

INDICE

1. INTRODUZIONE

1.1 L'Industria del caffè

1.1.1 La pianta del caffè

1.1.2 La raccolta del caffè

1.1.3 Fasi della lavorazione del caffè

1.1.4 Composizione del caffè

1.1.5 Scarti e sottoprodotti dell'industria del caffè

1.1.6 Il Coffee Silverskin

1.2 Insetti edibili e rispettiva normativa

1.2.1 Normativa vigente

1.3 Utilizzo di insetti edibili come mangimi per acquacoltura

1.3.1 Tipologie di mangimi

1.3.2 Materie prime e additivi

1.3.3 Mangimi alternativi

1.4 Le microalghe

1.4.1 *Schizochytrium*

1.4.2 *Isocrysis*

1.5 *Hermetia Illucens* L. (Diptera, Stratiomyidae)

1.5.1 Origine e diffusione

1.5.2 Ciclo biologico

1.5.2.1 La larva

1.5.2.2 La Pupa

1.5.2.3 L'adulto

1.5.3 Allevamento

1.5.4 Performance larvali in funzione del substrato alimentare

1.5.5 Composizione nutrizionale in funzione dei substrati alimentari

1.5.6 Utilizzo come mangime in acquacoltura

1.5.7 Bioconversione ed efficienza di conversione del substrato alimentare

2.SCOPO DELLA TESI

3. MATERIALI E METODI

3.1 Preparazione delle diete

3.2 Allevamento delle larve

3.3 Parametri rilevati

3.4 Analisi dei dati

4.RISULTATI E CONSIDERAZIONI

5.CONCLUSIONI

6.BIBLIOGRAFIA

7.SITOGRAFIA

1. INTRODUZIONE

1.1 L'industria del caffè

Il caffè è una delle bevande più consumate al mondo, può essere considerato come uno dei prodotti primari del commercio più preziosi al mondo, e si caratterizza per una notevole produzione di sottoprodotti (Musatto, 2011). In linea con la definizione introdotta dal decreto legislativo 152 del 2006 di attuazione della c.d. Delega Ambientale, che mutua i principi stabiliti dalla recente giurisprudenza della Corte di Giustizia europea (casi C-9/00, C-416/02 e C-121/03), il sottoprodotto è un prodotto dell'impresa che, pur non costituendo l'oggetto dell'attività principale, scaturisce in via continuativa dal processo industriale ed è destinato ad un ulteriore impiego o al consumo. La dimensione economica della gestione dei sottoprodotti derivanti dall'industria del caffè è rilevante. L'erronea classificazione di tali prodotti come "rifiuti" determina un inutile carico amministrativo generando effetti distorsivi sul funzionamento dei mercati interessati con impatti negativi in termini economici per i produttori costretti a farsi carico di smaltire materiali ancora suscettibili di impiego e gli utilizzatori obbligati a ricercare costose fonti di approvvigionamento alternative. Ancor più gravi le conseguenze in termini di impatto sull'ambiente: prodotti di valore verrebbero distratti dalle più efficaci modalità d'impiego per destinazioni ambientalmente meno sostenibili, quali la discarica.

1.1.1 La pianta del caffè

La pianta del caffè è un piccolo albero sempreverde appartenente alla famiglia delle Rubiacee, alla sottofamiglia Ixoroideae e alla tribù Coffeae. I chicchi di caffè sono prodotti dalle piante del genere *Coffea* e le varietà di caffè esistenti sono circa 60 ma solo 25 producono frutti con un valore commerciale. Tra questi sono 4 i tipi di

caffè utilizzati per preparare la bevanda: la *Coffea arabica* L., varietà più conosciuta (rappresenta i $\frac{3}{4}$ della produzione mondiale) è semplicemente denominata Arabica, tra cui la più rinomata è la Moka, la *Coffea canephora* Pierre ex Froehner, denominata Robusta, una varietà di caffè molto diffusa perché la pianta, come dice il suo nome, resiste molto bene alle malattie e può essere coltivata anche in pianura; *Coffea liberica* Hiern, coltivata soprattutto in Liberia e in Costa d'Avorio. I semi sono grandi e resistenti ai parassiti; *Coffea excelsa*, cresce ovunque ed è molto resistente, fornisce una resa elevata (Belitz *et al.*, 2009; Etienne, 2005).

Le origini della specie *Coffea arabica*, da cui si raccolgono i chicchi di caffè, sono ancora dibattute, sebbene sembri che le prime piante siano state trovate a Caffa, da cui il nome, in Etiopia. Da quelle terre, tra il XIII e il XIV secolo, gli etiopi portarono il caffè nello Yemen durante le loro campagne militari e arrivò sino in Arabia dove già alla fine del XV secolo sorsero luoghi di degustazione in cui ci si riuniva appositamente per berlo.

Dal XVI secolo, divenne Il Cairo uno dei principali centri di smistamento e la diffusione fu favorita soprattutto dalla propagazione della religione islamica, che proibiva di bere vino, sostituito dal caffè. Nel XVII secolo "il vino d'Arabia" giunse infine in Europa e in breve tempo il caffè divenne un bene di consumo facilmente reperibile. Oggi le stime indicano che i paesi maggiori produttori di caffè sono, nell'ordine, il Brasile, il Vietnam, la Colombia e l'Indonesia. Seguono, con ordine variabile secondo le annate, Messico, Guatemala, Honduras, Nicaragua, El Salvador, Etiopia, India, Ecuador (<http://www.ico.org>).

Il frutto del caffè è una drupa molto simile come dimensioni e colore alle ciliegie. La drupa è di colore verde se acerba, e rosso vivo quando è matura. Il marrone è il colore delle drupe quando hanno superato la maturazione ideale.

La drupa (Figura 01) è composta da diversi strati:

- Esocarpo, che rappresenta la buccia;
- mesocarpo, cioè la polpa;
- pergamino, primo strato duro di copertura del chicco;
- silverskin, secondo strato molto sottile di copertura del chicco.

Sotto tutti questi strati si trova il chicco vero e proprio composta da due semi protetti due semi solcati e quasi ovali. I semi hanno un lato piatto e l'altro convesso (Fig. 1).

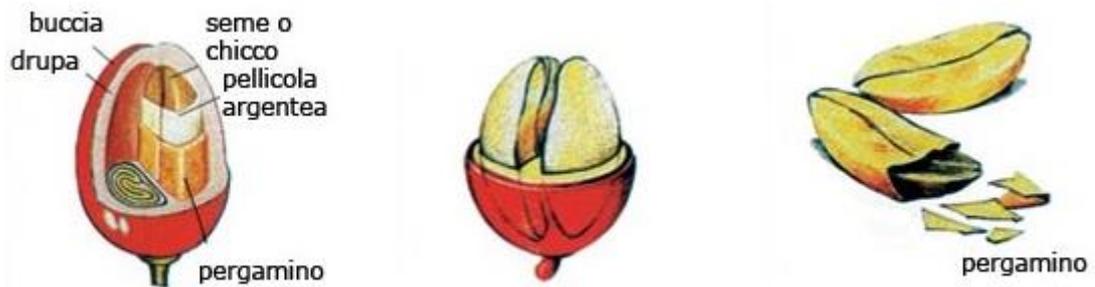


Figura 01. Drupa del caffè

Benché la struttura delle drupe sia praticamente sempre più o meno uguale, colore e forma dei chicchi differenziano le diverse varietà di caffè. Per esempio, mentre la qualità Robusta ha una forma tonda, quella Arabica ne ha una chiaramente più ovale, essendo allungata. Solitamente la prima raccolta avviene dopo cinque anni dalla piantagione e una volta che i frutti sono diventati rossi (Arya e Rao, 2007).

1.1.2 La raccolta del caffè

Le piante di caffè, grazie al clima caldo delle zone in cui sono coltivate (zona tropicale e acquatoriale), fruttificano tutto l'anno, in stretta relazione con il fenomeno delle piogge. La pianta, quindi, fa frutti ogni volta che piove, e dopo sette-otto mesi le drupe sono mature. Il continuo fruttificare ad ogni pioggia, comporta la presenza sullo stesso ramo, e contemporaneamente, di fiori e drupe in momenti di maturazione diversi. La raccolta del caffè può avvenire con due sistemi, manuale o meccanica. Con la raccolta manuale, le drupe sono raccolte una ad una nel momento della piena maturazione, garantendo la perfetta selezione del raccolto. Attraverso la raccolta meccanizzata i chicchi di caffè sono sgranati dal ramo tutti insieme. Con questo secondo metodo, più veloce e meno oneroso del precedente, e meccanizzato nelle piantagioni di pianura, nel raccolto sono presenti drupe con maturazioni differenti, che causano un deprezzamento qualitativo del caffè.

1.1.3 Fasi della lavorazione del caffè

Nella produzione del caffè classico, una volta separati dalla polpa, i semi vengono sottoposti a tostatura o torrefazione, attraverso la quale acquisiscono l'aroma caratteristico. I semi vengono sottoposti ad alte temperature, tra 210°C e 240°C, provocandone la disidratazione e l'aumento di volume, a cui seguiranno l'imbrunimento e lo sviluppo dell'aroma. I chicchi tostati, dunque, vengono raffreddati per poi essere macinati, confezionati e commercializzati. I residui solidi del processo, in base al metodo utilizzato, vengono indicati con una differente terminologia, rispettivamente: pellicola o buccia (Pandey *et al.*, 2000).

I metodi di lavorazione usati sono: a secco, normalmente utilizzato per la qualità Robusta, e umido utilizzato per la varietà Arabica, scelti in base al contenuto di acqua e alle esigenze qualitative. Con il processo a umido, la pellicola e il guscio vengono rimossi mentre la polpa resta fresca. La tostatura dei chicchi di caffè rimane il passaggio fondamentale nella lavorazione del prodotto, dato che esalta le

proprietà organolettiche e influenza la qualità del caffè e l'eccellenza della bevanda (Hernández *et al.*, 2008; Franca *et al.*, 2005; Fujioka e Shibamoto, 2008).

Il metodo a secco, comunemente usato per la varietà Robusta, è tecnologicamente più semplice confrontando con il metodo umido, che è generalmente usato per la varietà Arabica. (Musatto, 2011)

Il processo di lavorazione è fortemente influenzato dal tempo e temperatura utilizzata. Infatti, questi parametri comportano numerosi cambiamenti nella composizione chimica e nell'attività biologiche del caffè a seguito della trasformazione di costituenti polifenolici nella reazione di maillard (Czerny *et al.*, 1999; Sacchetti *et al.*, 2009), nonché la formazione di composti organici derivanti dalla pirolisi (Daglia *et al.*, 2000). I composti dello zolfo subiscono ossidazione e degradazione termica e/o idrolisi (Kumazawa e Masuda, 2003) e il contenuto di vanillina aumenta considerevolmente durante il processo di torrefazione (Czerny e Grosch, 2000). Oltre alle reazioni chimiche, durante la tostatura del caffè, si verifica perdita di umidità e altri importanti cambiamenti (colore, volume, massa, forma, pH, densità e componenti volatili), e viene generata anidride carbonica (Hernández *et al.*, 2008).

Dopo il processo di tostatura, i chicchi di caffè vengono rapidamente raffreddati per bloccare le reazioni esotermiche e per prevenire una tostatura eccessiva che comprometterebbero la qualità finale del prodotto (Dutra *et al.*, 2001).

Successivamente, i chicchi tostati vengono macinati, di solito da smerigliatrici multistadio. Alcuni chicchi tostati sono confezionati e spediti come chicchi interi.

Il caffè macinato viene confezionato sottovuoto e spedito. Se l'obiettivo è produrre caffè istantaneo, un'ulteriore fase di estrazione segue la tostatura e la macinazione. Acqua riscaldata a circa 175 °C in condizioni di pressione (per mantenere l'acqua sotto forma di liquido) viene utilizzata per estrarre tutti i solubili necessari dai chicchi di caffè che forniscono aroma e sapore (Musatto, 2011).

Una valutazione sensoriale (panel test) di diversi prodotti commerciali di caffè istantaneo ha rilevato che la qualità è associata alla varietà, al tempo di stoccaggio, al processo di fermentazione, di tostatura, dell'estrazione di solidi solubili e al materiale di confezionamento (Oliveira *et al.*, 2009).

Di seguito viene riportato uno schema delle varie fasi di lavorazione del caffè:

1. Raccolta (a mano o meccanica): la raccolta è una delle fasi più importanti nella produzione, ed è determinante per la qualità del prodotto. Se vengono raccolte troppe bacche verdi gli agricoltori sono pagati meno.
2. Spolpamento: viene separato (spesso in acqua) il frutto dal seme. Il seme è ancora protetto dal pergamino e dallo "silverskin".
3. Lavatura: nelle vasche i chicchi si liberano della polpa residua e subiscono una sorta di fermentazione che ne migliora l'aroma e il gusto. Dopo la fermentazione, i chicchi, sempre avvolti dal pergamino e dal "silverskin", subiscono un nuovo lavaggio, durante il quale, quelli non perfettamente maturi, sono facilmente riconosciuti ed eliminati.
4. Asciugatura: il caffè viene steso al sole e all'aria per una settimana. Migliora ulteriormente la qualità aromatica del caffè.
5. Decorticatura: eliminazione del pergamino.
6. Selezione: separazione dei semi per colore e grandezza. I semi rotti o danneggiati, e corpi estranei sono eliminati; il lavoro è spesso fatto a mano. Fino a questa fase si parla di "caffè verde"
7. Invecchiamento: alcuni tipi di caffè vengono invecchiati. Per lo più caffè che proviene dall'India o dall'Indonesia.
9. Insaccatura: i chicchi di caffè verde vengono insaccati in sacchi di juta da sessanta chili. Nei sacchi il caffè può essere conservato anche per alcuni anni, ma non più di uno se si vuole ottenere un buon caffè in tazza. Il caffè viene spedito verso i Paesi consumatori o nei sacchi di juta o in container ventilati.

10. Tostatura: quando i semi vengono tostati, i semi verdi riescono a raddoppiare quasi la loro grandezza originale, cambiando in colore e in densità. Quando la temperatura interna al seme raggiunge i 200 °C, il chicco incomincia ad assumere il colorito marrone scuro. Con la tostatura viene rimosso anche il “silverskin” e in seguito compattato da un macchinario apposito con pressione e aggiunta di acqua.

10. Controllo qualità

11. Macinatura

1.1.4 Composizione del caffè

La caffeina è il principio attivo del caffè, presente in quantità variabili dai 50 milligrammi (mg) ai 380 mg per 100 millilitri (ml), che legandosi a particolari recettori nel sistema nervoso e nei muscoli è responsabile delle sue proprietà stimolanti ed ergogeniche. Nella varietà Arabica il quantitativo di caffeina riscontrato varia dallo 0,8% all'1,4%, mentre nella Robusta lo stesso valore è compreso tra l'1,7% e il 4% (Belitz *et al.*, 2009).

Alcuni studi hanno osservato che 100 ml di caffè contengono 10 mg di vitamina B3 o niacina, indispensabile per il corretto funzionamento del sistema nervoso e per la salute di pelle e mucose; 200-800 mg di fibre solubili, quali galattomannani e arabinogalattani, responsabili della viscosità della bevanda. Una volta giunte nel colon, le fibre vengono fermentate dalla flora batterica, con produzione di metaboliti che, oltre a favorire il transito intestinale e quindi l'evacuazione, nutrono e mantengono vitali le cellule del colon. Inoltre, 250-700 mg/100 ml di elementi essenziali, principalmente potassio e fosforo. Il primo è importante per la trasmissione degli impulsi nervosi e per la contrazione muscolare mentre il secondo per la mineralizzazione ossea e il metabolismo energetico. L'acido clorogenico è un antiossidante che abbonda nei semi non tostati, ma che si riduce notevolmente con la tostatura. La niacina e acido clorogenico si trovano in proporzioni che vanno

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

La cellulosa, i minerali, zuccheri, lipidi tannini e polifenoli che si riscontrano nella polpa, negli scarti di lavorazione e nei fondi del caffè hanno dimostrato complessivamente un effetto deleterio sugli animali (ad esempio suini) (Hutagalung, 1981; Balogun e Koch, 1975).

Inoltre, nella drupa sono contenuti anche tannini ed elevate quantità di potassio. Tra i minerali si annoverano: potassio, magnesio, calcio, sodio, manganese, zinco, cromo, rubidio, rame, nickel, cobalto, molibdeno, titanio e cadmio (Bressani, 1982). Nei monogastrici e nei ruminanti è stata associata una bassa appetibilità, e scarsa assunzione di alimenti, difficoltosa digeribilità delle proteine alla presenza di fattori antinutrizionali (Mazzafera, 2002; Brand *et al.*, 2000). Quindi le limitazioni all'uso dei residui della lavorazione del caffè, nell'alimentazione degli animali, sono legate all'alto contenuto di tannini e caffeina (Clifford e Ramirez-Menezes, 1991).

1.1.5 Scarti e sottoprodotti dell'industria del caffè

Il settore agro-industriale e alimentare produce grandi quantitativi di scarti e sottoprodotti, sia in forma liquida che solida. Il caffè è il secondo bene più prodotto a livello mondiale, subito dopo il petrolio, ed è quindi responsabile della generazione di un grande quantitativo di scarti di lavorazione (Nabais *et al.*, 2008). Da circa dieci anni il riutilizzo dei residui della lavorazione del caffè è oggetto di studio di numerosi ricercatori, in accordo con un'idea di economia circolare che

numerosi Paesi tentano di perseguire, spinti anche dalla pressione politica e sociale proiettata verso una riduzione di consumi e di sostanze inquinanti. La stessa direttiva n 98/2008 che stabilisce l'ordine di priorità nella scelta del trattamento dei sottoprodotti, con il loro riutilizzo come opzione privilegiata, svolgerà un ruolo centrale per consolidare un'economia sostenibile.

Quasi tutti i paesi stanno cercando di adattarsi a questa realtà modificando i processi di produzione in modo che i residui delle loro lavorazioni possano essere riciclati. Di conseguenza, la maggior parte delle grandi aziende agroalimentari non considerano più i residui come rifiuti, ma come sottoprodotti (materia prima per altri processi) (Mussatto *et al.*, 2006). La valorizzazione di questi residui è di grande interesse per quanto riguarda le ripercussioni positive sia dal punto di vista ambientale che economico (Mussatto, 2011).

I principali residui della lavorazione del caffè sono: i fondi di caffè esauriti (SCG), la cascara (la buccia della drupa del caffè) e il caffè silverskin (CS) (Fig. 2). I residui sono ricchi di polisaccaridi, proteine e minerali, e hanno un potenziale elevato valore biotecnologico.

I fondi di caffè esausti e il coffee silverskin potrebbero rappresentare un'ottima alternativa, ad esempio, per il loro utilizzo nei processi fermentativi per l'estrazione/produzione di composti con importanti applicazioni nell'industria alimentare e farmaceutica (Mussatto, 2011). I fondi di caffè esausti sono dei residui con granulometria fine, elevata umidità e acidità, ottenuti durante il trattamento della polvere di caffè crudo con acqua calda o vapore per la preparazione del caffè solubile. Sono caratterizzati dall'elevato contenuto in zuccheri, tra cui mannosio e galattosio che sono i più abbondanti (Mussatto *et al.*, 2011). CS e SCG per le loro quantità di caffeina, tannini e polifenoli sono rifiuti tossici per l'ambiente e un pericolo di inquinamento. I fondi di caffè esausti ad esempio, sebbene il loro potere inquinante rappresenta uno dei più voluminosi rifiuti prodotti e smaltiti in discarica.

In alcuni casi, i fondi di caffè esausti possono essere utilizzati come combustibile nelle caldaie industriali della stessa industria grazie al suo alto potere calorifico. Però, occorre prestare attenzione alla generazione di particolato, che può influire sulla qualità dell'aria nei pressi della sede di lavorazione dei semi di caffè (ABNT, 1987).

Un'altra variante sperimentata è quella di utilizzare i fondi di caffè esausti come mangime per animali quali ruminanti, maiali, galline e conigli (Claude, 1979; Givens e Barber, 1986), anche se dato l'alto contenuto di lignina (oltre il 25%) può rappresentare un fattore limitante per la sua applicazione (Cruz, 1983).

Recenti studi hanno invece dimostrato che i fondi del caffè possono essere utilizzati come ammendamenti del terreno, o fonte di molecole organiche studiate per la cosmetica e possibile fonte di biocarburanti, come lo studio condotto da Kondamudi *et al.* (2008) che ha dimostrato che i fondi del caffè possono essere usati come fonte per la produzione di biodiesel e pellet.

Anche la cascara, ovvero la buccia della drupa di caffè, spesso utilizzata come fertilizzante, ma se essiccata con cura può produrre un infuso molto diffuso nei paesi arabi. In ultimo c'è il coffee silverskin, la sottile pellicola sottile dei chicchi di caffè che si separa da essi durante il processo di tostatura.

Ogni anno sono prodotte circa 200.000 tonnellate di coffee silverskin dall'industria del caffè (Murthy e Naidu, 2012; Mussatto *et al.*, 2011).

1.1.6 Il coffee silverskin

Il coffee silverskin (CS) (Figura 02) rappresenta una buona fonte di numerosi composti bioattivi che possono essere estratti e ulteriormente utilizzati per scopi alimentari, cosmetici e farmaceutici.

Il CS si caratterizza per un alto quantitativo di fibra dietetica solubile (86% delle fibre totali), un'elevata capacità antiossidante, probabilmente dovuta alla

concentrazione di composti fenolici nei chicchi di caffè (Borelli *et al.*, 2004) e per il contenuto di diterpeni, xantine e di vitamine, oltre ad un'importante presenza di caffeina (Rodrigues *et al.*, 2015), caratterizzato anche da potenziali attività prebiotiche (Narita e Inouye, 2014; Costa *et al.*, 2018; Iriundo-DeHond *et al.*, 2019).

Glucosio, xilosio, galattosio, mannosio e arabinosio sono i monosaccaridi presenti nel coffee silverskin (Mussatto, 2011). Anche la cellulosa, l'emicellulosa e le proteine alla base della composizione chimica di CS aprono possibilità per l'applicazione di questi residui della lavorazione del caffè nella produzione di diversi composti a valore aggiunto.

La cellulosa ad esempio può essere convertita in zuccheri come polisaccaridi, oligosaccaridi e monosaccaridi mediante diversi processi di trattamento usando acidi o enzimi come catalizzatori (Musatto *et al.*, 2008; Rinaldi e Schuth, 2009).

Rodrigues *et al.* (2015) hanno evidenziato l'ulteriore attività antimicrobica degli estratti di CS verso agenti patogeni come *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, dovuta probabilmente alla presenza di melanoidine estratte dai fondi di caffè esauriti (Jiménez-Zamora *et al.*, 2015). In particolare, a seconda della loro concentrazione, le melanoidine del caffè possono avere azione batteriostatica o battericida.

Molti studi, inoltre, hanno confermato le molteplici peculiarità di questo sottoprodotto come l'antiipertensività (Rufian-Henares e Morales, 2007a, b), l'attività antimicrobica (Rufian-Henares e de la Cueva, 2009) e antiossidante (Rufian-Henares e Morales, 2007a). Inoltre, altri composti presenti nel CS, come acidi clorogenici e caffeina (Costa *et al.*, 2014), potrebbero interagire sinergicamente nell'attività antibatterica (Antonio *et al.*, 2010).

Recenti studi, che hanno analizzato la composizione chimica del CS, prevedono il suo possibile utilizzo quale ingrediente in preparazioni cosmetiche. Il contenuto in

fenoli (tra cui acido clorogenico), diterpeni, xantine e precursori di vitamine lo rendono un interessante principio funzionale cosmetico ad azione antiradicalica e antiossidante. Inoltre, una presenza significativa di caffeina conferisce a coffee silversk la potenzialità di utilizzo in prodotti per il corpo e quale booster di assorbimento.

In diversi paesi, il CS è utilizzato come combustibile, per il compostaggio e per la concimazione del suolo (Saenger *et al.*, 2001).

Il CS è stato anche utilizzato come substrato di crescita per l'allevamento dell'insetto edibile *Hermetia Illucens* L. (Diptera, Stratiomyidae) utilizzato poi come ingrediente di mangimi per l'alimentazione di ruminanti, volatili (Didana, 2014), e di pesci (Vargas *et al.*, 2018; Zarantoniello *et al.*, 2018; Zarantoniello *et al.*, 2019; Zarantoniello *et al.*, 2020).

Gli ingredienti dei mangimi a base di larve di *H. illucens* alimentate esclusivamente con CS, inoltre, hanno evidenziato alcune carenze (bassi livelli di omega 3 e 6) per quanto riguarda le esigenze nutrizionali dei pesci (Vargas *et al.*, 2018).



Figura 02. Coffee Silverskin (Niglio, 2017)

1.2 Insetti edibili e loro utilizzo

Gli insetti o entomi (Insecta Linnaeus, 1758), sono una Classe di organismi appartenenti al Phylum degli Arthropoda, la quale rappresenta il più grande tra i raggruppamenti di animali che popolano la Terra, annoverando oltre un milione di specie, pari ai cinque sesti dell'intero Regno Animale.

I fossili rinvenuti di insetti risalgono al periodo Devoniano, conferendo loro il primato dei colonizzatori più antichi delle terre emerse.

L'eterogeneità nella morfologia, nell'anatomia, nella biologia e nell'etologia ha conferito agli Insetti, da oltre 300 milioni di anni, un ruolo di primo piano nella colonizzazione della Terra, in qualsiasi ambiente in cui vi sia sostanza organica, con manifestazioni di una notevole capacità di competizione.

Gli insetti sono organismi che, in positivo o in negativo, hanno una stretta relazione con l'Uomo e le sue attività, fino a condizionarne, più o meno direttamente, l'economia, l'alimentazione, le abitudini e la salute.

Da qui la nascita dell'entomologia, una branca specifica della zoologia che si occupa dello studio degli insetti o entomi, e ha permesso l'individuazione di diversi utilizzi degli stessi:

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

Secondo la definizione della FAO, l'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'Alimentazione e l'Agricoltura, l'alimentazione sostenibile è quella che ha un ridotto impatto ambientale e al tempo stesso soddisfa le linee guida nutrizionali, è economica, accessibile e culturalmente accettabile. Con il forte allarme di crescita della popolazione mondiale, che secondo la FAO toccherà i 9 miliardi entro il 2050, è previsto un incremento della domanda di alimenti di origine animale e in crescita.

L'attenzione verso fonti proteiche alternative per le attività di allevamento e uso degli insetti per l'alimentazione degli animali è un fattore chiave. Solo nel 2010, secondo la Federazione Internazionale dei Produttori di Mangimi, la produzione mondiale è stata di 720 milioni di tonnellate. L'alimentazione animale incide per circa il 60% sui costi di produzione (Gerber *et al.*, 2013). L'approvvigionamento di proteine è fondamentale per il settore zootecnico affinché possa fornire prodotti di origine animale di alta qualità. L'industria mangimistica, però, attualmente dipende dalle importazioni di fonti proteiche, per lo più farina di soia, colza, girasole, cotone, farina e olio di pesce, che forniscono la qualità proteica più appropriata per gli animali da allevamento nei Paesi dell'Unione Europea. L'Unione Europea ha varato un "Piano europeo delle proteine", diretto ad aumentare la qualità delle proteine vegetali "autoctone" e la loro idoneità a essere impiegate nell'ambito della produzione di alimenti per animali. Accanto a tale piano si stanno esplorando altre strategie volte ad ottenere proteine in modo sicuro, sostenibile ed economico. Una delle vie che si intende percorrere è quelle di utilizzare le proteine derivanti dagli insetti, attraverso un approccio innovativo all'alimentazione animale con lo scopo di sviluppare mangimi ecosostenibili per garantire la sostenibilità delle produzioni zootecniche e la salvaguardia delle risorse naturali (Sogari *et al.*, 2019).

Il sistema attuale di produzione alimentare è una delle principali cause di inquinamento ambientale, compreso il cambiamento climatico e l'impoverimento delle risorse naturali. L'agricoltura e il settore zootecnico sono responsabili dell'emissione di gas serra (GHG) per una quota pari al 30% e al 15%, rispettivamente (Gerber *et al.*, 2013). L'agricoltura, inoltre, è responsabile per il 70% dello sfruttamento delle risorse idriche, e rappresenta la causa primaria della deforestazione, del cambiamento d'uso dei terreni, della perdita di biodiversità, dell'inquinamento idrico e del consumo di acqua dolce. Si stima che l'8% del consumo globale di acqua, sia destinato principalmente per l'irrigazione delle

colture rivolte alla produzione di materie prime per alimenti zootecnici (FAO, 2009; Foley *et al.*, 2011, Makkar *et al.*, 2014). A questo si aggiungono altre attività legate alla produzione e al consumo alimentare come l'allevamento, il trasporto, l'imballaggio e il confezionamento agroalimentare, anch'esse con gravi ripercussioni ambientali.

Il raggiungimento di un sistema di produzione alimentare sostenibile e la riduzione dello spreco alimentare sono sfide globali importanti che possono aiutare ad affrontare la crescente domanda alimentare e a produrre alimenti sostenibili e al tempo stesso nutrienti a sufficienza per tutta la popolazione mondiale.

L'interesse per le materie prime proteiche nell'alimentazione di animali da allevamento è in crescita come pure l'interesse per l'allevamento di insetti. Gli insetti allevati sono in grado di fornire elevati quantitativi di proteine di alto valore biologico con cicli di allevamento rapidi. Tale tipologia di allevamento è anche capace di utilizzare una serie di materiali derivati ad esempio dalle industrie alimentari, quali fonti nutritive degli insetti stessi, favorendo l'economia circolare e l'utilizzo di prodotti di scarto.

Le farine di insetti, per la FAO, rappresentano quindi un'alternativa proteica innovativa in grado di esaltare la biodiversità e di garantire la sostenibilità delle produzioni terrestri e acquatiche che, mentre in svariate parti del mondo possono essere integrate negli alimenti zootecnici, all'interno della Comunità Europea il loro possibile impiego è oggetto di forte discussione (Reg. UE 575/2011 e Reg. UE 56/2013) (van Huis *et al.*, 2013; Halloran *et al.*, 2015) ed è consentito solo per alcune specie, ed in pochi paesi.

L'utilizzo degli insetti presenta numerosi vantaggi (Veldkamp *et al.*, 2012; van Huis *et al.*, 2013; Bukkens, 2005; Rumpold e Schlüter, 2013), che possono essere schematizzati come segue:

1. Fonte di nutrienti:

- ottima alternativa nutritiva ad alimenti di origine animale classico;
- alcune specie di insetti sono ricchi in proteine, grassi, vitamine e sali minerali.

2. Eco-sostenibilità:

- producono quantitativi esigui di gas climalteranti;
 - il loro allevamento non necessita di grandi estensioni di terreno;
 - le emissioni di ammoniaca associate all'allevamento degli insetti sono inferiori di quelle prodotte da altri allevamenti convenzionali (es. suini e bovini);
 - indice ottimale di conversione degli alimenti in proteine e peso corporeo;
- basso consumo idrico.

3. Fattori economici e sociali:

- l'allevamento di insetti può essere molto o poco meccanizzato, dipende dal livello di investimento;
- l'allevamento di insetti offre guadagni anche alla parte più povera della società, richiede bassi investimenti e bassa tecnologia;
- gli allevamenti su piccola scala offrono mezzi di sussistenza sia alla popolazione urbana che rurale.

Recentemente si sta diffondendo l'allevamento massale di molte specie di insetti (Veldkamp *et al.*, 2012) e a livello mondiale si stanno sviluppando realtà industriali per quanto riguarda questo comparto (van Huis *et al.*, 2013; Drew, 2014; Jeong, 2014; Roos *et al.*, 2014).

1.2.1 Normative vigenti

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

Una precisazione delle Direzioni di Sanità Animale e Sicurezza Alimentare corregge notizie fuorvianti sui 'novel food': nuovi alimenti o nuovi ingredienti alimentari disciplinati dalla legislazione alimentare comunitaria con il regolamento (CE) 258/97, con lo scopo di "prevenire condotte non conformi da parte degli operatori".

La Commissione Europea ha intrapreso un iter di modifica degli allegati I e IV dei Regolamenti (CE) 999/01 e degli allegati X, XIV e XV del regolamento (UE) 142/2011, finalizzato ad ammettere l'uso di proteine animali trasformate (PAT) derivate da insetto nell'alimentazione di animali da acquacoltura, a ben specifiche condizioni di trasformazione, stoccaggio, trasporto e utilizzo. Tuttavia, tale regolamento di modifica non è stato ancora pubblicato nella Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea quindi le disposizioni di modifica non sono attualmente applicabili.

Il Ministero della Salute ha quindi fatto chiarezza sui requisiti che regolano l'allevamento e l'uso di insetti nella produzione di mangimi applicabili ai sensi della normativa vigente, nonché fornire elementi in merito a quelli di futura applicazione. Gli sviluppi normativi si baseranno sui pareri dell'EFSA che ha definito una lista positiva di specie di insetti che saranno ammesse per la produzione di PAT destinate agli animali d'allevamento, diversi da quelli da pelliccia, che sarà contenuta nel regolamento di modifica dell'attuale quadro comunitario. Si tratta di:

- *Hermetia illucens* (L.) (Diptera, Stratiomyidae), (mosca soldato nero);
- *Musca domestica* L. (Diptera, Muscidae), (mosca domestica);

- *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera, Tenebrionidae), (verme della farina);
- *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera, Tenebrionidae), (verme della farina minore);
- *Acheta domesticus* (L.) (Orthoptera, Gryllidae), (grillo domestico);
- *Grylloides sigillatus* (Walker) (Orthoptera, Gryllidae), (grillo domestico tropicale);
- *Gryllus assimilis* (Fabricius) (Orthoptera, Gryllidae), (grillo silente).

Così come definito dal regolamento (UE) 68/2013 gli insetti vivi o trattati (secchi, congelati, etc) sono materie prime per mangimi.

Le PAT di insetto sono invece proteine animali trasformate, materie prime per mangimi elencate anch'esse nel regolamento (UE) 68/2013 e come definite dal reg. (UE) 142/2011, allegato I punto 5, ottenute da determinate specie di invertebrati terrestri non patogeni, in accordo coi requisiti stabiliti sempre dal reg (UE) 142/2011, allegato X, capo II, sezione I.

Gli insetti utilizzabili come mangimi non devono quindi appartenere a specie patogene, non devono essere riconosciuti come vettori di patogeni per l'uomo, gli animali e per le piante e devono rispettare i criteri ambientali per la salvaguardia delle specie autoctone.

Gli insetti inoltre devono rientrare nei criteri microbiologici e nei limiti di contaminanti e sostanze indesiderabili previsti dalla normativa comunitaria per le materie prime per mangimi, come la direttiva 2002/32/CE e successive modifiche. Il Regolamento UE 142, del 25 febbraio 2011, recante disposizioni di applicazione del regolamento (CE) n. 1069/2009 del Parlamento e del Consiglio europeo (<https://www.coldiretti.it>), riporta norme sanitarie relative ai sottoprodotti di origine animale e ai prodotti derivati non destinati al consumo umano, e della

direttiva 97/78/CE del Consiglio per quanto riguarda taluni campioni e articoli non sottoposti a controlli veterinari.

Il Regolamento CE 999/2001 reca disposizioni per la prevenzione, il controllo e l'eradicazione delle Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (TSE) nei bovini, negli ovini e nei caprini. Esso si applica alla produzione e all'immissione sul mercato di animali vivi e di prodotti di origine animale e, in taluni casi specifici, all'esportazione degli stessi.

L'articolo 7 dello stesso regolamento, in relazione alla prevenzione delle TSE, vieta la somministrazione di PAT agli animali d'allevamento (c.d. FEEDBAN), escludendo gli animali da pelliccia e da compagnia. Esistono una serie di deroghe a tale divieto (allegato IV del reg. (CE) 999/2001) come l'utilizzo di farine di pesce per gli animali d'allevamento non ruminanti o per ruminanti non svezzati (produzione di sostituti del latte), fino all'utilizzo di PAT di non ruminanti per l'alimentazione di animali d'acquacoltura (modifica introdotta con il regolamento (CE) 56/2013).

Con il Regolamento (UE) N. 56/2013 del 16 gennaio 2013, la Commissione Europea ha disposto la sostituzione dell'allegato IV (Alimentazione degli animali) del regolamento (CE) n. 999/2001, con un nuovo allegato. La Commissione ha ritenuto "opportuno autorizzare nuovamente le PAT ottenute da specie non ruminanti e gli alimenti per animali contenenti tali proteine per l'alimentazione delle specie d'acquacoltura, fatta eccezione per le farine di pesce e per i mangimi composti contenenti farina di pesce, che sono già autorizzate nella produzione di mangimi per non ruminanti". Questa misura - applicata a partire dal 1° giugno 2013 - ha consentito ai pesci di allevamento di essere alimentati con farine animali. Sebbene le PAT derivate da insetto siano definibili "non ruminanti" le condizioni ad oggi fissate dal regolamento (CE) 999/2001 sono inapplicabili alla filiera degli insetti, intesa in tutte le sue fasi, dall'allevamento, al loro uso o trasformazione

compresa la macellazione, il trasporto, e lo stoccaggio (strategic Safety Concept for Insects as Feed, updated, European commission, DG SANTE, Bruxelles, November 2016). Pertanto, nelle more dell'emanazione e pubblicazione della Gazzetta ufficiale dell'Unione Europea della modifica del regolamento (CE) 999/2001 e 142/2011 l'uso di PAT derivate da insetto è ammesso solo per le specie alle quali FEEDBAN non si applica (animali da compagnia, animali diversi dagli animali da allevamento ed animali da pelliccia).

Gli insetti sono animali d'allevamento (art 3, punto & deg. (CE) 1069/09), ai quali si applica il FEEDBAN e i divieti di alimentazione previsti dalla normativa vigente, ovvero:

- Ai sensi della normativa sui sottoprodotti di origine animale, solo i materiali di categoria 3 possono essere utilizzati per alimentare insetti.
- Gli insetti non possono essere alimentati con i materiali vietati contenuti nell'allegato III del regolamento (CE) 767/09 in materia di commercio ed etichettatura dei mangimi, tra cui ad esempio feci, urine, contenuto del tubo digerente e rifiuti urbani solidi, come rifiuti domestici.
- Gli insetti non possono essere alimentati con rifiuti di cucina e ristorazione o con ex-alimenti senza ulteriore trasformazione diversi da quelli all'allegato X, capo II, Parte III, sezione 10 del reg (UE) 142/2011.
- Ai sensi del regolamento (CE) 999/2001 gli insetti, essendo animali da allevamento, non ruminanti, diversi dai pesci d'acquacoltura, non possono essere alimentati con PAT (tranne la farine di pesce), con prodotti a base di sangue, gelatina e collagene derivati da ruminanti e proteine idrolizzate derivate da ruminanti(tranne quelle derivate da cuoio e pelli).Il Regolamento CE 767/2009, entrato in vigore il 21 settembre 2009, fissa le norme che si riferiscono all'immissione sul mercato e all'uso dei mangimi per animali destinati alla produzione di alimenti e animali da compagnia e stabilisce inoltre i requisiti legati

all'etichettatura, all'imballaggio e alla presentazione. Modifica il regolamento (CE) n. 1831/2003 e abroga le direttive 79/373/CEE del Consiglio, 80/511/CEE della Commissione, 82/471/CEE del Consiglio, 83/228/CEE del Consiglio, 93/74/CEE del Consiglio, 93/113/CE del Consiglio e 96/25/CE del Consiglio e la decisione 2004/217/CE della Commissione.

Il Regolamento copre tutte le sostanze o i prodotti, inclusi gli additivi, siano essi lavorati, parzialmente lavorati o non lavorati, destinati all'alimentazione degli animali per via orale. Si applica indipendentemente dalle altre normative dell'UE vigenti in materia di alimentazione animale e senza avere alcun effetto su di esse. Il regolamento contempla: mangimi medicati; sostanze indesiderabili; sottoprodotti di origine animale non destinati al consumo umano; alimenti e mangimi geneticamente modificati; la tracciabilità e l'etichettatura degli organismi geneticamente modificati; additivi; la produzione e l'etichettatura dei prodotti biologici. I mangimi devono soddisfare le prescrizioni in materia di sicurezza e di commercializzazione. In particolare, essi devono essere: sicuri; privi di effetti nocivi diretti sull'ambiente o sul benessere degli animali; sani, genuini, di qualità leale, adatti all'impiego previsto e di natura commerciabile; etichettati, imballati e presentati conformemente alla legislazione applicabile. Non devono contenere materiali la cui immissione sul mercato sia soggetta a restrizioni o vietata. Deve essere possibile tracciare i mangimi in tutte le fasi della produzione, della lavorazione e della distribuzione. Gli operatori del settore dei mangimi devono essere in grado di identificare chi ha fornito loro: mangimi; animali destinati alla produzione di alimenti; sostanze destinate o possibilmente destinate a essere aggiunte ai mangimi. I mangimi destinati o possibilmente destinati all'immissione sul mercato dell'UE devono essere etichettati o identificati in maniera tale da poter essere tracciati. Il Regolamento stabilisce le disposizioni generali relative all'etichettatura e alla presentazione di tutti i mangimi, come ad esempio l'obbligo

di indicare: il tipo di mangime; il nome e l'indirizzo dell'operatore del settore dei mangimi; il numero di riferimento della partita o del lotto; le quantità nette; l'elenco degli additivi usati; il tenore di umidità. L'etichettatura e la presentazione devono essere chiaramente leggibili e indelebili. Non devono indurre l'utilizzatore in errore per quanto concerne l'uso previsto o le caratteristiche dei mangimi. Le materie prime per mangimi e i mangimi composti devono essere immessi sul mercato all'interno d'imballaggi o recipienti sigillati.

Fin dai primi anni '60 l'Italia si è dotata di una legge organica (Legge n. 281/1963) che ha disciplinato la produzione e la commercializzazione degli alimenti per animali. All'epoca si trattava di una norma all'avanguardia, guida per lo sviluppo del settore e riferimento per l'elaborazione delle normative comunitarie degli anni '70, che hanno regolato i sistemi produttivi nell'Europa comunitaria.

Tuttavia, tali iniziali orientamenti legislativi avevano sostanzialmente tre obiettivi: prevenzione delle frodi, tutela del patrimonio ambientale e difesa dei consumatori. Successivamente il Libro bianco sulla Sicurezza alimentare, scaturito da importanti emergenze sanitarie, ha posto maggiormente l'accento sulla tutela della sicurezza alimentare lungo tutta la filiera, dalle materie prime al prodotto finito. Il Reg. CE n. 178/2002 reca infatti un'importante innovazione nella Legislazione: include gli alimenti per animali in un contesto più ampio, richiedendo il requisito della "rintracciabilità" del prodotto, del richiamo e del ritiro in caso di allerta. Contemporaneamente, viene istituita l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (European Food Safety Authority, EFSA). Sono gli anni del consolidamento del principio "dal campo alla tavola" e della consapevolezza che il concetto di garanzia della salute umana passa dalla garanzia della salute animale. Qualche anno dopo, il Reg. CE n. 183/2005 sull'igiene dei mangimi rinnova ed amplifica il quadro autorizzativo del settore mangimistico, estendendo la

responsabilità a tutti gli operatori della filiera inclusi gli operatori alimentari che forniscono materie prime all'industria degli alimenti per animali.

1.3 Utilizzo di insetti edibili come mangimi per acquacoltura

A fronte di una popolazione in continuo aumento la domanda di beni di sussistenza, ed in particolar modo di generi alimentari, continuerà a premere su un'offerta sempre più vincolata dai limiti imposti da un ecosistema che non riesce a mantenere un ritmo sufficiente a soddisfare i bisogni della popolazione mondiale. Così come lo sfruttamento indiscriminato dei terreni coltivabili sta minando la disponibilità di prodotti agricoli, l'eccessivo ricorso alla pesca tradizionale rischia di impoverire le risorse marine con un conseguente danno all'ecosistema e alle specie che lo abitano. Per ovviare, almeno in parte, a questo problema, negli ultimi anni si è volto con sempre maggiore attenzione lo sguardo all'acquacoltura quale alternativa alla pesca, per fornire una soluzione in grado di rispondere alle pressioni sulla domanda e assicurare al tempo stesso uno sviluppo sostenibile del settore.

L'acquacoltura è la produzione di organismi acquatici, principalmente pesci, crostacei e molluschi, ma anche alghe, in ambienti confinati e controllati dall'uomo denominati peschiere, vivai, valli da pesca, a seconda del tipo di allevamento. Ad oggi è il settore di produzione alimentare in più rapida crescita in tutto il mondo e si stima che entro il 2030 fornirà il 62% del cibo richiesto (FAO, 2018). Il motivo di questa crescita dipende principalmente dal declino della pesca in cattività, dall'aumento della domanda globale di prodotti ittici, dai 9 miliardi di persone che si prevede cammineranno sulla Terra entro i prossimi 30 anni e dal conseguente raddoppio della produzione agricola (Gerland et al, 2014; Guillen et al., 2015).

Di pari passo all'aumento della popolazione è associato un aumento ulteriore della produzione dei rifiuti e sottoprodotti di diversa tipologia e la Direttiva CE n. 2008/98, che stabilisce l'ordine di priorità nella scelta del trattamento dei rifiuti (il

primo è il loro riutilizzo e l'ultimo è la loro discarica), vuole svolgere un ruolo centrale per un ulteriore sviluppo di un'economia circolare a livello europeo.

Il concetto di economia circolare risponde al desiderio di crescita sostenibile, nel quadro della pressione crescente a cui produzione e consumi sottopongono le risorse mondiali e l'ambiente. Finora l'economia ha funzionato con un modello "produzione-consumo-smaltimento", modello lineare dove ogni prodotto è inesorabilmente destinato ad arrivare a "fine vita". Per produrre il cibo, costruire le case e le infrastrutture, fabbricare beni di consumo o fornire l'energia si usano materiali pregiati. Quando sono stati sfruttati del tutto o non sono più necessari, questi prodotti sono smaltiti come rifiuti. L'aumento della popolazione e la crescente ricchezza, tuttavia, spingono più che mai verso l'alto la domanda di risorse (scarseggianti) e portano al degrado ambientale. Sono saliti i prezzi dei metalli e dei minerali, dei combustibili fossili, degli alimenti per uomo e animali, così come dell'acqua pulita e dei terreni fertili. Nell'Unione europea ogni anno si usano quasi 15 tonnellate di materiali a persona, mentre ogni cittadino UE genera una media di oltre 4,5 tonnellate di rifiuti l'anno, per non parlare dei rifiuti prodotti dalle singole aziende, di cui quasi la metà è smaltita nelle discariche. L'economia lineare, che si affida esclusivamente allo sfruttamento delle risorse, non è più un'opzione praticabile. La transizione verso un'economia circolare sposta l'attenzione sul riutilizzare, aggiustare, rinnovare e riciclare i materiali e i prodotti esistenti. Quel che normalmente si considerava come " rifiuto " può essere trasformato in una risorsa.

Con queste consapevolezza, l'acquacoltura deve proiettarsi verso la sostenibilità e innovazione, seguendo il concetto di economia circolare, in grado di fornire maggiori volumi di alimenti sani utilizzando ingredienti rispettosi dell'ambiente, promuovendo nel contempo le esigenze e il benessere dei pesci (Merino et al., 2012; Tlusty e Thorsen, 2017; Stevens et al., 2018; Bohnes e Laurent, 2019).

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

proteici, compresi tra il 55% e il 75%, e una eccellente digeribilità, gli insetti sono adatti a completare la formula alimentare degli animali dell'acquacoltura" (<https://www.unaitalia.com>).

A favore dell'utilizzo di farine di insetto sono stati condotti diversi studi su pesci. I risultati ottenuti sono stati variabili a seconda della specie di insetto utilizzato, del suo stato (intero, macinato, sgrassato), del processo di ottenimento degli stessi e della specie ittica oggetto della sperimentazione. Ad esempio, alcuni studi hanno focalizzato l'attenzione sull'esame post-mortem degli organi principali di alcune specie di pesci alimentate con farina di larve di *Hermetia illucens* (L.) (Diptera, Stratiomyidae). Dagli studi non sono state riscontrate patologie a carico di milza, fegato e intestino, il che porta a dedurre che gli insetti non influenzino negativamente lo stato di salute degli animali (Bruni et al., 2018; Henry et al., 2018). Inoltre, la mucosa intestinale dei pesci non ha mostrato né alterazioni di forma, né modificazioni a carico delle mucine. In definitiva, la somministrazione di queste farine ha contribuito a migliorare l'assorbimento dei nutrienti, una crescita ottimale del pesce e una protezione efficace nei confronti di potenziali agenti patogeni a livello intestinale (Vargas et al., 2018; Zarantoniello et al., 2019). Pertanto, la rivalutazione dei sottoprodotti per produzione di mangimi e alimenti è fortemente supportata da numero proposte e studi di ricerca (Salomone et al., 2017).

1.3.1 Tipologie di mangimi

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

La Legislazione comunitaria definisce ed individua diverse tipologie di mangimi: additivi, premiscele e mangimi propriamente detti. Oltre alle materie prime destinate alla produzione di mangimi la Legislazione mangimistica vigente definisce diverse tipologie sulla base del soddisfacimento della razione giornaliera dell'animale, sulle sue funzioni e sulla forma di commercializzazione. Per gli animali da produzione alimentare generalmente sono in forma di sfarinati, pellet o spezzati; nel caso degli animali da compagnia, le presentazioni sono le più svariate, crocchette, paté, snack o bocconcini (<https://www.assalzo.it>).

Possono essere suddivisi in : mangimi semplici, le materie prime di origine vegetale o animale che possono essere destinate all'alimentazione degli animali, allo stato fresco o conservato; mangimi complementari, per la loro composizione soddisfano la razione giornaliera dell'animale solo se associati ad altri mangimi; mangimi completi, soddisfano le esigenze nutrizionali giornaliere dell'animale; mangimi destinati a particolari fini nutrizionali, in grado di soddisfare un particolare fine nutrizionale degli animali, le cui funzionalità (processo digestivo, di assorbimento o metabolismo) rischiano di essere alterati momentaneamente o sono alterati temporaneamente in forma irreversibile; mangimi medicati, sono addizionati di farmaci per la terapia di animali, si somministrano in casi di necessità testimoniati da prescrizione veterinaria; mangimi biologici, le norme per la produzione biologica riguardano modalità di produzione e caratteristiche delle materie prime vegetali ed animali e degli additivi (<https://www.assalzo.it>).

1.3.2 Materie prime e additivi

I mangimi sono costituiti da materie prime e additivi secondo la norma mangimistica.

Secondo la definizione della legge 281/63 le materie prime sono i prodotti di origine vegetale o animale, in grado di soddisfare le esigenze nutrizionali degli animali,

allo stato naturale, freschi o conservati, nonché i derivati della loro trasformazione industriale, destinati all'alimentazione degli animali per via orale, in quanto tali o previa trasformazione, oppure alla preparazione di mangimi composti oppure ad essere usati come supporto di additivi (Reg. CE n. 767/2009) (<https://www.efsa.europa.eu>).

Per assicurare benessere, all'animale devono essere forniti in termini quali-quantitativi i principi nutritivi necessari alla crescita ed alla salute e a tale scopo è necessario che tutti i nutrienti del mangime siano selezionati, controllati, bilanciati ma anche esenti da alcuni fattori anti-nutrizionali presenti in molteplici materie prime di origine vegetali. Ogni materia prima (vegetale, animale e minerale) deve soddisfare determinati requisiti sanitari e di utilizzo correlati alla specie di provenienza, ai trattamenti cui sono state sottoposte, alla modalità di impiego ed alla conformità legale (Reg. CE n. 1069/2009 e Reg. UE n. 142/2011 sui sottoprodotti di origine animale). Tutte le materie prime di origine animale devono obbligatoriamente derivare da animali dichiarati idonei alla macellazione per consumo umano (<https://www.efsa.europa.eu>); fra queste, con alcune eccezioni, trovano maggiore impiego nell'alimentazione degli animali destinati alla produzione alimentare i fosfati, le proteine idrolizzate, le farine di pesce, gli oli ed i grassi, il latte ed i prodotti derivati (<https://www.efsa.europa.eu>).

1.3.3 Mangimi tradizionali

I mangimi costituiti da nutrienti controllati, bilanciati e selezionati e privi di fattori anti-nutrizionali sono il fattore principale per assicurare il benessere animale e fornire gli adeguati principi nutritivi necessari alla crescita e alla salute. Per ottenere mangimi facilmente metabolizzabili, digeribili e salubri sono previsti trattamenti termici quali cottura, fiocatura, liofilizzazione e tostatura rendendo l'alimento più efficace per l'organismo e conferiscono stabilità microbiologica al prodotto (<https://www.assalzoo.it>).

Per ottenere la formulazione ideale e il miglior prodotto possibile vengono attuate alcune accortezze come l'eliminazione di sostanze che potrebbero dare effetti indesiderati per la dieta, o effetti patogeni dovuti all'accumulo di una particolare sostanza (es. alcuni acidi o lipidi, preferendo quelli a catena lunga ed insaturi), favorendo la concentrazione di composti naturalmente presenti con diversi benefici (vitamine, oligoelementi e amminoacidi) o arricchire il mangimi con semplici integrazioni.

In base al soddisfacimento dei fabbisogni energetici e nutrizionali, e ad alcune funzionalità desiderate o peculiarità di natura degli ingredienti inclusi la Legislazione comunitaria definisce e individua diverse tipologie di mangimi sulla base di numerosi aspetti. Oltre alle materie prime vegetali o animali destinate all'alimentazione animale, definite dalla norma vigente (Reg. CE n. 767/2009) come mangimi e alimenti semplici, è stabilita legalmente una classificazione in base al soddisfacimento della razione giornaliera dell'animale. La razione giornaliera è la quantità di uno specifico mangime di cui necessita al giorno un animale di una data specie, categoria di età e stile di vita o attività per soddisfare i bisogni energetici e nutrizionali.

1.3.3 Mangimi alternativi

Secondo la Food and Agriculture Organisation (FAO), ogni anno vengono utilizzate in media 18,90 milioni di tonnellate di pesce come sardine, acciughe o aringhe per produrre farina e olio di pesce. La FAO prevede anche che entro il 2030 sarà disponibile il 25% di pesce catturato in natura in meno, rispetto a oggi e che l'acquacoltura vedrà una riduzione simile a meno che non possa affrontare la carenza di farina di pesce per l'industria dei mangimi.

In questo panorama fonti alternative proteiche e non sono oggetto di valutazione scientifica e tecnologica e cresce l'interesse globale verso mangimi alternativi,

come gli insetti e le alghe, per i loro valori nutrizionali e facilità di approvvigionamento.

Le alghe ad esempio, che contano circa 800 mila specie possono essere utilizzate nei mangimi al posto della farina di mais o soia, vantando un apporto di acidi grassi omega 3, 6 e ferro maggiore rispetto ai mangimi tradizionali. Inoltre, in seguito alla valutazione scientifica dell'Autorità europea per la Sicurezza alimentare, a livello comunitario è stato recentemente pubblicato un provvedimento che autorizza l'allevamento di alcune specie di insetti a scopi mangimistici, nell'ottica della sicurezza, del benessere animale e della tutela ambientale (Regolamento UE 893/2017).

Anche i sottoprodotti aziendali come residui e scarti organici di diversa tipologia possono rappresentare una potenziale e possibile soluzione per la produzione di energia e molecole ad alto valore aggiunto attraverso processi biotecnologici.

Nella categoria di scarti provenienti dal settore agricolo rientrano le paglie dei cereali, gli steli, le foglie e i residui in genere di varie coltivazioni industriali e ortive di pieno campo; i sottoprodotti derivanti dalla trasformazione industriale delle produzioni vegetali e animali: sanse di olive, bucce di pomodoro, scarti del caffè e altri sfridi di lavorazione delle produzioni orticole, sottoprodotti di origine animale (sangue, carnicci, ecc.).

La suddivisione dei sottoprodotti agroalimentari prevede: sottoprodotti di origine animale, matrici derivanti dalla lavorazione di prodotti animali caratterizzati da alti livelli di lipidi e proteine; sottoprodotti dell'industria alimentare, una categoria molto vasta che comprende gli sfridi di produzione di diversi prodotti alimentari; scarti o residui vegetali, matrici residuali generate dalla lavorazione dei prodotti ortofrutticoli, della barbabietola e dei residui colturali, di notevole interesse per l'alto livello di sostanza organica e l'assenza di frazioni indesiderate, anche se la

loro stagionalità e la notevole variabilità impongono un'adeguata conoscenza della loro composizione.

Per ottenere un'alimentazione sana e bilanciata per gli animali occorre assicurare il loro fabbisogno energetico e compensare eventuali mancanze dovute a stati di malessere e in parallelo integrare probabili carenze riscontrate negli ingredienti. L'aggiunta di oligoelementi, vitamine ed altri principi nutritivi, conosciuto con il termine di additivi, è sufficiente a raggiungere lo scopo prefissato rispondendo alle richieste nutrizionali.

Gli additivi sono quindi sostanze o microrganismi o preparati intenzionalmente aggiunti agli alimenti per animali o all'acqua di abbeverata al fine di svolgere una o più funzioni (Reg. CE n. 1831/2003), secondo cui si dividono in categorie specifiche: organolettici, nutrizionali, zootecnici, coccidiostatici ed istomonostatici (<http://www.salute.gov.it>). Ogni additivo per mangimi deve essere autorizzato a livello comunitario dalla Commissione europea che, previa valutazione dell'EFSA, ne consente l'utilizzo a specifiche condizioni determinanti il fine, la specie di destinazione, eventuali tenori minimi e/o massimi, e raccomandazioni d'uso. I macro ed i microminerali normalmente contenuti negli alimenti non sono sempre sufficienti per il fabbisogno specifico di una data specie o categoria animale; per questo è necessario integrarli nelle razioni secondo criteri ben definiti (<https://www.assalzoo.it>).

1.4 Le Microalghe (*Isochrysis*, *Schizochytrium*)

Le alghe afferiscono ad un raggruppamento, non appartenente ad un taxon sistematico, rappresentato da organismi di struttura vegetale, autotrofi, unicellulari o pluricellulari, che producono energia chimica per fotosintesi, generando ossigeno e che non presentano una differenziazione in tessuti veri e propri.

Le alghe si suddividono in due grandi famiglie: le macroalghe, come la nori e la kombu, e le microalghe come la spirulina, da lungo tempo utilizzate come integratori alimentari e recentemente come ingredienti funzionali.

Le microalghe, definite anche come biofabbriche verdi, sono organismi fotosintetici microscopici che vivono nei mari, nei fiumi e nei laghi e utilizzano l'energia solare per sintetizzare gli zuccheri e l'energia necessaria alla loro vita.

La biodiversità delle microalghe è enorme, circa 35.000 sono le specie descritte rispetto alle 800.000 stimate (Barbato *et al.*, 2012).

La crescita continua della popolazione mondiale e la parallela necessità di superfici da coltivare hanno portato la FAO a valutare nuove risorse sostenibili. Questi organismi così sono arrivati sotto la lente di ingrandimento dei diversi ricercatori vantando alcuni pratici aspetti:

- facili da coltivare in zone desertiche o in contenitori sigillati,
- possibile riutilizzo di terreni non coltivabili,
- elevato contenuto in proteine, integratori e molecole bioattive,
- limitata richiesta di acqua,
- assenza di pesticidi/erbicidi,
- produzione tutto l'anno,
- elevato tasso di crescita,
- nessuna competizione con altre risorse alimentari;

La loro particolare composizione rende queste piante acquatiche molto versatili. Farmaci, cosmetici, alimenti rinforzati, mangimi, carburanti, plastiche biodegradabili, sono alcuni dei prodotti che si potranno in futuro ottenere da esse.

Il loro utilizzo inoltre può essere applicato a diversi campi: nutraceutica, per la produzione di integratori e alimenti fortificati; acquacoltura, per l'allevamento di molluschi, crostacei e pesci; farmaceutico, per la sintesi di molecole bioattive per

la cura di specifiche malattie; bioenergetico, per la progettazione di biomasse dall'elevato contenuto di oli con formazione di idrogeno.

I valori nutrizionali che caratterizzano le alghe le rendono di molteplice interesse. Ricche in proteine, carboidrati, sali minerali, vitamine e acidi grassi dopo essere state coltivate vengono raccolte ed essiccate per essere trasformate in polvere e utilizzate poi nella preparazione di integratori alimentari e prodotti di facile consumo come pane, pasta, biscotti e bevande.

In particolare, esse sono ricche di micronutrienti come il β -carotene (che viene trasformato nell'organismo in vitamina A), l'astaxantina (carotenoide ad azione antiossidante), la vitamina B12, e gli acidi grassi polinsaturi omega 3 e omega 6 (Amos Richmond e Qiang Hu. 2013).

Poche sono le alghe fino ad ora autorizzate per uso alimentare in Europa, oltre alla "spirulina" si possono citare la *Chlorella* e la *Dunaliella*. Se si volessero introdurre nuove specie di macro o microalghe oppure loro estratti come alimento o ingrediente alimentare, dovranno essere considerati novel foods e come tali sottoposti ad autorizzazione e valutazione dei rischi da parte di EFSA secondo il nuovo regolamento europeo 2015/2283.

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

1.4.1 *Schizochytrium* sp.

Schizochytrium è un genere di eucarioti monocellulari nella famiglia delle Thraustochytriaceae, che si trovano in habitat marini costieri. Il suo ciclo di vita è caratterizzato da diverse fasi. La forma alimentare ha un corpo rigido e arrotondato

con estensioni cellulari utilizzate nell'alimentazione. Le cellule possono trasformarsi in cellule mobili flagellate con peli tripartiti tipici degli *Stramenopiles* o crescere e dividersi per formare un gruppo di cellule che può diventare un sorus e produrre zoospore biflagellate (Figura 03)

É una ricca fonte di omega 3 a basso contenuto di iodio. *Schizochytrium* è caratterizzata da una forte concentrazione di acido docosaesaenoico (DHA), componente più abbondante dell'olio (circa il 35%), acido stearidonico e acido alfa-linolenico (Aussant *et al.*, 2018) ed acido eicosapentaenoico (EPA) entrambi trigliceridi di acidi grassi insaturi che rappresentano un importante componente strutturale delle membrane cellulari umane, in particolare delle cellule neuronali. Contiene quindi olio ricco di acidi grassi altamente insaturi (PUFA) omega-3 e omega-6 e aminoacidi essenziali (Silva Vaz *et al.*, 2016). È coltivata commercialmente per la produzione di questo olio per alimenti destinati ad animali, è utilizzata come ingrediente nutrizionale (Hammond *et al.*, 2001); biomassa, biocarburanti e consumo umano diretto sotto forma di integratori e additivi.

Il consumo di alga e di integratori a base di olio *Schizochytrium* ha dimostrato di prevenire danni al sistema cardiovascolare e nervoso, e proteggere dalle infiammazioni.

I ricercatori del settore alimentare hanno considerato quindi la microalga *Schizochytrium* come una potenziale fonte di alimenti funzionali ed ingredienti bioattivi, priva di inquinanti tra cui i metalli pesanti, che spesso contaminano i prodotti ittici. Negli ultimi decenni questa microalga è stata coltivata e commercializzata come prodotto nutraceutico ed integratore alimentare e in rispetto delle direttive alimentari dell'Unione Europea, la microalga *Schizochytrium* è stata certificata come cibo adatto al consumo umano nel 2003.

L'aggiunta di *Schizochytrium* alla dieta di larve *H. illucens* si è dimostrata promettente per colmare il deficit di acidi grassi a catena lunga PUFA con

ripercussione anche dei pesci che hanno mangiato tali insetti (Truzzi *et al.*, 2020; Zarantoniello *et al.*, 2020).

Secondo alcuni oltretutto un pasto dietetico di *Schizochytrium* ha la capacità di migliorare le risposte immunologiche innate in *Litopenaeus vannamei*, tra cui attività fagocitica, attività enzimatica antiossidante e conta totale degli emociti, nonché la loro resistenza al patogeno marino, *Vibrio harveyi*; confermando che questa risorsa sostenibile ricca di acidi grassi omega-3 può fornire maggiori benefici sia al pesce che al consumatore finale.

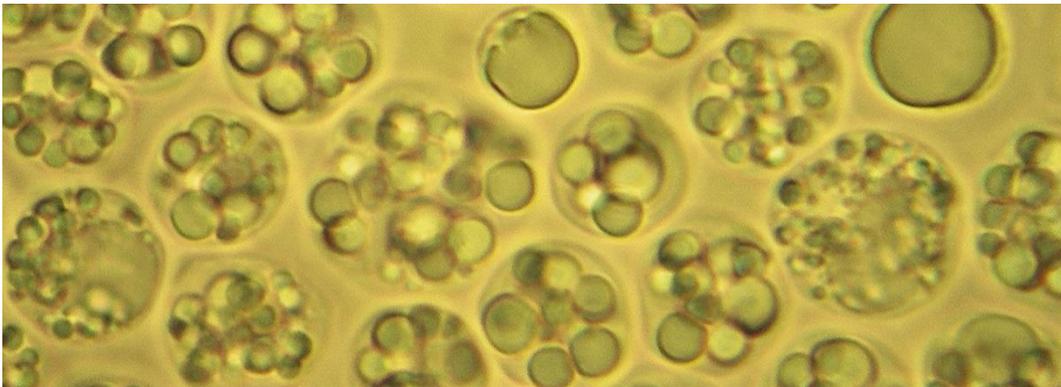


Figura 03. Foto al microscopio di *Schizochytrium* spp.

1.4.2 Isochrysis

Isochrysis è un'alga appartenente al genere *Haptophytes*. Comprende la specie *Isochrysis galbana*, *Isochrysis litoralis* e *Isochrysis maritima*. E' una microalga marina marrone-oro flagellata dalla forma ovoide, di 4-4 mm di diametro (Guiry, 2008) (Figura 04). La specie *Tisochrysis lutea* è una delle specie più utilizzate in acquacoltura. È caratterizzata anch'essa dall'altro contenuto di acidi grassi

polinsaturi come acido docosaesaenoico (DHA), l'acido stearico e l'acido alfa linolenico.

Dalle analisi gascromatografiche e spettrofotometriche emergono monosaccaridi come ramnosio, arabinosio, xylosio, monnosio, galattosio e in misura maggiore glucosio. Inoltre, cinque tipi di clorofilla e uno sterolo sono stati separati dagli estratti enozici, compreso il feoforbide-a, il feoforbide etilico-a, 10S-10-idrossiofitina-a, 10R-10-idrossiiofitina-a, (132-R)-faofitina-a, e otticasterolo. Vanta un alto valore proteico che la rende quasi unica fra le microalghe utilizzate in acquariofilia.

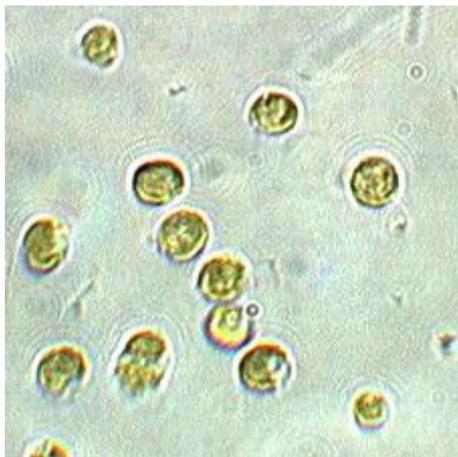


Figura 04. Foto al microscopio di *Isochrysis galbana*.

1.5 *Hermetia illucens*



Figura 05. Immagine di adulto di *Hermetia Illucens* (Park, 2015)

1.5.1 Origine e diffusione

Hermetia illucens (Linnaeus, 1758) è un insetto dittero della famiglia Stratiomyidae. Conosciuta anche come black soldier fly ("mosca soldato nera"), la specie è originaria del continente americano ma ha attualmente una distribuzione cosmopolita (Figura 05)

Le larve di questo dittero si rinvencono frequentemente negli impianti di compostaggio e di smaltimento dei rifiuti, all'interno dei quali svolgono un utile ruolo nella riduzione della massa e del carico inquinante dei rifiuti stessi; rivestono inoltre un ruolo significativo in entomologia forense.

Secondo il regolamento UE 17/2017 la specie può essere utilizzata come materia prima per la produzione dei mangimi.

Proveniente dalle zone tropicali e subtropicali dell'America del Sud e del Nord, oggi *H. illucens* è presente nelle zone calde di tutto il mondo, come diretta

conseguenza del commercio mondiale di frutta e verdura, dalle quali essa viene trasportata (James, 1935;

In Europa, è presente in Spagna, Portogallo, Italia, Croazia, Malta, Isole Canarie, e nel Sud della Francia; mentre assente nelle zone più fredde.

In Italia, ad esempio, il suo primo arrivo è collegato ai trasporti commerciali nel 1956 (Venturi, 1956) sino alla colonizzazione dell'intera penisola odierna (Adamo, 2008).

La sua rapida diffusione può essere spiegata con le sue molteplici capacità di adattamento e caratteristiche biologiche: ha soppiantato come degradatore sarcosaprofago i ditteri autoctoni con nicchie ecologiche affini, è un vorace competitore e predatore di altri ditteri e in grado di inibire lo sviluppo di altre specie tramite allomoni, speciali sostanze chimiche rilasciate dall'insetto allo scopo di allontanare un'altra specie. Questa specie inoltre non è attaccata da parassitoidi ed è estremamente resistente agli agenti chimici e agli insetticidi. Per questo motivo, nonostante non sia autoctona, è una specie attualmente diffusa in tutta Italia.

1.5.2 Ciclo biologico di *Hermetia illucens*

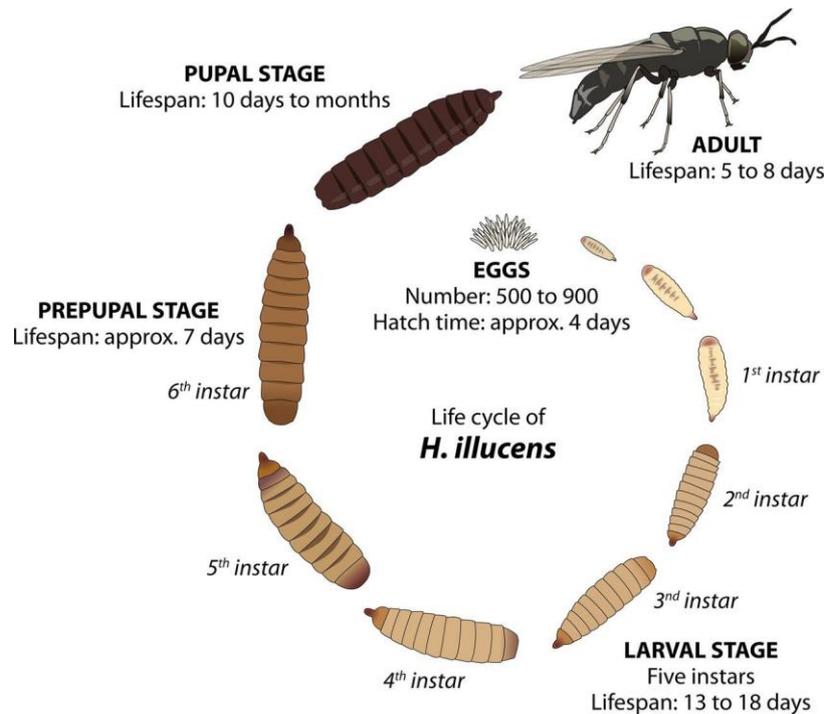


Figura 06. Immagine rappresentativa del ciclo biologico di *Hermetia illucens*

(De Smet et al., 2018)

Il ciclo di sviluppo di *H. illucens* (Figura 06), insetto olometabolo, comprende dopo la schiusa sei stadi larvali, uno stadio di pupa e uno di adulto. L'ultimo stadio larvale è caratterizzato dalle riduzioni delle appendici boccali e l'indurimento della cuticola della larva dato da inclusioni di carbonato di calcio che crea un'efficace protezione per l'impupamento.

Le uova di *H. illucens* vengono deposte dalle femmine adulte dopo essere state fecondate. Le femmine possono deporre tra le 320 e le 1000 uova in ambiente umido (per limitare la perdita di acqua delle stesse) mediante l'uso dell'ovopositore

(Tomberlin *et al.*, 2009, Kim *et al.*, 2008;) morendo subito dopo l'atto di ovoposizione (Tomberlin *et al.*, 2002).

Le uova misurano circa 1 mm di lunghezza e sono di colore dal bianco crema al giallo pallido. La schiusa avviene in circa 4 giorni (Booth e Sheppard, 1984) e generalmente sono deposte in interstizi lontano dal possibile attacco dei predatori. L'intero ciclo, a optimum temperature da 27 a 28, dura dai 38 ai 55 giorni, variabile a seconda dei fattori climatici (Tomberlin e Sheppard, 2002). Gli adulti non si nutrono e questo li rende innocui per le derrate alimentari o allevamenti.

Nel complesso, il ciclo di vita di *H. illucens* ha una durata che va da alcune settimane a diversi mesi, in relazione alla temperatura dell'ambiente e la qualità e quantità del substrato alimentare (Veldkamp *et al.*, 2012).

1.5.2.1 La larva

La larva nei primi stadi misura 1,5-2 mm, apoda ed eucefala, con corpo cilindrico-fusiforme, marcatamente segmentato, costituito da 11 segmenti ricoperti da peli e setole. Può raggiungere fino a 27 mm in lunghezza e 220 mg in peso nel loro ultimo stadio larvale. Il tegumento è fortemente sclerotizzato con cuticola contenente inclusioni di carbonato di calcio con cristalli esagonali che formano una caratteristica microscultura.

Il regime dietetico delle larve è prevalentemente saprofago. Le larve si rinvergono in substrati organici in decomposizione (James, 1935), sia vegetali sia animali, negli escrementi, nei suoli umidi e nelle lettiere, nella corteccia degli alberi, frutta e ortaggi, letame animale ecc. Singolarmente possono consumare dai 25 ai 500 mg di substrato fresco al giorno (Van Huis *et al.*, 2013;).

Durante lo stadio larvale, dal momento che gli adulti non si nutrono, è necessario che l'insetto accumuli una soddisfacente quantità di grasso per il mantenimento vitale.

La crescita larvale comprende sei stadi che si sviluppano durante due settimane, al termine delle quali si giunge allo stadio di larve mature (prepupa).

Il passaggio allo stadio di prepupa è distinguibile dalla variazione del colore da beige a marrone, dai movimenti rallentati e dall'inizio della migrazione fuori dal substrato di crescita per potersi impupare (Sheppard *et al.*, 1994;).

1.5.2.2 La Pupa

La pupa si evolve all'interno dell'esuvia dell'ultimo stadio larvale, caratteristica comune a tutti gli Stratiomyomorpha. Gli individui maschi tendono a sfarfallare prima delle femmine (Tomberlin *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2008) e la metamorfosi si completa in circa due settimane (Sheppard *et al.*, 2002). L'impupamento è caratterizzato dall'irrigidimento della cuticola e presenza dell'esuvia scura.

1.5.2.3 L'Adulto

L'adulto è un dittero di medie dimensioni, simili a vespe con corpo lungo 15-20 mm (Hardouin e Mahoux, 2003) di colore nero e con qualche riflesso metallico dal blu al verde sul torace. Il secondo tergite addominale presenta delle aree traslucide, da cui deriva l'epiteto specifico. Il capo è largo e ospita occhi molto sviluppati. Le antenne sono lunghe circa il doppio della testa. Le zampe sono nere con tarsi biancastri. Le ali sono membranose, in fase di riposo ripiegate orizzontalmente sull'addome e sovrapposte. I maschi riportano caratteristiche differenti rispetto alle femmine, sono più piccoli (Tomberlin *et al.*, 2002) e non posseggono l'ovopositore femminile nell'ultimo segmento addominale.

La durata media di vita di un adulto si stima tra i 4 e i 15 giorni (Tomberlin *et al.*, 2002; Tomberlin *et al.*, 2009) variabile a seconda delle disponibilità idriche (essendo l'unica fonte richiesta in fase adulta) e dalla grandezza del corpo.

1.5.3 Allevamento *Hermetia illucens*

Questa specie è originaria dell'ecozone Neotropica, ma negli ultimi decenni si è diffusa in tutti i continenti, diventando praticamente ubiquitaria.

È presente nella maggior parte delle zone calde europee a partire dalla Francia, l'Italia, la Croazia, Malta, le isole Canarie e la Svizzera. Possiamo ritrovarla anche nell'ecozone Afrotropicale, nell'ecozone australiana, nell'est ecozona Palearctica, nell'ecozone nearctica, in Nord Africa e nell'ecozone del regno Indomalayan.

Nei climi tropicali e subtropicali potrebbero riprodursi tutto l'anno ma in altri climi, per ottenere le uova nei periodi più freddi, potrebbe essere necessario l'ausilio di una serra.

La mosca soldato nera è estremamente sensibile all'ambiente in cui si trova; quindi, le condizioni di allevamento devono essere ampiamente monitorate per garantire la massima resa essendo la durata della loro vita funzionale a quanto sia caldo il loro ambiente (Park, 2015). Una maggiore longevità dettata dalle condizioni ambientali e nutrizionali si traduce in una maggiore possibilità di trovare un compagno e quindi di accoppiarsi (Tomberlin *et al.* 2009).

La temperatura ottimale di sviluppo per *H. illucens* è di circa 27 ° C; infatti a questa temperatura si riscontra la massima longevità larvale, prepupale, pupale e adulta (Tomberlin, 2009). Tomberlin *et al.* (2009) hanno osservato, inoltre, che le dimensioni più piccole degli adulti e una durata della vita adulta più breve sono correlati all'aumento della temperatura, a causa di tassi più elevati di metabolismo e crescita. Una volta che le temperature raggiungono una soglia superiore di 30-36 ° C lo sviluppo della mosca soldato viene fortemente inibito. A 27 ° C, i maschi e le femmine hanno impiegato 2,5 giorni in più per completare la crescita rispetto a 30 ° C. Inoltre, a 27 e 30 ° C, l'83,2-91,8% e il 74,2-96,7%, rispettivamente, degli individui sono sopravvissuti per diventare adulti.

In conclusione, Tomberlin *et al.* (2009) affermano: “Per la mosca soldato, gli adulti allevati a 27 ° C pesano il 5% in più e vivono circa il 10% in più rispetto a quelli allevati a 30 ° C. Tuttavia, per completare lo sviluppo larvale a 27 ° C sono necessari in media 4 giorni in più rispetto a 30 ° C. Poiché gli adulti non si nutrono, se non per bere (Tomberlin *et al.*, 2002), l'alimentazione larvale è cruciale anche per il benessere degli adulti“. (Tomberlin *et al.*, 2009).

Per quanto riguarda l'umidità, le mosche soldato, come precedentemente affermato, sono estremamente sensibili alla temperatura (Park, 2015).

Di conseguenza, il loro ciclo di sviluppo è influenzato dall'umidità. Questa variabile ha notevoli conseguenze sulla schiusura delle uova. Bassi livelli di umidità comportano una perdita d'acqua attraverso il corion dell'uovo e un'ulteriore essiccazione: il 25% di umidità relativa (UR) provoca tassi più elevati di essiccazione e di mortalità delle uova. Al 70% di UR, gli adulti vivono 2-3 volte più a lungo delle mosche soldato sottoposte a livelli di UR più bassi (Merino G., , 2012). Pertanto, maggiori sono i valori di umidità relativa, maggiori sono le probabilità che una colonia di insetti abbia successo. Un'umidità relativa del 30-90% favorisce l'accoppiamento e l'oviposizione quando uova e larve vengono allevate in un ambiente a 27 ° C. L'ampia gamma di umidità relativa è indice della forte capacità di adattamento di *H. illucens* ad una temperatura costante (Sheppard, 2002).

Un altro aspetto da considerare è la fonte di luce, considerando che *H. illucens* non si accoppia nei mesi invernali (Park, 2015). Naturalmente, le mosche soldato richiedono la luce solare diretta affinché avvenga l'accoppiamento. Pertanto, negli allevamenti di questa specie di insetto svolte in locali chiusi richiedono un'illuminazione artificiale integrata. Alla luce solare diretta naturale, l'85% dell'attività di accoppiamento avviene al mattino con 110 mol m²s⁻¹. Il superamento di 110 mol m²s⁻¹ comporta una riduzione dell'attività di accoppiamento. Una

lampada al quarzo-iodio da 500 watt, $135\text{mol m}^2\text{s}^{-1}$ ad intensità luminosa stimola l'accoppiamento e l'oviposizione a velocità e tempi paragonabili a quelli della luce solare naturale (Park, 2015). Briscoe e Chittka (2001) affermano che gli insetti non possono percepire lunghezze d'onda oltre i 700 nm. Si consiglia una lunghezza d'onda superiore di 450-700 nm per favorire gli accoppiamento tra adulti di mosca soldato nera (Zhang, 2010).

1.5.4 Performance larvali di *Hermetia illucence* in funzione dell'alimento

Le larve della mosca soldato si nutrono di un'ampia varietà di substrati organici derivati da piante e animali riducendo e trasformando queste sostanze (Diener *et al.*, 2019). Questa specie si nutre principalmente durante il suo stadio larvale e accumula un deposito sufficientemente di energia (fra cui il grasso) per ridurre o eliminare il bisogno dell'adulto di nutrirsi (Sheppard *et al.*, 2002). È noto che le larve di insetti tendono a consumare una dieta equilibrata (cioè ottimale per crescita e sviluppo), che si traduce nelle migliori performance riproduttive degli adulti (Parra, 1990).

In alcuni studi condotti con un substrato di farina animale (farina di carne), le larve allevate hanno impiegato più tempo per completare il loro sviluppo rispetto a quelli allevati con mangime per galline o una miscela di entrambi i componenti (Gobbi *et al.*, 2013).

Altri fattori, come le dimensioni del corpo degli adulti (Akoh *et al.*, 1992; Bradshaw e Holzapfel, 1992; Clements, 1992) e il numero di ovaroli e dimensioni degli ovari delle femmine (Hawley, 1988; Clements, 1992) sono determinati dalle condizioni di sviluppo delle larve.

Numerosi studi hanno mostrato una relazione positiva tra le dimensioni delle ali (o altre misurazioni corporee) e la fecondità (Bradshaw & Holzapfel, 1992; Clements, 1992; Renshaw *et al.*, 1994). Le femmine con ali grandi hanno corpi più grandi e

sono più fertili delle femmine con ali e corpo piccolo. Ad esempio, nelle femmine allevate con una dieta a base di mangime per galline si sono riscontrate dimensioni maggiori degli ovari e ovociti basali (Gobbi *et al.*, 2013).

Uno studio svolto da Sprangers *et al.* (2017) ha visto impiegati 4 diversi substrati di alimentazione: 3 di scarto vegetale (rifiuti dei ristoranti, rifiuti vegetali e digestato) e una dieta a base di mangimi per polli come substrato alimentare di riferimento di alta qualità. In questo studio si è visto che il lento sviluppo delle larve allevate con rifiuti dei ristoranti può essere associato alla difficoltà di digestione del grasso da parte delle larve di *H. illucens* portando ad un prolungamento del tempo di sviluppo di circa tre volte.

1.5.5 Composizione nutrizionale in funzione di substrati

Un'analisi delle larve di mosca soldato essiccato (ESR International 2008) chiarisce che per quanto riguarda il loro valore nutrizionale, queste contengono:

- 42,1% di proteine grezze
- 34,8% di lipidi
- 14,6% di ceneri
- 7,9% di umidità
- 7,0% di fibre grezze
- 5,0% di calcio
- 1,5% di fosforo
- 1,4% NFE

Insieme a questi risultati, è stato condotto un altro esperimento di ricerca a sostegno di queste statistiche (Park, 2015). Sono stati utilizzati come substrati di alimentazione tre diverse frattaglie di pesce e diete miste a base di letame costituito da teste omogenizzate di pesce, visceri e strutture ossee di trota iridea. I risultati di questo studio hanno portato ad un aumento del 43% dei lipidi totali nelle larve di

H. illucens alimentate in proporzioni variabili delle frattaglie di pesce rispetto al gruppo di controllo alimentate con il solo letame. Inoltre, i livelli di acidi grassi omega-3 sono aumentati (da scarse quantità al 3%) nei gruppi nutriti con le frattaglie del pesce. Le larve allevate su substrato arricchito con frattaglie di pesce hanno incrementato l'1% del loro peso secco in soli acidi grassi omega-3 (St-Hilaire, Cranfill 2007).

La ricerca aveva verificato con successo che le larve di mosca soldato erano in grado di convertire in modo efficiente una notevole percentuale degli oli di pesce e delle proprietà nutritive presenti nelle frattaglie di pesce in preziosi acidi grassi omega-3. Pertanto, risulta significativa l'integrazione anche di una piccola percentuale di scarti di pesce nelle diete entro 24 ore dalla nascita (St-Hilaire e Cranfill, 2007).

Un ulteriore studio svolto da Sprangers *et al.* (2017 sui valori nutrizionali finali di allevamento delle larve di *H. illucens* ha impiegato 4 diversi substrati di crescita: 3 di scarto vegetale (rifiuti dei ristoranti, rifiuti vegetali e digestato) e una dieta a base di mangimi di polli come substrato di riferimento di alta qualità. Le larve allevate con mangime per polli hanno avuto le migliori performance di accrescimento. Dopo 12 giorni, sono state osservate le prime larve mature sui substrati alimentari costituiti da mangime per polli mentre ci sono voluti 15 giorni per i substrati vegetali. Sul substrato composto dai rifiuti dei ristoranti ci sono volute circa 4 settimane per il completamento dello sviluppo larvale, di circa una settimana più lungo rispetto agli altri. Le larve mature allevate con digestato avevano alti contenuti in ceneri rispetto a quelli allevati su vegetali non fermentati. La biomassa finale invece per gli insetti allevati nei rifiuti dei ristoranti era più elevata rispetto a quelli allevati su verdure.

Gli aminoacidi essenziali più diffusi nella biomassa larvale sono stati lisina, valina e arginina tra i 20 e 30 g/kg; i livelli di acidi grassi polinsaturi (PUFA) variavano

tra i 46 e 120 g/kg; il livello di C12:0 (acido grasso laurico) è stato di 573 g/kg per il mangime per polli, i rifiuti vegetali e dei ristoranti a discapito dei 473 g/kg di C12:0 del digestato che invece presentava una quantità significativa di acidi grassi a catena ramificata. I livelli di calcio sono stati pari a 66g/kg per le larve allevate con digestato mentre 1g/kg per quelle nutrite con rifiuti dei ristoranti, 29 g/kg per quelle alimentate con mangime per polli e rifiuti vegetali (Spranger *et al.* 2017). I mangimi per polli e i rifiuti vegetali contenevano alti livelli di carboidrati e pochi di fibre mentre i rifiuti dei ristoranti erano ricchi sia di carboidrati che di EE. Al contrario, quasi nessun carboidrato era presente nella fermentazione del biogas. Per quanto riguarda il triptofano un altro amminoacido essenziale per suini e pollame, in letteratura sono disponibili solo pochi dati. Newton *et al.* 2005 hanno suggerito una sostanziale variabilità nei livelli di triptofano (2,0-5,9 g/kg) nelle larve allevate sui diversi substrati alimentari. Tuttavia, la variazione nello studio condotto sui 4 substrati non era molto pronunciata riportando valori di 5,4 e 6,7 g/kg di triptofano. Inoltre, non è stata riscontrata una correlazione significativa del substrato sulla composizione totale degli aminoacidi. Quando i valori di aminoacidi essenziali nelle larve sono confrontati con quelli della farina di soia con un simile contenuto di proteine grezze (440g/kg DM), i profili sembrano essere sostanzialmente simili. Inoltre, se le larve venissero sottoposte al processo di sgrassatura, come nel caso della farina di soia, potrebbe essere raggiunti livelli di proteine grezze di oltre il 60%. Di conseguenza, tale alimento pre-sgrassato avrebbe delle composizioni aminoacidiche superiori agli alimneti a base di farina di soia (Sprangers *et al.*, 2017). L'elevato contenuto in ceneri delle larve allevate su digestato, rispetto a quelle allevate nei rifiuti dei ristoranti, era derivato principalmente ad un alto livello di calcio nei substrati di partenza larve, tuttavia le larve allevate su substrati ricchi di energia e basso contenuto di ceneri e fibre come i rifiuti dei ristoranti portano ad un contenuto finale di ceneri inferiore rendendo il materiale più idoneo

all'alimentazione animale. In conclusione, i risultati mostrano che un sistema di allevamento di larve su rifiuti vegetali potrebbe fornire una risorsa di mangime di alta qualità, tuttavia il contenuto di grassi e ceneri sembra essere dipendente dal substrato alimentare (Sprangers *et al.*, 2017).

Alcuni studi hanno dimostrato che alimentando le larve di *H. illucens* con sostanza organica arricchite di microalghe si migliora anche il contenuto fonte di acidi grassi polinsaturi nelle larve da destinare all'alimentazione animale (Truzzi *et al.*, 2020b) In parallelo alle potenzialità della farina di insetti nell'alimentazione umana e animale, aumenta l'interesse per i rischi chimici associati ad essi (Truzzi *et al.*, 2020a).

1.5.6 Utilizzo degli insetti come mangime in acquacoltura

Da molto tempo gli insetti sono oggetto di discussione come fonte valida proteica alternativa: il valore nutrizionale degli insetti è paragonabile a quello della carne ed è migliore di quello delle fonti vegetali e le emissioni di gas serra, come il metano, derivanti dal loro allevamento sono di gran lunga inferiori.

Numerosi studi hanno confermato che gli insetti possono essere un'importante fonte alimentare per gli animali, soprattutto per il pesce e per il pollame, ma anche per l'uomo. *H. illucens* si colloca come sostituto dei mangimi a base di mais e soia, colture che da tempo ormai impoveriscono il pianeta.

La farina di insetti soddisfa i requisiti di macronutrienti di molti animali e pesci terrestri; studi precedenti hanno mostrato l'idoneità di questo nuovo ingrediente nelle diete per i suini e polli da carne e nella nutrizione della trota iridea (*Oncorhynchus*) o nel pesce gatto (*Ictalurus punctatus*) e tilapia blu (*Tilapia aurea*) (St-Hilaire S, Cranfill K, 2017; Bondari K, Sheppard DC 1981; Bruni L, Pastorelli R, 2018).

Le larve di *H. illucens* sono state utilizzate per l'alimentazione sperimentale di diverse specie animali con il fine di sostituire la farina di soia o di pesce nelle diete formulate, sia come larve che come prepupe vantando un'alta percentuale di

proteine (fino al 42%) e contenuto di grassi (fino al 30%) (Makkar, H.P.S.; Tran, G.; Heuzé, V.; Ankers, 2014; Wang, Y.S.; Shelomi, 2017).

Per questi test di alimentazione sono stati utilizzate: polli (Hale, 1973) che sono stati alimentati con larve di *H. illucens* allevate sul letame dei polli stessi riciclando i rifiuti, maiali (Newton *et al.*, 1977), pesci gatto e tilapie (Bondari e Sheppard, 1981; Sheppard e Newton 2000). I risultati positivi hanno comprovato il loro possibile utilizzo come fonte sostitutiva.

La farina di *H. illucens* è particolarmente vantaggiosa perché oltre a possedere livelli adeguati di minerali e vitamine essenziali superiore ad altri insetti ha anche riportato nel corso di diversi studi un beneficio nutraceutico in quanto ricca di acidi grassi a catena media, importanti prebiotici del microbiota intestinale, degli animali alimentati con mangimi a base di insetti, con effetti antimicrobici contro i batteri che causano malattie gastrointestinali. In quest'ottica *H. illucens* potrebbe anche essere utilizzata come alternativa all'uso degli antibiotici di sintesi, infatti l'acido laurico è un buon inibitore dei ceppi batterici (Meneguz *et al.*, 2018).

Uno studio recente ha testato, per la prima volta, l'inclusione parziale di larve liofilizzate di *H. illucens* nei mangimi per zebrafish (*Danio rerio*): la sostituzione del 50% di farina di pesce con farina di insetto ha influenzato la quantità e la qualità dei lipidi contenuti nei pesci. Ulteriori studi sono necessari per comprendere meglio le risposte fisiologiche dei pesci, comprese le sostituzioni molto basse di farina di *H. illucens*, che possono svolgere un ruolo immunomodulante nonché eventuali modifiche del substrato di crescita per valutare le variazioni indotte nel profilo lipidico degli insetti (Zarantoniello *et al.*, 2019).

Altro esperimento è stato condotto sui polli da carne per monitorare le performance di crescita dopo la somministrazione di mangimi a base di larve di *H. illucens*: la farina di *H. illucens* ha sostituito la farina di pesce commerciale per il 33% nella dieta e i polli sono stati nutriti da 3 a 8 settimane di età; tutti gli animali hanno

mostrato un aumento omogeneo del peso vivo mostrando un aumento dell'efficienza di alimentazione (Spranghers *et al.*, 2017).

1.5.7 Bioconversione ed efficienza di conversione del substrato alimentare

Dinanzi ad una società in rapida espansione, industrializzata, che sovrasfrutta le risorse al limite della disponibilità, e in una fase storica che ci mostra tutto il peso dei cambiamenti climatici e ambientali occorre iniziare a percorrere strade ecosostenibili puntando ad una economia circolare. Gli insetti sono un esempio molto promettente di organismi bioconvertitori (Barroso *et al.*, 2014; Henry *et al.*, 2015; Belghit *et al.*, 2019) che a sua volta può fornire nuovi ingredienti sostenibili per la nutrizione di pesci (Vargas *et al.*, 2018; Zarantoniello *et al.*, 2020).

A questo proposito le larve di *H. illucens* possono rappresentare un valido contributo in quanto è una delle specie di insetti più promettenti per rispondere ai problemi congiunti della futura mancanza di alimenti e mangimi convenzionali e la produzione eccessiva di rifiuti agroalimentari (Cutrignelli *et al.*, 2018), venendo proposta dall'European Food Safety come una delle specie con il maggiore potenziale in termini di alimenti e ingredienti mangimi per nell'unione Europea.

Il rapido ciclo di sviluppo e l'ampio spettro di sostanze organiche di cui si nutre rendono le larve di *H. illucens* efficacemente sfruttabili per lo smaltimento dei rifiuti organici ad alto impatto ambientale, come i liquami degli allevamenti zootecnici intensivi, i reflui dell'industria agroalimentare, i rifiuti solidi urbani. Un ulteriore vantaggio dal punto di vista tecnico-economico riguarda la facilità con la quale, una volta raggiunto l'ultimo stadio larvale essa cessa di alimentarsi, abbandona il substrato di alimentazione (molto spesso con un elevato tenore in UR) per impuparsi in zone secche e quindi la loro raccolta può essere facilitata.

La lettiera prodotta, composta da residui alimentari non utilizzati, da esuvie e escrementi, può essere destinata all'impiego come ammendante/fertilizzante e/o al trattamento per la produzione di biogas.

La ricerca è proiettata verso sistemi di smaltimento e riciclaggio dei reflui e dei rifiuti solidi basati su biodigestori e impianti di compostaggio che sfruttano allevamenti della mosca soldato nera per ridurre il volume dei rifiuti organici a costi relativamente bassi (Newton *et al.*, 2005).

Dal punto di vista della sostenibilità, ricorrere a sistemi che possano ridurre la massa e il contenuto di ammoniaca delle deiezioni e l'uso di fertilizzanti di sintesi è estremamente significativo.

L'attività delle larve di *H. illucens* permette la riduzione di circa il 60% della massa secca delle deiezioni, dei tenori di fosforo e azoto, e arginare la crescita batterica (soprattutto nociva), agisce positivamente sugli odori sgradevoli e sulla popolazione di mosche infestanti.

Una tecnologia di trattamento basata sull'allevamento di *H. illucens* è quindi ottima per la riduzione di rifiuti organici, abbattimento carico inquinante dei rifiuti e degli odori, e consente il recupero delle larve mature grazie alla particolare etologia della specie ed un minor impatto sanitario rispetto a quello registrato per sistemi di digestione che utilizzano ditteri (Turchetto e Vanin, 2004). Le larve mature e le pupe, facilmente recuperabili, vengono destinate a cicli produttivi esterni, come produzione di biocarburanti e mangimi. Le larve vengono così essiccate, polverizzate e utilizzate come ingredienti nei mangimi.

Il materiale organico invece viene trattato e così riutilizzato come fertilizzante o per la produzione di biogas (<http://www.biodieselmagazine.com>).

2. SCOPO DELLA TESI

L'obiettivo dello studio è stato quello di analizzare le performance larvali (tempi di sviluppo, sopravvivenza e peso finale) e l'efficienza di conversione del substrato alimentare di *Hermetia illucens* su otto diversi substrati di alimentazione basati sui residui della torrefazione del caffè (caffè siverskin), integrati con percentuali diverse di microalghe.

Partendo dai presupposti di economia circolare, eco-sostenibilità ed economicità, i substrati di crescita delle larve dell'insetto sono stati composti principalmente da sottoprodotti del processo di torrefazione del caffè, disponibili localmente (Saccari srl, Marina di Montemarciano – AN), arricchiti con diverse percentuali di inclusione di 2 diverse microalghe (*Scizochytrium* sp., *Isochrysis*) al fine di ottenere un mangime arricchito di acidi grassi polinsaturi (PUFA) da utilizzare come mangime per l'acquacoltura.

Lo studio rientra nel progetto della Fondazione CARIVERONA "Nuovi nutrienti per la produzione di specie ittiche pregiate (NUTRIFISH)".

3. MATERIALI E METODI

3.1 Preparazione delle diete per le larve di *Hermetia illucens*

La componente principale per le diete degli insetti è stato il coffee silverskin, un sottoprodotto industriale derivante dalla torrefazione del caffè e prodotto da Saccaria Caffè S.R.L. (Marina di Montemarçiano, Ancona, Italia). Il sottoprodotto del caffè (CB) (umidità 55%) è stato raccolto in contenitori di plastica in un unico stock, divisa in sacchetti sigillati (30x40 cm) da 1 Kg ciascuno, confezionati sottovuoto [FoodSaver, JCS (Europe) Ltd, IFS001X, Cina] e conservati a -20 ° C fino al loro utilizzo.

Le diete (n=8) sono state formulate includendo differenti percentuali di due diverse microalghe (*Schizochytrium* sp. e *Isochrysis*) (Tabella 01). Una dieta composta solo da sottoprodotto del caffè è stata utilizzata come controllo (dieta E).

Le microalghe *Schizochytrium* sp. e *Isochrysis galbana* sono state fornite liofilizzate da AlghItaly Società Agricola S.R.L. (Sommacampagna, Verona, Italia) e conservate a 4 ° C fino al momento dell'uso.

Gli ingredienti (CB e microalghe) sono stati miscelati con l'aggiunta di acqua demineralizzata [SAI S.p.A. Rocchabianca, Parma, Italia]. È stata aggiunta acqua demineralizzata per raggiungere un livello ottimale di umidità (70%) del substrato di alimentazione per la crescita degli insetti (Spranghers *et al.*, 2017; Makkar *et al.*, 2014).

Il CB è stato scongelato 48 ore prima della preparazione delle diete e macinato in un robot da cucina [Ariete, Mod. 1769, De'Longhi Appliances Srl, Italia] fino a una dimensione delle particelle di $2 \pm 0,4$ mm.

Diets	CB (%)	S (%)	I (%)
AS	95	5	-
BS	90	10	-
CS	80	20	-
DS	75	25	-
AI	95	-	5
BI	90	-	10
CI	80	-	20
DI	75	-	25
E (control)	100	0	0

Tabella 01. Composizione delle diete degli insetti costituite dal sottoprodotto della torrefazione del caffè (CB) arricchito con *Schizochytrium sp.* (S) o *Isochrysis galbana* (I) algae. Abbreviazioni delle diete sperimentali: CB = % di sottoprodotto di caffè; S = % dell'alga *Schizochytrium sp.*; I = % dell'alga *Isochrysis galbana*.

3.2 Allevamento delle larve

L'allevamento delle larve di *H. illucens* è stato effettuato con larve di 6 giorni di età acquistate da Smart Bugs s.s. [Ponzano Veneto (TV), Italia]. Per ogni dieta sono stati effettuate sei repliche di 100 larve ciascuna (Meneguz *et al.*, 2018). Ad ogni larva è stata fornita con una dose di 100 mg / giorno di dieta (Diener *et al.*, 2009). Le larve sono state allevate a una densità larvale di 0,3 / cm² (Barragan-Fonseca *et al.*, 2018) in scatole di plastica (28x19x14 cm) coperte con una garza di cotone a maglie fini (40 x 30 cm) (Sideris e Tsagkarakis, 2017) e chiuse con un coperchio dotato di un solo foro di ventilazione (4,5 cm Ø) (Spranghers *et al.*, 2017). I contenitori di plastica, contenenti le larve e il substrato di alimentazione, sono stati posti in una camera climatica a una temperatura di 27 ± 1 ° C, umidità relativa 65 ± 5% (Spranghers *et al.*, 2017), nell'oscurità continua (Figura 07). Prima di iniziare l'esperimento, ogni contenitore è stato pesato e contrassegnato. Per ogni dieta sperimentale, un gruppo di 100 larve è stato pesato e posto direttamente nel

substrato nel contenitore di plastica. Le diete sono state preparate ed aggiunte alle precedenti una volta a settimana (70g a contenitore) fino a quando il 40% delle larve non ha raggiunto lo stadio di larva matura (prepupa). Le prepupe sono state identificate dal cambiamento nel colore del tegumento dal bianco al nero (May 1961) e raccolte manualmente usando pinze e pennelli. Una volta raggiunta questa fase, le prepupe sono state isolate dalla dieta, ripulite dai residui di substrato, lavate, asciugate, contate e pesate individualmente. Diete, lettiera (dieta non utilizzata, esuvie e feci) e campioni di prepupa sono stati conservati a -20°C per ulteriori analisi da parte degli altri partner del progetto NUTRIFISH.



Figura 07. Camera climatica con all'interno i box di allevamento delle larve di *Hermetia illucens* (Foto di B. Montefiore).

3.3 Parametri rilevati

I seguenti parametri sono stati calcolati come segue:

-Growth rate (GR) ossia l'aumento di peso giornaliero in grammi di ogni singola larva

$GR = [\text{Peso medio finale delle larve (g)} - \text{Peso medio iniziale delle larve (g)}] / \text{Durata dell'esperimento (giorni)}$

-Feed conversion ratio (FCR) ossia la quantità di substrato consumato necessaria per aumentare di 1 g il peso delle larve

$FCR = \text{Peso della dieta ingerita (g)} / \text{Peso guadagnato (g)}$

-Waste reduction index (WRI) ossia la percentuale di substrato consumato dalle larve giornalmente

$WRI = [(W - R) / W] / \text{Durata dell'esperimento (giorni)} * 100$

dove W = dieta totale distribuita durante l'esperimento (g); R = dieta residua (g)

-Efficiency of conversion of digested food (ECD) ossia il peso delle larve per 1 g di substrato consumato

$ECD = \text{Biomassa finale totale (g)} / (\text{Dieta totale distribuita (g)} - \text{Dieta residua (g)})$

Dove biomassa finale totale = larve + prepupe; dieta residua = cibo non ingerito + prodotti escreti.

Tutti i parametri sono stati calcolati su una base di materia fresca (Meneguz *et al.*, 2018; Oonincx *et al.*, 2015; Waldbauer, 1968; Scirber, 1981).

3.4 Analisi dei dati

Differenze significative tra i diversi trattamenti ($P < 0.05$) sono state calcolate utilizzando il test di Kruskal-Wallis seguito dal Wilcoxon rank sum post hoc test oppure dall'ANOVA a una via seguito dal Tukey's HSD post hoc test a seconda della distribuzione dei dati. La normalità dei dati è stata determinata utilizzando il test di Shapiro-Wilk e tutti i p-values sono stati normalizzati utilizzando il metodo di Benjamini-Hochberg (BH). Tutte le analisi statistiche sono state effettuate con il software statistico R.

4. RISULTATI E CONSIDERAZIONI

5.1 Tempo di sviluppo, tasso di sopravvivenza e peso delle prepupe

Dieta	Peso delle prepupe (g)	Sopravvivenza larvale (%)	Tempo di sviluppo (giorni)
AS	0.1430 ± 0.0124 ^c	88.17 ± 6.05 ^a	20 ± 0 ^c
BS	0.1613 ± 0.0107 ^{bc}	91.00 ± 5.44 ^a	19 ± 0 ^b
CS	0.1739 ± 0.0096 ^{ab}	87.83 ± 3.06 ^a	19 ± 0 ^b
DS	0.1802 ± 0.0115 ^a	84.50 ± 12.57 ^a	18 ± 0 ^a
AI	0.1076 ± 0.0051 ^d	84.33 ± 3.14 ^a	20 ± 0 ^c
BI	0.1431 ± 0.0052 ^c	82.00 ± 7.29 ^a	20 ± 0 ^c
CI	0.1131 ± 0.0118 ^d	85.17 ± 5.64 ^a	19 ± 0 ^b
DI	0.1323 ± 0.0112 ^c	84.33 ± 6.50 ^a	18 ± 0 ^a
E	0.0724 ± 0.0077 ^e	81.00 ± 8.81 ^a	39 ± 0 ^d

Tabella 02: Performance larvali di Hermetia illucens allevate sulle diverse diete sperimentali. Lettere diverse indicano differenze significative per $p < 0,05$.

Per quanto riguarda il periodo di sviluppo larvale (tempo impiegato dalle larve per raggiungere lo stadio di prepupa) sono state rilevate delle differenze statistiche tra le varie diete. Tutte le diete che prevedevano l'inclusione di microalghe (AS, BS, CS, DS, AI, BI, CI, DI) hanno mostrato tempi di sviluppo che variano tra i 18 e i 20 giorni. I tempi di sviluppo minori sono stati osservati in entrambe le diete dove è stata presente il 25% di inclusione di microalghe (DS e DI); mentre i maggiori tempi di sviluppo sono stati rilevati nella dieta di controllo (E) che ha impiegato 39 giorni per raggiungere lo stadio di prepupa.

In tabella 02 sono anche riportati i valori di sopravvivenza larvale nelle varie diete analizzate. Non sono presenti differenze statisticamente significative tra tutte le diete. Il tasso di sopravvivenza più alto è stato osservato nella dieta BS (91.00 ± 5.44) mentre il più basso nella dieta E (81.00 ± 8.81).

Le larve alimentate con la dieta E (0.0724 ± 0.0077) sono quelle che hanno dato origine a delle prepupe con il minor peso. Sono presenti inoltre delle rilevanti differenze statistiche tra i valori di peso di larve alimentate con *Isochrysis galbana* e *Schizochytrium* spp.. Le larve con il maggior peso sono state quelle alimentate con *Schizochytrium*, in particolare la dieta DS è quella che presenta i valori più alti (0.1802 ± 0.0115) mentre la dieta AS quelli più bassi (0.1430 ± 0.0124). Per quanto riguarda *Isochrysis galbana* invece i valori più elevati sono presenti nella dieta BI (0.1431 ± 0.0052) mentre i più bassi nella dieta AI (0.1076 ± 0.0051) (Grafico 01).

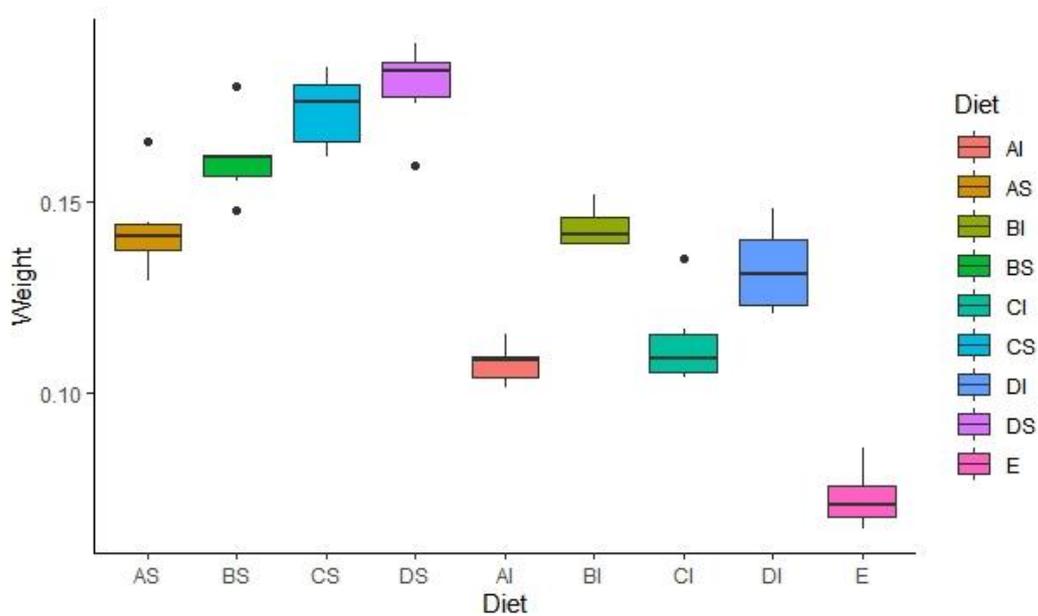


Grafico 01. Peso medio delle prepupe di *Hermetia illucens* allevate sulle diverse diete sperimentali.

5.2 Dinamiche di crescita e efficienza di riduzione del substrato

Diet	ECD	WRI (%/day)	GR (g/day)	FCR
AS	0.196 ± 0.011 ^a	1.532 ± 0.054 ^a	0.0070 ± 0.0006 ^c	5.206 ± 0.292 ^a
BS	0.142 ± 0.012 ^c	2.604 ± 0.197 ^b	0.0084 ± 0.0006 ^b	7.214 ± 0.668 ^c
CS	0.185 ± 0.027 ^{ab}	2.106 ± 0.269 ^{cd}	0.0090 ± 0.0005 ^b	5.596 ± 0.849 ^{ab}
DS	0.202 ± 0.012 ^a	1.986 ± 0.218 ^d	0.0099 ± 0.0007 ^a	5.038 ± 0.284 ^a
AI	0.179 ± 0.011 ^b	1.217 ± 0.087 ^{eg}	0.0053 ± 0.0003 ^e	5.759 ± 0.335 ^b
BI	0.201 ± 0.018 ^a	1.419 ± 0.116 ^f	0.0070 ± 0.0003 ^c	5.115 ± 0.480 ^a
CI	0.110 ± 0.011 ^d	2.227 ± 0.102 ^c	0.0058 ± 0.0006 ^d	9.476 ± 0.945 ^d
DI	0.228 ± 0.026 ^a	1.314 ± 0.067 ^{ef}	0.0072 ± 0.0006 ^c	4.533 ± 0.529 ^a
E	0.031 ± 0.006 ^e	1.156 ± 0.090 ^g	0.0018 ± 0.0002 ^f	34.176 ± 6.373 ^e

Tabella 03. Dinamiche di crescita ed efficienza di riduzione del substrato di larve di *Hermetia illucens* allevate sulle diverse diete sperimentali. Lettere diverse indicano differenze significative per $p < 0,05$.

L'ECD (Efficiency of Conversion of Digested food), presenta delle differenze statistiche tra le varie prove. I risultati peggiori, ossia i valori più bassi, sono stati riscontrati nella dieta E (0.031 ± 0.006) mentre i migliori sono quelli delle diete DS e DI rispettivamente 0.202 ± 0.012 e 0.228 ± 0.026 (Grafico 02).

Come per gli altri parametri il valore più basso di WRI (Waste Reduction Index) è stato osservato nella dieta E (1.156 ± 0.090), mentre nelle diete dove è presente un'inclusione di microalga non segue un andamento lineare. Il valore più alto è presente nella dieta BS (2.604 ± 0.197) mentre il più basso nella dieta AI (1.217 ± 0.087) (Grafico 03).

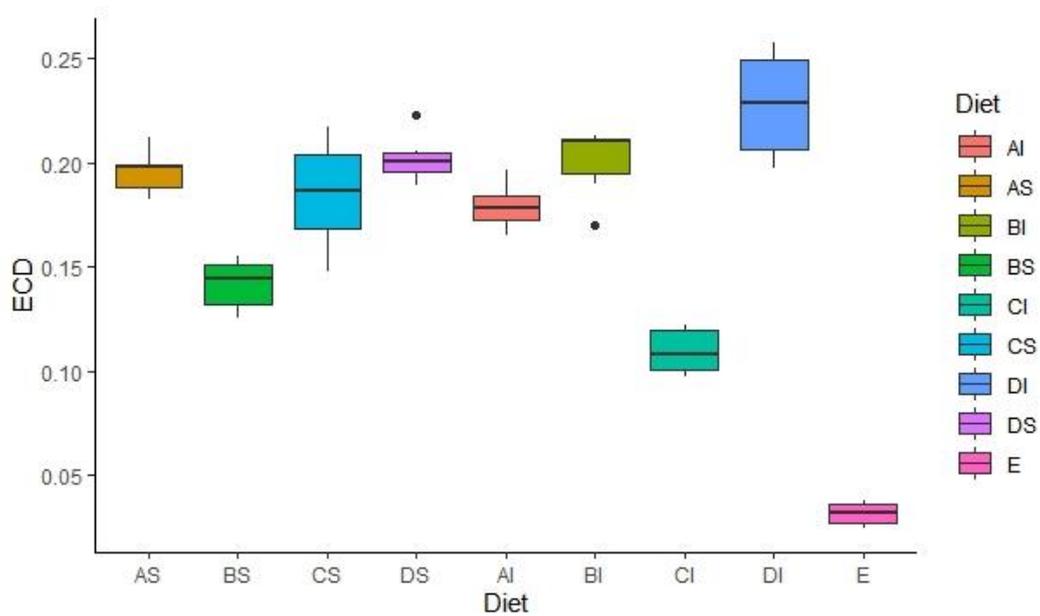


Grafico 02. *Efficiency of Conversion of Digested food per le diverse diete sperimentali.*

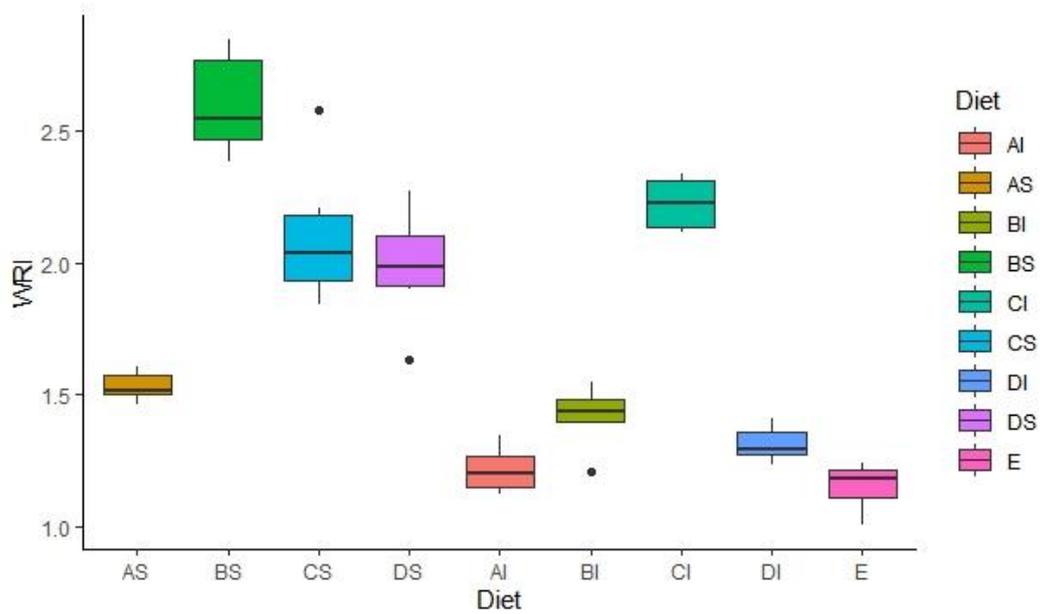


Grafico 03. *Waste Reduction Index per le diverse diete sperimentali.*

Per quanto riguarda il Growth Rate (GR), possiamo osservare lo stesso trend rilevato per il parametro del peso delle prepupe. I valori più alti sono stati rilevati nelle diete contenenti *Schizochytrium* spp., di cui la dieta DS mostra i valori maggiori (0.0099 ± 0.0007). Il valore più basso in assoluto è stato osservato nella dieta E (0.0018 ± 0.0002) mentre le diete con inclusione di *Isochrysis galbana* presentano i risultati intermedi (Grafico 04).

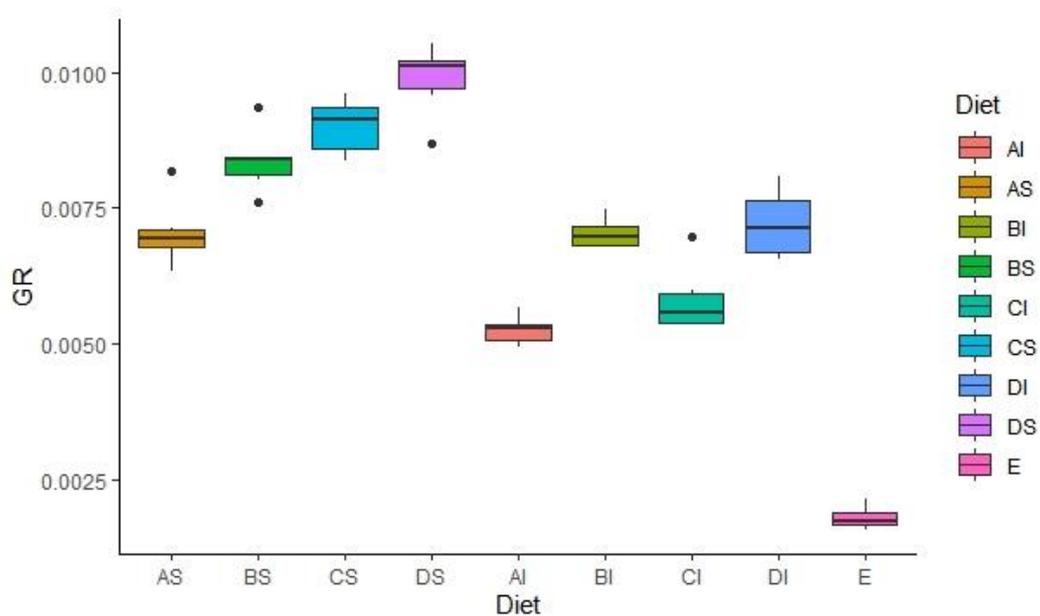


Grafico 04. Growth Rate per le diverse diete sperimentali.

L'FCR (Feed Conversion Ratio), mostra il suo valore più alto, ossia il peggiore, nella dieta E (34.176 ± 6.373). I valori migliori invece sono, per entrambe le microalghe, nelle diete con la maggiore inclusione (DS = 5.038 ± 0.284 , DI = 4.533 ± 0.529) (Grafico 05).

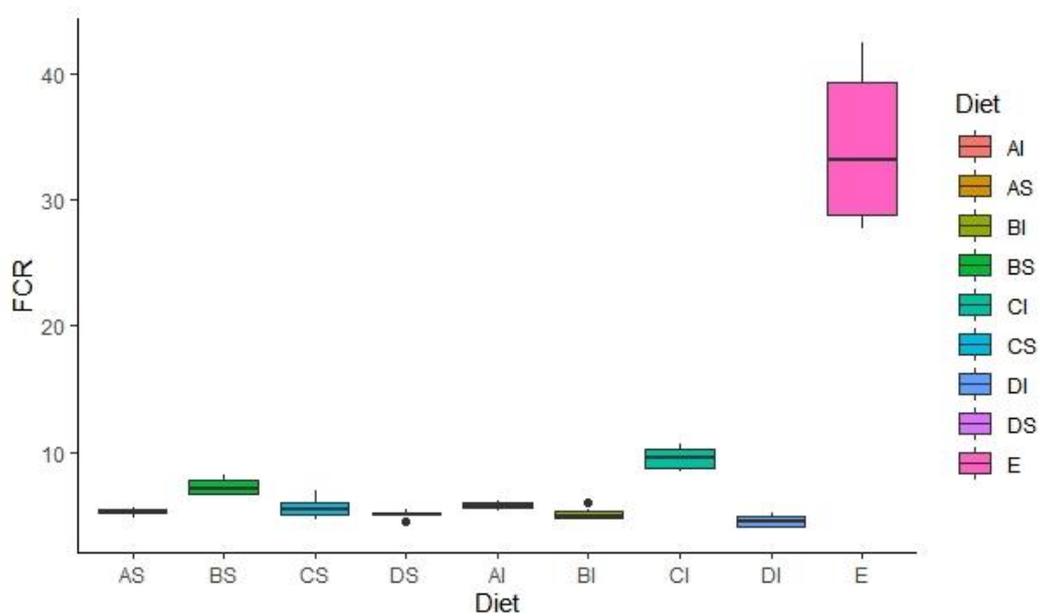


Grafico 05. Feed Conversion Ratio per le diverse diete sperimentali.

5. CONCLUSIONI

Lo studio effettuato pone il suo obiettivo sull'analisi delle performance larvali di *Hermetia Illucens* alimentata con otto differenti diete sperimentali composte da sottoprodotti/scarti del processo di torrefazione del caffè arricchiti di diverse percentuali di due microalghe *Schizochytrium* spp e *Isochrysis galbana*. In particolare, sono stati scelti sette diversi parametri per l'analisi del benessere e dell'efficienza di conversione del substrato: peso delle prepupe, sopravvivenza larvale, tempo di sviluppo, ECD, WRI, GR, FCR. I risultati ottenuti hanno evidenziato come la dieta DS (25% inclusione di microalga *Schizochytrium* spp.) sia risultata la dieta migliore: i) per il peso finale delle prepupe, che risulta essere di quasi tre volte maggiore rispetto alla dieta E di controllo; ii) per i tempi di sviluppo, metà della tempistica rispetto alla dieta E; iii) per l'efficienza di conversione (ECD), sei volte superiore alla dieta E; iv) per l'aumento di peso giornaliero (GR) con valori di cinque volte superiori; e v) per la quantità di substrato consumata (FCR) che risulta invece essere di quasi sette volte inferiore rispetto alla dieta E, mostrando come *H. Illucens*, in substrati arricchiti di microalghe, necessiti di una quantità inferiore di substrato per raggiungere lo stadio di larva matura.

Per quanto riguarda la sopravvivenza larvale la dieta BS ha mostrato valori significativamente più alti, seppure i risultati di DS e CS non si discostano di molto. La dieta di controllo E (priva di microalghe) è risultata essere la peggiore per quanto riguarda i valori di tutti i parametri, con i valori più bassi di peso delle prepupe, ECD, WRI e GR e i più alti di FCR e tempi di sviluppo. Questi risultati potrebbero derivare dalla presenza di fattori anti-nutrizionali che inibiscono l'assunzione delle proteine a livello dell'apparato digerente degli insetti, come inibitori della tripsina (Opstvedt *et al.*, 2003). In parallelo anche l'alta concentrazione di fenoli contenuti

nel coffee silverskin potrebbero influenzare negativamente le performance di crescita delle larve, alzando i livelli di mortalità.

In conclusione, si può confermare che le diete con una percentuale di inclusione di microalghe maggiore (DS e CS) siano risultati i substrati di alimentazioni con le maggiori performance delle larve di *H. illucens*. Le larve hanno trovato probabilmente il rapporto ottimale tra nutrienti e sostanze necessarie per il loro sviluppo, incrementando tutti i parametri presi in analisi e raggiungendo i risultati migliori.

6. BIBLIOGRAFIA

ABNT—Associação Brasileira de Normas Técnicas 1987. - Resíduos Sólidos—Classificação—NBR 10.004. ABNT, Rio de Janeiro, Brazil.

Adamo I. 2008. - Prima segnalazione faunistica per la Basilicata di *Hermetia illucens* (Linné, 1758) (Diptera: Stratiomyidae). - *Il Naturalista Campano*, (2), 1–3.

Alsager O. A., Alnajrani M. N., Alhazzaa, O. 2018. - Decomposition of antibiotics by gamma irradiation: Kinetics, antimicrobial activity, and real application in food matrices. - *Chemical Engineering Journal*, 338, 548-556.

Ansoff H.I., Kipley D., Lewis A.O., Helm-Stevens R., Ansoff R. 2018. - *Implanting strategic management*. – Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.

Arya M., Rao L. J. M. 2007. - An impression of coffee carbohydrates. - *Critical reviews in food science and nutrition*, 47(1), 51-67.

Antonio, A. G., Moraes, R. S., Perrone, D., Maia, L. C., Santos, K. R. N., Iório, N. L., Farah, A. 2010. - Species, roasting degree and decaffeination influence the antibacterial activity of coffee against *Streptococcus mutans*. - *Food Chemistry*, 118(3), 782-788.

Ayadi R., Arbak E., Pieter De Groen W. 2012. - Regulation of European banks and business models: towards a new paradigm? - Centre for European Policy Studies, Brussels.

Aussant, J., Guihéneuf, F., & Stengel, D. B. (2018). Impact of temperature on fatty acid composition and nutritional value in eight species of microalgae. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(12), 5279-5297.

Bandara T. 2018. - Alternative feed ingredients in aquaculture: Opportunities and challenges. - *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(2), 3087-3094.

Barbato F., Campiotti C., Giagnacovo G., Pignatelli V., Tumminelli D., Viola C., Diorato E. 2012. - Sfruttamento delle microalghe: tra realtà e prospettive, 19-28.. GREEN: LA SCIENZA AL SERVIZIO DELL'UOMO E DELL'AMBIENTE, 26(26), 19-28.

Barragan-Fonseca K.B., Dicke M., van Loon J.J.A. 2018. Influence of larval density and dietary nutrient concentration on performance, body protein, and fat contents of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*). *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 166(9), 761-770.

Becker E.W. 2007. - Micro-algae as a source of protein. - *Biotechnology advances*, 25(2), 207-210.

Belghit I., Liland N.S., Gjesdal P., Biancarosa I., Menchetti S., Li Y., Waagbø R., Krogdahl A., Jan Lock E. 2019. - Black soldier fly larvae meal can replace fish meal in diets of sea-water phase Atlantic salmon (*Salmo salar*). - *Aquaculture*, 503, 609-619.

Belitz H. D., Grosch W., Schieberle P. 2009. - Coffee, tea, cocoa. In: Belitz H.D., Grosch W., Schieberle P. *Food chemistry*, 938-970.

Bohnes F. A., Laurent A. 2019. - LCA of aquaculture systems: methodological issues and potential improvements. - *The International Journal of Life Cycle Assessment*, 24(2), 324-337.

Booth D.C., Sheppard. C., 1984. - Oviposition of the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae): eggs, masses, timing, and site characteristics. - *Environmental Entomology*, 13, 421-423.

Bondari K., Sheppard D.C. 1981. - Soldier fly larvae as feed in commercial fish production.- *Aquaculture*, 24, 103-109.

Borrelli R.C., Esposito F., Napolitano A., Ritieni A., Fogliano V. 2004. - Characterization of a new potential functional ingredient: coffee silverskin. - *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1338–1343.

Briscoe, A. D., & Chittka, L. (2001). The evolution of color vision in insects. *Annual review of entomology*, 46(1), 471-510.

Bruni L., Pastorelli R., Viti C., Gasco L., Parisi G. 2018. - Characterisation of the intestinal microbial communities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed with *Hermetia illucens* (black soldier fly) partially defatted larva meal as partial dietary protein source. - *Aquaculture*, 487, 56-63.

Bukkens S.G.F. 2005. - Insects in the human diet: nutritional aspects. In M.G. Paoletti, (Ed.) Ecological implications of minilivestock; role of rodents, frogs,

snails, and insects for sustainable development. - New Hampshire Science Publishers, 545–577.

Čičková H., Newton, G.L., Lacy R.C., Kozánek, M. 2015. The use of fly larvae for organic waste treatment. *Waste management*, 35, 68-80.

Claude B. 1979. - Étude bibliographique: utilisation des sous-produits du café. - *Café Cacao Thé*, 23 (2), 146–152

Cunha M.R. 1992. - Apêndice estatístico. In E. L. Bacha, R. Greenhill (Eds.), 150 anos de café. - Rio de Janeiro: Martins M., Johnston E., 286-388.

Cutrignelli, M. I., Messina, M., Tulli, F., Randazzo, B., Olivotto, I., Gasco, L., ... & Bovera, F. (2018). Evaluation of an insect meal of the Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) as soybean substitute: Intestinal morphometry, enzymatic and microbial activity in laying hens. *Research in veterinary science*, 117, 209-215.

Costa A.S., Alves R.C., Vinha A.F., Barreira S.V., Nunes M.A., Cunha L.M., Oliveira M.B.P.P. 2014. - Optimization of antioxidants extraction from coffee silverskin, a roasting by-product, having in view a sustainable process. - *Industrial Crops and Products Journal*, 53, 350–357.

Dahiya S., Kumar A. N., Sravan J. S., Chatterjee S., Sarkar O., Mohan S. V. 2018. - Food waste biorefinery: sustainable strategy for circular bioeconomy. - *Bioresource technology*, 248, 2-12.

Daniel W.W., Cross C.L. 2018. - Biostatistics: a foundation for analysis in the health sciences. - Wiley.

Cruz G.M. 1983. - Resíduos de cultura e indústria. - *Informe Agropecuário*, 9, 32–37.

de Melo Pereira G.V., Soccol V.T., Pandey A., Medeiros A.B.P., Lara J.M.R.A., Gollo A.L., Soccol C.R. 2014. - Isolation, selection and evaluation of yeasts for use in fermentation of coffee beans by the wet process. - *International journal of food microbiology*, 188, 60-66.

De Smet J., Wynants E., Cos P., van Campenhout L. 2018. - Microbial community dynamics during rearing of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) and impact on exploitation potential. - *Applied and Environmental Microbiology*, 84(9), e02722-17.

Didanna H.L. 2014. - A critical review on feed value of coffee waste for livestock feeding. - *World Journal of Biology and Biotechnology*, 2, 072-86.

Diener S., Zurbrügg C., Tockner K. 2009. - Conversion of organic material by black soldier fly larvae – Establishing optimal feeding rates. - *Waste Management & Research*, 27, 603-610.

Drew D. 2014. - AgriProtein: Building the worlds' largest insect rearing protein farm – a history and vision. In: Vantomme P., Munke C., van Huis A. (Eds.), 1st International conference “Insects to Feed the World”. - Wageningen University, Ede-Wageningen, The Netherlands.

Dutra E.R, Franca A.S., Oliveira L.S., Ferraz V. 2001. - A preliminary study on the feasibility of using composition of coffee roasting exhaust gas for the determination of the degree of roast. - *Journal of Food Engineering*, 47 (3), 241–246.

Etienne H. 2005. - Somatic embryogenesis protocol: coffee (*Coffea arabica* L. and *C. canephora* P.). In: Jain S.M., Gupta P.K., Protocol for somatic embryogenesis in woody plant, 167–168.

Everest Canary G., 2009. - Diseño y gestion de un proceso para reciclar desechos organicos con la larva *Hermetia illucens* para producir harina de larva. - Tesis de Maestria, Facultad de ingeniera Chia, Universidad de la Sabana, 106 pp.

FAO 2009. - How to feed the world in 2050. Technical papers from the Expert Meeting on How to Feed the World in 2050, Rome, Italy, 12–13 October.

FAO 2018. - The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals. Rome, Italy

Foley J.A., Ramankutty N., Brauman K.A., Cassidy E.S., Gerbe, J. S., Johnston M., O’ Connel C., Ray D.K., West P.C., Balzer C., Bennet E.M., Carpenter S.R., Hill J., Monfreda C., Polasky S., Rockstrom J., Sheehan J., Siebert S., Tilman D., Zaks D.P.M. 2011. - Solutions for a cultivated planet. - *Nature*, 478(7369), 337.

Franca A.S., Gouvea B.M., Torres C., Oliveira L.S., Oliveira E.S. 2009. - Feasibility of ethanol production from coffee husks. - *Biotechnology letters*, 31(9), 1315-1319.

Franca A.S., Mendonça J.C., Oliveira S.D. 2005. - Composition of green and roasted coffees of different cup qualities. - *LWT-Food Science and Technology*, 38(7), 709-715.

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

Fujioka K., Shibamoto T. 2008. - Chlorogenic acid and caffeine contents in various commercial brewed coffees. - *Food Chemistry Journal*, 106(1), 217-221.

Gerber P. J., Steinfeld H., Henderson B., Mottet A., Opio C., Dijkman J., Falcucci A., Tempio, G. 2013. - Tackling climate change through livestock: a global assessment of emissions and mitigation opportunities. - Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome.

Gerland P., Raftery A.E., Ševčíková H., Li Nan, Gu D., Spoorenberg T., Alkema L., Fosdick B. K., Chunn J., Lalic N., Bay G., Buettner T., Heilig G. H., Wilmoth J. 2014. - World population stabilization unlikely this century. - *Science*, 346 (6206), 234-237.

Ginz M., Balzer H.H., Bradbury A.G., Maier H.G. 2000. - Formation of aliphatic acids by carbohydrate degradation during roasting of coffee. - *European Food Research and Technology*, 211(6), 404-410.

Givens D.I., Barber W.P. 1986. - In vivo evaluation of spent coffee grounds as a ruminant feed. - *Agricultural Wastes*, 18, 69–72.

Gobbi P., Martinez-Sanchez A., Rojo S. 2013. The effects of larval diet on adult life-history traits of the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). *European Journal of Entomology*, 110(3), 461.

Guillén J., Macher C., Merzéréaud M., Boncoeur J., Guyade, O. 2015. - Effects of the Share Remuneration System on Fisheries Management Targets and Rent Distribution. - *Marine Resource Economics*, 30 (2), 123-138.

Guiry, M. D., & Guiry, G. 2. (2008). AlgaeBase. *AlgaeBase*.

Hale O. M. 1973. - Dried *Hermetia illucens* larvae (Diptera: Stratiomyidae) as a feed additive for poultry. - *Journal of the Georgia Entomological Society*, 8, 16-20.

Halloran A., Vantomme P., Hanboonsong Y., Ekesi S. 2015. Regulating edible insects: the challenge of addressing food security, nature conservation, and the erosion of traditional food culture. - *Food Security*, 7(3), 739-746.

Hammond B.G., Mayhew D.A., Holson J.F., Nemeč M.D., Mast R.W., Sander W.J. 2001. - Safety assessment of DHA-Rich microalgae from *Schizochytrium* sp.: II. Developmental toxicity evaluation in rats and rabbits.- *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 33(2), 205-217.

Hardouin J., Mahoux G. 2003. - Zootechnie d'insectes-Elevage et utilisation au bénéfice de l'homme et de certains animaux. - In: Bureau pour l'Echange et la Distribution de l'Information sur le Mini-élevage (BEDIM), 164 p.

Henry M.A., Gai F., Enes P., Pérez-Jiménez A., Gasco L. (2018). Effect of partial dietary replacement of fishmeal by yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) larvae meal on the innate immune response and intestinal antioxidant enzymes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). - *Fish & shellfish immunology*, 83, 308-313.

Hernández J.A., Heyd B., Trystram G. 2008. - Prediction of brightness and surface area kinetics during coffee roasting. - *Journal of Food Engineering*, 89 (2), 156-163.

James M.T. 1935. - The genus *Hermetia* in the United States (Diptera: Stratiomyidae). - *Bulletin Brooklyn Entomological Society*. 30, 165–170.

Jeong J. 2014. – Perspectives of insects industry in South Korea: Government policies and R&D strategies. In: 1st International conference “Insects to Feed the World” (Vantomme P., Munke C., van Huis A. Eds.). - Wageningen University, Ede-Wageningen, The Netherlands.

Jiménez-Zamora A., Pastoriza S., Rufián-Henares J.A. 2015. - Revalorization of coffee by-products. Prebiotic, antimicrobial and antioxidant properties. - *LWT-Food Science and Technology*, 61(1), 12-18.

Kim J.G., Choi Y.C., Choi J.Y., Kim W.T., Jeong G.S., Park K.H., Hwang S.J. 2008. - Ecology of the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera; Stratiomyidae) in Korea. - *Korean Journal of Applied Entomology*, 47, 337–343.

Kondamudi N., Mohapatra S. K., Misra M. 2008. - Spent coffee grounds as a versatile source of green energy. - *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 11757–11760.

Leclercq M. 1997. - Á propos de *Hermetia illucens* (Linnaeus, 1758) ("soldier fly") (Diptera Stratiomyidae: Hermetiinae). - *Bulletin et Annales de la Societe Royale Belge d'Entomologie*, 133, 275-282.

Lima Filho O. D., Malavolta E. 2003. - Studies on mineral nutrition of the coffee plant (*Coffea arabica* L. cv. *Catuai Vermelho*): LXIV. Remobilization and re-utilization of nitrogen and potassium by normal and deficient plants. - *Brazilian journal of biology*, 63 (3), 481-490.

Livdahl, T. P. (1982). Competition within and between hatching chorots of a treehole mosquito. *Ecology*, 63(6), 1751-1760.

Machado E.S.M. 2009. - Reaproveitamento de resíduos da indústria do café como matéria-prima para a produção de etanol. – Master of Science thesis, Department of Biological Engineering, University of Minho, Braga, Portugal.

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

Manceron S., Ben Ari T., Dumas P. 2014. - Feeding proteins to livestock: global land use and food vs. feed competition. OCL. - *Oilseeds and Fats, Crops and Lipids*, 21(4), 408.

May B.M. 1961. - The occurrence in New Zealand and the life-history of the soldier fly *Hermetia illucens* (L.) (Diptera: Stratiomyidae). - *New Zealand Journal of Scienze*, 4, 55–65.

Meneguz, M., Schiavone, A., Gai, F., Dama, A., Lussiana, C., Renna, M., Gasco, L., 2018. Effect of rearing substrate on growth performance, waste reduction efficiency and chemical composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. *J. Sci. Food Agric.*

Merino G., Barange M., Blanchard J.L., Harle J., Holmes R., Allen I., Allison E.H., Badjeck M.C., Dulvy N.K., Holt J., Jennings S., Mullon C., Rodwell L.D. 2012. - Can marine fisheries and aquaculture meet fish demand from a growing human population in a changing climate? - *Global Environmental Change Journal*, 22(4), 795-806.

Mussatto S.I., Carneiro L.M., Silva J.P.A., Roberto I.C., Teixeira J. A. 2011. - A study on chemical constituents and sugars extraction from spent coffee grounds. - *Carbohydrate Polymers*, 83, 368–374.

Mussatto S. I., Dragone G., Roberto I.C. 2006. - Brewer's spent grain: generation, characteristics and potential applications. - *Journal of Cereal Science*, 43, 1–14.

Mussatto S. I., Machado E. M., Martins S. Teixeira, J. A. 2011. Production, composition, and application of coffee and its industrial residues - *Food and Bioprocess Technology*, 4(5), 661.

Nabais J. M. V., Nunes P., Carrott P.J., Carrott M., García A. M., Díaz-Díez M. A. 2008. - Production of activated carbons from coffee endocarp by CO₂ and steam activation. - *Fuel Processing Technology*, 89(3), 262-268.

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

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

Niglio S., Procentese A., Russo M.E., Sannia G., Marzocchella A. 2017. Ultrasound-assisted dilute acid pretreatment of coffee silverskin for biorefinery applications. *Chemical Engineering Transactions*, 57, 109-114.

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.

Opstvedt J., Nygård E., Samuelsen T.A., Venturini G., Luzzana U., Mundheim H. 2003 - Effect on protein digestibility of different processing conditions in the

production of fish meal and fish feed. - *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83 (8), 775-782

Osimani A., Milanović, V., Roncolini, A., Riolo, P., Ruschioni, S., Isidoro, N., Loreto N., Franciosi E., Tuohy K., Olivotto I., Zarantoniello M., Cardinali F., Garofalo C., Aquilanti L., Clementi F. 2019. *Hermetia illucens* in diets for zebrafish (*Danio rerio*): A study of bacterial diversity by using PCR-DGGE and metagenomic sequencing. *Plos One*,14(12), e0225956.

Park, H.H. 2016. Black soldier fly larvae manual. University of Massachusetts Amherst: Amherst, MA, USA.

Packer, M. J., & Corbet, P. S. (1989). Size variation and reproductive success of female *Aedes punctor* (Diptera: Culicidae). *Ecological Entomology*, 14(3), 297-309.

Richmond, A., & Hu, Q. (2013). *Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology*. John Wiley & Sons.

Rodrigues F., Palmeira-de-Oliveira A., das Neves J., Sarmiento B., Amaral M.H., Oliveira M. B. P. 2015. - Coffee silverskin: a possible valuable cosmetic ingredient. - *Pharmaceutical biology*, 53(3), 386-394.

Roos N. Owino V., Kinyuru J., Ekesi S., Courtwright G., Drew D., Hanboonsong Y., Vantomme P., Chamnan C., Olsen S.B., Jensen A.B., Ayienko M. 2014. GREEiNSECTS: a multidisciplinary research project on potentials and barriers for insect-farming for food and feed in Kenya. In: Vantomme P., Munke C., van Huis

A. (Eds.), 1st International conference “Insects to Feed the World”. - Wageningen University, Ede-Wageningen, The Netherlands.

Rufián-Henares J.A., de la Cueva S.P. 2009. Antimicrobial activity of coffee melanoidins – a study of their metal-chelating properties. - *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 432-438.

Rufián-Henares J.A., Morales F.J. 2007a. - Antimicrobial activity of melanoidins. - *Journal of Food Quality*, 30, 160-168.

Rufián-Henares J.A., Morales F.J. 2007b. Functional properties of melanoidins: In vitro antioxidant, antimicrobial and antihypertensive activities. - *Food Research International Journal*, 40, 995-1002.

Rumpold B. A., Schlüter O. K. 2013. - Nutritional composition and safety aspects of edible insects. - *Molecular nutrition & food research Journal*, 57, 802-823.

Saenger M., Hartge E.-U., Werther J., Ogada T., Siagi Z. 2001. - Combustion of coffee husks. - *Renewable Energy Journal*, 23, 103–121.

Salomone, R., Saija, G., Mondello, G., Giannetto, A., Fasulo, S., & Savastano, D. (2017). Environmental impact of food waste bioconversion by insects: application of life cycle assessment to process using *Hermetia illucens*. *Journal of Cleaner Production*, 140, 890-905.

Sánchez-Muros M.J., Barroso F.G., Manzano-Agugliaro F. 2014. - Insect meal as renewable source of food for animal feeding: a review. - *Journal of Cleaner Production*, 65, 16-27.

Scriber J.M., Slansky Jr.F., 1981. The nutritional ecology of immature insects. *Annual review of entomology*, 26(1), 183-211.

Sheppard C.D., Newton L., Thompson S.A., Savage S. 1994. - A value added manure management system using the black soldier fly. - *Bioresource Technology Journal*, 50, 275-279.

Sheppard D. C., Newton G. L. 2000. - Valuable byproducts of a manure management system using the black soldier fly. A literature review with some current results. In: Proceedings of the 8th international symposium of animal, agricultural and food processing wastes. - American Society of Agricultural Engineers. St. Joseph, 35-39.

Sheppard C., Tomberlin J.K., Joyce J.A., Kiser B.C., Sumner S.M. 2002. - Rearing methods for the black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae). - *Journal of Medical Entomology*, 39, 695-698.

Shepherd C.J., Jackson A.J. 2013. - Global fishmeal and fish oil supply: inputs, outputs and markets. - *Journal of fish biology*, 83(4), 1046-1066.

Silva M.A., Nebra S. A., Machado Silva M.J., Sanchez C.G. 1998. - The use of biomass residues in the Brazilian soluble coffee industry. - *Biomass and Bioenergy*, 14, 457-467.

Silva Vaz, B., Moreira, J. B., de Morais, M. G., & Costa, J. A. V. (2016). Microalgae as a new source of bioactive compounds in food supplements. *Current Opinion in Food Science*, 7, 73-77

Sideris V.F., Tsagkarakis A. E. 2017. - Immature development time of *Hermetia illucens* L. in different varieties of feed. - *Advances in Entomology*, 5(3), 109.

Sogari G., Amato M., Biasato I., Chiesa S., Gasco L. 2019. The Potential role of insects as feed: A Multi-Perspective Review. - *Animals*, 9(4), 119.

Spranghers T., Ottoboni M., Klootwijk C., Owyn A., Deboosere S., De Meulenaer B., Michielis J., Eeckhout M., De Clercq P., De Smet S. 2017. - Nutritional composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) prepupae reared on different organic waste substrates. - *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(8), 2594-2600.

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.

Tacon A.G., Metian M. 2008. - Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. - *Aquaculture*, 285 (1-4), 146-158.

Taunay A.E. 1939. - História do café no Brasil. No Brasil Imperial 1822–1872. - Departamento Nacional do Café, Rio de Janeiro, Brazil.

Thlusty M.F., Thorsen Ø. 2017. - Claiming seafood is ‘sustainable’ risks limiting improvements. - *Fish and fisheries*, 18 (2), 340-346.

Tomberlin J.K., Sheppard DC., Joyce J.A., Kiser B.C., Sumner S.M. 2002. - Rearing methods for the black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae). - *Journal of Medical Entomology*, 39(4), 695-698.

Tomberlin J.K., Adler P.H., Myers H.M. 2009. - Development of the black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) in relation to temperature. - *Environmental Entomology*, 38(3), 930-934.

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

Trugo L. 2003. - Coffee. In B. Caballero, L. Trugo, P. Finglas (Eds.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. - London: Academic.

Trugo L.C., Macrae R. 1984. - A study of the effect of roasting on the chlorogenic acid composition of coffee using HPLC. - *Food Chemistry Journal*, 15, 219–227.

Truzzi C., Annibaldi A., Girolametti F., Giovannini L., Riolo P., Ruschioni S., Olivotto I., Illuminati S. 2020a. A chemically safe way to produce insect biomass

for possible application in feed and food production. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(6), 2121.

Truzzi C., Giorgini E., Annibaldi A., Antonucci M., Illuminati S., Scarponi G., Riolo P., Isidoro N., Conti C., Zarantoniello M., Cipriani R., Olivotto I. 2020b. Fatty acids profile of black soldier fly (*Hermetia illucens*): Influence of feeding substrate based on coffee-waste silverskin enriched with microalgae. *Animal Feed Science and Technology*, 259, 114309.

Truzzi, C., Illuminati, S., Girolametti, F., Antonucci, M., Scarponi, G., Ruschioni, S., Riolo P., Annibaldi, A. 2019. Influence of feeding substrates on the presence of toxic metals (Cd, Pb, Ni, As, Hg) in larvae of *Tenebrio molitor*: Risk Assessment for Human Consumption. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(23), 4815.

Turchetto M., Vanin S. 2004. - Forensic entomology and globalisation. *Parassitologia*, 46(1-2), 187-190.

Van Huis A., Van Itterbeeck J., Klunder H., Mertens E., Halloran A., Muir G., Vantomme P. 2013. Edible insects: future prospects for food and feed security. - FAO Forestry paper, (171).

Vargas A., Randazzo B., Riolo P., Truzzi C., Gioacchini G., Giorgini E., Loreto N., Ruschioni S., Zarantoniello M., Antonucci M., Polverini S., Cardinaletti G., Sabbatini S., Tulli F., Olivotto I. 2018. - Rearing Zebrafish on Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*): Biometric, Histological, Spectroscopic, Biochemical, and Molecular Implications. *Zebrafish*, 15(4), 404-419.

Veldkamp T., Van Duinkerken G., van Huis A., Lakemond C.M.M., Ottevanger E., Bosch G., Van Boekel T. 2012. - Insects as a Sustainable Feed Ingredient in Pig and Poultry Diets: a Feasibility Study. *Wageningen Livestock Research*, 638.

Venturi F. 1956. - Notulae Dipterologice X. Specie nuove per l'Italia. - *Bollettino della Società Entomologica Italiana*, 3-4, 56.

Waldbauer G.P. 1968. The consumption and utilization of food by insects. In *Advances in insect physiology* (Vol. 5, pp. 229-288). Academic Press.

Wang, H., Shi, Y., Liu, X., & Zhang, R. (2010). Growth and development of *Boettcherisca peregrine* under different temperature conditions and its significance in forensic entomology. *Journal of Environmental Entomology*, 32(2), 166-172.

Zarantoniello M., Zimbelli A., Randazzo B., Compagni M.D., Truzzi, C., Antonucci M., Loreto N., Osimani A., Milanovic V., Giorgini E. Cardinaletti G., Tulli F., Cipriani R., Gioacchini G., Olivotto I. 2020. Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) reared on roasted coffee by-product and *Schizochytrium* sp. as a sustainable terrestrial ingredient for aquafeeds production. *Aquaculture*, 518, 734659.

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

Zarantoniello M., Bruni L., Randazzo B., Vargas A., Giocachini G., Truzzi C., Annibaldi A., Riolo P., Parisi G., Cardinaletti G., Trulli F., Olivotto I. 2018. - Partial dietary inclusion of *Hermetia illucens* (black soldier fly) full fat prepupae in zebrafish feed: biometric histological biochemical and molecular implications. *Zebrafish* 5: 519–53

7. SITOGRAFIA

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

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

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

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

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

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

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

“*Hermetia illucens*” *Wikipedia, L'enciclopedia libera*. Tratto il 3 agosto 2019, 10:09 da <https://it.wikipedia.org/wiki/>

“Insetti e mangimi animali” *Veterinaria e sicurezza alimentare*. Tratto il 18 agosto 2019, 14.33 da <http://www.veterinariaalimenti.marche.it/>

“La lavorazione del chicco di caffè” *S-caffè*. Tratto il 31 agosto 2019, 21.33 da <https://www.s-caffe.com>

“L'utilizzo dei sottoprodotti di origine animale nel settore dei mangimi” *Veterinaria e sicurezza alimentare*. Tratto il 29 agosto 2019, 14.37 da <http://www.veterinariaalimenti.marche.it/>

“Nuovo catalogo materie prime per mangimi, il Regolamento” *Coldiretti*. Tratto il 30 agosto, 12.03 da <https://www.coldiretti.it>

“The Human Use of Insects as a Food Resource: A Bibliographic Account in Progress” *Food Insects*. Tratto il 13 giugno 2019, 10.31 da <http://www.food-insects.com>

“Tipologie di mangimi” ASSALZOO. Associazione Nazionale tra i Produttori di Alimenti Zootecnici. Tratto il 30 agosto 2019, 22.34 da <https://assalzoo.it>