi grassi nel breve periodo, ma somministrazioni prolungate di diete ad alte inclusioni potrebbero portare ad una riduzione dell'energia destinata a processi di crescita, al fine di garantire le conversioni biochimiche necessarie a sopperire alle carenze di HUFA nella dieta. All'aumentare dell'inclusione della farina di insetto nella dieta si osserva un

calo statisticamente significativo di EPA e DHA sia nelle diete che negli zebrafish a 20 giorni e a due mesi. Nuovamente, si può notare che, per quanto esista una progressiva diminuzione di questi due importanti acidi grassi, le differenze presenti nella composizione degli animali dei vari gruppi sono meno accentuate che nei mangimi, evidenziando probabilmente l'attivazione di pathways di sintesi di acidi grassi polinsaturi a partire da precursori a catena più corta al fine di compensare almeno parzialmente la forte riduzione di questi importanti acidi grassi nelle diete (Tocher 2010). Tuttavia, queste carenze potrebbero porre delle limitazioni all'inclusione di alte percentuali di insetti nella dieta di pesci marini che non sono in grado di attuare queste conversioni. Nonostante l'origine comune, i pesci dulcicoli differiscono notevolmente da quelli marini in termini di Essential Fatty Acid Requirement (EFAR); ciò riflette la diversa distribuzione di acidi grassi rinvenibile nei due ambienti e la diversa pressione evolutiva che ne consegue. In ambiente d'acqua dolce gli organismi alla base della rete trofica sono molto ricchi di acido α -linolenico, ma non in EPA e DHA, che devono essere ottenuti tramite sintesi enzimatiche a partire dai loro precursori; al contrario, i pesci marini possono contare su una fonte diretta di EPA e di DHA di cui le loro prede sono naturalmente ricche. Il fabbisogno di acidi grassi essenziali di pesci dulcicoli e diadromi può essere generalmente soddisfatto dai C18-PUFA (Holt 2011). Benché il fabbisogno di

acidi grassi essenziali vari tra specie diverse e in relazione al ciclo ontogenetico dell'animale, il fabbisogno di n3-PUFA non è correlato soltanto alla quantità assoluta con cui questi acidi grassi vengono forniti, ma anche alle relative proporzioni tra DHA ed EPA; in particolare il fabbisogno di acidi grassi essenziali è inversamente proporzionale al rapporto $\frac{DHA}{EPA}$; ciò è correlato sia al tasso di conversione di EPA in DHA, apparentemente troppo lento nei pesci marini in via di sviluppo, sia al ruolo svolto dal DHA nello sviluppo retinale e cerebrale (Tocher 2010; Bell et al. 1997). Sulla base della composizione di acidi grassi presente nelle uova di molte specie di pesci marini, il rapporto $\frac{DHA}{EPA}$ ritenuto ottimale per la prima alimentazione larvale è di 2 (Holt 2011). I dati ottenuti nel presente lavoro mostrano che l'inclusione di farina di insetto nella dieta determina un aumento importante di questo rapporto, che raggiunge un valore prossimo al valore ottimale nei mangimi (fino a un massimo di 2.4 ± 0.2 per Hi100), e cresce nelle larve e nei giovanili fino ad un valore massimo di 3.2 ± 0.2 di 4.4 ± 0.4 , rispettivamente, nei gruppi alimentati con la dieta Hi100. L'inclusione di farina di insetto nella dieta porta anche un aumento significativo ($P < 0.05$) di acido arachidonico che riflette il progressivo incremento di acido linoleico all'aumentare della percentuale di inclusione di BSF; ciò si traduce in un parallelo aumento degli n6.

Analogamente a quanto detto per DHA ed EPA, è ormai ampiamente riconosciuto che per raggiungere un buon stato di salute un rapporto $\frac{n6}{n3}$ bilanciato è più rilevante rispetto al quantitativo assoluto dei singoli acidi grassi. Nella dieta dei nostri antenati del Paleolitico il rapporto tra i due gruppi di acidi grassi era mantenuto intorno ad 1:1. Nella dieta occidentale odierna questo rapporto è salito fino a 20:1 o anche più (Zárate et al. 2017). Secondo alcuni studi l'aumentata assunzione di n6 favorirebbe l'insorgenza di tumore al seno, alla prostata e al colon, sia nell'uomo che negli animali (Shahidi and Ambigaipalan 2018). Berquin e collaboratori (2008) hanno dimostrato che un rapporto tra questa due classi di acidi grassi minore di 5 è efficace nel rallentare la progressione tumorale. I dati ottenuti nel presente lavoro di tesi mostrano che l'inclusione di farina di insetto nella dieta determina un aumento di questo rapporto, che varia nelle larve da ~0.54 nel gruppo Hi25 a ~1.0 nel gruppo Hi100, e nei giovanili da ~0.53 nel gruppo Hi25 a ~1.6 nel gruppo Hi100. Tuttavia, il rapporto si mantiene sempre a livelli ottimali per la salute e il benessere fisico dell'animale.

6 CONCLUSIONI

In accordo con il concetto di economia circolare, l'uso degli insetti in acquacoltura potrebbe rappresentare un'alternativa sostenibile ai mangimi a base di FM e FO, tradizionalmente impiegati nel settore. Tra le specie di insetto testate, uno dei candidati più promettenti è *Hermetia illucens* che gode di un profilo amminoacidico simile a quello dei mangimi tradizionali e di un profilo lipidico relativamente modulabile. Il suo uso nella mangimistica è, tuttavia, limitato dal suo profilo lipidico sbilanciato verso gli SFA e dalla presenza dell'esoscheletro chitinoso. Per questi motivi, viene suggerita un'inclusione di BSF nelle diete non superiore al 40% per non incorrere in effetti negativi sulla salute e sul benessere del pesce (Sanchez-Muros, 2014). In questo lavoro di tesi tuttavia, è stata usata un'Hi cresciuta su un substrato arricchito di PUFA, e che pertanto presenta tra gli acidi grassi anche diversi MUFA e PUFA.

Nonostante le diete siano state formulate in modo da essere isoproteiche, isolipidiche ed isoenergetiche, l'inclusione di BSF nei mangimi si traduce in una serie di variazioni a carico del profilo lipidico. Tutte le diete a base di insetto sono caratterizzate, rispetto a quella di controllo, da un aumento degli SFA e da un calo dei PUFA e, in particolare, da un decremento di EPA e DHA, per quanto il calo meno drastico di quest'ultimo acido grasso determini un favorevole aumento del rapporto DHA/EPA. Le differenze in termini di PUFA,

meno accentuate nelle larve piuttosto che nei mangimi e nei giovanili, fanno supporre che l'inclusione di BSF nei mangimi tradizionali possa soddisfare il fabbisogno di EFA nel breve periodo ma che in tempi di somministrazione prolungati possa indurre delle criticità. L'inclusione di BSF nella dieta potrebbe trovare applicazione durante lo sviluppo larvale così che la grande quantità di acidi grassi a media catena e, in particolare, di acido laurico sostenga il fabbisogno energetico cellulare durante il periodo di massimo accrescimento dell'animale. L'alta concentrazione di acido laurico, inoltre, stimolando il sistema immunitario, potrebbe prevenire gli affetti avversi attribuibili ad alte inclusioni di chitina favorendo complessivamente il benessere dell'animale. Tuttavia, ulteriori analisi riguardo lo stato di salute del tratto intestinale e il grado di accumulo lipidico a livello epatico, oltre al monitoraggio di importanti marker molecolari dello stress e della risposta immunitaria sono necessarie per avere un quadro più completo in termini di benessere dei pesci alimentati con le diverse diete sperimentali.

In conclusione, considerando le diete, la composizione di acidi grassi dei diversi stadi di sviluppo dello zebrafish testati nel presente studio, e considerato che i gruppi sperimentali alimentati con le più alte percentuali di inclusione hanno mostrato una crescita maggiore rispetto ai gruppi Controllo, il 50% di inclusione di BSF nella dieta potrebbe risultare il compromesso migliore tra

sostenibilità, fabbisogno di acidi grassi essenziali nella dieta e composizione di acidi grassi nei pesci allevati.

Ci si attende, in futuro, di testare gli effetti di queste diete su modelli sperimentali come zebrafish in tempi di somministrazione più lunghi, che vadano cioè dalla fase larvale a quella di maturità sessuale, per poi trasporre il suddetto approccio a specie di interesse commerciale dulcicole e, infine, marine.

7 BIBLIOGRAFIA

- Aleström, Peter, Jethro L. Holter, and Rasoul Nourizadeh-Lillabadi. 2006. "Zebrafish in Functional Genomics and Aquatic Biomedicine." *Trends in Biotechnology* 24 (1): 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.11.004>.
- Bell, J. Gordon, Bruce M. Farndale, Michael P. Bruce, Jose M. Navas, and Manuel Carillo. 1997. "Effects of Broodstock Dietary Lipid on Fatty Acid Compositions of Eggs from Sea Bass (*Dicentrarchus Labrax*)." *Aquaculture* 149 (1–2): 107–19. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01436-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01436-6).
- Belghit, I., Liland, N. S., Waagbø, R., Biancarosa, I., Pelusio, N., Li, Y., ... & Lock, E. J. (2018). Potential of insect-based diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 491, 72-81.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2012). *Biochemistry*/Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer; with Gregory J. Gatto, Jr.
- Berquin, I. M., Edwards, I. J., & Chen, Y. Q. (2008). Multi-targeted therapy of cancer by omega-3 fatty acids. *Cancer letters*, 269(2), 363-377.
- Bradbury, J. (2011). Docosahexaenoic acid (DHA): an ancient nutrient for the modern human brain. *Nutrients*, 3(5), 529-554.
- Cahu, C., Salen, P., & De Lorgeril, M. (2004). Farmed and wild fish in the prevention of cardiovascular diseases: assessing possible differences in lipid nutritional values. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 14(1), 34-41.
- Cai, J., & Leung, P. (2017). Short-term projection of global fish demand and supply gaps. *Fao*.
- Dayrit, Fabian M. 2015. "The Properties of Lauric Acid and Their Significance in Coconut Oil." *Journal of the American Oil Chemists' Society* 92 (1): 1–15. <https://doi.org/10.1007/s11746-014-2562-7>.
- Deckelbaum, Richard J., and Claudia Torrejon. 2007. "Sharia Implementation in Northern Nigeria 1999-2006: The Sharia Penal and Criminal Procedure Codes" 4: 587–91. <https://doi.org/10.3945/jn.111.148080.587S>.
- Dumas, André, Thiago Raggi, Justin Barkhouse, Elizabeth Lewis, and Erika Weltzien. 2018. "The Oil Fraction and Partially Defatted Meal of Black Soldier Fly Larvae (*Hermetia Illucens*) Affect Differently Growth Performance, Feed Efficiency, Nutrient Deposition, Blood Glucose and Lipid Digestibility of Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*)." *Aquaculture* 492: 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.03.038>.

- EFSA Scientific Committee. (2015). Risk profile related to production and consumption of insects as food and feed. *EFSA Journal*, 13(10), 4257.
- Fisheries, F. A. O. (2011). Aquaculture Department. 2013. Global Aquaculture Production Statistics for the year.
- Gasco, Laura, Francesco Gai, Giulia Maricchiolo, Lucrezia Genovese, Sergio Ragonese, Teresa Bottari, and Gabriella Caruso. 2018. *Feeds for the Aquaculture Sector*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-77941-6>.
- Henry, M., L. Gasco, G. Piccolo, and E. Fountoulaki. 2015. "Review on the Use of Insects in the Diet of Farmed Fish: Past and Future." *Animal Feed Science and Technology* 203 (1): 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.03.001>.
- Holt, G. Joan. 2011. *Larval Fish Nutrition*. *Larval Fish Nutrition*. <https://doi.org/10.1002/9780470959862>.
- Howe, Kerstin, Matthew D. Clark, Carlos F. Torroja, James Torrance, Camille Berthelot, Matthieu Muffato, John E. Collins, et al. 2013. "The Zebrafish Reference Genome Sequence and Its Relationship to the Human Genome." *Nature* 496 (7446): 498–503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>.
- Huis, Arnold van. 2012. "Potential of Insects as Food and Feed in Assuring Food Security." *Annual Review of Entomology* 58 (1): 563–83. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153704>.
- Isaacs, Moenieba. 2016. "The Humble Sardine (Small Pelagics): Fish as Food or Fodder." *Agriculture and Food Security* 5 (1): 1–14. <https://doi.org/10.1186/s40066-016-0073-5>.
- Izquierdo, M. 2005. "Essential Fatty Acid Requirements in Mediterranean Fish Species." *Mediterranean Fish Nutrition* 102: 91–102.
- Laidlaw, M., Cockerline, C. A., & Rowe, W. J. (2014). A randomized clinical trial to determine the efficacy of manufacturers' recommended doses of omega-3 fatty acids from different sources in facilitating cardiovascular disease risk reduction. *Lipids in health and disease*, 13(1), 99.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M., & Cox, M. M. (2005). *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan.
- Lugert, Vincent, Georg Thaller, Jens Tetens, Carsten Schulz, and Joachim Krieter. 2016. "A Review on Fish Growth Calculation: Multiple Functions in Fish Production and Their Specific Application." *Reviews in Aquaculture* 8 (1): 30–42. <https://doi.org/10.1111/raq.12071>.
- Madsen, Lise, Arild C. Rustan, Hege Vaagenes, Kjetil Berge, Endre Dyrøy, and Rolf K. Berge. 1999. "Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acid Affect Mitochondrial and Peroxisomal Fatty Acid Oxidation in Relation to Substrate Preference." *Lipids* 34 (9): 951–63.

- <https://doi.org/10.1007/s11745-999-0445-x>.
- Martin Tschirner, Werner Kloas, and While. 2017. "Increasing the Sustainability of Aquaculture Systems." *Gaia*, 332–40.
- Marzouk, Sammer. 2016. "Physiological , Ethological and Ecological Features of Hermetia Illucen." *Peer J Preprints*. <https://doi.org/https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.2436v1>.
- Masuda, Reiji, Toshio Takeuchi, Katsumi Tsukamoto, Hiroo Sato, Ken Shimizu, and Keinosuke Imaizumi. 1999. "Incorporation of Dietary Docosahexaenoic Acid into the Central Nervous System of the Yellowtail *Seriola Quinqueradiata*." *Brain, Behavior and Evolution* 53 (4): 173–79. <https://doi.org/10.1159/000006592>.
- Oonincx, D. G., Van Broekhoven, S., Van Huis, A., & van Loon, J. J. (2015). Feed conversion, survival and development, and composition of four insect species on diets composed of food by-products. *PLoS One*, 10(12), e0144601.
- Park, Haeree H. 2016. "Black Soldier Fly Larvae Manual," 1–13. http://scholarworks.umass.edu/sustainableumass_studentshowcase/14.
- Pauly, Daniel, and Dirk Zeller. 2017. "Comments on FAOs State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA 2016)." *Marine Policy* 77 (January): 176–81. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2017.01.006>.
- Péron, Guillaume, Jean François Mittaine, and Bertrand Le Gallic. 2010. "Where Do Fishmeal and Fish Oil Products Come from? An Analysis of the Conversion Ratios in the Global Fishmeal Industry." *Marine Policy* 34 (4): 815–20. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2010.01.027>.
- Ribas, Laia, and Francesc Piferrer. 2014. "The Zebrafish (*Danio Rerio*) as a Model Organism, with Emphasis on Applications for Finfish Aquaculture Research." *Reviews in Aquaculture* 6 (4): 209–40. <https://doi.org/10.1111/raq.12041>.
- Rodríguez, C, Ja Perez, P Badia, MS H Izquierdo Fernandez-Palacios, and A Lorenzo Hernandez. 1998. "DHArEPA Ratio in the Diet." *Aquaculture* 169: 9–23. http://ac.els-cdn.com/S0044848698003287/1-s2.0-S0044848698003287-main.pdf?_tid=ac5c4874-2a86-11e7-8d03-00000aab0f01&acdnat=1493214536_de5b28a34fd516e2f07722992c4719a4.
- Sealey, W. M., Gaylord, T. G., Barrows, F. T., Tomberlin, J. K., McGuire, M. A., Ross, C., & St-Hilaire, S. (2011). Sensory analysis of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, fed enriched black soldier fly prepupae, *Hermetia illucens*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 42(1), 34-45.
- Senanayake, S. P. J. N., & Fichtali, J. (2006). Single-cell oils as sources of nutraceutical and specialty lipids: processing technologies and applications. *NUTRACEUTICAL SCIENCE AND TECHNOLOGY*, 5, 251.

- Sánchez-Muros, María José, Fernando G. Barroso, and Francisco Manzano-Agugliaro. 2014. "Insect Meal as Renewable Source of Food for Animal Feeding: A Review." *Journal of Cleaner Production* 65: 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.11.068>.
- Shahidi, Fereidoon, and Priyatharini Ambigaipalan. 2018. "Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Health Benefits." *Annual Review of Food Science and Technology* 9 (1): 345–81. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-111317-095850>.
- Spence, Rowena, Gabriele Gerlach, Christian Lawrence, and Carl Smith. 2008. "The Behaviour and Ecology of the Zebrafish, *Danio Rerio*." *Biological Reviews* 83 (1): 13–34. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x>.
- Stamer, Andreas. 2015. "Insect Proteins - a New Source for Animal Feed." *EMBO Reports* 16 (6): 676–80. <https://doi.org/10.15252/embr.201540528>.
- St-Hilaire, S., Cranfill, K., McGuire, M. A., Mosley, E. E., Tomberlin, J. K., Newton, L., ... & Irving, S. (2007). Fish offal recycling by the black soldier fly produces a foodstuff high in omega-3 fatty acids. *Journal of the World Aquaculture Society*, 38(2), 309-313.
- Thilsted, Shakuntala Haraksingh, Andrew Thorne-Lyman, Patrick Webb, Jessica Rose Bogard, Rohana Subasinghe, Michael John Phillips, and Edward Hugh Allison. 2016. "Sustaining Healthy Diets: The Role of Capture Fisheries and Aquaculture for Improving Nutrition in the Post-2015 Era." *Food Policy* 61: 126–31. <https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2016.02.005>.
- Tocher D. R. 2003. "Metabolism and Functions of Lipids and Fatty Acids in Teleost Fish." *Reviews in Fisheries Science* 11 (2): 107–84.
- Tocher, Douglas R. 2010. "Fatty Acid Requirements in Ontogeny of Marine and Freshwater Fish." *Aquaculture Research* 41 (5): 717–32. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02150.x>.
- Tóth-Markus, M. 2014. *Food Enrichment with Omega-3 Fatty Acids*. *Acta Alimentaria*. Vol. 43. <https://doi.org/10.1556/aalim.43.2014.1.19>.
- Tran, V Heuzé, and H P S Makkar. 2015. "Insects in Fish Diets." *Animal Frontiers* 5 (2): 37–44. <https://doi.org/10.2527/af.2015-0018>.
- Truzzi, C, E. Giorgini, A. Annibaldi, M. Antonucci, S. Illuminati, G. Scarponi, P. Riolo, N. Isidoro, C. Conti, M. Zarantoniello, R. Cipriani, I. Olivotto. Submitted 04/03/2019. "GC-MS and FTIR Analysis of Fatty Acids Profile and Biochemical Composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*): Influence of Feeding Substrate Based on Coffee-waste Silverskin enriched With Microalgae". *Animal Feed Science and Technology*.
- Truzzi, C., S. Illuminati, A. Annibaldi, M. Antonucci, and G. Scarponi. 2017.

- “Quantification of Fatty Acids in the Muscle of Antarctic Fish *Trematomus Bernacchii* by Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Optimization of the Analytical Methodology.” *Chemosphere* 173: 116–23. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.140>.
- Vargas-Abúndez, Arturo Jorge, Basilio Randazzo, Marco Foddai, Lorenzo Sanchini, Cristina Truzzi, Elisabetta Giorgini, Laura Gasco, and Ike Olivotto. 2019. “Insect Meal Based Diets for Clownfish: Biometric, Histological, Spectroscopic, Biochemical and Molecular Implications.” *Aquaculture* 498: 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.018>.
- Vetter, Walter, and Saskia Thurnhofer. 2007. “Analysis of Fatty Acids by Mass Spectrometry in the Selected Ion Monitoring Mode.” *Lipid Technology* 19 (8): 184–86. <https://doi.org/10.1002/lite.200700062>.
- Wall, Rebecca, R. Paul Ross, Gerald F. Fitzgerald, and Catherine Stanton. 2010. “Fatty Acids from Fish: The Anti-Inflammatory Potential of Long-Chain Omega-3 Fatty Acids.” *Nutrition Reviews* 68 (5): 280–89. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00287.x>.
- Zarantoniello, M., Randazzo, B., Truzzi, C., Giorgini, E., Marcellucci, C., Vargas-Abúndez, J. A., ... & Riolo, P. (2019). A six-months study on Black soldier Fly (*Hermetia illucens*) based diets in zebrafish. *Scientific reports*, 9(1), 8598.
- Zárate, Rafael, Nabil el Jaber-Vazdekis, Noemi Tejera, José A. Pérez, and Covadonga Rodríguez. 2017. “Significance of Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Human Health.” *Clinical and Translational Medicine* 6 (1). <https://doi.org/10.1186/s40169-017-0153-6>.
- Zhang, Liangxiao, Peiwu Li, Xiaoman Sun, Wei Hu, Xiupin Wang, Qi Zhang, and Xiaoxia Ding. 2014. “Untargeted Fatty Acid Profiles Based on the Selected Ion Monitoring Mode.” *Analytica Chimica Acta* 839: 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.06.040>.