



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

**DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE**

Corso di laurea magistrale in

**BIOLOGIA MOLECOLARE E APPLICATA  
CURRICULUM SCIENZE DELLA NUTRIZIONE**

***Microalghe e grillo domestico: produzione sostenibile dei Novel Foods in un'ottica di economia circolare***

***Microalgae and house cricket: sustainable production of Novel Foods within a circular economy framework***

Tesi di laurea magistrale di:

Simona Anna Siena

Relatore:

Prof.ssa Truzzi Cristina

Correlatore:

Prof.ssa Norici Alessandra

Secondo correlatore:

Dott.ssa Ajdini Behixhe

Anno Accademico 2023/2024

## SOMMARIO

<b>1 INTRODUZIONE</b> .....	1
<b>1.1 Novel foods</b> .....	1
<b>1.1.1 Insetti edibili</b> .....	2
<b>1.1.1.1 Grillo domestico (<i>Acheta domesticus</i>)</b> .....	5
<b>1.1.2 Microalghe</b> .....	11
<b>1.1.2.1 <i>Chlorella vulgaris</i></b> .....	14
<b>1.1.2.2 <i>Nannochloropsis salina</i></b> .....	16
<b>1.1.2.3 <i>Phaeodactylum tricornutum</i></b> .....	18
<b>1.2 Economia circolare ed Ecosostenibilità</b> .....	20
<b>2 SCOPO DELLA TESI</b> .....	24
<b>3 MATERIALI E METODI</b> .....	25
<b>3.1 Disegno sperimentale</b> .....	25
<b>3.2 Test di tolleranza</b> .....	26
<b>3.3 Esperimento a partire da frass autoclavato</b> .....	29
<b>3.3.1 Crescita delle alghe</b> .....	30
<b>3.4 Preparazione dell'estratto di alghe</b> .....	31
<b>3.5 Allevamento <i>Acheta domesticus</i></b> .....	32
<b>3.6 Strumentazione per analisi</b> .....	33
<b>3.7 Reagenti e materiali</b> .....	36
<b>3.8 Trattamento e analisi dei campioni</b> .....	38
<b>3.8.1 Omogeneizzazione di <i>Acheta domesticus</i></b> .....	38

3.8.2 Liofilizzazione .....	38
3.8.3 Estrazione lipidica .....	39
3.8.4 Transesterificazione degli acidi grassi.....	43
3.8.5 Determinazione della composizione degli acidi grassi mediante Gas Cromatografo-Spettrometro di Massa .....	43
3.8.6 Indici nutrizionali .....	47
3.8.7 Controlli analitici.....	48
3.8.8 Determinazione delle proteine mediante Spettrofotometro .....	48
3.10 Analisi statistica .....	50
4 RISULTATI .....	51
4.1 Microalghe - <i>Nannochloropsis salina</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> e <i>Phaeodactylum tricornutum</i> .....	51
4.1.1 Crescita.....	51
4.1.2 Contenuto lipidico e composizione degli acidi grassi .....	54
4.1.3 Contenuto proteico .....	61
4.2 <i>Acheta domesticus</i> .....	62
4.2.1 Performance .....	62
4.2.2 Contenuto lipidico e composizione degli acidi grassi .....	65
4.2.3 Contenuto proteico .....	68
5 DISCUSSIONE.....	69
5.1 Microalghe - <i>Nannochloropsis salina</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> .....	69

<b>5.1.1 Crescita microalghe</b> .....	69
<b>5.1.2 Profilo nutrizionale</b> .....	71
<b>5.2 <i>Acheta domesticus</i></b> .....	72
<b>5.2.1 Crescita di <i>Acheta domesticus</i></b> .....	72
<b>5.2.2 Profilo nutrizionale di <i>Acheta domesticus</i></b> .....	73
<b>6 CONCLUSIONI</b> .....	77
<b>7 BIBLIOGRAFIA</b> .....	79

## ABBREVIAZIONI

<b>AD</b>	<i>Acheta domesticus</i>
<b>DHA</b>	Acido docosaesaenoico
<b>WW</b>	Wet Weight
<b>DW</b>	Dry Weight
<b>EPA</b>	Acido eicosapentaenoico
<b>FAs</b>	Acidi grassi
<b>EAA</b>	Amminoacidi essenziali
<b>MUFA</b>	Acidi grassi mono-insaturi
<b>PUFA</b>	Acidi grassi poli-insaturi
<b>RF</b>	Fattore di risposta
<b>SFA</b>	Acidi grassi saturi
<b>SI</b>	Standard interno
<b>SIM</b>	Monitoraggio dei singoli ioni
<b>TIC</b>	Corrente ionica totale

# 1 INTRODUZIONE

## 1.1 Novel foods

Entro il 2050, la popolazione mondiale dovrebbe arrivare a circa 9.8 miliardi di persone (OMS, 2019), e ciò comporterà un aumento della domanda di cibo, che si prevede arriverà fino a circa il 70% in più rispetto ai livelli attuali. La produzione di cibo sufficiente per la crescente popolazione rappresenta, quindi, una sfida molto importante per il futuro (Ajdini et al., 2024a). Il metodo tradizionale di allevamento di animali, inclusi bovini, suini, pollame e pesci, è ormai considerato insostenibile per via dell'eccessivo sfruttamento delle risorse limitate come terra, acqua e mangimi, e per gli impatti ambientali gravi, come le emissioni di gas serra, la perdita di biodiversità e la trasformazione degli ecosistemi (Guiné et al., 2021). Con l'innovazione e la globalizzazione, l'Unione Europea (UE) sta cercando di introdurre un numero sempre maggiore di prodotti alimentari sul mercato, cercando di soddisfare l'interesse crescente dei consumatori verso nuovi prodotti, nuove alternative alimentari e, soprattutto, scelte sostenibili dal punto di vista ambientale. Gli alimenti prodotti con nuove tecnologie, derivati da nuove fonti, nuove sostanze e alimenti tradizionali consumati in paesi non UE, non consumati in misura significativa all'interno dell'UE prima del 15 maggio 1997, sono chiamati "Novel Foods" secondo il Regolamento (UE) 2015/2283 (Ververis et al., 2020). Questo regolamento, in vigore dal 1° gennaio 2018, richiede un'autorizzazione pre-commercializzazione da parte della Commissione Europea (CE) per i nuovi alimenti, stabilendo le procedure per l'autorizzazione e l'uso degli stessi. Nel valutare la sicurezza dei Novel Foods, (EFSA, 2021). L'EFSA considera se:

- Il nuovo alimento in oggetto sia sicuro quanto quello di una categoria alimentare comparabile già esistente sul mercato all'interno dell'Unione;

- La composizione del nuovo alimento e le condizioni del suo utilizzo non comportano rischi per la sicurezza della salute umana nell'Unione;
- Il nuovo alimento, destinato a sostituire un altro alimento, non differisce da tale alimento in modo tale che il suo normale consumo sarebbe svantaggioso dal punto di vista nutrizionale per il consumatore.

Il termine Novel Foods si riferisce a cibi che non fanno parte delle abitudini alimentari tradizionali dei cittadini europei. Questi rappresentano l'integrazione delle diverse culture alimentari, dunque sono alimenti innovativi o prodotti che derivano dall'uso di nuove tecnologie e nuovi processi di produzione. In particolare, questi prodotti richiedono un processo di produzione diverso da quello standard dell'UE o derivato dall'applicazione di biotecnologie innovative (Zarbà et al., 2020). L'innovazione è senza dubbio un punto di partenza per il progresso economico e lo sviluppo. In alcuni studi è stato dimostrato che gli investimenti in nuove tecnologie hanno portato a tassi di produttività elevati e a una crescita economica rapida e positiva, dimostrando un effetto significativo sulla crescita economica (Zarbà et al., 2020). Alcuni esempi riguardano gli insetti edibili, come i grilli e le larve, considerati come una fonte sostenibile di proteine; alghe e microalghe, considerando specie non tradizionalmente consumate che offrono benefici nutrizionali unici; frutti esotici come il baobab e il noni, che non facevano parte della dieta europea prima del 1997; prodotti a base di proteine vegetali come sostituti della carne e altri prodotti sviluppati con nuove tecnologie.

### **1.1.1 Insetti edibili**

La rapida crescita della popolazione mondiale è causa di grande preoccupazione poiché la produzione di cibo da fonti animali tradizionali non può seguire questo aumento a causa della

non-sostenibilità degli allevamenti. Pertanto, sono necessarie fonti proteiche alternative (Huis et al., 2013). In questo contesto, negli ultimi anni è stato preso in considerazione l'allevamento di insetti, che presenta minori emissioni di gas serra, minor consumo di acqua e terra rispetto alla produzione di animali tradizionali, il che lo rende molto più ecologico (Perez-Santaescobal et al., 2023a). Gli insetti hanno un alto valore nutrizionale, con un contenuto proteico che varia, sulla base della materia secca, dal 13% al 77%, includendo un alto livello di aminoacidi essenziali (EAA) che può raggiungere, a seconda della specie, il 46-96% del totale (Kouřimská e Adámková, 2016). Il contenuto lipidico varia in base a diversi fattori, come lo stadio della vita e l'alimentazione, dal 10% al 60% nella materia secca, mostrando spesso un alto contenuto di acido linoleico, oleico e  $\alpha$ -linolenico (Ghosh et al., 2017a). Come riconosciuto dall'Organizzazione per l'Alimentazione e l'Agricoltura (FAO), tra i principali vantaggi legati all'utilizzo degli insetti vi è la loro capacità di convertire efficacemente un'ampia gamma di substrati in prodotti di valore come proteine e lipidi di alta qualità. Secondo la Piattaforma Internazionale degli Insetti per il Cibo e i Mangimi (IPIFF), i produttori di insetti in Europa hanno mostrato interesse nell'utilizzare materiali ecologicamente sostenibili per l'allevamento degli insetti, al fine di ridurre l'impronta del settore degli insetti e migliorare la sua circolarità (Ajdini et al., 2024a). Gli insetti sono poveri di acidi grassi polinsaturi (PUFA) ma, data la loro capacità di sequestrare ed assorbire i nutrienti, il loro profilo lipidico può essere modulato con la dieta (Liland et al., 2017a; Truzzi et al., 2020). Tra le specie di insetti autorizzate come nuovi alimenti in Europa, *Tenebrio molitor* (larva gialla della farina) autorizzata dal regolamento di esecuzione (UE) n. 2021/882 della Commissione del 10 giugno 2021, che ne autorizza l'immissione sul mercato come essiccata; *Locusta migratoria* (locusta migratoria), approvata dal regolamento di esecuzione (UE) 2021/1975 della Commissione del 12 novembre 2021, che ne autorizza l'immissione

sul mercato come congelata, essiccata e in polvere; *Acheta domesticus* (grillo domestico) autorizzato dal regolamento di esecuzione (UE) 2022/188 della Commissione del 10 febbraio 2022 che ne autorizza l'immissione sul mercato come congelato, essiccato e in polvere; *Alphitobius diaperinus* (larva minore della farina), quest'ultima approvata dal regolamento di esecuzione (UE) n. 2023/58 della Commissione del 5 gennaio 2023, che ne autorizza l'immissione sul mercato come congelate, in pasta, essiccate e in polvere. Tutte queste specie sono state introdotte come nuovo alimento a norma del regolamento UE 2015/2283 del Parlamento europeo e del consiglio, che modifica il regolamento di esecuzione (UE) n. 2017/2470 (Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, 2023, n°46). Una panoramica generale sul profilo nutrizionale delle specie suddette è presente in Tabella 1.

**Tabella 1.** Panoramica del profilo nutrizionale degli insetti edibili (% Dry Weight, DW) (Clarkson et al., 2018; Rumbos et al., 2019; Rumpold e Schlüter, 2013).

<b>Insetti commestibili</b>	<b>Proteine</b>	<b>Lipidi</b>	<b>Carboidrati</b>	<b>Fibra</b>	<b>Minerali</b>	<b>Amminoacidi essenziali</b>	<b>Vitamine</b>
<i>Tenebrio molitor</i>	45-60%	25-30%	5-10%	5-10%	P-Mg-K-Ca-Fe-Zn	Buona fonte, Quantità simile agli animali tradizionali	B12, riboflavina (B2), acido pantotenico (B5)
<i>Locusta migratoria</i>	60-70%	13-17%	3-10%	5-8%	Fe-Zn-Mg-K-Ca	Ottimo profilo, include tutti gli aminoacidi essenziali	A, B1, B2, B6, B12, E, K
<i>Alphitobius diaperinus</i>	45-55%	30-35%	5-10%	4-8%	Ca-P-K-Fe	Profilo simile ad altre specie di insetti, buoni livelli	B12, riboflavina (B2), acido pantotenico (B5), biotina
<i>Acheta domesticus (adulti)</i>	60-70%	18-23%	2-6%	5-10%	Ca-Fe-Mg-Zn-K	Tutti gli aminoacidi essenziali, fonte proteica completa	vitamine B2 (riboflavina), B12, e B9 (acido folico)

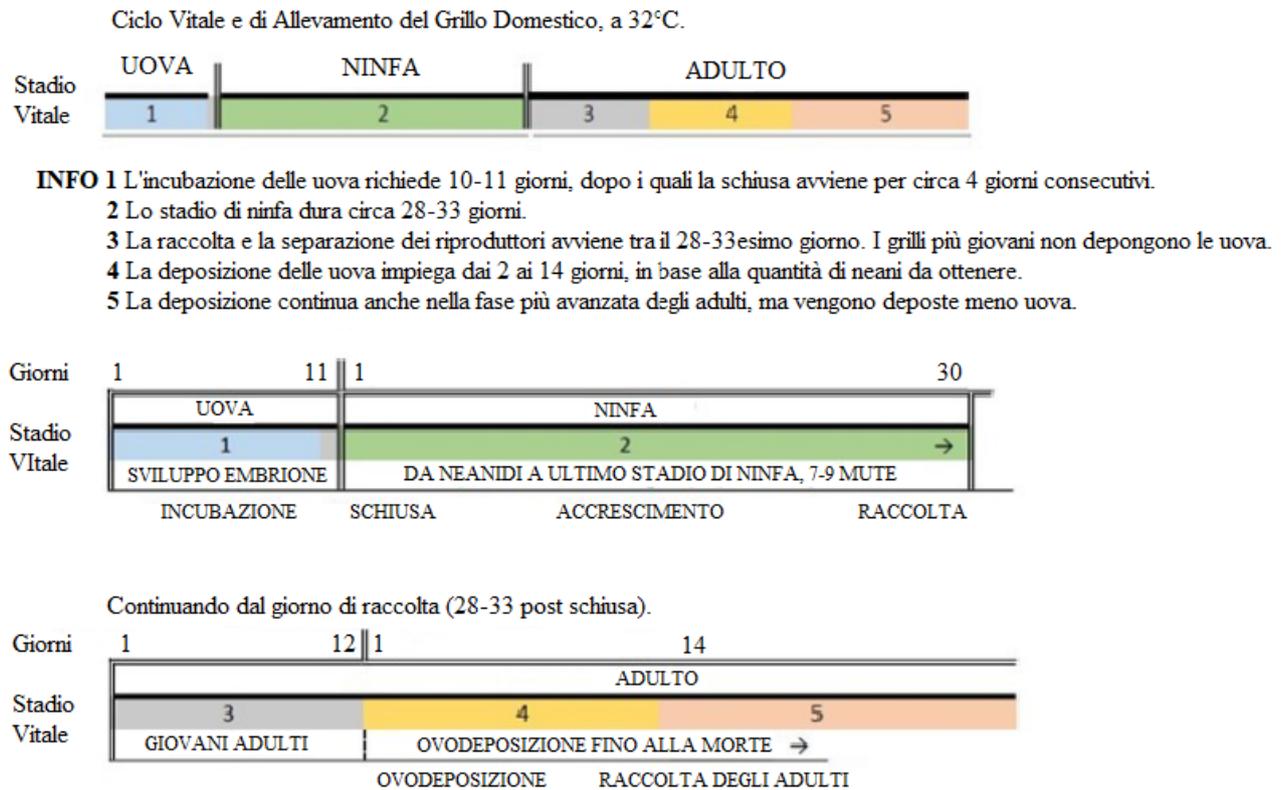
### 1.1.1.1 Grillo domestico (*Acheta domesticus*)

Il grillo domestico (*Acheta domesticus*, AD) (Figura 1), appartiene all'ordine degli Orthoptera ed alla famiglia dei Gryllidae, è originario del Sud-ovest Asiatico, ma oggi largamente distribuito anche in Europa (Morales-Ramos et al., 2020a). È una delle specie recentemente autorizzate come Novel Foods, grazie al suo profilo nutrizionale ricco di proteine e aminoacidi essenziali (EAA), lipidi, macro e micronutrienti (Ajdini et al., 2024), nonché alla eco-sostenibilità dei suoi allevamenti. I grilli, infatti, hanno un'elevata efficienza di conversione alimentare, richiedono meno acqua e spazio e producono meno gas serra (Huis et al., 2013), rispetto agli allevamenti tradizionali. Questi fattori rendono i grilli una scelta sostenibile per affrontare la crescente domanda di proteine a livello globale.



**Figura 1.** *Acheta domesticus*.

Il ciclo vitale del grillo prevede 3 fasi: uova, ninfa, adulto. Secondo uno studio condotto da due studiosi (Booth e Kiddell, 2007), i grilli risultano avere un ciclo d'allevamento più duraturo a temperature di 21-25°C, circa 17 giorni in più rispetto ad un ciclo di allevamento controllato a temperatura di 32°C, che prevede una durata di 28-33 giorni. Il numero di mute (processo di caduta e rigenerazione dell'esoscheletro) a cui AD va incontro è influenzato dalla durata del ciclo vitale e dalla temperatura ambientale. Ad esempio, a 30°C, si registrano 7-9 mute (Figura 2).



**Figura 2.** Fasi del ciclo vitale e dell'allevamento del grillo domestico a 32°C (Guida Nutrinsect 2021).

Il tasso di sviluppo e la durata del ciclo di vita dipendono prevalentemente dalla temperatura dell'ambiente circostante e dalla qualità del mangime fornito. A una temperatura di 32°C, il periodo di incubazione dura circa 8-10 giorni. Al termine della maturazione delle uova, le neanidi iniziano a schiudersi in un arco di tempo che può arrivare fino a 10 giorni, ma l'80% delle schiuse avviene nei primi 3-4 giorni (Nutrinsect, ricerca interna 2019).

Quando AD raggiunge lo stadio adulto, sviluppa ali e una striatura sull'addome. Al momento della maturazione sessuale, le femmine formano l'ovodepositore (Figura 3), un ago che consente la deposizione delle uova in profondità nel terreno. I maschi, invece, cominciano a emettere suoni per attirare le femmine durante il corteggiamento.



**Figura 3.** Differenza AD Femmina – Maschio.

Circa una settimana dopo la maturazione sessuale e l'accoppiamento, che avviene circa 42 giorni dopo la schiusa, inizia la deposizione delle uova. In natura, questo processo termina con la morte della femmina, quindi può protrarsi per due mesi o più (Clifford, 1985). Tuttavia, il tasso di deposizione delle uova diminuisce significativamente dopo 14 giorni dall'inizio. Durante questo periodo, una femmina può deporre fino a 1500 uova.

Studi dimostrano che una dieta ricca di proteine (circa il 20% di proteine grezze sul totale della dieta) assicura una crescita ottimale di AD (Nakagaki e Defoliart, 1991). Relativamente al contenuto proteico di AD (>70 g/100 g di dry weight, DW), mettendo a confronto 100 g di grilli con lo stesso quantitativo di carne di manzo e pollo, avremo che 100 g di grilli forniscono 69 g di proteine rispetto a 25.6 g di proteine nella carne di manzo e 39 g di proteine nel pollo (Finke, 2002). Inoltre, AD contiene tutti EAA (42.7% DW) (Tabella 2) in livelli paragonabili a quelli di uova, pollo, maiale e manzo, considerati le principali fonti proteiche per la dieta dell'uomo (Udomsil et al., 2019).

Tali livelli presenti in AD, potrebbero soddisfare il fabbisogno giornaliero di EAA per l'uomo Hackewitz, 2018. In particolare, gli elevati contenuti di lisina e treonina in AD potrebbero contribuire ad integrare le diete a base di cereali, che in genere sono povere di questi due EAA. L'acido glutammico e la glutammina sono gli aminoacidi più abbondanti ed anche

l'arginina è presente in elevate quantità, mentre sono presenti basse quantità di metionina, triptofano, e cisteina (Tabella 2) (Udomsil et al., 2019).

**Tabella 2.** Aminoacidi (g/100 g DW) contenuti in *A. domesticus* (Udomsil et al., 2019).

Aminoacidi	<i>A. domesticus</i>
Valina	4.50±0.03
Isoleucina	2.90±0.10
Leucina	3.80±0.14
Lisina	3.22±0.08
Treonina	1.65±0.05
Fenilalanina	2.38±0.00
Metionina	0.98±0.03
Istidina	1.72±0.02
Triptofano	0.43±0.03
Arginina	3.92±0.05
Asparagina + Acido Aspartico	4.61±0.23
Glutammina + Acido Glutammico	6.45±0.05
Serina	1.59±0.09
Glicina	2.60±0.15
Alanina	3.67±0.05
Citosina	0.40±0.00
Prolina	3.04±0.03
Tirosina	2.71±0.10
EAA <sup>1</sup>	21.58±0.28
NEAA <sup>2</sup>	28.97±0.48
Totale	50.55±0.20

<sup>1</sup>EAA: Aminoacidi essenziali.

<sup>2</sup>NEAA: Aminoacidi non essenziali.

Relativamente ai lipidi, anche noti come grassi, il loro contenuto in AD varia dal 8.9 al 43.9% (National Institute of Health, 2019) di FAs totali. Nel grillo, il profilo degli acidi grassi è influenzato dai fattori alimentari e ambientali (Ghosh et al., 2017b). Gli Acidi Grassi Saturi (SFA) sono gli acidi grassi predominanti, seguiti da acidi grassi monoinsaturi (MUFA) e acidi grassi polinsaturi (PUFA) (Tabella 3). I principali SFA presenti in AD sono l'acido palmitico (16:0) e l'acido stearico (18:0), mentre l'acido insaturo dominante è l'oleico (18:1n9) (Tabella 3).

**Tabella 3.** Composizione acidi grassi (g/100 g DW) in *A. domesticus* (Udomsil et al., 2019).

Acidi grassi	<i>A. domesticus</i>
10:0 Acido Caprico	0.01±0.00
11:0 Acido Undecilico	0
12:0 Acido Laurico	0.03±0.00
14:0 Acido Miristico	0.11±0.00
15:0 Acido Pentadecanoico	0.01±0.00
16:0 Acido Palmitico	5.87±0.31
17:0 Acido Eptadecanoico	0.08±0.00
18:0 Acido Stearico	1.83±0.09
20:0 Acido Arachidico	0.13±0.01
21:0 Acido Eicosenoico	0.01±0.00
22:0 Acido Benzoico	0.06±0.01
24:0 Acido Lignocerico	0.02±0.01
14:1 Acido Miristoleico	0.02±0.02
16:1 Acido Palmitoleico	0.15±0.01
18:1n9 Acido trans Elaidinico	0.03±0.00
18:1n9 Acido cis Oleico	3.90±0.24
20:1n11 Acido cis Eicosenoico	0.02±0.01
22:1n9 Acido Erucico	0.01±0.01
18:2n6 Acido trans Linoleilaidico	0
18:2n6 Acido cis Linoleico	1.17±0.36
20:2 cis 11,14 Acido cis Eicosadienoico	0.19±0.04
22:6n3 Acido Docosaesanoico	0
18:3n6 Acido cis Linolenico	0.01±0.00
18:3n3 Acido Linolenico	0.01±0.00
20:3n6 cis 8,11,14 Acido Eicosatrienoico	0.01±0.00
20:3n3 cis 11,14,17 Acido Eicosatrienoico	0.01±0.00
20:4n6 Acido Arachidonico	0
20:5n3 cis 5,8,11,14,17 Acido Eicosapentanoico	0.06±0.01
SFA <sup>1</sup>	8.15±0.35
MUFA <sup>2</sup>	4.14±0.25
PUFA <sup>3</sup>	1.46±0.33
Totale	13.74±0.76
ω3	0.07±0.01
ω6	1.13±0.35

<sup>1</sup>SFA: Acidi Grassi Saturi.<sup>2</sup>MUFA: Acidi Grassi Mono-Insaturi.<sup>3</sup>PUFA: Acidi Grassi Poli-Insaturi.

I grilli prodotti in commercio sono spesso poveri di acidi grassi ω3 e hanno rapporti ω6/ω3 non ottimali. È noto che, per la salute umana, è necessaria una certa quantità e proporzione di questi FA. È noto dalla letteratura che la composizione degli acidi grassi negli insetti, è influenzata dalla dieta. Da uno studio è emerso che il rapporto ω6/ω3 di AD alimentato con una dieta standard è pari a 36.2±1.32, ma con l'introduzione di olio di semi di lino

nell'alimentazione, ricco di  $\omega_3$ , il rapporto diminuisce significativamente a  $2.0 \pm 0.09$  (Ooninx et al., 2020), migliorando la qualità nutrizionale dell'insetto. Da un altro studio, nel quale AD è stato sottoposto ad una alimentazione con dieta standard presenta un rapporto  $\omega_6/\omega_3$  di 12.53, a differenza di una alimentazione che prevedeva la supplementazione di *Ascophyllum nodosum* (AN), una macroalga, in due concentrazioni diverse, quali 20% e 40% si arriva ad un rapporto  $\omega_6/\omega_3$  in AD, rispettivamente di 13.89 e 10.48 (Ajdini et al., 2024b). In riferimento al contenuto di carboidrati, AD presenta meno del 20%, con la chitina come carboidrato più abbondante (Collavo e Huang, 2005). Inoltre, AD può essere considerato una fonte preziosa di vitamine (come B12, riboflavina e vitamina E) e minerali (tra cui troviamo K, P e Na) (Ververis et al., 2022). In questo contesto, le condizioni di lavorazione possono influenzare i livelli vitaminici (come le vitamine termicamente labili), infatti alcuni studi hanno riportato la presenza in AD di polifenoli e del  $\beta$ -carotene (Ververis et al., 2022). In merito ai minerali invece, è stato appurato che AD durante il suo ciclo vitale può accumulare minerali in misura differente, con conseguenti livelli diversi durante le fasi di sviluppo.

La Commissione Europea considera prioritaria la sicurezza alimentare nei Novel foods. Per quanto riguarda il grillo, diversi studi hanno dimostrato che AD può essere allevato in ambiente controllato, riducendo il rischio di contaminazione microbiologica e chimica (Siddiqui et al., 2024). Sono stati sviluppati protocolli specifici per garantire che i grilli siano liberi da patogeni e tossine (Siddiqui et al., 2024). Nonostante i benefici nutrizionali e ambientali, l'accettazione culturale degli insetti commestibili nei paesi occidentali rappresenta una sfida. Tuttavia, campagne di sensibilizzazione e innovazioni culinarie stanno gradualmente cambiando le percezioni, facilitando l'integrazione dei grilli nei mercati alimentari tradizionali.

### 1.1.2 Microalghe

Il termine microalghe racchiude una gran varietà di organismi con fotosintesi ossigenica e può includere perfino i cianobatteri o alghe azzurre. Si stima che esistano circa 80.000 specie di microalghe. Una delle principali linee evolutive, le alghe clorofite (*Chlorophyta*), raggruppa la maggior parte delle specie comunemente denominate alghe verdi e include molti membri appartenenti al gruppo, ritenuto ancestrale, dei flagellati con scaglie della classe *Prasinophyceae*, oltre a quelli delle classi *Ulvophyceae*, *Trebouxiophyceae* e *Chlorophyceae* (Lewis & McCourt, 2004). La classificazione è ad oggi di tipo molecolare e questo ha permesso di effettuare classificazioni basate su caratteri morfologici e ultrastrutturali (Lewis & McCourt, 2004). La varietà morfologica è data da cellule che possono essere di forma arrotondata, ovale, cilindrica o fusiforme, oltre alla presenza di proiezioni come flagelli o ciglia. Inoltre, possono essere classificate anche in base alle loro dimensioni: picoplancton (0,2-2  $\mu\text{m}$ ), nanoplancton (2-20  $\mu\text{m}$ ) e microplancton (20-200  $\mu\text{m}$ ) (Correa et al., 2017). Specie come *Chlorella*, *Isochrysis*, *Pavlova*, *Phaeodactylum*, *Chaetoceros*, *Nannochloropsis* e *Thalassiosira* sono riportate come le più frequentemente utilizzate in acquacoltura grazie al loro adeguato valore nutrizionale, alti tassi di produzione, idoneità per la coltivazione su larga scala, resistenza a condizioni di crescita variabili (Safafar et al., 2016).

Le microalghe crescono in diversi ambienti (Olabi et al., 2023) grazie alla capacità di tollerare e adattarsi alla variazione di vari parametri come salinità, temperature, intensità luminose e intervalli di pH differenti. Per la loro coltivazione le microalghe necessitano di carbonio (C), azoto (N), fosforo (P) e zolfo (S), oltre ad addizionali micronutrienti. Nella preparazione del mezzo colturale, tutti questi nutrienti elevano i costi di produzione di biomassa (Ación Fernández et al., 2018), inoltre i depositi naturali di fosfato si stanno esaurendo rapidamente rendendo a breve impossibile l'approvvigionamento di fertilizzanti (Chavez e Uchanski,

2021). Da qui la necessità di cercare altre fonti di nutrienti per la produzione di microalghe. Molti scarti provenienti dall'industria, dall'agricoltura o dalle municipalità contengono grandi quantità di N e P e potrebbero essere considerati una valida fonte alternativa di nutrienti per la produzione di microalghe. Questo permetterebbe una crescita microalgale più sostenibile, insieme alla valorizzazione di scarti, e potrebbe anche ridurre l'alto costo di produzione microalgale (Acién Fernández et al., 2018; Wollmann et al., 2019).

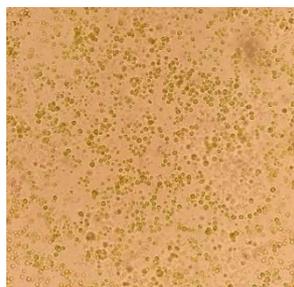
Le microalghe possono perciò essere utilizzate per combinare la bonifica delle acque reflue con la produzione di molecole di interesse, poiché tendono ad acquisire per la loro crescita contaminanti organici come nitriti, nitrati, ortofosfati e ammoniaca presenti nelle acque reflue. Pertanto, coltivare microalghe in acque reflue per la produzione di biocarburanti rappresenta una soluzione innovativa, riducendo i costi di produzione energetica (Olabi et al., 2023). Tra le microalghe di maggiore rilevanza biotecnologica troviamo le alghe verdi (Chlorophyceae) *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis*, *Dunaliella salina* e i cianobatteri *Spirulina maxima*, che sono già ampiamente commercializzate e utilizzate, principalmente come integratori alimentari per gli esseri umani e come additivi per mangimi animali (Gouveia et al., 2008). *Chlorella vulgaris* è considerata una potenziale fonte ad ampio spettro di nutrienti, come carotenoidi, vitamine e minerali, ed è ampiamente utilizzata nel mercato degli alimenti salutari, nonché come mangime per animali e nell'acquacoltura. È ritenuta importante per gli effetti benefici sulla salute in presenza di vari disturbi, tra cui ulcere gastriche, ferite, stitichezza, anemia, ipertensione, diabete, malnutrizione infantile e nevrosi (Gouveia et al., 2008). Tra le sostanze di interesse in *Chlorella* il  $\beta$ -1,3-glucano è un immunostimolatore attivo, un antiossidante e un riduttore dei lipidi nel sangue (Spolaore et al., 2006). *Haematococcus pluvialis* è stata identificata come l'organismo in grado di accumulare i livelli più alti di astaxantina in natura, con una concentrazione che varia tra l'1.5% e il 3.0% del peso

secco (Gouveia et al.,2008). Questo pigmento carotenoide agisce come un potente neutralizzatore di radicali liberi e soppressore dell'ossigeno singoletto, con evidenze che indicano che i suoi benefici antiossidanti superano quelli del  $\beta$ -carotene, della vitamina C e della vitamina E (Gouveia et al.,2008). *Dunaliella salina* è una microalga alofila che si trova naturalmente nei laghi salati ed è in grado di accumulare grandi quantità di  $\beta$ -carotene, un composto prezioso utilizzato principalmente come colorante alimentare naturale e provitamina A (retinolo). Inoltre, produce grandi quantità di glicerolo (Gouveia et al.,2008). *Arthrospira (Spirulina)* è prodotta in grande quantità in tutto il mondo (3000 tonnellate/anno) ed è ampiamente utilizzata in integratori alimentari e mangimi, grazie al suo alto contenuto proteico e al suo eccellente valore nutritivo, come l'elevato livello di acido  $\gamma$ -linolenico, inoltre è in grado di alleviare l'iperlipidemia, l'ipertensione, riduce i livelli di glucosio sierico (Spolaore et al., 2006). Alcune microalghe sintetizzano acidi grassi di particolare interesse, in particolare: Acido  $\gamma$ -linolenico (GLA, 18:3n6) (*Arthrospira*); Acido arachidonico (AA, 20:4n6) (*Porphyridium*); Acido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n3) (*Nannochloropsis*, *Phaeodactylum*, *Nitzschia*, *Isochrysis*, *Diacronema*); Acido docosaesaenoico (DHA, 22:6n3) (*Cryptocodinium*, *Schizochytrium*) (Gouveia et al.,2008). Questi acidi grassi polinsaturi a catena lunga (più di 18 atomi di carbonio) non possono essere sintetizzati dalle piante superiori e dagli animali, ma solo dalle microalghe, che forniscono tali acidi a tutta la catena alimentare (Pulz e Gross, 2004). Questa osservazione conferma l'importanza dell'inclusione di questi acidi grassi a catena lunga (e quindi delle alghe) nella dieta quotidiana. L'utilizzo della biomassa di microalghe e dei loro metaboliti rappresenta un approccio innovativo e interessante per la creazione di prodotti alimentari più salutari (Gouveia et al.,2008).

### 1.1.2.1 *Chlorella vulgaris*

La microalga *Chlorella vulgaris* rientra nel gruppo principale Chlorophyta, dunque alga verde eucariotica unicellulare. La specie è cosmopolita delle acque dolci (fiumi, laghi e lagune) e la si può trovare in endosimbiosi con altri organismi quali plattelminti, ciliati e cnidari del genere Hydra. La microalga ha una forma sferica dal diametro di 2-10  $\mu\text{m}$  ed è priva di flagelli. Oltre alla deducibile presenza di cloroplasti ricchi di pigmenti fotosintetici, condivide diversi elementi con le cellule delle piante superiori. *C. vulgaris* è un organismo mixotrofo, ovvero in grado di adottare sia un metabolismo autotrofo che eterotrofo o una loro combinazione dei due. *C. vulgaris* si riproduce per autosporulazione, la più comune forma di riproduzione asessuata delle alghe. Dalla cellula madre si formano quattro cellule figlie dotate di propria parete cellulare. Al termine della maturazione le quattro cellule figlie vengono liberate grazie alla disgregazione della parete cellulare materna i cui resti diverranno la fonte del loro nutrimento (Puglisi et al., 2022). *Chlorella vulgaris* è una microalga verde molto studiata e utilizzata come integratore alimentare grazie al suo ricco profilo nutrizionale. È considerata un superfood per via dei numerosi benefici che apporta alla salute umana (Toniolo et al., 2019). Relativamente alle applicazioni di alghe nel sequestro di CO<sub>2</sub> emessa in atmosfera *C. vulgaris* è in grado di tollerare elevate concentrazioni di CO<sub>2</sub> e di convertirla in biomassa e O<sub>2</sub>. Un recente studio di Mountourakis et al., (2021) ha infatti osservato che *C. vulgaris* non solo è in grado di tollerare concentrazioni di CO<sub>2</sub> superiori al 40%, ma che queste concentrazioni rappresentano una condizione ideale di crescita in cui si ha un'intensificazione dell'attività fotosintetica con conseguente aumento di biomassa e produzione di ossigeno. Oltre alla CO<sub>2</sub>, *C. vulgaris* è in grado di sequestrare dall'ambiente grandi quantità di nutrienti e contaminanti, tra cui metalli pesanti e composti dell'azoto e del fosforo. Questo fa di *C.*

*vulgaris* una specie di spicco nei trattamenti delle acque di scarico, come acque reflue civili e industriali o effluenti zootecnici (Figura 4).



**Figura 4.** *Chlorella vulgaris* al microscopio ottico.

In uno studio di Tokuşoglu e Ünal, (2003), sono stati analizzati diversi aspetti dell'alga *C. vulgaris*. La composizione prossimale è riportata in Tabella 4.

**Tabella 4.** Parametri della composizione *Chlorella vulgaris* (g/100g DW) (Tokuşoglu e Ünal, 2003).

Parametri	<i>Chlorella vulgaris</i>
Umidità	3.87±0.04
Ceneri	6.30±0.02
Proteine	47.82±0.05
Lipidi	13.32±0.07
Carboidrati disponibili	8.08±0.09
Energia (kJ)	1427.30±4.88

Per quanto riguarda invece il profilo lipidico di *Chlorella vulgaris*, nella Tabella 5 vengono mostrate le percentuali delle diverse classi di lipidi, nonché il rapporto l'acido docosaesaenoico/acido eicosapentaneoico (DHA/EPA). La Tabella 5 riporta il contenuto di elementi in *C. vulgaris*.

**Tabella 5.** Elementi minerali presenti in *Chlorella vulgaris* (mg/100g DW) (Tokuşoglu e Ünal, 2003).

Elemento	<i>Chlorella vulgaris</i>	Elemento	<i>Chlorella vulgaris</i>
Na	1346.40±0.18	Cr	0.02±0.01
K	49.92±0.09	Cu	1.49±0.14
Ca	593.70±0.07	Zn	1.19±0.07
Mg	344.30±0.12	Mn	2.09±0.15
Fe	259.10±0.04	Se	0.07±0.03
Cd	nd <sup>1</sup>	P	1761.50±0.13

<sup>1</sup>nd: non determinato.

Nella Tabella 6 viene riportata la composizione di acidi grassi in *Chlorella vulgaris*.

**Tabella 6.** Composizione acidi grassi (% FAs totali) in *Chlorella vulgaris* (Tokuşoglu e Ünal, 2003).

Acidi grassi	<i>Chlorella vulgaris</i>
14:0	0.38
14:1	Tr <sup>1</sup>
16:0	15.41
16:1n7	1.17
18:0	6.24
18:1n9	33.14
18:1n7	1.13
18:2n6	9.73
18:3n6	Tr <sup>1</sup>
18:3n3	1.93
18:4n3	Tr <sup>1</sup>
20:0	0.19
20:4n6	Tr <sup>1</sup>
20:5n3	3.23
22:5n3	3.11
22:6n3	20.94
SFA <sup>2</sup>	22.22
MUFA <sup>3</sup>	35.44
PUFA <sup>4</sup>	38.94
ω3	29.21
ω6	9.73
ω3/ω6	3.00
DHA <sup>5</sup> /EPA <sup>6</sup>	6.73

<sup>1</sup>Tr: tracce

<sup>2</sup>SFA: Acidi Grassi Saturi.

<sup>3</sup>MUFA: Acidi Grassi Mono-Insaturi.

<sup>4</sup>PUFA: Acidi Grassi Poli-Insaturi.

<sup>5</sup>DHA: Acido docosaesaenoico.

<sup>6</sup>EPA: Acido eicosapentaneoico.

### 1.1.2.2 *Nannochloropsis salina*

*Nannochloropsis salina* è un'alga unicellulare della classe Eustigmatophyceae, presente in ambienti marini. La cellula è semplice nella morfologia, con diametri che variano da 2 a 8 µm, e possiede plastidi simili a quelli delle cellule vegetali (Ma et al., 2016). *Nannochloropsis* contiene solo clorofilla a e violaxantina come pigmenti principali. *Nannochloropsis salina* ha

una parete cellulare sottile e priva di cellulosa, con una composizione differente in termini di polisaccaridi e lipidi rispetto a *C. vulgaris* (Scholz et al., 2014). *Nannochloropsis* è una delle poche specie accettate come alimento ed è quindi di grande interesse come merce altamente produttiva, dove può essere applicato un concetto di bioraffineria a zero rifiuti e a più prodotti. *Nannochloropsis* rappresenta un genere di microalghe marine con un'elevata efficienza fotosintetica, in grado di convertire l'anidride carbonica in lipidi di riserva, principalmente sotto forma di triacilgliceroli, e in EPA, un acido grasso polinsaturo a catena lunga della serie  $\omega 3$  (Ma et al., 2016). *Nannochloropsis* risulta essere una delle microalghe con più lipidi al suo interno, in particolare: contenuto di lipidi totale sul peso secco 37-60%; contenuto lipidi neutri 23-58% (Ma et al., 2016). Due ceppi di *Nannochloropsis salina* sono distinti proprio in base alla crescita e alle caratteristiche appena descritte (Tabella 7):

**Tabella 7.** Crescita, produttività di biomassa, contenuto lipidico e produttività lipidica di due ceppi di *Nannochloropsis salina* (Ma et al., 2014).

Ceppi	Tasso di crescita specifico (day <sup>-1</sup> )	Tempo di duplicazione	Produttività Biomassa (mg L <sup>-1</sup> day <sup>-1</sup> )	Contenuto lipidico (%)	Produttività lipidica (mg L <sup>-1</sup> day <sup>-1</sup> )
<i>Nannochloropsis Salina</i> CCMP537	0.19±0.01	3.71±0.14	316.18±4.50	38.75±1.67	122.52±3.53
<i>Nannochloropsis Salina</i> CCMP1176	0.19±0.01	3.74±0.18	363.10±0.91	36.95±0.91	134.17±6.91

La Tabella 8 invece, riporta il contenuto di acidi grassi delle due specie di *Nannochloropsis salina*, CCMP537 e CCMP1176:

**Tabella 8.** Composizione di acidi grassi (g/100g FAs totali) in *Nannochloropsis Salina* CCMP537 e CCMP1176 (Ma et al., 2014).

Acidi grassi	CCMP537	CCMP1176
14:0	3.34±0.19	2.08±0.31
16:0	32.23±0.67	32.04±1.80
16:1	25.41±0.82	29.94±0.85
16:2	2.98±0.95	---
18:0	2.47±0.70	3.19±0.18
18:1	15.46±0.71	9.37±0.15
18:2	2.89±0.29	2.58±0.40
18:3	0.65±0.04	0.90±0.06
20:4	3.64±0.07	7.16±0.75
20:5	10.93±0.14	12.74±1.84
SFA <sup>1</sup>	38.04±1.81	37.31±2.29
MUFA <sup>2</sup>	40.87±1.53	39.31±1.00
PUFA <sup>3</sup>	18.11±0.54	23.38±3.05
UFA <sup>4</sup>	58.98±2.07	62.69±4.05

<sup>1</sup>SFA: acidi grassi saturi;

<sup>2</sup>MUFA: acidi grassi monoinsaturi;

<sup>3</sup>PUFA: acidi grassi polinsaturi;

<sup>4</sup>UFA: acidi grassi insaturi.

Il contenuto proteico in *Nannochloropsis sp.* è stato misurato in cellule cresciute in diverse condizioni di crescita, garantite da un fotobioreattore chiuso. I fotobioreattori chiusi offrono i più alti livelli di controllo sperimentale per lo sviluppo di sistemi ottimali di produzione di microalghe (Hulatt et al., 2017). Al variare delle concentrazioni di azoto e fosforo, la massima percentuale di proteine, pari al 54.9±1.7% della massa secca totale, è stata ottenuta durante la crescita in condizioni di nutrienti abbondanti, mentre il contenuto proteico più basso, pari al 24.6±1.5%, è stato osservato in condizioni di nutrienti limitati (Hulatt et al., 2017).

### 1.1.2.3 *Phaeodactylum tricornutum*

*Phaeodactylum tricornutum* è una diatomea pennata marina ampiamente utilizzata come organismo modello per ricerche in ambito biotecnologico e biologico. Questa specie si distingue per la sua notevole adattabilità a diverse condizioni ambientali e per il suo elevato potenziale biotecnologico. Nei sistemi di coltura di massa all'aperto, dunque produzione su

larga scala, è stato dimostrato che domina e supera in competizione altre specie di microalghe, tollera pH elevati e può crescere in condizioni di bassa luminosità (Remmers et al., 2017).

Una caratteristica particolare delle diatomee è data dalla loro capacità di assorbire il silicio dall'acqua marina, utilizzandolo per costruire scheletri traslucidi di vetro. Questi ultimi costituiscono la parete cellulare che prende il nome di frustulo ed è un materiale mesoporoso regolare (Raven e Waite, 2004). Il frustulo, rigido ma flessibile, serve a proteggere le diatomee dai predatori. Oltre a questo, i frustuli possono difenderle da attacchi virali, ottimizzare l'assorbimento di nutrienti e convogliare la luce solare verso i cloroplasti (Raven e Waite, 2004). Grazie a questa barriera, le diatomee hanno potuto adattarsi a diversi ambienti: le troviamo nell'acqua salata, dolce, nei sedimenti oceanici, e sono persino in grado di sopravvivere nel ghiaccio marino (Petrucciani et al., 2023). In base ad uno studio effettuato da Fuentes e altri studiosi (2000) in cui cellule di *P. tricornutum* sono state coltivate in fotobioreattore tubolare esterno e in colonna gorgogliata, la biomassa conteneva il 36.4% di proteine grezze, il 26.1% di carboidrati disponibili, il 18.0% di lipidi, il 15.9% di cenere e lo 0.25% di fibra detergente neutra, sulla base del peso secco. I contenuti degli elementi minerali in 100 g di biomassa secca erano: Ca (1910 mg), K (1720 mg), Na (1430 mg), S (1050 mg), Mg (555 mg), Zn (373 mg), Mn (31,4 mg), Cu (8,4 mg) e P (269 mg). I contenuti di metalli pesanti tossici erano trascurabili. Il contenuto degli acidi grassi era (in percentuale sul peso secco): 0.65% in 14:0, 1.28% in 16:0, 1.48% in 16:1n7, 0.34% in 16:2n4, 0.75% in 16:3n4 e 2.50% in 20:5n3. I contenuti totali in media di carotenoidi totali, clorofille totali e pigmenti totali in 100 g di peso secco DW era rispettivamente di 0.243 g, 2.04 g, 2.28 g. La composizione nutrizionale della biomassa dipendeva in modo significativo dal tempo di permanenza nel bioreattore e dal livello di irradiazione esterno. La biomassa coltivata con

un'irradianza esterna ridotta risultava particolarmente più ricca di proteine e acido eicosapentaenoico (Fuentes et al., 2001).

## **1.2 Economia circolare ed Ecosostenibilità**

L'economia circolare è un modello economico volto a minimizzare lo spreco di risorse e ridurre l'impatto ambientale, promuovendo la riutilizzazione, il riciclo e la rigenerazione dei materiali all'interno di un ciclo continuo. Contrariamente all'economia lineare tradizionale, che segue un percorso di “produzione-consumo-smaltimento”, l'economia circolare si propone di "chiudere il cerchio" progettando prodotti più durevoli, utilizzando le risorse in modo più efficiente e minimizzando i rifiuti attraverso il riciclo (Mas-Tur et al., 2019). L'obiettivo principale è mantenere il valore dei materiali e delle risorse il più a lungo possibile, riducendo la necessità di nuove estrazioni e limitando l'impatto ambientale complessivo. Questo approccio si basa su principi quali la riduzione del consumo di risorse naturali, l'allungamento della vita dei prodotti e la creazione di sistemi che favoriscano la circolarità (O'connor et al., 2023). La sostenibilità ecologica o sostenibilità economica si riferisce alla capacità di un'entità, sia essa individuale o collettiva, di esistere e prosperare nel tempo, mantenendo la propria integrità o evolvendo, in modo che anche altre entità possano fare lo stesso, in modo coerente e integrato con gli altri sistemi (Starik e Rands, 1995). Per molto tempo, le risorse naturali sono state considerate abbondanti e la loro conservazione raramente è stata una priorità organizzativa. La sostenibilità ecologica di un'organizzazione si misura dal grado in cui le sue attività possono essere mantenute in maniera persistente senza compromettere i fattori che permettono l'esistenza e la prosperità di altri gruppi, comprese altre organizzazioni. Questi fattori limitanti includono cibo, acqua, rifugi, luoghi di

riproduzione, predatori, concorrenti, agenti patogeni e tossine (Odum 1989). Le attività sostenibili non dovrebbero alterare drasticamente le condizioni fisiche, chimiche e biologiche o quelle politiche, economiche, sociali e culturali in modo tale da ridurre significativamente la capacità di carico per le entità sostenibili. Starik e Rands (1995) ritengono che la sostenibilità ecologica sia essenziale non solo per le specie non umane, ma anche per l'umanità e quindi per le organizzazioni stesse. Tuttavia, il concetto di sostenibilità ecologica continuerà probabilmente a essere oggetto di discussioni e dibattiti. Con l'aumento della popolazione mondiale e il deterioramento irreversibile dell'ambiente naturale, l'uso eccessivo delle risorse naturali renderà lo sviluppo economico insostenibile e limiterà il controllo che le generazioni future potranno esercitare su di esse. Di conseguenza, cresce la necessità di soluzioni efficaci per energie alternative e rinnovabili, per il controllo delle contaminazioni degli ecosistemi e per affrontare crisi alimentari e di risorse (Puglisi et al., 2022). I segnali di allerta, come l'effetto serra e la perdita di biodiversità a causa dell'inquinamento dell'aria, dell'acqua e del suolo, sono sempre più evidenti (Standing et al., 2008). In risposta a queste problematiche, è stato condotto uno studio sull'uso del frass di grillo come fonte di nutrienti per il pomodoro (*Solanum lycopersicum L.*) in condizioni controllate (Campos et al., 2023). Il "frass" è una miscela di feci, pelle e scheletri degli insetti allevati e dei loro alimenti (Steinrücken et al., 2024). In uno studio del 2024, effettuato da Psarianos e altri studiosi, sono stati effettuati degli esperimenti sulla possibilità di crescere *Acheta domesticus* in "indoor", dunque in ambienti chiusi, come serre, e in sistemi di "co-coltivazione", ovvero una pratica che consiste nell'allevare più di un tipo di organismo nello stesso ambiente come piante o altri insetti, dunque un sistema pensato in modo da promuovere l'economia circolare e ridurre gli sprechi. L'obiettivo è stato quello di osservare il suo effetto sullo sviluppo dei grilli, sulla loro composizione nutrizionale e sul contenuto minerale dei loro escrementi, che hanno un

grande potenziale come fertilizzante. Il tutto, applicando la radiazione PAR a intensità elevata combinata con l'irradiazione UV-B a banda stretta a 285 nm. Nella Tabella 9 è possibile visualizzare la composizione minerale del frass ottenuto da *Acheta domesticus* nelle suddette condizioni.

**Tabella 9:** Analisi composizione minerale di frass ottenuto da *Acheta domesticus* esposto ai regimi di irradiazione nella terza settimana di allevamento. I risultati sono riferiti al peso umido (Wet Weight, WW) (Psarianos et al., 2024).

<b>Elementi</b>	<b>Controllo</b>	<b>PAR<sup>1</sup> Elevato</b>	<b>PAR<sup>1</sup> Elevato/UV-B a banda stretta</b>
Ca (g/kg WW)	33.99±3.85	35.58±1.84	35.77±3.24
K (g/kg WW)	21.74±1.16	20.92±1.25	22.01±1.21
Mg (g/kg WW)	4.45±0.37	4.55±0.29	4.67±0.37
Na (g/kg WW)	30.72±4.02	26.13±3.43	19.94±2.67
Pb (mg/kg WW)	1.15±0.52	1.36±1.16	1.44±0.31
S (g/kg WW)	5.33±0.34	5.45±0.17	5.40±0.29

<sup>1</sup>PAR: Radiazione Fotosinteticamente Attiva (Photosynthetically Active Radiation).

Campos ed altri studiosi (2023), hanno esaminato l'effetto di basse concentrazioni (0.1%, 0.5% e 1.0% p/p) di frass di grillo nel substrato durante la coltivazione di pomodori in serra. Un trattamento con 0.1% (p/p) di frass ha mostrato caratteristiche tipiche di un biostimolante, mentre i trattamenti con 0.5% e 1.0% hanno indotto meccanismi difensivi nelle piante di pomodoro (Campos et al., 2023). Questi risultati suggeriscono che il frass di grillo potrebbe essere utilizzato nella coltivazione dei pomodori e possibilmente in altre colture come stimolante o inibitore in sistemi di produzione sostenibili (Campos et al., 2023). Come per tutti i tipi di produzione, anche un impianto di allevamento di insetti genera rifiuti, come il frass menzionato. Ottimizzare lo sfruttamento dei rifiuti è cruciale per ottenere un'economia

circolare più efficiente. Per quanto riguarda l'utilizzo di rifiuti per la produzione di microalghe, è stato condotto uno studio sull'uso del frass di grillo come fonte di nutrimento per le microalghe, in particolare *Chlorella vulgaris* (Steinrücken et al., 2024). Questo studio ha cercato di sostituire i fertilizzanti chimici con nutrienti derivati da rifiuti o residui, contribuendo così a rendere la produzione di microalghe più sostenibile, economica e parte di una bioeconomia circolare. È stato riscontrato che *C. vulgaris*, coltivata con nutrienti estratti dal frass di insetto (Larveriet in Voss), è cresciuta bene e ha mostrato un alto contenuto proteico (40% del peso secco), simile a quello ottenuto con i fertilizzanti commerciali. L'azoto nel mezzo a base di frass era prevalentemente composto da azoto organico, di cui il 71-78% è stato assimilato dalle microalghe. Sebbene il carbonio organico disciolto nel frass abbia favorito la crescita di batteri associati alle alghe, le prestazioni delle microalghe non sono state influenzate negativamente (Steinrücken et al., 2024).

## 2 SCOPO DELLA TESI

Nell'ottica di ottimizzare lo sfruttamento dei rifiuti per ottenere un'economia circolare più efficiente, è nata l'idea di utilizzare il frass di AD come fonte di nutrimento per le microalghe, che a loro volta sono state sperimentate come supplemento alla dieta di AD, nel tentativo di migliorare la composizione nutrizionale dell'insetto stesso.

L'obiettivo di questa tesi è stato quello di valutare la fattibilità dell'inserimento di frass di grillo domestico nel terreno di coltura delle microalghe, che a loro volta sono state aggiunte alla dieta del grillo stesso per la produzione di un insetto più salutare, arricchito in acidi grassi insaturi, in un'ottica di economia circolare. Attraverso un'analisi bibliografica, sono state ricercate le specie microalgali che meglio si potessero adattare a questo scopo. Sulla base della composizione di acidi grassi delle microalghe, sono state selezionate *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis salina*, e *Phaeodactylum tricornutum*. Dopo una valutazione preliminare della loro crescita in presenza di frass, le alghe *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis salina* sono state sottoposte a due diversi terreni di coltura: mezzo di crescita di "controllo", e mezzo di crescita "trattato", ovvero con frass di grillo. Sono stati valutati la crescita algale nonché il contenuto di proteine (mediante Spettrofotometro) e la composizione di acidi grassi (mediante Gas Cromatografo accoppiato a Spettrometro di Massa). Una delle due microalghe selezionate, *Chlorella vulgaris*, è stata utilizzata come fonte di nutrimento per il grillo, del quale sono stati valutati la crescita, il contenuto lipidico ed il contenuto proteico.

Il lavoro di tesi è stato svolto in collaborazione con l'azienda Nutrinsect SRL (Montecassiano, Italia), specializzata nell'allevamento industriale di AD per i settori di pet food, feed e food.

## 3 MATERIALI E METODI

### 3.1 Disegno sperimentale

Nella prima parte del progetto di tesi è stato condotto uno studio bibliografico per selezionare le specie di microalghe che fossero in grado di crescere meglio in presenza di frass di grillo. È stata valutata la crescita e successivamente il profilo lipidico. In seguito, le microalghe sono state utilizzate come fonte di nutrizione acquosa per il grillo con l'obiettivo di valutare il profilo lipidico di AD.

Sono state selezionate tre specie algali: *Phaeodactylum tricornutum*, *Chlorella vulgaris* e *Nannochloropsis salina*. Queste sono state fatte crescere in appropriati e specifici mezzi di crescita, in base alla natura dell'alga (se d'acqua dolce o marina). Tutte queste specie sono già approvate dall'UE come ingredienti alimentari e/o per mangimi, conferendo loro un significativo valore commerciale.

Dopo un'accurata valutazione preliminare della capacità di crescita in un mezzo contenente frass di grillo, sono state prese in considerazione *Chlorella vulgaris* e *Nannochloropsis salina*. *Phaeodactylum tricornutum* è stata esclusa perché in presenza di frass, non è stata in grado di accrescersi. Per le specie prese in considerazione è stata valutata la capacità di crescita in presenza di frass, ed il profilo nutrizionale, in termini di contenuto proteico, lipidico, e composizione degli acidi grassi. Successivamente, è stata selezionata *Chlorella vulgaris* come potenziale additivo alimentare di *Acheta domesticus* (AD). Gli effetti della dieta sul grillo domestico sono stati valutati in termini di crescita, mortalità, contenuto proteico e lipidico, e composizione di acidi grassi.

### 3.2 Test di tolleranza

Nella prima fase dell'esperimento, *Nannochloropsis salina* e *Phaeodactylum tricornerutum* sono state acclimate a due tipologie di mezzi di crescita differenti:

1- AMCONA per il controllo, autoclavato prima dell'uso, ricetta presente nella Tabella 10.

**Tabella 10.** Reagenti e rispettive quantità nel mezzo di crescita Amcona.

Reagenti	Volume per 1 L	Stock
NaCl	21.21 g	
Tris HCl pH 8,1	10 mL	1 M
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	25 mL	1 M
KCl	5 mL	1,6 M
NaHCO <sub>3</sub>	5 mL	0,41 M
KBr	0.2 mL	3,63 M
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1 mL	0.37 M
NaF	0.2 mL	0.33 M
MgCl * 6 H <sub>2</sub> O	25 mL	1.65 M
CaCl <sub>2</sub>	5 mL	1.83 M
SrCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	0,2 mL	0.41 M
NaNO <sub>3</sub>	0.2 mL	2.74 M
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	210 µL	100 mM
NaSiO <sub>3</sub> * 9 H <sub>2</sub> O	1 mL	205 mM
CuSO <sub>4</sub> * 5 H <sub>2</sub> O	1 mL	40 µM
Soluzione metalli 1 Ferro	1 mL	6.5 mM
Soluzione metalli 2 Tracce metalli	1 mL	
Soluzione Vitamine		
* [dopo autoclave]	1 mL	

2- per il trattamento: acqua deionizzata, aggiunta di NaCl autoclavati e successiva aggiunta di frass di grillo: 0.5 M NaCl, 250 mg L<sup>-1</sup> (dopo aver selezionato le microalghe, il frass è stato aggiunto prima dell'inserimento del mezzo di crescita in autoclave). L'acqua deionizzata è stata prodotta tramite il sistema Adrona Crystal (Adrona, Riga, Lettonia) (Figura 5).



**Figura 5.** Cappa biologica a flusso laminare (Faster Bio 48, Faster S.r.l., Milano, Italia).

3- Il frass è stato ottenuto dall'azienda Nutrinsect SRL (Montecassiano, Italia). I campioni prelevati sono stati conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$  fino al momento dell'analisi.

La quantità di frass da aggiungere è stata calcolata in modo da rispettare la quantità di azoto presente nel terreno di controllo. Il frass conteneva il 36% di proteine grezze e, assumendo che il 16% delle proteine sia azoto, è stato calcolato un contenuto di azoto pari al 5.76%. In particolare, *Nannochloropsis salina* e *Phaeodactylum tricorutum*, le due specie marine, sono state coltivate in Amcona (Fanesi et al., 2014), contenente  $7.7 \text{ mg L}^{-1}$  di N sotto forma di  $\text{NaNO}_3$ ; dunque, sono stati aggiunti  $250 \text{ mg L}^{-1}$  di frass secondo i calcoli precedentemente citati.

I triplicati delle colture algali sono stati stabiliti in beute Erlenmeyer da 150 mL riempite con 50 mL di terreno di controllo o di frass; sono stati mantenuti in una camera climatica con una temperatura controllata di  $20^{\circ}\text{C}$  e illuminati con lampade fluorescenti ( $100 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , luce 24 ore). Le microalghe sono state acclimate in questi terreni per almeno 10 generazioni prima dell'analisi della crescita.

Così come per le due specie marine, anche per *Chlorella vulgaris*, la specie d'acqua dolce, è stato eseguito il test di tolleranza in due tipi di mezzi differenti:

1- BG11 per il controllo, autoclavato prima dell'uso, ricetta nella Tabella 11.

**Tabella 11.** Reagenti e rispettive quantità nel mezzo di crescita BG11.

Reagenti	Volume per 1L	Stock
NaNO <sub>3</sub>	5 mL	300 g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 mL	40 g/L
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	1 mL	75 g/L
CaCl <sub>2</sub>	1 mL	27 g/L
Na <sub>2</sub> EDTA	5 mL	0.2 g/L
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1 mL	20,32 g/L
Tris HCl pH 7.6	5 mL	2 M
Soluzione tracce metalli	1 mL	
Acido citrico	1 mL	6 g/L
* [dopo autoclave]		
Citrato di Ammonio Ferrico	1 mL	6 g/L
* [dopo autoclave]		

2- Acqua deionizzata autoclavata e aggiunta successivamente in frass (dopo aver selezionato le microalghe, il frass è stato aggiunto prima dell'inserimento del mezzo di crescita in autoclave).

Data la concentrazione di azoto nel terreno standard (BG11) di 0.250 g L<sup>-1</sup>, sono stati usati 4 g L<sup>-1</sup> di frass per preparare il terreno di coltura per il trattato.

Anche questa specie algale è stata mantenuta in camera climatica con una temperatura controllata di 20°C e illuminata con lampade fluorescenti (100 µmol fotoni m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, luce 24 ore). Le microalghe sono state acclimatate a questi terreni per almeno 10 generazioni prima dell'analisi della crescita (Figura 6).



**Figura 6.** Primo inoculo di *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis salina*,  
*Phaeodactylum tricornerutum*.

Per mantenere la sterilità in tutte le attività previste per la crescita delle alghe, è stata utilizzata una cappa biologica a flusso laminare (Faster Bio 48, Faster S.r.l., Milano, Italia), con presenza di raggi UV sempre accesi a cappa spenta (Figura 7).



**Figura 7.** Sistema per Acqua deionizzata (Adrona Crystal, Adrona, Riga, Lettonia).

### 3.3 Esperimento a partire da frass autoclavato

Le specie che hanno mostrato le migliori prestazioni nel test di tolleranza sono state *Chlorella vulgaris* e *Nannochloropsis salina*, come dimostrato dalle evidenze sperimentali; *Phaeodactylum tricornerutum* non è riuscita a crescere nel mezzo contenente frass. Le specie

scelte sono state poi coltivate in batch per caratterizzare la composizione macromolecolare della biomassa. Le colture algali sono state stabilite in beute Erlenmeyer da 150 mL riempite con 50 mL di terreno di controllo o di frass sono stati mantenuti a una temperatura variabile tra 20 e 23°C e illuminati con lampade fluorescenti ( $250 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , luce 24 ore). Le microalghe sono state acclimatate a questi terreni per almeno 10 generazioni prima dell'analisi della crescita. Triplicati di colture da 1 L sia nel caso di *C. vulgaris* (Figura 8, 9) che nel caso di *N. salina* sono stati stabiliti e mantenuti a una temperatura variabile tra 20 e 23°C e illuminati con lampade fluorescenti ( $250 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , luce 24 ore).



**Figura 8.** Colture di *Chlorella vulgaris* controllo.

**Figura 9.** Colture di *Chlorella vulgaris* trattato.

Le cellule sono state raccolte in fase di crescita esponenziale avanzata, successivamente filtrate con una dimensione di maglia di  $150 \mu\text{m}$  per eliminare i residui di frass e centrifugate per 15 minuti a 6000 rpm. La biomassa è stata lavata con acqua deionizzata per rimuovere i sali di crescita.

### 3.3.1 Crescita delle alghe

Un numero fisso di  $1 \cdot 10^5$  cellule in crescita esponenziale è stato inoculato in terreni di controllo e di frass; la crescita è stata eseguita con conteggi giornalieri delle cellule. Per effettuare il conteggio di cellule, aliquote di  $80 \mu\text{L}$  di campione sono state diluite in 8 mL di

una soluzione elettrolitica (CASY TON; Innovatis AG). Il numero di cellule è stato ottenuto utilizzando un contatore di cellule CASY Model TT (Innovatis AG, Reutlingen, Germania) (Figura 10).



**Figura 10.** CASY Model TT (Innovatis AG, Reutlingen, Germania).

Le cellule sono state pompate nel contatore di cellule CASY Model TT (Innovatis AG, Reutlingen, Germania) attraverso un capillare da 150  $\mu\text{m}$  a flusso costante, e il numero di cellule è stato determinato attraverso l'enumerazione degli eventi misurati come variazione di conduttività. Lo stesso strumento è stato utilizzato anche per misurare la dimensione cellulare come il volume di soluzione elettrolitica spostato dal passaggio delle cellule attraverso un poro di misurazione (Palmucci et al., 2011).

### 3.4 Preparazione dell'estratto di alghe

La preparazione delle microalghe consiste nell'allestimento di uno scale up, ovvero un incremento del volume microalgale mediante aggiunta di mezzo di crescita, nel caso di *Chlorella vulgaris*, rispettivamente BG11 per il controllo (Ctrl\_*C. vulgaris*) e acqua deionizzata con frass per il trattato (Frass\_*C. vulgaris*). Nel caso di *Nannochloropsis salina*, rispettivamente Amcona per il controllo (Ctrl\_*N. salina*) e acqua deionizzata con NaCl e frass per il trattato (Frass\_*N. salina*). In entrambi i casi sono stati preparate tre repliche da 1 L di

controllo e tre repliche da 1 L di trattato. Per la preparazione degli estratti, le colture di microalghe sono state filtrate con filtri da 150 µm (Polyamid monofil, Siebgewebe, Graftschafft, Ringen), centrifugati e concentrati in falcon da 50 mL, fino ad ottenere un volume di 35 mL di alga. Per ogni coltura di microalghe sono state preparate tre repliche di estratti. In seguito, le alghe sono state conservate a -20°C fino al momento della somministrazione ai grilli. Aliquote di estratti sono stati conservati a -80°C fino al momento dell'analisi.

### **3.5 Allevamento *Acheta domesticus***

In questo studio, AD è stato allevato in condizioni specifiche per la sperimentazione. Le modalità di crescita del grillo sono le seguenti: i grilli sono stati posti all'interno di contenitori chiamati "bacc", recipienti di plastica per alimenti con dimensioni standard 682 x 480 x 385 cm (100 L), posti in camere con temperatura di crescita 30±2 °C ed umidità relativa del 50±2 % e luce costante h24.

Sono stati preparati 9 bacc per l'esperimento divisi nella seguente modalità:

- 3 bacc per la crescita di AD, grilli mantenuti in condizioni standard, senza l'aggiunta di alghe;
- 3 bacc per la crescita di AD, in presenza dell'estratto di controllo *Chlorella vulgaris* aggiunto nell'acqua;
- 3 bacc per la crescita di AD, in presenza dell'estratto di *Chlorella vulgaris* cresciuta su frass aggiunto all'acqua.

All'interno di ciascun bacc sono stati inseriti 5.2 g di grilli (ninfe), con rispettivi abbeveratoi con all'interno 1.1 L di acqua.

In ogni cassa di allevamento sono stati utilizzati 14 cartoni per uova per aumentare lo spazio di crescita dei grilli e fornire loro un riparo. Fino all'inizio di ogni prova di alimentazione (10° giorno dopo la schiusa), i grilli sono stati alimentati con l'unico mangime tradizionale utilizzato da Nutrinsect SRL per favorire loro una crescita ottimale. Si tratta un mangime di origine vegetale con una composizione approssimativa al suo interno di ~28% proteine, ~5% grassi, ~6.4% fibre, 8.9% ceneri, ~0.4% sodio.

L'esperimento è iniziato al 10° giorno dalla schiusa con l'aggiunta degli estratti di alga nell'acqua ed è terminato al 31° giorno dopo la schiusa (totale esperimento: 21 giorni). I grilli sono stati pesati all'inizio e alla fine dell'esperimento per valutare la loro crescita.

Al primo giorno effettivo dell'esperimento, sono stati aggiunti 1 L di acqua e 3 mL di estratto di coltura *Chlorella vulgaris* (controllo o trattato) a 1.1 L di acqua già presenti nell'abbeveratoio. Ogni 4 giorni circa sono stati aggiunti ulteriori 1.5 L di acqua e 4.5 mL di estratto di coltura *Chlorella vulgaris* controllo o trattato. In egual modo nei bacc di controllo sono state aggiunte le medesime quantità di acqua, ma in assenza di microalghe. Al termine dell'esperimento, i grilli sono stati pesati ed in seguito sacrificati, previo inserimento in un abbattitore industriale, a -40°C e successivamente posti in sacchetti sottovuoto, in congelatore a -80°C fino al momento delle analisi.

### **3.6 Strumentazione per analisi**

Il trattamento dei campioni e la successiva estrazione lipidica sono stati entrambi effettuati in laboratorio decontaminato (Clean room), ISO 14644-1 Classe 6, con aree ISO Classe 5; tutte le operazioni sono state condotte sotto cappa a flusso laminare. La temperatura del laboratorio è impostata a 20±1 °C durante l'inverno e a 23±1 °C durante l'estate (Illuminati et al., 2014).

Camici, calzari e guanti da Clean room vengono indossati seguendo attentamente tutte le procedure previste per questo tipo di laboratorio durante tutte le fasi più critiche del trattamento e della preparazione dei campioni. Il funzionamento della Clean room si basa sul principio di ricircolo forzato di aria super-filtrata in una stanza sigillata. Il sistema è costituito da grandi ventilatori operanti a bassa velocità, che immettono nella stanza attraverso il soffitto un flusso laminare di aria precedentemente filtrata da poderosi filtri ad alta efficienza (HEPA), posizionati all'esterno della stessa, ed aspirata attraverso griglie poste sul pavimento.

Di seguito si elenca la strumentazione utilizzata:

- Sistema di deionizzazione dell'acqua. L'acqua che viene utilizzata per la preparazione di soluzioni standard, per il lavaggio dei materiali e per gli usi generali del laboratorio viene prodotta attraverso uno strumento (Merck Millipore, Darmstadt, Germania) con trattamento a due stadi, che produce rispettivamente acqua deionizzata nel primo stadio (sistema Elix) e acqua elettro deionizzata Milli-Q nel secondo stadio (sistema Milli-Q) (Figure 11 e 12).



**Figura 11.** Sistema Milli-Q.



**Figura 12.** Sistema Elix.

- Bilancia analitica, Mettler Toledo (Svizzera), precisione 0.01 mg, ripetibilità: deviazione standard=0.015 mg;
- Omogeneizzatore, mortaio da laboratorio in marmo;
- Micro-centrifuga Eppendorf AG mini Spin 22331(Germany);

- Gascromatografo 6890N (Agilent Technologies, USA), dotato di:
  - Colonna capillare DB-WAX UI (30 m x 0.250 mm ID, 0.25  $\mu$ m film);
  - Sistema di iniezione split-splitless;
  - Forno programmabile con condizioni di lavoro impostate a seconda del tipo di colonna adottata;
  - Rivelatore: spettrometro di massa 5973 (Agilent Technologies, USA); interfacciato direttamente alla colonna cromatografica per mezzo di un setto a tenuta stagna in Vespel. La ionizzazione delle molecole avviene per frammentazione ad impatto elettronico (70 eV); il selettore di massa è un quadrupolo;
- Siringa manuale con ago rimovibile da 5  $\mu$ L (Hamilton);
- Forno a microonde MARS 6 (MARS-X, 1500 W, CEM, Mathews, NC, USA) dotato di un carrello all'interno del quale è possibile inserire fino a 14 contenitori (vessel) in teflon PFA trasparenti alle microonde, di cui uno dei contenitori è il pilota (control vessel) dove vengono controllati i parametri pressione e temperatura durante l'intero processo;
- Stufa da laboratorio Binder (USA) a ventilazione forzata che lavora in un range di temperatura che va da 5°C sopra la temperatura ambiente fino ad un massimo di 300°C (precisione  $\pm 0.1^\circ\text{C}$  a 50°C).
- Vortex Velp scientifica (MB, Italia).
- Liofilizzatore (BUCHI Lyovapor L-200) (Figura 13);



**Figura 13.** Liofilizzatore (BUCHI Lyovapor L-200).

- Piastra riscaldante (Stuart Block Heater SBH130D/3, Stuart, Stone, Regno Unito);
- Spettrofotometro UV-visibile (Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis, Santa Clara, USA).

### 3.7 Reagenti e materiali

- n-eptano per l'analisi dei residui organici (Baker, Phillipsburg, NJ, USA cod.9338-22);
- n-esano per l'analisi dei residui organici (Carlo Erba, Arese (MI) Italia, cod.44711);
- estere metilico dell'acido nonadecanoico 99.6%, (Dr. Ehrenstorfer GmbH cod.15622360);
- metanolo (Baker, Phillipsburg, NJ, USA cod. 9263);
- cloroformio per l'analisi dei pesticidi (Carlo Erba, Arese (MI), Italia, cod.438651);
- etere di petrolio 35-60°C per l'analisi dei pesticidi (Carlo Erba, Arese (MI), Italia, cod.447862);
- acetone per l'analisi di pesticidi (Carlo Erba, Arese (MI), Italia, cod.SO01500500);
- sodio metilato per sintesi ~97%, (Merck, Hohenbrunn, Germania, cod.8.06538.0250);
- sodio idrogeno solfato anidro extra puro, (Scharlau, Sentmenat, Spagna, cod.SO01500500);

- elio 6.0, gas carrier per analisi gascromatografiche, grado di purezza  $\geq 99.9999\%$  (Air liquide);
- filtri WHATMAN GF/C diametro 90 mm, (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK);
- 37-FAME (Fatty Acid Methyl Esters), mix di standard di Metil Esteri degli Acidi Grassi, (Supelco, Bellefonte, PA, USA, n. di lotto LC04806V);

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

$$[C] = P(mg)/V(ml)$$

dove:

- [C] = concentrazione effettiva analita ( $mg\ ml^{-1}$ )
- P = peso dell'analita come da certificato di composizione (mg)
- V = volume diluizione (ml)

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

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

dove:

- [CS] = concentrazione soluzione
- C = concentrazione soluzione madre
- FD = fattore di diluizione dato dal rapporto tra volume soluzione madre e volume soluzione finale.

Per la preparazione degli standard si parte dal materiale di riferimento a titolo certificato, applicando la metodologia proposta da (Truzzi et al., 2017); una volta preparate le soluzioni

di calibrazione a concentrazione crescente, queste possono essere conservate fino a tre mesi in freezer a -18°C.

### **3.8 Trattamento e analisi dei campioni**

#### **3.8.1 Omogeneizzazione di *Acheta domesticus***

Il campione di AD, conservato a -80°C per evitare la perossidazione lipidica, viene setacciato a mano per eliminare parti come zampe e ali, e successivamente omogeneizzato mediante l'apposito mortaio in marmo da laboratorio. Dopo l'omogeneizzazione viene pesata la quantità destinata all'analisi (generalmente ~ 0.5 g). Per ogni campione vengono prelevate tre aliquote.

#### **3.8.2 Liofilizzazione**

Il processo di liofilizzazione è stato effettuato sugli estratti di alghe e sul campione omogeneizzato di AD, dopo averli lasciati almeno un'ora a -80 °C. Questo processo permette la disidratazione del campione in particolari condizioni di temperatura (<0 °C) e di pressione (sottovuoto). La liofilizzazione permette di ottenere un campione disidratato e conservabile a lungo, data l'inibizione delle trasformazioni chimiche ed enzimatiche, ed è indispensabile quando si vogliono esprimere i dati in peso secco (DW). Tale processo è inoltre fondamentale per l'analisi dei lipidi, in quanto la presenza di acqua nel campione può interferire sia durante l'estrazione lipidica che durante la transesterificazione. Per cui avere campioni disidratati consente di ottenere un ambiente favorevole per i processi sopra elencati. Il campione viene posto in provette di vetro portate precedentemente a peso costante. Le provette contenenti il campione sono state pesate per ottenere il peso del campione umido (Wet Weight, WW) e

sigillate con del parafilm su cui sono stati effettuati dei piccoli fori mediante l'ago di una siringa (Figura 14).



**Figura 14.** Provette con campione sigillate da parafilm.

Il processo di liofilizzazione necessita di circa 22 ore al fine di permettere l'evaporazione completa dell'acqua. Il DW del campione viene determinato gravimetricamente per differenza.

### **3.8.3 Estrazione lipidica**

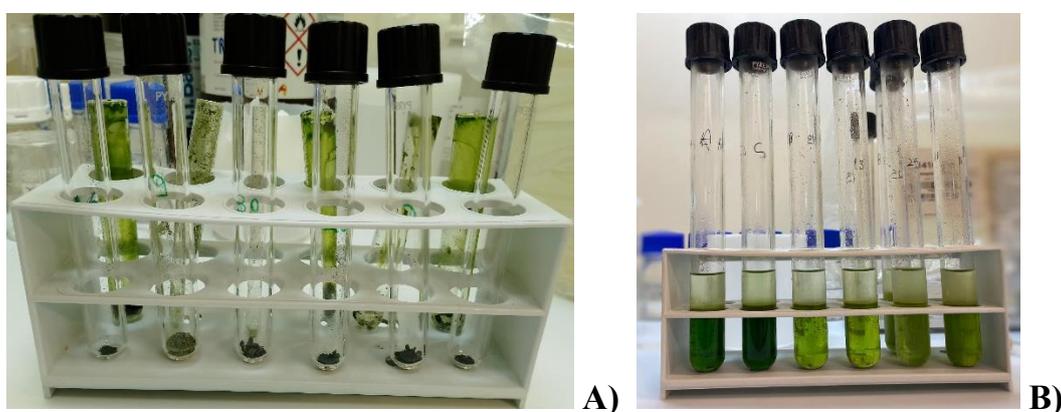
L'estrazione dei lipidi è stata eseguita sui campioni liofilizzati utilizzando due metodi:

- Metodo Folch per le microalghe (Folch et al., 1957);
- Estrazione assistita da microonde (Microwave-Assisted Extraction, MAE) per i campioni di AD.

**Metodo Folch:** Il metodo (Folch et al., 1957) è un metodo semplice utilizzato per effettuare l'estrazione lipidica dalle microalghe ridotte in polvere. Si tratta di un metodo di estrazione a freddo che consiste nell'aggiunta, nella provetta contenente il campione, di una miscela costituita da cloroformio e metanolo in rapporto 2:1, in particolare 6 mL di cloroformio, 3 mL di metanolo, inoltre vengono aggiunti 2 mL di acqua, la quale permette la formazione di due fasi: una fase inferiore contenente cloroformio e lipidi, e una fase superiore contenente

metanolo, acqua e composti non lipidici (come proteine e carboidrati). La separazione avviene grazie alla diversa solubilità dei lipidi nei solventi utilizzati, con i lipidi che si dissolvono preferenzialmente nella fase cloroformica (Folch et al., 1957).

Si procede aggiungendo 100  $\mu$ L di standard interno (l'estere metilico dell'acido nonadecanoico diluito 1:10 con n-eptano) a ciascuna provetta. A questo punto la soluzione viene posta sotto agitazione con il vortex per circa 1 minuto. Infine, le provette vengono riposte in una busta sigillata e lasciate riposare per 12 ore a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Figure 15, A e B).



**Figura 15.** Microalghe liofilizzate e ridotte in polvere trasferite nelle provette con tappo (A) e provette con rispettivo rapporto di solventi (B).

Dopo 12 ore, come si può visualizzare nella figura 15 (B), è possibile osservare la netta separazione tra le due fasi.

La fase successiva prevede l'eliminazione del surnatante cui segue la filtrazione con filtro WHATMAN (GF/C diametro 90 mm) sul quale viene aggiunto Sodio Iposolfato ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) all'interno di pesafiltri portati precedentemente a peso costante. Il filtro viene lavato con 2 aliquote da 2 mL della miscela di cloroformio e metanolo (2:1). In seguito, il filtrato all'interno del pesafiltro (portato a peso costante) viene posto su piastra riscaldante (Stuart Block Heater SBH130D/3, Stuart, Stone, Regno Unito) a  $80^{\circ}\text{C}$  (Figura 16), sotto cappa chimica, per favorire l'evaporazione della maggior parte del solvente organico.



**Figura 16.** Piastra riscaldante (Stuart Block Heater SBH130D/3, Stuart, Stone, Regno Unito).

Infine, il pesafiltro viene posto in stufa a 60°C per 1 ora per completare l'evaporazione del solvente. Raggiunto il peso costante, viene calcolato il peso di lipidi estratti dall'aliquota di campione.

**Estrazione assistita da microonde (Microwave-Assisted Extraction):** La tecnica MAE è una tecnica rapida di estrazione a caldo attraverso l'utilizzo del microonde che, se da un lato consente di evitare di utilizzare un reagente tossico come il cloroformio, dall'altro implica l'utilizzo di minori quantità di reagenti (Truzzi et al., 2017). Il campione viene collocato negli appositi contenitori in teflon PFA per estrazione lipidica e si aggiunge una miscela di etere di petrolio e acetone in rapporto 2:1 (Figura 17).



**Figura 17.** Contenitori in teflon PFA utilizzati per l'estrazione MAE.

Vengono aggiunti 100  $\mu\text{L}$  di standard interno 10  $\text{mg mL}^{-1}$  e una punta di spatola di Sodio Iposolfito ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), in modo tale da trattenere l'eventuale acqua che il campione liofilizzato può inglobare durante la conservazione e/o il trattamento (agente anidrificante). Una sonda inserita nel contenitore specifico (contenitore pilota), contenente quindi la stessa quantità di materia organica presente negli altri, monitora temperatura e pressione durante l'intero processo di estrazione in microonde (Figura 18). Una volta che i contenitori sono stati inseriti sul carrello e questo inserito nell'apposito alloggiamento all'interno del microonde, viene selezionato il programma per l'estrazione lipidica che prevede: riscaldamento fino a  $90^\circ\text{C}$  in 10 minuti, hold di 20 minuti a  $90^\circ\text{C}$  e raffreddamento in 10 minuti.



**Figura 18.** Microonde utilizzato per la tecnica MAE.

Il campione viene sottoposto a una filtrazione effettuata con filtri WHATMAN (GF/C diametro 90 mm) sui quali viene aggiunto  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Il filtro viene lavato con 2 aliquote da 2 mL della miscela di etere di petrolio e acetone (2:1). Il filtrato per i campioni di AD viene raccolto all'interno di un pesafiltro. In seguito, il filtrato all'interno del pesafiltro (portato a peso costante) viene posto su piastra riscaldante (Stuart Block Heater SBH130D/3, Stuart, Stone, Regno Unito) a  $80^\circ\text{C}$  (Figura 17), sotto cappa chimica, per favorire l'evaporazione della maggior parte del solvente organico. Infine, il pesafiltro viene posto in stufa a  $60^\circ\text{C}$  per completare l'evaporazione del solvente. Raggiunto il peso costante, viene calcolato il peso di lipidi estratti dall'aliquota di campione.

### 3.8.4 Transesterificazione degli acidi grassi

I lipidi estratti presenti nel pesafiltro vengono risospesi in 0.5 mL di n-eptano in eppendorf da 1 mL (almeno 2 aliquote da ~250  $\mu$ L). A questo punto viene aggiunta la soluzione di 25  $\mu$ L di NaOCH<sub>3</sub> 2M per la transesterificazione degli acidi grassi in esteri metilici (FAME) e subito dopo la soluzione viene agitata per 3 minuti, poi centrifugata per 1 minuto a 1000 rpm. Si preleva il surnatante e si inserisce in una seconda eppendorf, si aggiungono 40 mg di sodio metabisolfito (NaHSO<sub>4</sub>) per rimuovere eventuali residui di H<sub>2</sub>O nella soluzione; si agita nuovamente per 1 minuto. Si centrifuga di nuovo per 1 minuto a 1000 rpm e, infine, si recupera il surnatante in una vial con tappo a chiusura ermetica. Il campione è pronto per l'analisi.

### 3.8.5 Determinazione della composizione degli acidi grassi mediante Gas Cromatografo-Spettrometro di Massa

La determinazione dei FAME nei campioni è stata effettuata con un Gas Cromatografo Agilent 6890N associato ad uno Spettrometro di Massa Agilent MSD 5973 (Figura 19).



**Figura 19.** Gas Cromatografo Agilent 6890N accoppiato ad uno spettrometro di massa Agilent MSD 5973.

Le analisi sono state eseguite con i parametri operativi mostrati in Tabella 12.

**Tabella 12.** Parametri operativi GC.

<b>Parametri</b>	<b>Settaggio</b>
<b>Temperatura d'ingresso</b>	250°C
<b>Colonna</b>	DB-WAX UI (30 m x 0.250 mm ID, 0.25 µm film)
<b>Volume di iniezione</b>	1 µL
<b>Rapporto split</b>	1:10-1:50
<b>Gas di trasporto</b>	Elio 6.0 (99.9999%)
<b>Pressione</b>	8.0 psi, 36 cm/sat 50°C
<b>Temperatura forno</b>	100 °C, 1 min, rampa di 25 °C/min fino a 150 °C, rampa di 5 °C/min fino a 200 °C, rampa di 1 °C/min fino a 230 °C
<b>Transferline</b>	280°C
<b>MSD parametri</b>	(da 40 a 500 amu), soglia 100; MS quad 150°C; MS source 230 °C; Solvent delay: 2 min

La modalità Total Ion Current (TIC) è stata utilizzata per l'individuazione dei tempi di ritenzione dei singoli acidi grassi operando prima sullo standard FAME mix, poi sul campione. Per la quantificazione degli acidi grassi si è successivamente lavorato in modalità SIM (Single Ion Monitoring). I metodi SIM si basano sull'analisi di tre masse selezionate anziché sull'intero intervallo di massa. Riducendo l'intervallo a pochi ioni, la sensibilità può essere aumentata all'incirca di un fattore di 100 rispetto alle misurazioni in modalità TIC (Vetter e Thurnhofer, 2007). Dallo spettro di massa si ricava l'abbondanza relativa degli ioni in funzione del loro rapporto massa/carica. Lo spettro di massa è specifico di ogni composto e ne costituisce un'impronta digitale. Gli ioni selezionati in letteratura per l'analisi del profilo lipidico sono i seguenti:  $m/z$  74 per gli SFA,  $m/z$  55 per i MUFA,  $m/z$  67 per i di- insaturi e  $m/z$  79 per i PUFA (Zhang et al., 2014). Secondo Hauff e Vetter, (2009) gli esteri metilici degli SFA e monoenoici vengono determinati tenendo conto dei rapporti  $m/z$  74 e 87, mentre i PUFA vengono determinati usando i rapporti  $m/z$  81 e  $m/z$  79. Partendo da queste due diverse fonti, e facendo diverse prove, gli ioni selezionati per l'analisi dei FAME sono ( $m/z$ ): 74 e 87

per i SFA, 74 e 55 per i MUFA, 67 e 81 per i di-insaturi e 79 e 81 per i PUFA (Truzzi et al., 2017). Si è preferito assegnare ioni differenti a di-insaturi e PUFA poiché questi spesso nel cromatogramma si trovano ad avere tempi di ritenzione molto simili; selezionare ioni differenti permette una migliore differenziazione dei picchi. Poiché lo strumento non è dotato di un campionatore automatico le iniezioni sono state fatte manualmente tramite l'apposita siringa. Alla fine dell'analisi si ottiene uno spettro di massa specifico per ogni composto che ne definisce l'impronta digitale. Per quanto detto è stato possibile associare ogni acido grasso ad un dato tempo di ritenzione (Tabella 13). Il riconoscimento dei picchi mostrati dal cromatogramma è stato effettuato tramite la libreria NIST (Mass Spectral Database O2, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD 2002).

La quantificazione di ogni singolo acido grasso è stata effettuata attraverso una specifica retta di taratura per ogni analita, utilizzando le soluzioni standard preparate per diluizione del FAME-mix (Truzzi et al., 2017).

**Tabella 13.** Acidi grassi contenuti nel FAME con rispettivi tempi di ritenzione.

Acido grasso	Tempo di ritenzione (minuto)	Acido grasso	Tempo di ritenzione (minuto)
6:0	2.50	18:3n6	20.20
8:0	3.59	18:3n3	21.23
10:0	5.10	20:0	23.57
11:0	6.08	20:1n9	24.30
12:0	7.23	20:2n6	26.05
13:0	8.55	20:3n6	27.08
14:0	10.04	21:0	27.36
14:1n5	10.64	20:4n6	27.97
15:0	11.64	20:3n3	28.65
15:1n5	12.26	20:5n3	30.76
16:0	13.33	22:0	31.61
16:1n7	13.81	22:1n9	32.55
17:0	15.25	22:2n6	34.80
17:1n7	15.83	23:0	36.35
18:0	17.54	24:0	41.42
18:1n9	18.05	22:6n3	42.15
18:2n6	19.30	24:1n9	42.55

Viene utilizzato come standard interno l'estere metilico dell'acido nonadecanoico in quanto presenta le stesse proprietà fisiche e chimiche delle componenti del campione esterificato e, inoltre, non è presente in natura. Analizzando i campioni con la gascromatografia in modalità SIM il rivelatore presenta una sensibilità specifica per ogni componente; ne consegue che il segnale rilevato non sarà proporzionale alle quantità di ogni singolo analita, generando così picchi di dimensioni diverse.

Per quanto affermato sarebbe necessario fare curve di taratura per ogni singolo acido grasso aumentando enormemente la mole di lavoro e le tempistiche necessarie alla quantificazione delle sostanze. Per ottimizzare i tempi e semplificare il lavoro, la quantificazione è stata effettuata tramite il metodo che prende in considerazione il fattore di risposta. A tal proposito è stato necessario calcolare la diversa risposta del rivelatore per ogni sostanza nei confronti dello standard interno (SI) preso come sostanza di riferimento. Per calcolare il fattore di risposta dovrebbe essere ottimizzata una retta per ogni singolo estere metilico (dal C4 al C24) riportando in un grafico sull'asse y l'area sottesa al picco dell'estere metilico dell'acido grasso rapportata all'area dello standard interno, in funzione della concentrazione dell'estere metilico rapportata alla concentrazione di SI (asse x). La differenza della risposta del rivelatore al componente x rispetto allo SI è rappresentata dalla pendenza della retta di taratura ed espressa come fattore di risposta (RF). RF lega l'area del picco alla quantità del componente iniettato. La retta di taratura è stata ottenuta attraverso l'utilizzo di soluzione standard a concentrazione nota di acidi grassi (FAME) (Truzzi et al., 2017).

La Tabella 14 riporta il valore del RF per ogni metil-estere degli acidi grassi presenti nel FAME-mix. Più basso sarà il valore di RF, minore sarà la sensibilità del rivelatore nei confronti di quel dato acido grasso. Possiamo osservare che il valore medio di RF per i saturi

( $0.68 \pm 0.13$ ) è significativamente più alto rispetto ai valori medi di RF per i MUFA ( $0.30 \pm 0.07$ ) e per i PUFA ( $0.26 \pm 0.08$ ).

I risultati vengono espressi come percentuale di ogni singolo acido grasso rispetto al contenuto totale dei lipidi, previa correzione della stessa con il relativo fattore di risposta calcolato.

**Tabella 14.** Fattore di risposta (RF) dei metilesteri degli acidi grassi.

FAME	RF	FAME	RF
1 6:0	0.5298	19 18:3n6	0.2292
2 8:0	0.6739	20 18:3n3	0.2734
3 10:0	0.7607	21 20:0	0.636
4 11:0	0.8093	22 20:1n9	0.2559
5 12:0	0.8124	23 20:2n6	0.3374
6 13:0	0.8416	24 20:3n6	0.3387
7 14:0	0.8156	25 21:0	0.5704
8 14:1	0.3178	26 20:4n6	0.1864
9 15:0	0.8242	27 20:3n3	0.2287
10 15:1	0.3251	28 20:5n3	0.1703
11 16:0	0.7834	29 22:0	0.5573
12 16:1	0.3348	30 22:1n9	0.2276
13 17:0	0.7654	31 22:2n6	0.1708
14 17:1	0.3285	32 23:0	0.4989
15 18:0	0.7318	33 24:0	0.4392
16 18:1	0.3972	34 22:6n3	0.19
17 18:2n6t <sup>1</sup>	0.3774	35 24:1n9	0.1956
18 18:2n6c <sup>2</sup>	0.3744		

<sup>1</sup>t: trans

<sup>2</sup>c: cis

### 3.8.6 Indici nutrizionali

Sono stati calcolati quattro indici più significativi per definire la qualità nutrizionale del grillo allevato con l'aggiunta dell'alga cresciuta su frass: il rapporto tra acidi grassi polinsaturi/saturi (PUFA/SFA), l'indice aterogenico (AI) e l'indice trombogenico (TI) proposti da Ulbricht e Southgate (1991), e il rapporto ipocolesterolemico e ipercolesterolemico (H/H) secondo Santos-Silva et al. (2002). Questi indici offrono informazioni sugli effetti della

composizione degli acidi grassi sulla nostra salute, con particolare riferimento alla prevenzione e al trattamento delle malattie cardiovascolari.

Il rapporto PUFA/SFA, gli indici AI e TI, e il rapporto H/H sono stati calcolati secondo le seguenti formule:

- $PUFA/SFA = \Sigma PUFA / \Sigma SFA$
- $AI = [12:0 + (4 \times 14:0) + 16:0] / \Sigma UFA$
- $TI = (14:0 + 16:0 + 18:0) / [(0.5 \times \Sigma MUFA) + (0.5 \times \Sigma n-6 PUFA) + (3 \times \Sigma n-3 PUFA) + (n-3 / n-6)]$
- $H/H = (18:1 + \Sigma PUFA) / (12:0 + 14:0 + 16:0)$

### **3.8.7 Controlli analitici**

Il GC richiede due importanti controlli, il controllo del bianco e il controllo del buon funzionamento dello strumento (TUNE). Al fine di accertarsi della pulizia della colonna e/o dell'assenza di picchi anomali, viene effettuato, all'inizio di ogni serie di analisi o prima della costruzione della retta di taratura, il bianco del GC costituito da n-eptano (1  $\mu$ L). Per distinguere l'eventuale sporcizia della colonna capillare piuttosto che della siringa è opportuno effettuare anche un bianco strumentale. Inoltre, per garantire il buon funzionamento del GC è necessario controllare i tempi di eluizione degli esteri metilici degli acidi grassi presenti nello standard 37 FAME mix che viene iniettato periodicamente.

### **3.8.8 Determinazione delle proteine mediante Spettrofotometro**

La quantificazione delle proteine per cellula è stata effettuata utilizzando il protocollo di Lowry, con le modifiche apportate da Peterson (1977). Questo è un metodo colorimetrico che

consente di determinare il contenuto proteico misurando l'assorbanza a 750 nm. Per le microalghe, le proteine sono state determinate sull'estratto liofilizzato.

Per AD, le proteine sono state determinate sul campione liofilizzato. I campioni liofilizzati sono stati risospesi tramite vortex in una soluzione composta da sodio dodecil solfato (SDS) al 1% e NaOH 0.1 M, per favorire la lisi cellulare e la solubilizzazione delle proteine (Tabella 15).

**Tabella 15.** Reagenti per la determinazione delle proteine.

<b>Reagenti</b>	<b>Concentrazione finale</b>
Soluzione SDS	SDS <sup>1</sup> 1%
Reagente A	NaOH 0.1 M
	¼ H <sub>2</sub> O ¼ CTC <sup>2</sup>
Reagente B	¼ NaOH 0.8M
	¼ SDS <sup>1</sup> 10%
Soluzione CTC	<sup>1/5</sup> Reattivo di Folin
	<sup>4/5</sup> H <sub>2</sub> O
	0.1% CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O 0.2% NaK tartrato 10% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>

<sup>1</sup>SDS: Sodio Dodecil Solfato.

<sup>2</sup>CTC: Complesso Tetraivalente del Rame.

Successivamente, sono stati aggiunti 500 µL del reagente A e lasciato reagire per 10 minuti. Dopo questo tempo, sono stati aggiunti 250 µL del reagente B e, dopo 30 minuti, è stata misurata l'assorbanza utilizzando lo spettrofotometro Beckman DU 640. Il medesimo trattamento è stato applicato a soluzioni standard contenenti quantità crescenti e note di BSA (Albumina di Siero Bovino), utilizzate per costruire la curva di calibrazione. L'equazione ottenuta da questa curva ha permesso di determinare la concentrazione proteica nel campione analizzato.

### **3.10 Analisi statistica**

I dati sono stati elaborati con il programma STATGRAPHICS Centurion 18 (2018, Manugistics Inc., Rockville, Maryland, USA). Il confronto tra i gruppi di AD è stato effettuato con il test di ANOVA ad una via, dopo aver testato l'omogeneità della varianza con il test di Levene. Il confronto tra gruppi di microalghe è stato effettuato con Test t di student assumendo uguale varianza tra le due variabili. Differenze statisticamente significative sono state valutate a un livello di confidenza del 95% ( $p < 0.05$ ). Per valori di  $p = 0.0000$ , si indica  $p < 0.0001$ .

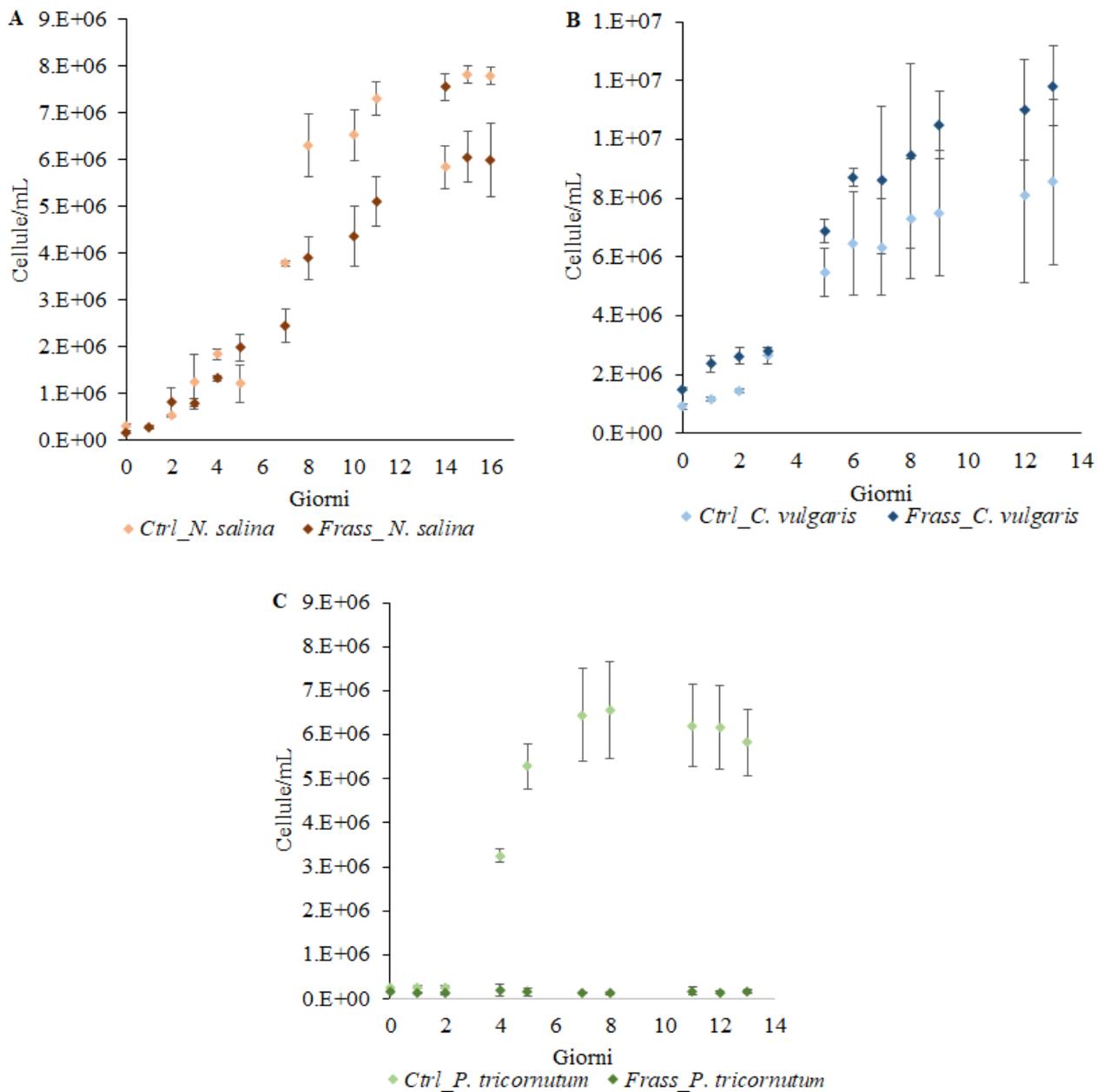
## 4 RISULTATI

### 4.1 Microalghe - *Nannochloropsis salina*, *Chlorella vulgaris* e *Phaeodactylum tricornerutum*

#### 4.1.1 Crescita

##### Test di tolleranza

La crescita di *Nannochloropsis salina*, *Chlorella vulgaris* e *Phaeodactylum tricornerutum* è stata monitorata in ambiente controllato (camera climatica) durante il test per verificare la loro sopravvivenza in presenza di frass di grillo non autoclavato. Dalla Figura 20, si evince la curva di crescita delle microalghe in presenza di mezzo di controllo e frass di grillo. In particolare, in Figura 20A si può notare una lieve limitazione della crescita di *N. salina* in presenza di frass rispetto al controllo, specialmente nella fase esponenziale. Al giorno 8 infatti le cellule di *N. salina* cresciute su frass sono  $3.91 \cdot 10^6$  cellule  $\text{mL}^{-1}$  contro una quantità di  $6 \cdot 10^6$  cellule  $\text{mL}^{-1}$  nel controllo. Nella fase stazionaria, al giorno 15, le cellule di *N. salina* cresciute su frass sono  $6.06 \cdot 10^6$  cellule  $\text{mL}^{-1}$  rispetto alla coltura di controllo che presenta  $8 \cdot 10^6$  cellule  $\text{mL}^{-1}$ . In Figura 20B invece, si evince come *C. vulgaris* sia riuscita ad accrescersi maggiormente in presenza di frass rispetto al controllo già dalla fase di latenza, dove al giorno 1 le cellule di *C. vulgaris* cresciute su frass erano pari a  $2.36 \cdot 10^6$  cellule  $\text{mL}^{-1}$  mentre nel controllo erano presenti  $1.16 \cdot 10^6$  cellule  $\text{mL}^{-1}$ . Questa maggiore crescita di *C. vulgaris* in presenza di frass rispetto al controllo si è evidenziata anche durante la fase esponenziale, dove al giorno 6 erano presenti  $8.71 \cdot 10^6$  cellule  $\text{mL}^{-1}$  in *C. vulgaris* cresciuta su frass, rispetto a  $6.45 \cdot 10^6$  cellule  $\text{mL}^{-1}$  del controllo. *P. tricornerutum* (Fig. 20C) non è riuscita ad accrescersi in presenza di frass già dalla fase stazionaria, con valori decisamente bassi nella fase esponenziale, dove al giorno 4 vi erano  $2.03 \cdot 10^5$  cellule  $\text{mL}^{-1}$  contro  $3.25 \cdot 10^6$  cellule  $\text{mL}^{-1}$  nel controllo.

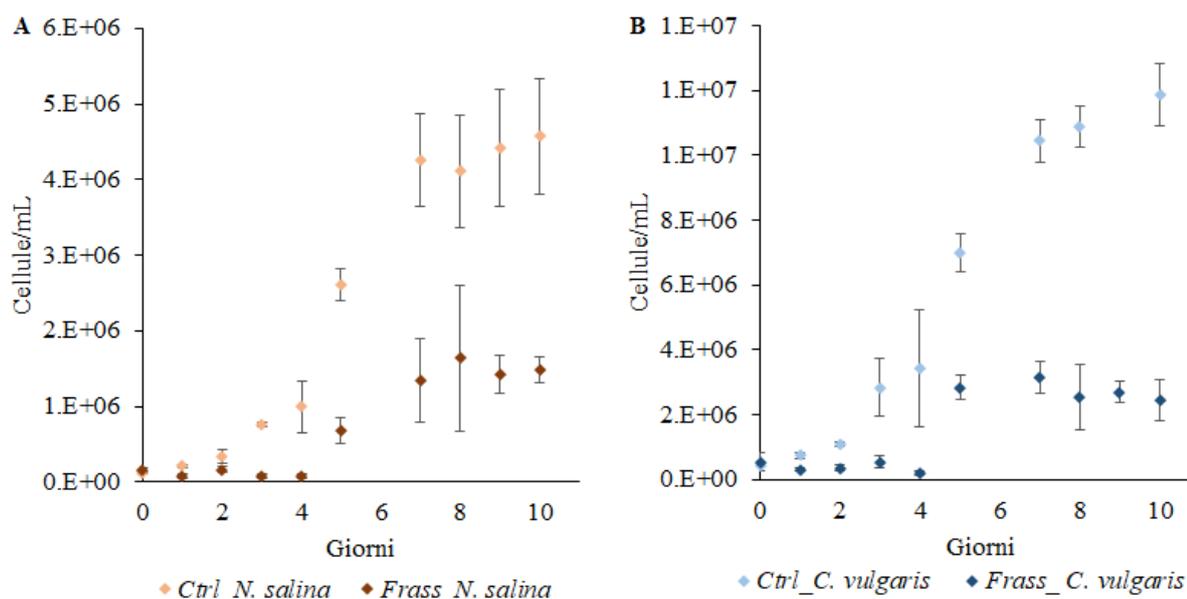


**Figura 20.** Curva di crescita di microalghe: A) *Nannochloropsis salina*, B) *Chlorella vulgaris*, C) *Phaeodactylum tricorutum*. Ctrl\_ *N. salina*, cresciuta nel mezzo di controllo; Frass\_ *N. salina*, cresciuta su frass; Ctrl\_ *C. vulgaris*, cresciuta nel mezzo di controllo; Frass\_ *C. vulgaris*, cresciuta su frass. Ctrl\_ *P. tricorutum*, cresciuta nel mezzo nel mezzo di controllo; Frass\_ *P. tricorutum*, cresciuta su frass.

Questo primo test ci ha permesso di escludere *P. tricorutum* dagli esperimenti successivi, in quanto non è riuscita ad accrescersi in presenza di frass.

## Crescita di alghe in frass autoclavato

Dopo aver verificato la sopravvivenza delle microalghe in presenza di frass mediante il test di tolleranza, *Nannochloropsis salina* e *Chlorella vulgaris*, sono state sottoposte a crescita in frass autoclavato, così come descritto nel paragrafo della preparazione dei campioni. Nella Figura 21 si possono osservare due curve di crescita nel mezzo di controllo (Ctrl) e nel mezzo trattato autoclavato (Frass) per ogni microalga. A differenza del precedente esperimento (Figura 20), si può osservare una netta diminuzione della crescita di entrambe le specie microalgali in presenza di frass autoclavato. In particolare, al giorno 5 *N. salina* (Figura 21A), presentava  $2.61 \cdot 10^6$  cellule  $\text{mL}^{-1}$  nel gruppo di controllo a differenza dell'alga cresciuta su frass in cui vi erano  $6.82 \cdot 10^5$  cellule  $\text{mL}^{-1}$ . Nello stesso giorno, *C. vulgaris* (Figura 21B), presentava  $7 \cdot 10^6$  cellule  $\text{mL}^{-1}$  nel controllo e  $2.84 \cdot 10^6$  cellule  $\text{mL}^{-1}$  nell'alga cresciuta su frass, inoltre nella fase esponenziale, al giorno 7, vi erano  $1.05 \cdot 10^7$  cellule  $\text{mL}^{-1}$  nel controllo e  $3.16 \cdot 10^6$  cellule  $\text{mL}^{-1}$  nel frass. Confrontando il numero di cellule nel frass, a partire dal 5° giorno dall'inizio della crescita in coltura batch, *N. salina* presentava un numero di cellule pari a  $6.82 \cdot 10^5$  cellule  $\text{mL}^{-1}$ , mentre *C. vulgaris* arrivava già a  $2.84 \cdot 10^6$  cellule  $\text{mL}^{-1}$ , corrispondente a circa il doppio rispetto a *N. salina*. Al 10° giorno dall'inizio della crescita in coltura batch, *N. salina* presentava un numero di cellule pari a  $1.48 \cdot 10^6$  cellule  $\text{mL}^{-1}$  nel frass contro  $2.46 \cdot 10^6$  cellule  $\text{mL}^{-1}$  in *C. vulgaris* nel frass, dunque circa  $1 \cdot 10^5$  cellule  $\text{mL}^{-1}$  in più rispetto a *N. salina*. Sulla base di queste ultime evidenze raccolte riguardo a *C. vulgaris* e *N. salina* soprattutto durante la fase esponenziale e stazionaria, è stata selezionata *C. vulgaris* come specie microalgale da impiegare nell'allevamento del grillo.

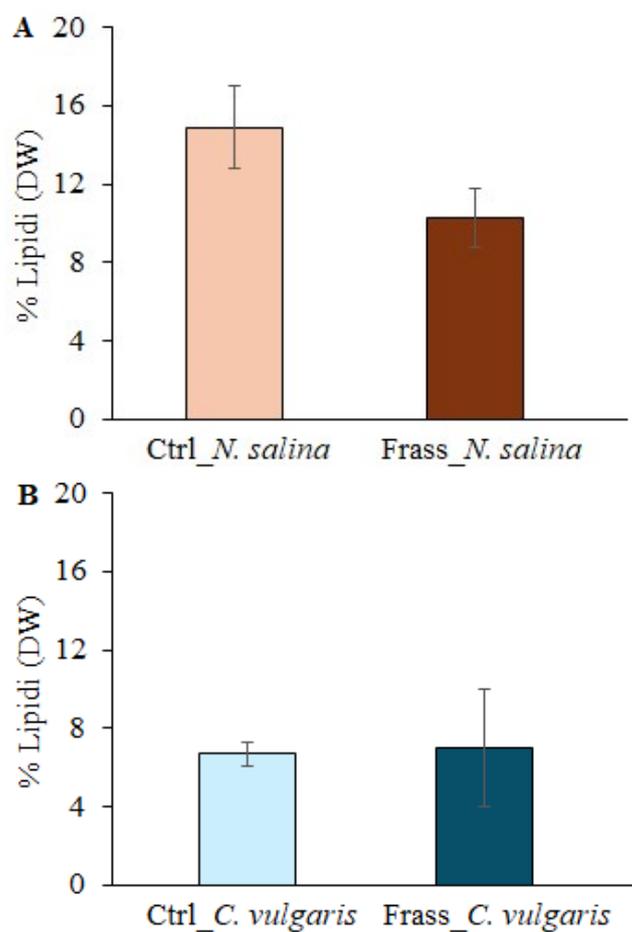


**Figura 21.** Curva di crescita di microalghe: A) *Nannochloropsis salina*, B) *Chlorella vulgaris*. Ctrl\_*N. salina*, cresciuta nel mezzo di controllo; Frass\_*N. salina*, cresciuta su frass; Ctrl\_*C. vulgaris*, cresciuta nel mezzo di controllo; Frass\_*C. vulgaris*, cresciuta su frass.

#### 4.1.2 Contenuto lipidico e composizione degli acidi grassi

Riguardo al contenuto lipidico delle microalghe indagate, *N. salina* presenta un contenuto di acqua che varia tra 86 e 90 % per Ctrl\_*N. salina* e Frass\_*N. salina*, rispettivamente, mentre *C. vulgaris* (Ctrl\_*C. vulgaris* e Frass\_*C. vulgaris*) presenta un contenuto di acqua pari a 99 %.

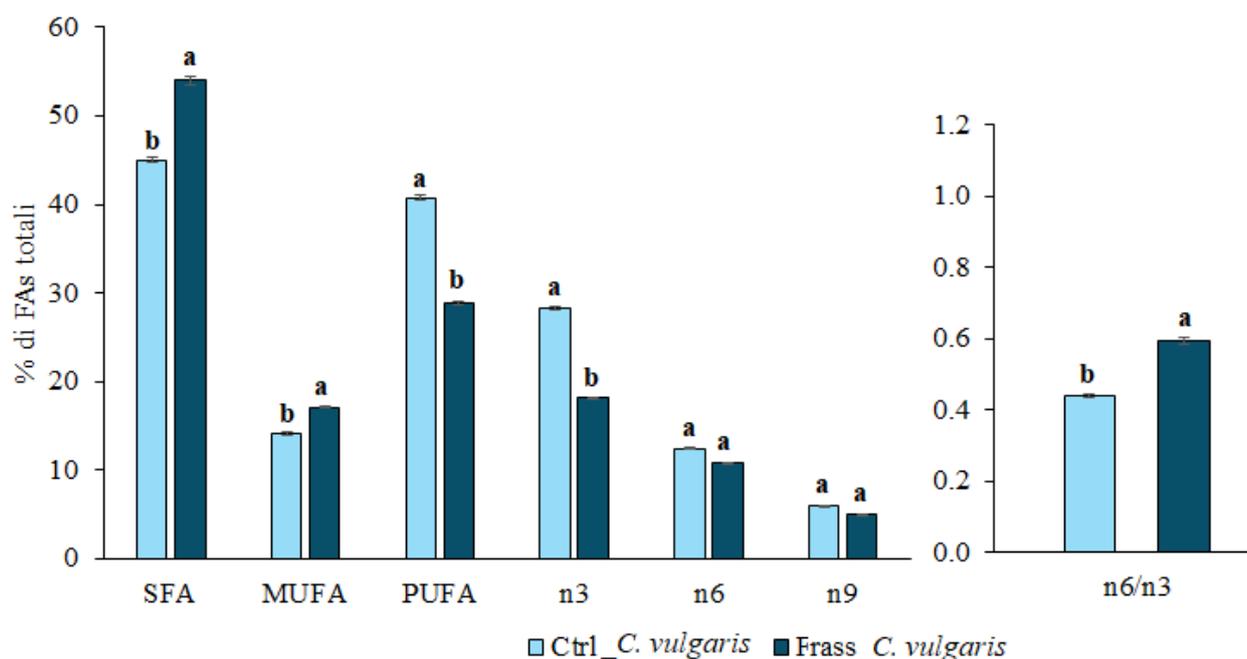
La Figura 22 riporta i risultati della percentuale di lipidi totali su peso secco (% DW) relativi alle microalghe studiate, *N. salina* e *C. vulgaris*. *N. salina* presenta una percentuale corrispondente a  $14.91 \pm 2.10$  % e  $10.27 \pm 1.50$  % per il gruppo Ctrl e il Frass, rispettivamente (Fig. 22A). *C. vulgaris* presenta una percentuale pari a  $6.72 \pm 0.63$  % e  $7.05 \pm 3.01$  % per il gruppo Ctrl e il Frass, rispettivamente (Fig. 22B). Non sono state evidenziate differenze statisticamente significative ( $p > 0.05$ ) per nessuna specie.



**Figura 22.** Lipidi totali (% DW) in *N. salina* (A) e in *C. vulgaris* (B). Ctrl\_ *N. salina*, cresciuta nel mezzo di controllo; Frass\_ *N. salina*, cresciuta su frass; Ctrl\_ *C. vulgaris*, cresciuta nel mezzo di controllo; Frass\_ *C. vulgaris*, cresciuta su frass. I valori sono espressi come media (n=3), le barre di errore indicano la deviazione standard.

La Figura 23 mostra la percentuale delle diverse classi di FAs vs FAs totali, relative a *Chlorella vulgaris* cresciuta nel mezzo di controllo (Ctrl\_ *C. vulgaris*) e su frass di grillo (Frass\_ *C. vulgaris*). In generale, si sono evidenziate differenze statisticamente significative tra i gruppi sperimentali ( $p < 0.05$ ). In particolare, *C. vulgaris* cresciuta su frass di grillo mostra un aumento significativo degli SFA ( $p = 0.0230$ ), dei MUFA ( $p = 0.0008$ ) e del rapporto n6/n3 ( $p = 0.0026$ ), ( $54.0 \pm 0.5$  %,  $17.1 \pm 0.1$  % e  $0.59 \pm 0.01$  per SFA, MUFA e n6/n3, rispettivamente), rispetto all'alga cresciuta nel mezzo di controllo ( $45.0 \pm 0.3$  %,  $14.1 \pm 0.2$  % e  $0.44 \pm 0.01$  per SFA, MUFA e n6/n3, rispettivamente), e una diminuzione statisticamente significativa dei PUFA ( $p = 0.0047$ ) e degli n3 ( $p = 0.0020$ ) ( $28.9 \pm 0.2$  % e  $18.1 \pm 0.1$  % per PUFA e n3

rispettivamente), rispetto all'alga cresciuta su mezzo standard ( $40.8 \pm 0.3$  % e  $28.3 \pm 0.2$  % per PUFA e n3 rispettivamente). Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative tra i due gruppi sperimentali per le seguenti classi di acidi grassi: n6 e n9, con valori rispettivamente pari a  $12.0 \pm 0.1$  % e  $5.9 \pm 0.2$  % per il gruppo controllo  $11.0 \pm 0.1$  % e  $5.1 \pm 0.1$  % per il gruppo trattato. Anche il rapporto n3/n6,  $2.27 \pm 0.03$  e  $1.56 \pm 0.02$ , nel gruppo controllo e trattato, rispettivamente, non mostra differenze statisticamente significative tra gruppi ( $p > 0.05$ ).



**Figura 23.** Composizione percentuale delle diverse classi di acidi grassi in *C. vulgaris*. Ctrl\_ *C. vulgaris*, cresciuta nel mezzo di controllo; Frass\_ *C. vulgaris*, cresciuta su frass. SFA, acidi grassi saturi; MUFA, acidi grassi monoinsaturi; PUFA, acidi grassi polinsaturi; n3, acidi grassi omega 3; n6, acidi grassi omega 6; n9, acidi grassi omega 9; n3/n6, acidi grassi omega 3/acidi grassi omega 6. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i due gruppi sperimentali per la stessa classe di acidi grassi ( $p < 0.05$ ). I valori sono espressi come media ( $n=9$ ), le barre di errore indicano la deviazione standard. Test del t di student.

La Tabella 16 mostra la composizione degli acidi grassi (% vs FA totali) in *C. vulgaris* cresciuta nel mezzo di controllo e su frass di grillo. Gli FAs che presentano una percentuale maggiore rispetto agli FAs totali sono, per entrambi i gruppi sperimentali: per gli SFA, acido palmitico (16:0) e acido stearico (18:0), per i MUFA, acido eptadecanoico (17:1n7) e acido

palmitoleico (16:1n7), e per i PUFA, acido linoleico (18:2n6) e acido alfa-linolenico (18:3n3). Complessivamente, si notano differenze statisticamente significative ( $p < 0.05$ ) tra i due gruppi sperimentali per la maggior parte degli acidi grassi. In particolare, si osserva un aumento statisticamente significativo in *C. vulgaris* cresciuta su frass rispetto al gruppo controllo della percentuale di acido laurico (12:0,  $p = 0.0005$ ), acido miristico (14:0,  $p = 0.0032$ ), acido pentadecanoico (15:0,  $p = 0.0003$ ), acido palmitico (16:0,  $p = 0.0052$ ), acido palmitoleico (16:1n7,  $p = 0.0014$ ), acido stearico (18:0,  $p = 0.0016$ ), acido eicosanoico (20:0,  $p = 0.0012$ ), acido eicosadienoico (20:2n6,  $p = 0.0001$ ), acido icosanoico (21:0,  $p = 0.0054$ ), acido eicosatrienoico (20:3n3,  $p < 0.0001$ ), e acido behenico (22:0,  $p < 0.0001$ ).

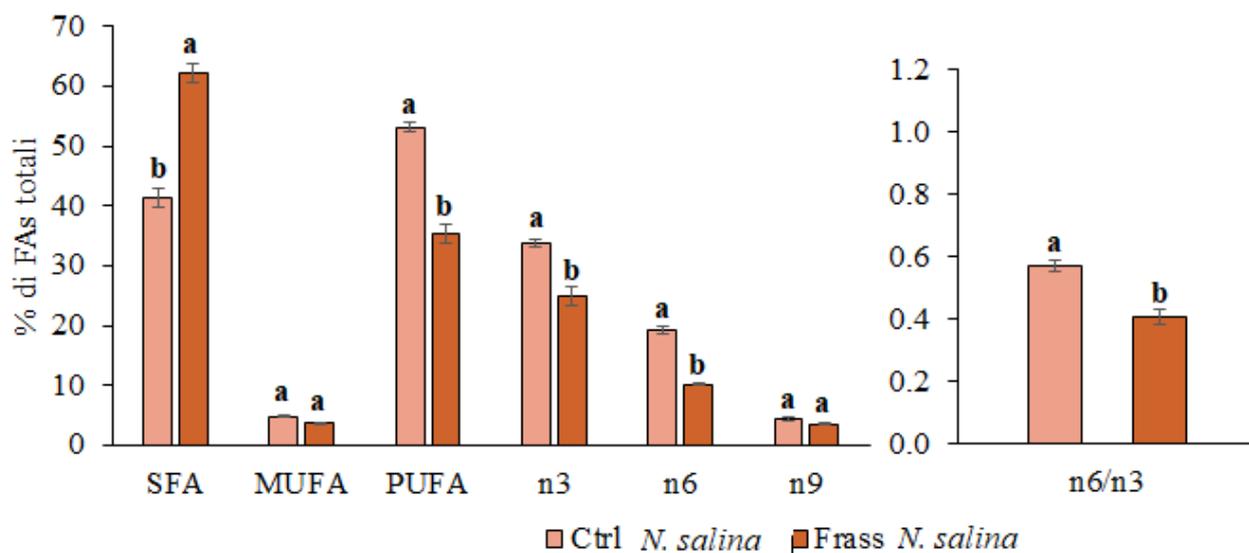
**Tabella 16.** Composizione degli acidi grassi (% vs FAs totali) in *C. vulgaris*.

Acido grasso	Ctrl_ <i>C. vulgaris</i>	Frass_ <i>C. vulgaris</i>
8:0	0.0123±0.0001	0.015±0.001
10:0	0.0097±0.0002	0.0123±0.0002
11:0	0.00110±0.00004	0.003±0.001
12:0	0.039±0.002 <sup>b</sup>	0.10±0.01 <sup>a</sup>
13:0	0.00273±0.00001	0.021±0.001
14:0	0.49±0.03 <sup>b</sup>	0.82±0.01 <sup>a</sup>
15:0	0.098±0.007 <sup>b</sup>	0.318±0.006 <sup>a</sup>
16:0	31.1±0.7 <sup>b</sup>	33.1±2.0 <sup>a</sup>
16:1n7	2.89±0.03 <sup>b</sup>	7±1 <sup>a</sup>
17:0	0.088±0.003 <sup>b</sup>	0.200±0.007 <sup>a</sup>
17:1n7	5.3±0.2 <sup>a</sup>	5.06±0.02 <sup>b</sup>
18:0	12.9±0.2 <sup>b</sup>	19.0±1.7 <sup>a</sup>
18:1n9	5.9±0.5 <sup>a</sup>	4.7±0.6 <sup>b</sup>
18:2n6	12.4±0.4 <sup>a</sup>	10.7±0.9 <sup>b</sup>
18:3n3	28.2±1.3 <sup>a</sup>	18.0±2.3 <sup>b</sup>
20:0	0.130±0.003 <sup>b</sup>	0.22±0.01 <sup>a</sup>
20:1n9	0.018±0.001	0.032±0.001
20:2n6	0.0202±0.0004 <sup>b</sup>	0.051±0.004 <sup>a</sup>
20:3n6	0.029±0.002	0.018±0.001
21:0	0.023±0.001 <sup>b</sup>	0.040±0.003 <sup>a</sup>
20:3n3	0.027±0.002 <sup>b</sup>	0.049±0.001 <sup>a</sup>
22:0	0.025±0.002 <sup>b</sup>	0.067±0.004 <sup>a</sup>
22:1n9	nd	0.31±0.02
22:2n6	0.017±0.007	nd
23:0	0.013±0.001	0.014±0.001
24:0	0.054±0.002 <sup>b</sup>	0.085±0.005 <sup>a</sup>
22:6n3	0.07±0.01 <sup>b</sup>	0.29±0.05 <sup>a</sup>

Ctrl\_ *C. vulgaris*, cresciuta nel mezzo di controllo; Frass\_ *C. vulgaris*, cresciuta su frass. I valori sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard (n. aliquote per campione=3, repliche per ogni aliquota=3). Le medie dei valori di ogni acido grasso aventi lettere diverse sono statisticamente diverse tra loro ( $p < 0.05$ ). Acidi grassi  $< 0.02\%$  sono stati esclusi dall'analisi statistica perché la loro concentrazione era vicina al limite di rivelabilità (LOD). nd: non determinato.

Al contrario, *C. vulgaris* cresciuta su frass di grillo mostra una diminuzione statisticamente significativa ( $p < 0.05$ ) rispetto a *C. vulgaris* cresciuta nel mezzo standard (Tabella 16) della percentuale di: acido linoleico (18:2n6,  $10.7 \pm 0.9\%$  vs  $12.4 \pm 0.4\%$ ), acido alfa-linolenico (18:3n3,  $18.0 \pm 2.3\%$  vs  $28.2 \pm 1.3\%$ ) e, inoltre, dell'acido oleico (18:1n9,  $4.7 \pm 0.6\%$  vs  $6.0 \pm 0.5\%$ ).

La Figura 24 mostra la percentuale delle diverse classi di FAs vs FAs totali, relative a *Nannochloropsis salina* cresciuta nel mezzo di controllo (Ctrl\_ *N. salina*) e su frass di grillo (Frass\_ *N. salina*). In generale, le alghe cresciute sui due mezzi di crescita mostrano differenze statisticamente significative ( $p < 0.05$ ) tra loro. In particolare, *N. salina* cresciuta su frass presenta un aumento statisticamente significativo degli SFA ( $p = 0.0023$ ) ( $62 \pm 2\%$ ), rispetto all'alga cresciuta su mezzo standard ( $41 \pm 2\%$ ), e una diminuzione statisticamente significativa dei PUFA ( $p = 0.0034$ ), degli n3 ( $p = 0.0053$ ) e degli n6 ( $p = 0.0342$ ) e del rapporto n6/n3 ( $p = 0.0053$ ) ( $35 \pm 2\%$ ,  $25 \pm 2\%$ ,  $10.2 \pm 0.1\%$  e  $0.41 \pm 0.02$  per PUFA, n3, n6 e n6/n3, rispettivamente), rispetto al gruppo di controllo ( $53 \pm 1\%$ ,  $34 \pm 1\%$ ,  $19.3 \pm 0.6\%$  e  $0.57 \pm 0.02$  per PUFA, n3, n6 e n6/n3, rispettivamente). Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative ( $p > 0.05$ ) tra i due gruppi sperimentali per i MUFA e gli n9, con valori rispettivamente pari a  $4.8 \pm 0.2\%$  e  $4.4 \pm 0.2\%$  per il gruppo controllo e  $3.7 \pm 0.1\%$  e  $3.6 \pm 0.1\%$  per il gruppo trattato.



**Figura 24.** Composizione percentuale delle diverse classi di acidi grassi in *N. salina*. Ctrl\_ *N. salina*, cresciuta nel mezzo di controllo; Frass\_ *N. salina*, cresciuta su frass. SFA, acidi grassi saturi; MUFA, acidi grassi monoinsaturi; PUFA, acidi grassi polinsaturi; n3, acidi grassi omega 3; n6, acidi grassi omega 6; n9, acidi grassi omega 9; n3/n6, acidi grassi omega 3/acidi grassi omega 6. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i due gruppi sperimentali per la stessa classe di acidi grassi ( $p < 0.05$ ). I valori sono espressi come media ( $n=9$ ), le barre di errore indicano la deviazione standard. Test del t di student.

La Tabella 17 mostra la composizione degli acidi grassi (% vs FA totali) in *N. salina* cresciuta nel mezzo di controllo e su frass di grillo. Gli FAs più rappresentativi sono, per entrambi i gruppi sperimentali: tra gli SFA, 16:0 e 18:0, tra i MUFA, 16:1n7 e 17:1n7, e tra i PUFA, gli acidi grassi essenziali 18:3n3 e 18:2n6. Si può notare che il mezzo di crescita influenza la composizione degli acidi grassi di *N. salina* portando a differenze statisticamente significative ( $p < 0.05$ ) nella percentuale della maggior parte degli acidi grassi. In particolare, si osserva un aumento statisticamente significativo in Frass\_ *N. salina* rispetto al Ctrl\_ *N. salina* della percentuale degli SFA 12:0 ( $p=0.034$ ), 16:0 ( $p=0.0008$ ), 18:0 ( $p=0.0006$ ) e 20:0 ( $p=0.0001$ ). Al contrario, *N. salina* cresciuta su frass mostra, rispetto al controllo, una diminuzione statisticamente significativa dei seguenti FAs: 14:0 ( $p=0.0001$ ), 17:0 ( $p=0.0083$ ), 17:1n7 ( $p=0.0003$ ), 18:1n9 ( $p=0.0009$ ), 20:2n6 ( $p=0.0002$ ), 20:4n6 ( $p=0.0143$ ), 20:3n3 ( $p=0.0001$ ), 22:2n6 ( $p=0.0002$ ), 23:0 ( $p=0.0007$ ) e 24:0 ( $p=0.0068$ ). Inoltre, si nota anche una diminuzione

statisticamente significativa degli acidi grassi essenziali 18:2n6 ( $p=0.0001$ ) e 18:3n3 ( $p=0.0012$ ) in Frass\_ *N. salina* rispetto a Ctrl\_ *N. salina* (Tabella 17).

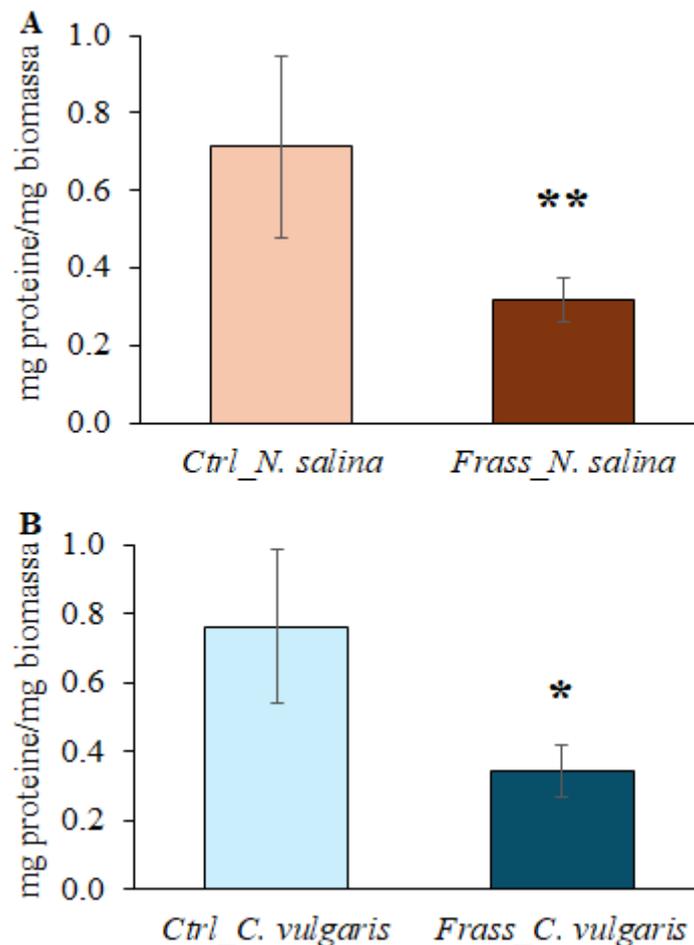
**Tabella 17.** Composizione acidi grassi (% vs FAs totali) di *N. salina*.

Acidi grassi	Ctrl_ <i>N. salina</i>	Frass_ <i>N. salina</i>
8:0	0.02±0.01	0.019±0.003
10:0	0.009±0.003	0.015±0.001
11:0	0.005±0.001	0.006±0.001
12:0	0.194±0.005 <sup>b</sup>	0.21±0.01 <sup>a</sup>
13:0	0.016±0.001	0.015±0.001
14:0	1.343±0.001 <sup>a</sup>	1.10±0.05 <sup>b</sup>
14:1n5	0.019±0.002	0.006±0.001
15:0	0.41±0.02	0.38±0.03
16:0	29±5 <sup>b</sup>	36±3 <sup>a</sup>
17:0	0.23±0.02 <sup>a</sup>	0.19±0.02 <sup>b</sup>
17:1n7	0.4±0.1 <sup>a</sup>	0.14±0.02 <sup>b</sup>
18:0	9±2 <sup>b</sup>	23±2 <sup>a</sup>
18:1n9	4.2±1.0 <sup>a</sup>	3.3±0.4 <sup>b</sup>
18:2n6	18±4 <sup>a</sup>	10±2 <sup>b</sup>
18:3n3	28±2 <sup>a</sup>	19±2 <sup>b</sup>
20:0	0.14±0.04 <sup>b</sup>	0.27±0.01 <sup>a</sup>
20:1n9	0.034±0.004	0.039±0.000
20:2n6	0.12±0.05 <sup>a</sup>	0.05±0.01 <sup>b</sup>
20:3n6	0.4±0.1	0.3±0.14
21:0	0.03±0.01	0.04±0.01
20:4n6	0.21±0.07 <sup>a</sup>	0.09±0.03 <sup>b</sup>
20:3n3	0.53±0.15 <sup>a</sup>	0.2±0.1 <sup>b</sup>
20:5n3	5.4±1.5	5.7±2.0
22:0	0.13±0.01	0.16±0.04
22:1n9	0.08±0.02	0.14±0.01
22:2n6	0.31±0.02 <sup>a</sup>	0.11±0.09 <sup>b</sup>
23:0	0.193±0.045 <sup>a</sup>	0.05±0.05 <sup>b</sup>
24:0	0.5±0.1 <sup>a</sup>	0.4±0.1 <sup>b</sup>
22:6n3	0.3±0.1	0.3±0.2
24:1n9	0.07±0.01	0.10±0.05

Ctrl\_ *N. salina*, cresciuta nel mezzo di controllo; Frass\_ *N. salina*, cresciuta su frass. I valori sono espressi come media ± deviazione standard (n. aliquote per campione=3, repliche per ogni aliquota=3). Le medie dei valori di ogni acido grasso aventi lettere diverse sono statisticamente diverse tra loro ( $p<0.05$ ). Acidi grassi <0.02% sono stati esclusi dall'analisi statistica perché la loro concentrazione era vicina al LOD. nd: non determinato.

### 4.1.3 Contenuto proteico

La determinazione delle proteine nelle microalghe è stata effettuata con lo Spettrofotometro, mediante una metodica colorimetrica descritta nel paragrafo 3.8.8. In genere, si evidenzia una riduzione significativa del contenuto di proteine nelle microalghe cresciute su frass, rispetto alle microalghe cresciute in coltura standard. Il contenuto proteico in *N. salina* (Fig. 25A) è pari a  $0.71 \pm 0.24$  mg proteine mg biomassa<sup>-1</sup> nel gruppo controllo e  $0.32 \pm 0.06$  mg proteine mg biomassa<sup>-1</sup> nel gruppo trattato, con una differenza statisticamente significativa ( $p=0.0076$ ). Il contenuto proteico in *C. vulgaris* (Fig. 25B) è pari a  $0.76 \pm 0.22$  mg proteine mg biomassa<sup>-1</sup> nel gruppo di controllo e  $0.35 \pm 0.08$  mg proteine mg biomassa<sup>-1</sup> nel frass, con una differenza statisticamente significativa ( $p=0.0151$ ).



**Figura 25.** Quantificazione proteine in mg proteine mg biomassa<sup>-1</sup> in *N. salina* (A) e in *C. vulgaris* (B). Ctrl\_*N. salina*, cresciuta nel mezzo di controllo; Frass\_*N. salina*, cresciuta su frass; Ctrl\_*C. vulgaris*, cresciuta nel mezzo di controllo; Frass\_*C. vulgaris*, cresciuta su frass. \*\* differenza statisticamente significativa (p<0.01); \* differenza statisticamente significativa (p<0.05). Test del t di student.

## Confronto profilo lipidico e contenuto proteico nelle microalghe

Dai dati relativi al contenuto di lipidi totali nelle microalghe, emerge che *C. vulgaris*, cresciuta su frass di grillo, presenta un più basso contenuto lipidico in peso secco ( $7.05 \pm 3.01$  %), rispetto a *N. salina* cresciuta sul medesimo substrato ( $10.3 \pm 1.5$  %). Riguardo al profilo degli acidi grassi, Frass\_*C. vulgaris* presenta una minore percentuale di SFA ( $54.0 \pm 0.5$  %), rispetto a Frass\_*N. salina* ( $65 \pm 2$  %). Per quanto riguarda gli acidi grassi insaturi (UFA), si osserva una percentuale maggiore in Frass\_*C. vulgaris* ( $43.2 \pm 0.2$  %) rispetto a Frass\_*N. salina* ( $39 \pm 2$  %), principalmente dovuta alla maggiore percentuale dei MUFA ( $15.5 \pm 0.1$  % vs  $3.7 \pm 0.1$  % per *C. vulgaris* e *N. salina*, rispettivamente).

D'altro canto, *C. vulgaris* trattata presenta un contenuto proteico ( $0.35 \pm 0.08$  mg proteine mg biomassa<sup>-1</sup>), simile a quello di *N. salina* trattata ( $0.32 \pm 0.06$  mg proteine mg biomassa<sup>-1</sup>).

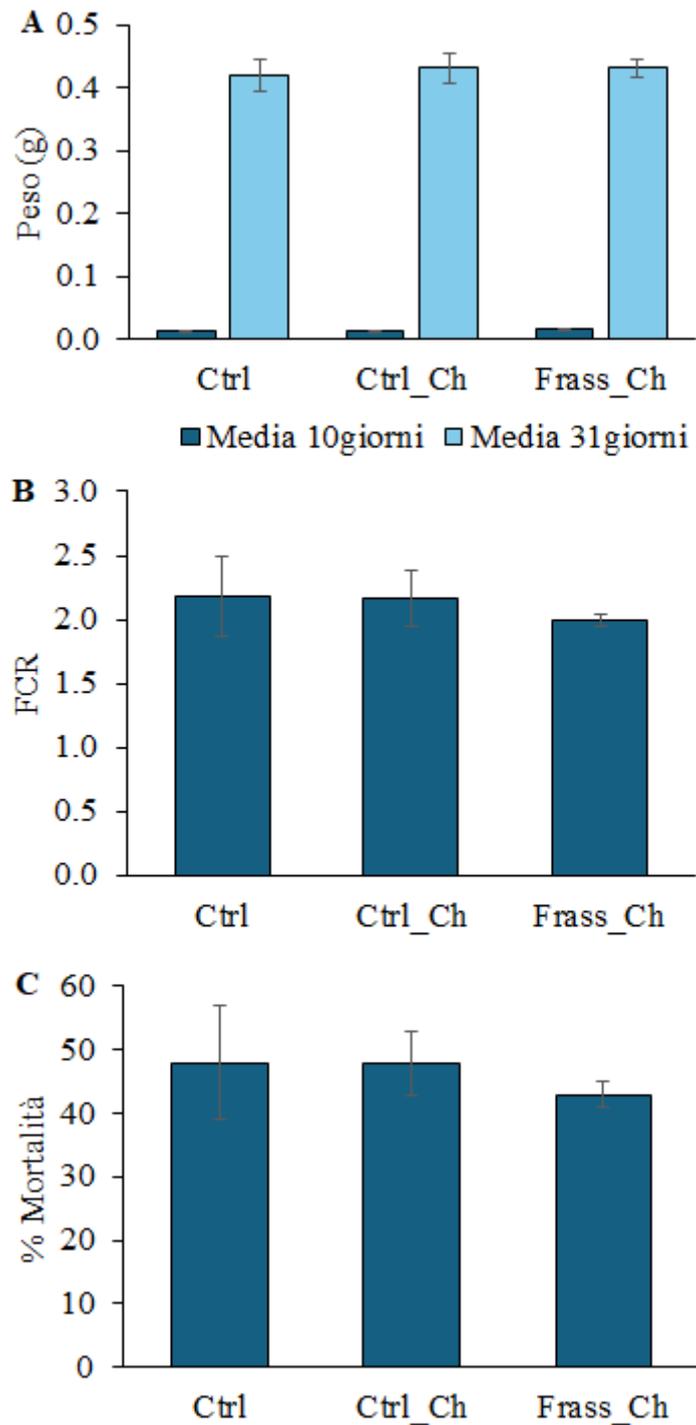
Sulla base di un profilo lipidico più ricco in UFA di *C. vulgaris* rispetto a *N. salina*, e tenendo conto del fatto che *C. vulgaris* cresce molto meglio di *N. salina* su frass (al 7° giorno, picco di crescita,  $3.16 \cdot 10^6$  cellule mL<sup>-1</sup> e  $1.35 \cdot 10^6$  cellule mL<sup>-1</sup> *C. vulgaris* e *N. salina*, rispettivamente), è stata selezionata la specie *C. vulgaris* come supplemento alla dieta di *A. domesticus*, con l'obiettivo di migliorare la composizione nutrizionale dell'insetto stesso.

## 4.2 *Acheta domesticus*

### 4.2.1 Performance

Le performance di *Acheta domesticus* sono state valutate in termini di peso corporeo (g), percentuale di mortalità e FCR (Feed Conversion Ratio), parametro dato dal rapporto tra

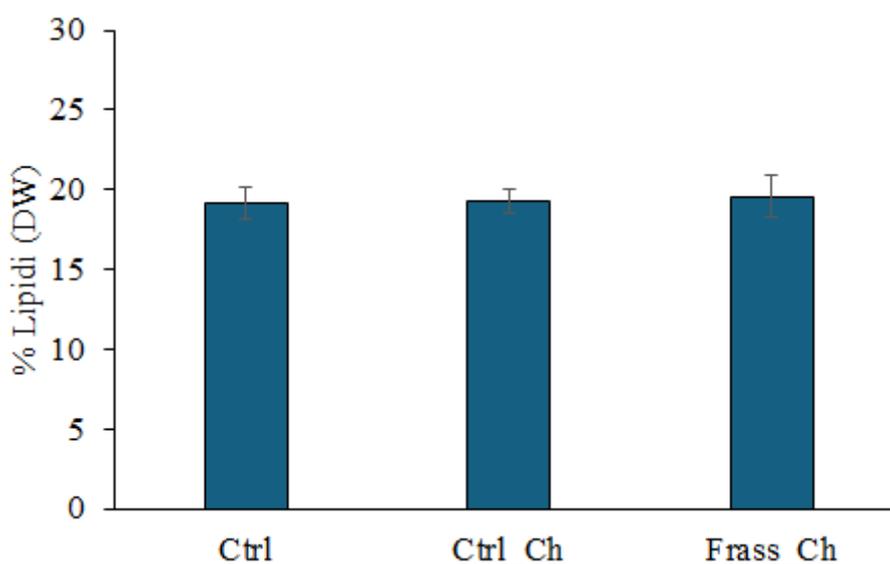
quantità di cibo consumato (kg) e peso del grillo (kg), che indica l'efficienza con cui un animale converte il cibo che consuma in biomassa. I grilli alimentati con le due diverse tipologie di *Chlorella vulgaris*, hanno assunto le stesse quantità di acqua e cibo. La Figura 26 mostra i grafici relativi alle performance di AD dei diversi gruppi sperimentali: Ctrl (AD allevato in assenza di microalghe), Ctrl\_Ch (AD allevato in presenza di estratto di *C. vulgaris* cresciuta nel mezzo di controllo, BG11) e Frass\_Ch (AD allevato in presenza di estratto di *C. vulgaris* cresciuta su frass). Il peso medio dei grilli (Fig. 26A) al 10° giorno dalla schiusa, dunque all'inizio dell'esperimento, era pari a: Ctrl,  $0.013 \pm 0.001$  g; Ctrl\_Ch,  $0.014 \pm 0.001$  g; Frass\_Ch,  $0.015 \pm 0.001$  g, e non risultavano differenze statisticamente significative tra gruppi ( $p > 0.05$ ). Al 31° giorno dalla schiusa, ovvero l'ultimo giorno dell'esperimento, il peso medio era pari a: Ctrl,  $0.421 \pm 0.025$  g; Ctrl\_Ch,  $0.432 \pm 0.023$  g; Frass\_Ch,  $0.431 \pm 0.016$  g, e non si sono evidenziate differenze statisticamente significative tra i gruppi sperimentali ( $p > 0.05$ ). La mancanza di differenze significative nel peso medio dei grilli appartenenti ai vari gruppi, e la stessa quantità di cibo assunta per ogni bacc, hanno portato ad ottenere un valore di FCR (rapporto cibo consumato/peso grillo), che non differiva significativamente ( $p > 0.05$ ) tra i vari gruppi: Ctrl,  $2.18 \pm 0.31$ ; Ctrl\_Ch,  $2.17 \pm 0.22$ ; Frass\_Ch,  $1.99 \pm 0.05$  (Fig. 26B). L'integrazione della microalga nella dieta del grillo ha portato ad un trend decrescente della mortalità (Fig. 26C), passando da  $48 \pm 9\%$  nel gruppo Ctrl, a  $48 \pm 5\%$  e  $43 \pm 2\%$  nei gruppi trattati Ctrl\_Ch e Frass\_Ch, rispettivamente, ma non si sono evidenziate differenze statisticamente significative tra i gruppi ( $p > 0.05$ ).



**Figura 26.** Tasso di crescita di *Acheta domesticus* alimentato con dieta sperimentale in presenza di *Chlorella vulgaris*: **A)** Peso del grillo a 10 giorni, inizio esperimento e a 31 giorni, fine esperimento; **B)** FCR; **C)** % Mortalità. Ctrl, allevato in condizioni standard; Ctrl\_Ch, allevato in presenza di estratto di *C. vulgaris* cresciuta nel mezzo di controllo; Frass\_Ch, allevato in presenza di estratto di *C. vulgaris* cresciuta su frass.

#### 4.2.2 Contenuto lipidico e composizione degli acidi grassi

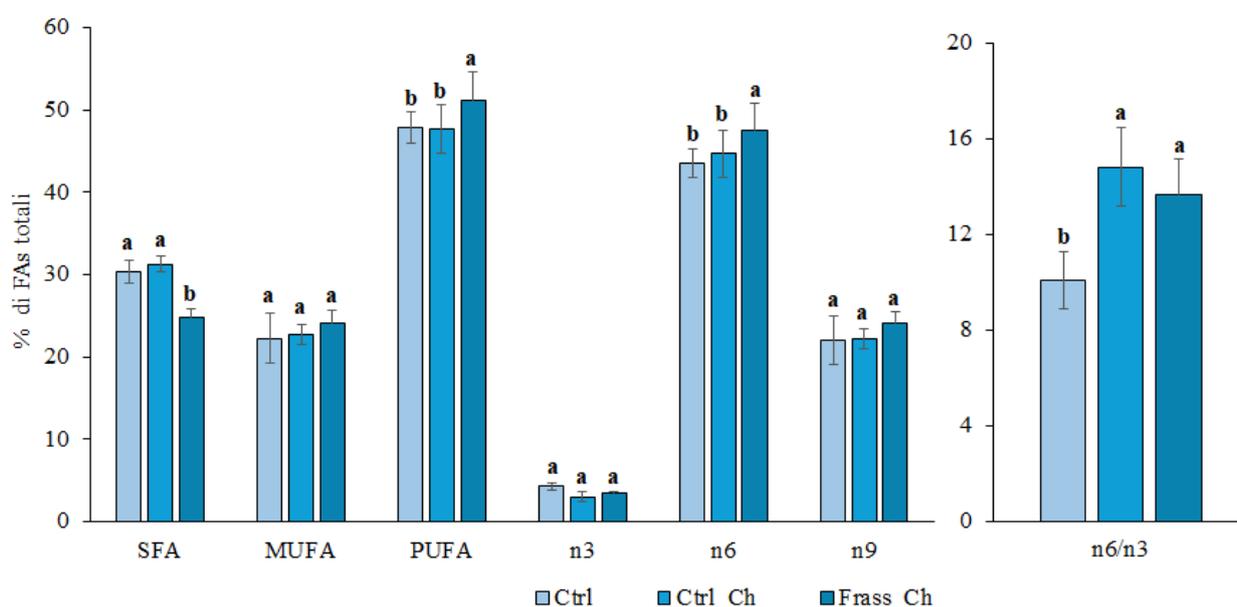
I gruppi sperimentali indagati, Ctrl (AD cresciuto in condizioni standard), Ctrl\_Ch (AD allevato in presenza di *C. vulgaris* cresciuta nel mezzo di controllo), e Frass\_Ch (AD allevato in presenza di *C. vulgaris* cresciuta su frass), presentano un contenuto di acqua che varia dal 67 % al 69 %, senza differenze statisticamente significative tra gruppi ( $p>0.05$ ). Il contenuto totale di lipidi presenta un valore medio pari a  $19.4\pm 0.2$  % DW (Fig. 27), e non si sono evidenziate differenze statisticamente significative tra i gruppi ( $p>0.05$ ).



**Figura 27.** Lipidi totali (% DW) in *Acheta domesticus* (AD). I valori sono espressi come media ( $n=3$ ), le barre di errore indicano la deviazione standard. Ctrl, allevato in condizioni standard; Ctrl, allevato in condizioni standard; Ctrl\_Ch, allevato in presenza di estratto di *C. vulgaris* cresciuta nel mezzo di controllo; Frass\_Ch, allevato in presenza di estratto di *C. vulgaris* cresciuta su frass. ( $p>0.05$ ).

La Figura 28 mostra la percentuale delle diverse classi di FAs vs FAs totali in AD, relative ai gruppi sperimentali. Il gruppo Frass\_Ch mostra un calo statisticamente significativo ( $p=0.0356$ ) della percentuale di SFA ( $25\pm 1$  %) rispetto al gruppo controllo Ctrl ( $30\pm 1$  %), e al gruppo Ctrl\_Ch ( $31\pm 1$  %). Inoltre, Frass\_Ch mostra un aumento statisticamente significativo dei PUFA ( $p=0.0365$ ), degli n6 ( $p=0.0234$ ) e del rapporto n6/n3 ( $p=0.0002$ ), ( $51\pm 3$  %,  $48\pm 3$  %,  $14\pm 1$  per PUFA, n6 e n6/n3 rispettivamente), rispetto ad AD allevato su *C.*

*vulgaris* cresciuta su mezzo di controllo (48±3 %, 45±3 %, e 15±2 per PUFA, n6 e n6/n3 rispettivamente) e rispetto ad AD cresciuto in condizioni standard (48±2 %, 44±2 % e 10±1 per PUFA, n6, n6/n3 rispettivamente). Non si sono riscontrate differenze statisticamente significative tra i gruppi sperimentali per le seguenti classi di acidi grassi: MUFA, n3 e n9, con valori rispettivamente pari a 22±3 %, 4.3±0.4 % e 22±3 % per il gruppo Ctrl, 23±1 %, 3.0±0.5 % e 22±1 % per il gruppo Ctrl\_Ch e 24±2 %, 3.5±0.2 % e 24±2 % per il gruppo Frass\_Ch.



**Figura 28.** Composizione percentuale delle diverse classi di acidi grassi in *Acheta domesticus* (AD). Ctrl, allevato in condizioni standard; Ctrl\_Ch, allevato in presenza di estratto di *C. vulgaris* cresciuta nel mezzo di controllo; Frass\_Ch, allevato in presenza di estratto di *C. vulgaris* cresciuta su frass. SFA, acidi grassi saturi; MUFA, acidi grassi monoinsaturi; PUFA, acidi grassi polinsaturi; n3, acidi grassi omega 3; n6, acidi grassi omega 6; n9, acidi grassi omega 9; n3/n6, acidi grassi omega 3/acidi grassi omega 6. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i gruppi sperimentali per la stessa classe di acidi grassi ( $p < 0.05$ ). I valori sono espressi come media ( $n=9$ ), le barre di errore indicano la deviazione standard. Test ANOVA.

La Tabella 18 mostra la composizione degli acidi grassi (% vs FA totali) relativa ai gruppi sperimentali di AD. Gli FAs più rappresentativi sono, per tutti e tre i gruppi sperimentali: per gli SFA, 16:0 e 18:0, per i MUFA, 18:1n9 e per i PUFA, gli acidi grassi essenziali 18:2n6 e 18:3n3. Si può notare che il mezzo di crescita influenza la composizione degli acidi grassi di

AD portando a differenze statisticamente significative ( $p < 0.05$ ) nella percentuale della maggior parte degli acidi grassi. Riguardo agli FAs maggiori, si osserva una diminuzione statisticamente significativa in Frass\_Ch della percentuale dell'acido 16:0 ( $p = 0.0001$ ) rispetto a Ctrl e Ctrl\_Ch e della percentuale di 18:0 ( $p = 0.0091$ ) rispetto al Ctrl\_Ch. Al contrario, Frass\_Ch mostra, rispetto agli altri gruppi sperimentali, un aumento statisticamente significativo di 18:1n9 ( $p = 0.0082$ ), e degli acidi grassi essenziali 18:2n6 ( $p = 0.0008$ ) e 18:3n3 ( $p = 0.006$ ) (Tabella 18).

**Tabella 18.** Composizione degli acidi grassi (% vs FAs totali) di *Acheta domesticus*.

Acido grasso	Ctrl	Ctrl_Ch	Frass_Ch
6:0	0.007±0.001	0.0056±0.0004	0.008±0.001
8:0	0.003±0.001	0.007±0.001	0.005±0.001
10:0	0.005±0.002	0.006±0.001	0.0065±0.0003
11:0	0.009±0.005	0.0011±0.0001	0.0017±0.0003
12:0	0.05±0.01 <sup>b</sup>	0.06±0.01 <sup>a</sup>	0.07±0.01 <sup>a</sup>
13:0	0.005±0.005	0.004±0.001	0.004±0.001
14:0	0.69±0.04	0.68±0.07	0.74±0.06
14:1n5	0.15±0.01 <sup>a</sup>	0.10±0.01 <sup>a</sup>	0.03±0.01 <sup>b</sup>
15:0	0.11±0.01	0.11±0.01	0.12±0.01
15:1n5	nd	0.006±0.001	nd
16:0	21±1 <sup>a</sup>	21±2 <sup>a</sup>	17±1 <sup>b</sup>
16:1n7	0.10±0.06	0.221±0.002	nd
17:0	0.19±0.02	0.19±0.01	0.18±0.01
17:1n7	nd	0.2±0.1 <sup>a</sup>	0.06±0.01 <sup>b</sup>
18:0	8±2 <sup>b</sup>	9±1 <sup>a</sup>	6±2 <sup>b</sup>
18:1n9	22±1 <sup>b</sup>	22±1 <sup>b</sup>	24±1 <sup>a</sup>
18:2n6	44±1 <sup>b</sup>	45±3 <sup>b</sup>	48±2 <sup>a</sup>
18:3n3	2.74±0.04 <sup>b</sup>	2.7±0.1 <sup>b</sup>	3.10±0.01 <sup>a</sup>
20:1n9	nd	0.11±0.01 <sup>a</sup>	0.03±0.01 <sup>b</sup>
20:2n6	nd	nd	0.07±0.01
21:0	0.10±0.07	0.010±0.003	0.013±0.001
20:3n3	1.5±0.4 <sup>a</sup>	0.3±0.1 <sup>b</sup>	0.37±0.04 <sup>b</sup>
22:1n9	0.26±0.03 <sup>b</sup>	0.113±0.004 <sup>c</sup>	0.30±0.02 <sup>a</sup>
22:6n3	0.09±0.01 <sup>a</sup>	0.03±0.01 <sup>ab</sup>	0.022±0.003 <sup>b</sup>
24:1n9	0.022±0.003	0.024±0.001	nd

Ctrl, allevato in condizioni standard; Ctrl\_Ch, allevato in presenza di estratto di *C. vulgaris* cresciuta nel mezzo di controllo; Frass\_Ch, allevato in presenza di estratto di *C. vulgaris* cresciuta su frass. I valori sono espressi come media ± deviazione standard (n. aliquote per campione=3, repliche per ogni aliquota=3). Le medie dei valori di ogni acido grasso aventi lettere diverse sono statisticamente diverse tra loro ( $p < 0.05$ ). Acidi grassi <0.02% sono stati esclusi dall'analisi statistica perché la loro concentrazione era vicina al LOD. nd: non determinato.

La Tabella 19 riporta gli indici nutrizionali dei vari gruppi sperimentali di AD. Il gruppo Frass\_Ch presenta un aumento statisticamente significativo del rapporto PUFA/SFA ( $p=0.0010$ ) e dell'indice HH (0.0002) e un calo statisticamente significativo di AI ( $p=0.0004$ ) e TI ( $p<0.0001$ ) rispetto agli altri gruppi sperimentali. AD allevato su *C. vulgaris* controllo non presenta differenze statisticamente significative rispetto ai grilli allevati in condizioni standard.

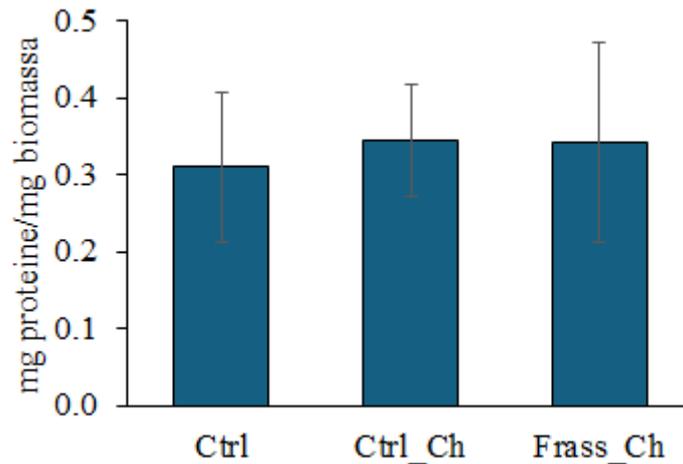
**Tabella 19.** Indici nutrizionali di *Acheta domesticus*.

	<b>Ctrl</b>	<b>Ctrl_Ch</b>	<b>Frass_Ch</b>
PUFA/SFA	1.6±0.2 <sup>b</sup>	1.5±0.2 <sup>b</sup>	2.0±0.2 <sup>a</sup>
AI	0.37±0.05 <sup>a</sup>	0.35±0.03 <sup>a</sup>	0.25±0.06 <sup>b</sup>
TI	0.70±0.06 <sup>b</sup>	0.79±0.03 <sup>a</sup>	0.49±0.20 <sup>c</sup>
HH	2.9±0.4 <sup>b</sup>	3.1±0.4 <sup>b</sup>	3.9±0.3 <sup>a</sup>

Ctrl, allevato in condizioni standard; Ctrl\_Ch, allevato in presenza di estratto di *C. vulgaris* cresciuta nel mezzo di controllo; Frass\_Ch, allevato in presenza di estratto di *C. vulgaris* cresciuta su frass. Rapporto PUFA/SFA; AI, indice aterogenico; TI, indice trombogenico; HH, indice ipo/ipercolesterolemico (HH).

#### 4.2.3 Contenuto proteico

La determinazione delle proteine nel grillo è stata effettuata mediante il metodo colorimetrico descritto nel paragrafo 3.8.8. Non si sono evidenziate differenze statisticamente significative tra i gruppi sperimentali ( $p=0.7871$ ) relativamente al contenuto proteico di AD, pari a  $0.31\pm 0.10$  mg proteine mg biomassa<sup>-1</sup> nel gruppo controllo,  $0.35\pm 0.07$  mg proteine mg biomassa<sup>-1</sup> in AD abbeverato in presenza di estratto di *C. vulgaris* cresciuta su mezzo di controllo,  $0.34\pm 0.13$  mg proteine mg biomassa<sup>-1</sup> in AD abbeverato in presenza di estratto di *C. vulgaris* cresciuta con mezzo contenente frass (Fig. 29).



**Figura 29.** Quantificazione proteine in AD Ctrl, allevato in condizioni standard; Ctrl\_Ch, allevato in presenza di estratto di *C. vulgaris* cresciuta nel mezzo di controllo; Frass\_Ch, allevato in presenza di estratto di *C. vulgaris* cresciuta su frass. ( $p>0.05$ ).

## 5 DISCUSSIONE

### 5.1 Microalghe - *Nannochloropsis salina*, *Chlorella vulgaris*

#### 5.1.1 Crescita microalghe

Dopo aver selezionato le tre specie microalgali sulla base della letteratura scientifica perché ricche in acidi grassi insaturi, *N. salina*, *C. vulgaris* e *P. triornutum* (Ma et al., 2014; Tokuşoglu e Ünal, 2003; Reitan et al., 1994, rispettivamente) sono state acclimatate alla crescita in presenza di frass come unico sostituto di tutti i nutrienti contenuti nel mezzo standard (Pandey et al., 2023).

A differenza di *C. vulgaris* di cui è nota già la crescita in frass (Steinrücken et al., 2024), le altre due specie sono state qui esposte per la prima volta alla crescita in frass.

Dopo aver osservato il non accrescimento di *P. triornutum* si può concludere che questa specie non è riuscita ad acclimatarsi al mezzo di crescita alternativo (Fig. 20). Quindi il frass non ha rilasciato in acqua tutti i macro- e micronutrienti di cui la diatomea ha bisogno. È possibile che arricchendo il mezzo alternativo qui testato con elementi di cui è povero quali

il silicio, particolarmente richiesto da questo gruppo algale per la costruzione della parete cellulare, la mancata acclimatazione possa essere superata. Al contrario, *N. salina* e *C. vulgaris* si sono acclimatate.

Le alghe in grado di estrarre tutti i nutrienti dal frass aggiunto come unico componente all'acqua salata o non salata (per mimare acqua di mare e dolce) sono state fatte crescere nuovamente in frass autoclavato al fine di ridurre la carica batterica in una eventuale applicazione industriale. In questo caso, è stata riscontrata una differenza molto evidente nella crescita di *N. salina* e *C. vulgaris* rispetto alle stesse specie cresciute in mezzo standard: la crescita era rallentata. Poiché nel test di tolleranza non si era osservata differenza nella crescita tra alghe in mezzo standard e alghe in frass, è possibile che la sterilizzazione di frass abbia sfavorito l'acquisizione dei nutrienti. Inoltre, poiché *C. vulgaris* ha raggiunto una densità cellulare maggiore rispetto alla densità di *N. salina* già dal quinto giorno di crescita (Fig. 21), è stata selezionata *C. vulgaris* come specie più adatta alla crescita in frass e al suo sfruttamento nella alimentazione del grillo.

Nello studio di Steinrücken ed altri studiosi (2024), in cui l'alga *C. vulgaris* è stata coltivata in mezzi contenenti frass trattato in diversi modi, le concentrazioni cellulari della microalga sono state mediamente più alte di quelle qui riscontrate. Infatti, durante la fase esponenziale hanno raggiunto valori compresi tra  $1.7 \cdot 10^7$  e  $2.6 \cdot 10^7$  cellule  $\text{mL}^{-1}$  contro una media di  $4.92 \cdot 10^6$  cellule  $\text{mL}^{-1}$  nel nostro studio; alla fine della coltivazione, dopo tre giorni di fase stazionaria, le concentrazioni cellulari nell'articolo citato hanno raggiunto valori compresi tra  $3.0 \cdot 10^8$  e  $4.3 \cdot 10^8$  cellule  $\text{mL}^{-1}$  contro concentrazioni cellulari pari a  $7.16 \cdot 10^6$  cellule  $\text{mL}^{-1}$  nella presente tesi.

### 5.1.2 Profilo nutrizionale

Dallo studio di Steinrücken ed altri studiosi (2024), sono emerse quantità di proteine totali in *C. vulgaris* cresciuta nel mezzo di controllo pari a  $0.40 \pm 8.7$  mg proteine mg biomassa<sup>-1</sup> in fase esponenziale contro  $0.76 \pm 0.22$  mg proteine mg biomassa<sup>-1</sup> in fase stazionaria determinate nel nostro studio. Nello stesso studio sono state determinate le proteine di *C. vulgaris* cresciuta in mezzo di crescita con frass autoclavato e centrifugato pari a  $0.39 \pm 3.2$  mg proteine mg biomassa<sup>-1</sup> in fase esponenziale, contro  $0.35 \pm 0.08$  mg proteine mg biomassa<sup>-1</sup> in fase stazionaria determinate nel nostro studio. In entrambi gli esperimenti è stata riscontrata una diminuzione della quantità di proteine totali nella microalga cresciuta nel frass rispetto al controllo (Fig. 25).

Per quanto riguarda il contenuto lipidico di *C. vulgaris*, le percentuali di lipidi totali trovate in questo studio ( $6.72 \pm 0.63$  % per Ctrl\_*C. vulgaris* e  $7.05 \pm 3.01$  % per Frass\_*C. vulgaris*) (Fig. 22B) si sono rivelate più basse rispetto ai dati trovati in letteratura, che sono a loro volta abbastanza variabili: dal 13% al 25 % (Tokuşoglu e Ünal, 2003; Aguru e Okibe, 2015). Anche il contenuto lipidico di *N. salina* ( $14.91 \pm 2.10$  % in Ctrl\_*N. salina* e  $10.27 \pm 1.50$  % in Frass\_*N. salina*) (Fig. 22A) è risultato inferiore rispetto ai dati di letteratura, dove si sono registrati valori intorno al 37-39 % (Tokuşoglu e Ünal, 2003; Aguru e Okibe, 2015). Le diverse percentuali di lipidi trovate nei vari studi potrebbero essere dovute alle diverse condizioni di crescita a cui sono state sottoposte le microalghe, quali temperatura, luce, quantità di CO<sub>2</sub> e di O<sub>2</sub>, come riscontrato in altri studi (Aguru e Okibe, 2015). Nello studio di Tokuşoglu e Unal (2003), ad esempio, *C. vulgaris* è stata sottoposta ad un sistema di coltura semicontinuo in doppio (Richmond, 1986) e successivamente areate continuamente con una pompa d'aria senza aggiunta di CO<sub>2</sub>. Nel nostro studio invece, *C. vulgaris* è cresciuta in

ambiente controllato di illuminazione (lampade fluorescenti  $250 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , luce 24 ore), temperatura variabile  $20 \pm 3^\circ\text{C}$ .

L'aggiunta di frass di grillo al mezzo di coltura ha portato, in entrambe le specie di microalghe indagate, ad un aumento significativo degli SFA (dovuto principalmente ad un aumento di 16:0 e 18:0), mentre la percentuale di MUFA è rimasta inalterata. Inoltre, l'aggiunta di frass di grillo come nutrimento per le microalghe ha portato ad una diminuzione significativa di PUFA sia in *C. vulgaris* che in *N. salina* (dovuto essenzialmente ad un calo degli FAs 18:2n6 e 18:3n3), riportando un calo percentuale di circa il 30% in entrambe le specie. Per quanto riguarda gli FAs, i più rappresentativi per *C. vulgaris* sono 16:0, 17:1n7, 18:0, 18:1n9, 18:2n6 e 18:3n3 (Tabella 16), mentre per *N. salina* sono 16:0, 18:0, 18:1n9, 18:2n6, 18:3n3 e 20:5n3 (Tabella 17). Questi FAs rappresentano insieme più del 90% degli FAs totali. Il frass di grillo aggiunto al mezzo di crescita ha portato alle stesse variazioni degli FAs principali nelle due specie di alghe indagate, con un aumento significativo di 16:0 e 18:0 ed una diminuzione significativa di 18:1n9, 18:2n6 e 18:3n3. In base ai risultati ottenuti, possiamo ipotizzare che l'aggiunta di frass di grillo al mezzo di crescita influenzi significativamente la composizione degli FAs nelle alghe, apportando modifiche molto simili in alghe diverse, che non dipendono quindi dalla specie algale.

## **5.2 *Acheta domesticus***

### **5.2.1 Crescita di *Acheta domesticus***

In questo studio si sono valutate le performance di AD in seguito all'aggiunta nell'acqua da bere di *C. vulgaris* cresciuta su mezzo standard o su frass di grillo. L'inserimento di *C. vulgaris* nell'abbeveratoio non ha condizionato il peso individuale del grillo, l'FCR e la

sopravvivenza dei grilli, (Fig. 26), in linea con i risultati ottenuti nello studio di Ajdini et al. (2024), dove la macroalga *P. palmata*, aggiunta alla dieta di AD in diverse percentuali, non ha influenzato negativamente le performance di AD. Riguardo la sopravvivenza, i dati rilevati in questo studio (valore medio  $54 \pm 3$  %) sono in linea con quelli riportati da Oonincx et al., (2015) (55 %) in grilli alimentati con diete a base vegetale. Al contrario, sono risultati inferiori a quelli riportati da Sorjonen et al. (2019) (64-94%) e Morales-Ramos et al. (2020b) (~80 %) in grilli alimentati con sottoprodotti dell'industria alimentare. Questo parametro è fortemente influenzato da numerosi fattori, oltre alla sola dieta, tra i quali la densità di popolazione, l'accesso a cibo e acqua, lo spazio disponibile, il rapporto tra maschi e femmine (Nutrinsect SRL; Floater, 1997; Mc Clooney e Date, 2008). Da questi risultati possiamo dedurre che l'introduzione dell'estratto di *C. vulgaris* nell'acqua da bere non ha influenzato negativamente le performance del grillo, che è stato in grado di mantenere una crescita e uno sviluppo armonico.

### **5.2.2 Profilo nutrizionale di *Acheta domesticus***

In questo studio, l'inclusione di *C. vulgaris* cresciuta su frass non ha apportato differenze statisticamente significative al contenuto proteico, pari a 0.31, 0.35 e 0.34 mg proteine mg biomassa<sup>-1</sup> (corrispondente al 31 %, 35 % e 34 %, in Ctrl, Ctrl\_Ch, Frass\_Ch rispettivamente) (Fig. 29). Rispetto ai dati di letteratura, che riportano un contenuto proteico intorno al 50-70 % (Ajdini et al., 2024; Bawa et al., 2020; Magara et al., 2021; Pilco-Romero et al., 2023), il contenuto proteico trovato è decisamente inferiore. Il motivo può essere legato al diverso metodo di determinazione delle proteine. In questo lavoro di tesi è stato usato il metodo di Lowry, dove il reattivo di Folin (reattivo fosfomolibdico-fosfotungstico) va a reagire con le

tirosine ed i triptofani delle proteine, assumendo una colorazione blu con massimo di assorbimento a 750nm. Generalmente in letteratura il metodo di elezione per la quantificazione delle proteine è il metodo di Kjeldahl, che prevede la digestione del campione, seguita da alcalinizzazione, distillazione di ammoniaca e determinazione dell'azoto mediante titolazione acido-base. Tramite un fattore di conversione, è possibile ricavare il contenuto proteico. Il metodo di Lowry presuppone un alto contenuto di aminoacidi quali triptofano e tirosina, ma è stato dimostrato che il contenuto di questi aminoacidi in AD è basso (Sancez-Muros et al., 2014), di conseguenza questo metodo fornisce un contenuto proteico più basso del contenuto reale. Nel caso di AD quindi il metodo di Lowry non è sufficientemente accurato.

Riguardo il contenuto di lipidi, l'inclusione di *C. vulgaris* cresciuta su frass non ha influenzato la quantità di lipidi totali del grillo, con un valore medio pari a 19.4 % DW. Questo risultato è in linea con dati di letteratura: Harsányi et al. (2020) hanno registrato valori di 19.4 %, Koutsos et al. (2019) e Gasco et al. (2019), hanno riportato un contenuto lipidico pari a circa il 18 %, mentre Rumpold & Schlüter, (2013) hanno ottenuto valori nel range 18-23 %. Ajdini et al. (2024) hanno registrato un contenuto lipidico leggermente inferiore (13-16.4 %). Il contenuto lipidico di AD registrato in questo studio è inferiore all'intervallo (29-35%) stabilito dal Regolamento di Esecuzione (UE) 2022/188 della Commissione, il quale autorizza l'immissione nel mercato alimentare europeo di diverse forme di *Acheta domesticus* (congelato, essiccato e in polvere) (Commissione Europea, 2022). Il contenuto lipidico degli insetti è considerato una fonte di energia, non solo per gli insetti stessi, ma anche per il consumatore. Di conseguenza, il contenuto lipidico moderato rende i grilli indagati un novel food salutare per il benessere fisico del consumatore.

Diversi studi hanno dimostrato che il profilo degli acidi grassi negli insetti è in gran parte influenzato dal profilo degli acidi grassi della loro dieta (Liland et al., 2017b; Barroso et al., 2014; Truzzi et al., 2020; Oonincx et al., 2015). Questa scoperta ha aperto la strada al miglioramento della composizione nutrizionale dei grilli domestici attraverso la formulazione di substrati adeguati. In questo studio, AD allevato con l'aggiunta di *C. vulgaris* ha presentato variazioni significative nella composizione degli acidi grassi.

Gli AD alimentati con *C. vulgaris* cresciuta su frass hanno mostrato una diminuzione degli SFA (fino al 25 %) (Fig. 28) al di sotto dell'intervallo (36-45 %) stabilito dal Regolamento di attuazione della Commissione (UE) 2022/188 (European Commission, 2022). Inoltre, la diminuzione degli SFA è stata accompagnata da un aumento degli UFA (fino a +5 %), dovuto a un incremento dei PUFA. Il rapporto SFA/UFA variava da 0.33 a 0.44, più basso rispetto a quanto riportato da Pastell et al. (2021) con valori da 0.63 a 0.73 e Ajdini et al. (2024) con valori da 0.63 a 0.71. La diminuzione degli SFA, una classe lipidica associata ad un impatto negativo sulla salute cardiovascolare, per la quale l'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA, 2017) raccomanda un basso apporto, insieme all'aumento degli UFA, in particolare degli acidi grassi n-3 benefici per la salute, migliora la qualità nutrizionale dei grilli come fonte alimentare innovativa. I dati comparativi sul profilo degli acidi grassi degli AD alimentati con biomassa algale sono limitati. Ajdini et al. (2024) hanno dimostrato che l'aggiunta dell'alga *Palmaria palmata* alle diete ha portato in AD a un aumento degli SFA e a una diminuzione degli UFA. Secondo i dati ottenuti, gli AD allevati con *C. vulgaris* potrebbero rappresentare una buona fonte alimentare di alcuni acidi grassi importanti con effetti sulla salute rilevanti, come gli acidi oleico, linoleico e alfa-linolenico, come riportato in letteratura (Ajdini et al., 2024; Oonincx et al., 2015a, b). L'inclusione di *C. vulgaris* nella dieta ha portato, in AD, a cambiamenti significativi nella percentuale di molti acidi grassi,

soprattutto dei più rilevanti, quali 16:0, 18:0, 18:1n9, 18:2n3 e 18:3n3, in linea con quanto ottenuto da Ajdini et al. (2024b) dove l'inclusione della macroalga *Ascophyllum nodosum* nella dieta ha influenzato significativamente la composizione degli acidi grassi di AD.

Gli indici di qualità, calcolati a partire dalla composizione degli acidi grassi (FAs), come il rapporto PUFA/SFA, l'AI, il TI e l'HH, sono stati presi in considerazione per valutare l'impatto del consumo del grillo sulla salute cardiovascolare (Pleadin et al., 2017); Ivanova e Hadzhinikolova, 2015; Liu et al., 2020). Per quanto riguarda il rapporto PUFA/SFA, è stato segnalato che un valore inferiore a 0.45 promuove l'ipercolesterolemia (Ramos Filho et al., 2010; Ivanova e Hadzhinikolova, 2015), mentre un rapporto PUFA/SFA > 1.0 è considerato un indice ottimale. Valori di AI  $\leq$  0.51, TI inferiori a 1 e di HH attorno a 2 sono stati considerati ottimali per diete di qualità (Ivanova e Hadzhinikolova, 2015; Pleadin et al., 2017). In questo studio, i valori di PUFA/SFA per gli AD risultano in linea a quelli riportati da Otero et al. (2020) (superiori a 1.5), più alti (da 1.5 a 2) rispetto a quelli riportati da Perez-Santaescolastica et al. (2023b) (1.1) e più bassi rispetto a Ajdini et al. (2024) (1.1). Allo stesso modo, gli indici AI, TI e HH sono comparabili ai valori precedentemente riportati in AD e in altre specie di insetti (Perez-Santaescolastica et al., 2023b; Truzzi et al., 2020). Dai risultati ottenuti possiamo quindi affermare che gli indici nutrizionali dei grilli controllo mostrano valori ottimali, ma i grilli allevati con *C. vulgaris* cresciuta su frass hanno mostrato un significativo miglioramento degli indici di qualità rispetto al gruppo di controllo. I grilli allevati con *C. vulgaris* cresciuta su frass rappresentano quindi una fonte alimentare alternativa promettente per il consumo umano.

## 6 CONCLUSIONI

L'inclusione di frass di grillo nel substrato di crescita per le microalghe *C. vulgaris* e *N. salina* ha portato ad una crescita delle stesse, anche se in misura minore rispetto alle alghe cresciute su un substrato standard. *C. vulgaris* ha dimostrato una crescita maggiore rispetto a *N. salina*. Per quanto riguarda il profilo nutrizionale di entrambe le specie microalgali trattate con frass, i lipidi totali non hanno subito variazioni, mentre le proteine totali hanno subito una diminuzione significativa rispetto al gruppo controllo. Possiamo quindi concludere che l'uso di frass di grillo per la crescita delle microalghe, può essere considerato un possibile substrato di crescita rispetto ai mezzi di crescita standard disponibili sul mercato, anche se sono necessari ulteriori studi per trovare la miglior inclusione di frass di grillo nel mezzo di crescita che garantisca la massima crescita e le migliori qualità nutrizionali delle alghe. L'utilizzo di frass di insetto rimane comunque uno strumento molto interessante in quanto ridurrebbe gli elevati costi di produzione delle microalghe, e promuoverebbe una gestione degli scarti sostenibile, attraverso la rigenerazione di questi ultimi.

L'aggiunta di *C. vulgaris* coltivata su frass nella dieta di *Acheta domesticus* non ha influenzato negativamente le performance dell'insetto, in termini di peso individuale e FCR, mentre si è osservato un lieve trend decrescente della mortalità rispetto ad AD allevato con dieta standard. AD allevato con *C. vulgaris* cresciuta su frass ha mostrato un contenuto proteico e lipidico paragonabile ad AD allevato in condizioni standard, ma ha presentato un miglioramento della qualità lipidica, caratterizzato da una diminuzione degli SFA e da un incremento dei PUFA. In particolare, tra gli acidi grassi insaturi si è verificato un importante aumento degli acidi grassi essenziali (acido linoleico e l'acido alfa-linolenico), indispensabili per la salute umana. Anche se sono necessari ulteriori studi, questi risultati dimostrano la fattibilità dell'inclusione di frass di grillo nel substrato di crescita di *C. vulgaris*, e la possibilità di aggiungere

quest'alga così prodotta nella dieta di AD, aprendo la strada alla possibilità di crescere i Novel Foods, quali alghe e insetti, in modo ecosostenibile, nell'ottica di un'economia circolare, per soddisfare l'aumento della popolazione previsto in futuro.

## 7 BIBLIOGRAFIA

- Acién Fernández, F. G., Gómez-Serrano, C., & Fernández-Sevilla, J. M. Recovery of nutrients from wastewaters using microalgae. *Frontiers in Sustainable Food Systems* (2018). (Vol. 2). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2018.00059>
- Aguoru, C. U., & Okibe, P. O. Content and composition of lipid produced by *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Advances in life science and technology*, (2015), 36, 96-100.
- Ajdini, B., Biancarosa, I., Cardinaletti, G., Illuminati, S., Annibaldi, A., Girolametti, F., Fanelli, M., Pascon, G., Martinoli, M., Tulli, F., Pinto, T., & Truzzi, C. The use of seaweed as sustainable feed ingredient for the house cricket (*Acheta domesticus*): investigating cricket performance and nutritional composition. *Journal of Insects as Food and Feed*, (2024), 8. <https://doi.org/10.1163/23524588-20230176>
- Ajdini, B., Biancarosa, I., Cardinaletti, G., Illuminati, S., Annibaldi, A., Girolametti, F., Fanelli, M., Tulli, F., Pinto, T., & Truzzi, C. Enhancing the nutritional value of *Acheta domesticus* (house cricket) for human consumption through eco-sustainable *Ascophyllum nodosum* dietary supplementation. *Applied future source*, (2024b), <https://ssrn.com/abstract=4848739>
- Barroso, F. G., de Haro, C., Sánchez-Muros, M. J., Venegas, E., Martínez-Sánchez, A., & Pérez-Bañón, C. The potential of various insect species for use as food for fish. *Aquaculture*, (2014), 422–423, 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture>
- Bawa, M., Songsermpong, S., Kaewtapee, C., & Chanput, W. Effect of diet on the growth performance, feed conversion, and nutrient content of the house cricket. *Journal of Insect Science*, (2021), 20(2). <https://doi.org/10.1093/JISESA/IEAA014>

- Booth, D. T., & Kiddell, K. Temperature and the energetics of development in the house cricket (*Acheta domesticus*). *Journal of Insect Physiology*, (2007), 53(9), 950–953. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2007.03.009>
- Chavez, M., & Uchanski, M. Insect left-over substrate as plant fertiliser. *Journal of Insects as Food and Feed*, (2021), 7(5), 683–694. <https://doi.org/10.3920/JIFF2020.0063>
- Clarkson, C., Miroso, M., & Birch, J. Potential of extracted *Locusta migratoria* protein fractions as value-added ingredients. *Insects*, (2018), 9(1), 20 <https://doi.org/10.3390/insects9010020>
- Clifford, C. W. The biology of egg production in the house cricket, *Acheta domesticus* L. *Louisiana State University and Agricultural & Mechanical College* (1985).
- Collavo, A., & Huang, Y.-S. House cricket smallscale farming in ecological implications of minilivestock: potential of insects, rodents, frogs and snails. *Ecological Implications of Minilivestock. Potential of Insects, Rodents, Frogs and Snails*, (2005), 26., <https://www.researchgate.net/publication/288624354>
- Correa, I., Drews, P., Botelho, S., De Souza, M. S., & Tavano, V. M. Deep learning for microalgae classification. *Proceedings - 16th IEEE International Conference on Machine Learning and Applications*, (2017), 20–25. <https://doi.org/10.1109/ICMLA.2017.0-183>
- European Food Safety Authority (EFSA). Dietary reference values for nutrients summary report. *EFSA Supporting Publications*, (2017), (Vol. 14, No. 12, p. e15121E).
- European Commission. Authorising the placing on the market of frozen, dried and powder forms of *Acheta domesticus* as a novel food under Regulation (EU) 2015/2283 of the European Parliament and of the Council and amending Commission Implementing Regulation (EU) 2017/24. *Official Journal of the European Union*, (2022), 188(30), 108–114.

- Fanesi, A., Raven, J. A., & Giordano, M. Growth rate affects the responses of the green alga *Tetraselmis suecica* to external perturbations. *Plant, Cell and Environment*, (2014), 37(2), 512–519. <https://doi.org/10.1111/pce.12176>
- Ferruzca-Campos, E. A., Rico-Chavez, A. K., Guevara-González, R. G., Urrestarazu, M., Cunha-Chiamolera, T. P. L., Reynoso-Camacho, R., & Guzmán-Cruz, R. Biostimulant and elicitor responses to cricket frass (*Acheta domesticus*) in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) under protected conditions. *Plants*, (2023), 12(6). <https://doi.org/10.3390/plants12061327>
- Finke, M. D. Complete nutrient composition of commercially raised invertebrates used as food for insectivores. *Zoo Biology*, (2002), 21(3), 269–285. <https://doi.org/10.1002/zoo.10031>
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, (1957), 226(1), 497–509. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)64849-5)
- Gasco, L., Biasato, I., Dabbou, S., Schiavone, A., & Gai, F. Animals fed insect-based diets: State-of-the-art on digestibility, performance and product quality. *Animals*, (2019), (Vol. 9, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ani9040170>
- Gouveia, L., Batista, A. P., Sousa, I., Raymundo A. & Bandarra, N. M. Microalgae in Novel Food products. *Food Chemistry Research Developments*. (2008), ISBN 978-1-60456-262-0.
- Ghosh, S., Lee, S. M., Jung, C., & Meyer-Rochow, V. B. Nutritional composition of five commercial edible insects in South Korea. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, (2017a), 20(2), 686–694. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2017.04.003>

- Ghosh, S., Lee, S. M., Jung, C., & Meyer-Rochow, V. B. Nutritional composition of five commercial edible insects in South Korea. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, (2017b), 20(2), 686–694. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2017.04.003>
- Guida Nutrinsect SRL, (2021).
- Guiné, R. P. F., Correia, P., Coelho, C., & Costa, C. A. The role of edible insects to mitigate challenges for sustainability. *Open Agriculture*, (2021), (Vol. 6, Issue 1, pp. 24–36). De Gruyter Open Ltd. <https://doi.org/10.1515/opag-2020-0206>
- Hackerwitz, V. L. The house cricket *Acheta domesticus*, a potential source of protein for human consumption. *Food Science*, (2018), <https://stud.epsilon.slu.se>
- Harsányi, E., Juhász, C., Kovács, E., Huzsvai, L., Pintér, R., Fekete, G., Varga, Z. I., Aleksza, L., & Gyuricza, C. Evaluation of organic wastes as substrates for rearing *Zophobas morio*, *Tenebrio molitor*, and *Acheta domesticus* larvae as alternative feed supplements. *Insects*, (2020), 11(9), 1–18. <https://doi.org/10.3390/insects11090604>
- Hauff, S., & Vetter, W. Quantification of fatty acids as methyl esters and phospholipids in cheese samples after separation of triacylglycerides and phospholipids. *Analytica Chimica Acta*, (2009), 636(2), 229–235. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.01.056>
- Huis, V. A., Itterbeeck, V. J., Klunder, H., Mertens, E., Halloran, A., Muir, G., & Vantomme, P. Edible insects: future prospects for food and feed security. Fao Forestry Paper. *Food and agriculture organization of the united nations*, (2013).
- Hulatt, C. J., Wijffels, R. H., Bolla, S., & Kiron, V. Production of fatty acids and protein by *Nannochloropsis* in flat-plate photobioreactors. *PLoS ONE*, (2017), 12(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170440>

- Illuminati, S., Annibaldi, A., Truzzi, C., & Scarponi, G. Recent temporal variations of trace metal content in an Italian white wine. *Food Chemistry*, (2014), 159, 493–497. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.058>
- Ivanova, A., & Hadzhinikolova, L. Evaluation of nutritional quality of common carp (*Cyprinus carpio* L.) Lipids through fatty acid ratios and lipid indices. Agricultural Academy. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, (2015), 21, 180-185.
- Kouřimská, L., & Adámková, A. Nutritional and sensory quality of edible insects. *NFS Journal*, (2016), (Vol. 4, pp. 22–26). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2016.07.001>
- Koutsos, L., McComb, A., & Finke, M. Insect composition and uses in animal feeding applications: a brief review. *Annals of the Entomological Society of America*, (2019), 112(6), 544–551. <https://doi.org/10.1093/aesa/saz033>
- Lewis, L. A., & McCourt, R. M. Green algae and the origin of land plants. *American Journal of Botany*, (2004), (Vol. 91, Issue 10, pp. 1535–1556). <https://doi.org/10.3732/ajb.91.10.1535>
- Liland, N. S., Biancarosa, I., Araujo, P., Biemans, D., Bruckner, C. G., Waagbø, R., Torstensen, B. E., & Lock, E. J. Modulation of nutrient composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae by feeding seaweed-enriched media. *PLoS ONE*, (2017a), 12(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183188>
- Liland, N. S., Biancarosa, I., Araujo, P., Biemans, D., Bruckner, C. G., Waagbø, R., Torstensen, B. E., & Lock, E. J. Modulation of nutrient composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae by feeding seaweed-enriched media. *PLoS ONE*, (2017b), 12(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183188>

- Liu, H., Chen, Y., Shi, C., Yang, X., & Han, D. FT-IR and Raman spectroscopy data fusion with chemometrics for simultaneous determination of chemical quality indices of edible oils during thermal oxidation. *Food Science and Technology*, (2020), 119. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108906>
- Ma, X. N., Chen, T. P., Yang, B., Liu, J., & Chen, F. Lipid production from *Nannochloropsis*. *Marine Drugs*, (2016), 14(4). <https://doi.org/10.3390/md14040061>
- Ma, Y., Wang, Z., Yu, C., Yin, Y., & Zhou, G. Evaluation of the potential of 9 *Nannochloropsis* strains for biodiesel production. *Bioresource Technology*, (2014), 167, 503–509. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.047>
- Magara, H. J. O., Niassy, S., Ayieko, M. A., Mukundamago, M., Egonyu, J. P., Tanga, C. M., Kimathi, E. K., Ongere, J. O., Fiaboe, K. K. M., Hugel, S., Orinda, M. A., Roos, N., & Ekesi, S. Edible crickets (Orthoptera) around the World: distribution, nutritional value, and other benefits—a review. *Frontiers in Nutrition*, (2021), (Vol. 7). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.537915>
- Mas-Tur, A., Guijarro, M., & Carrilero, A. The influence of the circular economy: exploring the knowledge base. *Sustainability (Switzerland)*, (2019), 11(16). <https://doi.org/10.3390/su11164367>
- Morales-Ramos, J. A., Rojas, M. G., Dossey, A. T., & Berhow, M. Self-selection of food ingredients and agricultural by-products by the house cricket, *Acheta domesticus* (Orthoptera: Gryllidae): A holistic approach to develop optimized diets. *PLoS ONE*, (2020a), 15(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227400>
- Morales-Ramos, J. A., Rojas, M. G., Dossey, A. T., & Berhow, M. Self-selection of food ingredients and agricultural by-products by the house cricket, *Acheta domesticus*

(Orthoptera: Gryllidae): A holistic approach to develop optimized diets. *PLoS ONE*, (2020b), 15(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227400>

Mountourakis, F., Papazi, A., & Kotzabasis, K. The microalga *Chlorella vulgaris* as a natural bioenergetic system for effective CO<sub>2</sub> mitigation—new perspectives against global warming. *Symmetry*, (2021), 13(6). <https://doi.org/10.3390/sym13060997>

Nakagaki, B. J., & Defoliart, A. R. Comparison of diets for mass-rearing *Acheta domesticus* (Orthoptera: Gryllidae) as a Novelty Food, and comparison of food conversion efficiency with values reported for livestock. *Journal of Economic Entomology*, (1991), 84(3), 891-896.

Nutrinsect SRL, ricerca interna (2019).

O'Connor, K., Gaffey, J., Gavin, E., Stout, J., & Holden, N. M. Circular bioeconomy outlook study 2030-2050 in support of climate action, sustainable food and biobased systems. *Evidence Synthesis Report*, (2023), 2.

Olabi, A. G., Shehata, N., Sayed, E. T., Rodriguez, C., Anyanwu, R. C., Russell, C., & Abdelkareem, M. A. Role of microalgae in achieving sustainable development goals and circular economy. *Science of the Total Environment*, (2023), (Vol. 854). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158689>

Oonincx, D. G. A. B., Laurent, S., Veenenbos, M. E., & van Loon, J. J. A. Dietary enrichment of edible insects with omega 3 fatty acids. *Insect Science*, (2020), 27(3), 500–509. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12669>

Oonincx, D. G. A. B., Van Broekhoven, S., Van Huis, A., & Van Loon, J. J. A. Feed conversion, survival and development, and composition of four insect species on diets composed of food by-products. *PLoS ONE*, (2015), 10(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144601>

- Otero, P., Gutierrez-Docio, A., Navarro del Hierro, J., Reglero, G., & Martin, D. Extracts from the edible insects *Acheta domesticus* and *Tenebrio molitor* with improved fatty acid profile due to ultrasound assisted or pressurized liquid extraction. *Food Chemistry*, (2020), 314. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126200>
- Palmucci, M., Ratti, S., & Giordano, M. Ecological and evolutionary implications of carbon allocation in marine phytoplankton as a function of nitrogen availability: a fourier transform infrared spectroscopy approach. *Journal of Phycology*, (2011), 47(2), 313–323. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2011.00963.x>
- Pandey, S., Narayanan, I., Vinayagam, R., Selvaraj, R., Varadavenkatesan, T., & Pugazhendhi, A. A review on the effect of blue green 11 medium and its constituents on microalgal growth and lipid production. *Journal of Environmental Chemical Engineering* (2023), (Vol. 11, Issue 3). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.109984>
- Pastell, H., Mellberg, S., Ritvanen, T., Raatikainen, M., Mykkänen, S., Niemi, J., Latomäki, I., & Wirtanen, G. How does locally produced feed affect the chemical composition of reared house crickets (*Acheta domesticus*)? *ACS Food Science and Technology*, (2021), 1(4), 625–635. <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.0c00083>
- Perez-Santaescolastica, C., de Pril, I., van de Voorde, I., & Fraeye, I. Fatty acid and amino acid profiles of seven edible insects: focus on lipid class composition and protein conversion factors. *Foods*, (2023a), 12(22). <https://doi.org/10.3390/foods12224090>
- Perez-Santaescolastica, C., de Pril, I., van de Voorde, I., & Fraeye, I. Fatty acid and amino acid profiles of seven edible insects: focus on lipid class composition and protein conversion factors. *Foods*, (2023b), 12(22). <https://doi.org/10.3390/foods12224090>
- Peterson, G. L. A Simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, (1977), (Vol. 83).

- Petrucciani, A., Llopis Monferrer, N., & López-Acosta, M. Silicifiers: the glassy creatures of the ocean. *Frontiers for Young Minds*, (2023).
- Pilco-Romero, G., Chisaguano-Tonato, A. M., Herrera-Fontana, M. E., Chimbo-Gándara, L. F., Sharifi-Rad, M., Giampieri, F., Battino, M., Vernaza, M. G., & Álvarez-Suárez, J. M. House cricket (*Acheta domesticus*): a review based on its nutritional composition, quality, and potential uses in the food industry. *Trends in Food Science and Technology*, (2023), (Vol. 142). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.104226>
- Pleadin, J., Lešić, T., Krešić, G., Barić, R., Bogdanović, T., Oraić, D., Vulić, A., Legac, A., & Zrnčić, S. Nutritional quality of different fish species farmed in the adriatic sea. *Italian Journal Food Science*, (2017), (vol 29), - 537
- Psarianos, M., Fricke, A., Altuntaş, H., Baldermann, S., Schreiner, M., & Schlüter, O. K. Potential of house crickets *Acheta domesticus* L. (Orthoptera: Gryllidae) as a novel food source for integration in a co-cultivation system. *Future Foods*, (2024), 9. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2024.100332>
- Puglisi, I., La Bella, E., Rovetto, E. I., Stevanato, P., Fascella, G., & Baglieri, A. Morpho-biometric and biochemical responses in lettuce seedlings treated by different application methods of *Chlorella vulgaris* extract: foliar spray or root drench? *Journal of Applied Phycology*, (2022), 34(2), 889–901. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02671-1>
- Pulz, O., & Gross, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, (2004), (Vol. 65, Issue 6, pp. 635–648). <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1647-x>
- Ramos Filho, M. M., Ramos, M. I. L., Hiane, P. A., & De Souza, E. M. T. Nutritional value of seven freshwater fish species from the Brazilian pantanal. *JAOCs, Journal of the*

*American Oil Chemists' Society*, (2010), 87(12), 1461–1467.  
<https://doi.org/10.1007/s11746-010-1639-1>

Raven, J. A., & Waite, A. M. The evolution of silicification in diatoms: Inescapable sinking and sinking as escape? *New Phytologist*, (2004), (Vol. 162, Issue 1, pp. 45–61).  
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01022.x>

Reboloso-fuentes, M. M., Navarro-pÉrez, A., Ramos-miras, J. J., & Guil-guerrero, J. L. Biomass nutrient profiles of the microalga *Phaeodactylum Tricornutum*. *Journal of Food Biochemistry*, (2001), 25(1), 57–76. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2001.tb00724.x>

Reitan, K. I., Rainuzzo, J. R., & Olsen, Y. Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae. In *Journal Phycology*, (1994), 30, 972-979

Remmers, I. M., Martens, D. E., Wijffels, R. H., & Lamers, P. P. Dynamics of triacylglycerol and EPA production in *Phaeodactylum tricornutum* under nitrogen starvation at different light intensities. *PLoS ONE*, (2017), 12(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175630>

Richmond, A. (Ed.). *CRC Handbook of microalgal mass culture*, (1986), (pp. 83-84). Boca Raton, FL, USA: CRC press.

Rumbos, C. I., Karapanagiotidis, I. T., Mente, E., & Athanassiou, C. G. The lesser mealworm *Alphitobius diaperinus*: a noxious pest or a promising nutrient source?. *Reviews in Aquaculture*, (2019), 11(4), 1418-1437. Rumpold, B. A., & Schlüter, O. K. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Molecular Nutrition and Food Research* (2013). (Vol. 57, Issue 5, pp. 802–823). <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200735>

Safafar, H., Hass, M. Z., Møller, P., Holdt, S. L., & Jacobsen, C. High-EPA biomass from *Nannochloropsis salina* cultivated in a flat-panel photo-bioreactor on a process water-enriched growth medium. *Marine Drugs*, (2016), 14(8).  
<https://doi.org/10.3390/md14080144>

- Santos-Silva, J., Bessa, R. J. B., & Santos-Silva, F. J. L. P. S. Effect of genotype, feeding system and slaughter weight on the quality of light lambs: II. Fatty acid composition of meat. *Livestock Production Science*, (2002), 77(2-3), 187-194.
- Scholz, M. J., Weiss, T. L., Jinkerson, R. E., Jing, J., Roth, R., Goodenough, U., Posewitz, M. C., & Gerken, H. G. Ultrastructure and composition of the *Nannochloropsis gaditana* cell wall. *Eukaryotic Cell*, (2014), 13(11), 1450–1464.  
<https://doi.org/10.1128/EC.00183-14>
- Siddiqui, S. A., Zhao, T., Fitriani, A., Rahmadhia, S. N., Alirezalu, K., & Fernando, I. *Acheta domesticus* (house cricket) as human foods-An approval of the European Commission-A systematic review. *Food Frontiers*, (2024), 5(2), 435-473.
- Sorjonen, J. M., Valtonen, A., Hirvisalo, E., Karhapää, M., Lehtovaara, V. J., Lindgren, J., Marnila, P., Mooney, P., Mäki, M., Siljander-Rasi, H., Tapio, M., Tuiskula-Haavisto, M., & Roininen, H. The plant-based by-product diets for the mass-rearing of *Acheta domesticus* and *Gryllus bimaculatus*. *PLoS ONE*, (2019), 14(6).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218830>
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, (2006), 101(2), 87–96.  
<https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
- Standing, C., Jackson, P., Chen, A. J. w., Boudreau, M. C., & Watson, R. T. Information systems and ecological sustainability. *Journal of Systems and Information Technology*, (2008), 10(3), 186–201. <https://doi.org/10.1108/13287260810916907>
- Starik, M., & Rands, G. P. Weaving an integrated web: Multilevel and multisystem perspectives of ecologically sustainable organizations. *Academy of management Review*, (1995), 20(4), 908-935.

- Steinrücken, P., Müller, O., Böpple, H., & Kleinegris, D. M. M. Insect frass as a fertilizer for the cultivation of protein-rich *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology Reports*, (2024), 25. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2023.101686>
- Toniolo, C., Nicoletti, M., Del Serrone, P., Rao, A. R., & Ravishankar, G. A. Champion microalgal forms for food and health applications: Spirulina and Chlorella. In *Handbook of Algal Technologies and Phytochemicals*, (2019), (pp. 43-59). CRC Press.
- Tokuşoglu, Ö., & Ünal, M. K. Biomass nutrient profiles of three microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*. *Journal of Food Science*, (2003), 68(4), 1144–1148. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb09615.x>
- Truzzi, C., Illuminati, S., Annibaldi, A., Antonucci, M., & Scarponi, G. Quantification of fatty acids in the muscle of Antarctic fish *Trematomus bernacchii* by gas chromatography-mass spectrometry: Optimization of the analytical methodology. *Chemosphere*, (2017), 173, 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.140>
- Truzzi, C., Giorgini, E., Annibaldi, A., Antonucci, M., Illuminati, S., Scarponi, G., Riolo, P., Isidoro, N., Conti, C., Zarantonello, M., Cipriani, R., & Olivotto, I. 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*, (2020). 259. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114309>
- Turck, D., Bohn, T., Castenmiller, J., De Henauw, S., Hirsch-Ernst, K. I., Maciuk, A., Mangelsdorf, I., McArdle, H. J., Naska, A., Pelaez, C., Pentieva, K., Siani, A., Thies, F., Tsabouri, S., Vinceti, M., Cubadda, F., Frenzel, T., Heinonen, M., Marchelli, R., Knutsen, H. K. Safety of frozen and dried formulations from whole yellow mealworm (*Tenebrio molitor larva*) as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA Journal*,

(2021), (Vol. 19, Issue 8). John Wiley and Sons Inc.  
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6778>

Udomsil, N., Imsoonthornruksa, S., Gosalawit, C., & Ketudat-Cairns, M. Nutritional values and functional properties of house cricket (*Acheta domesticus*) and field cricket (*Gryllus bimaculatus*). *Food Science and Technology Research*, (2019), 25(4), 597–605.  
<https://doi.org/10.3136/fstr.25.597>

Ulbricht, T. L. V., & Southgate, D. A. T. Coronary heart disease: seven dietary factors. *The lancet*, (1991), 338(8773), 985-992.

Ververis, E., Ackerl, R., Azzollini, D., Colombo, P. A., de Sesmaisons, A., Dumas, C., Fernandez-Dumont, A., Ferreira da Costa, L., Germini, A., Goumperis, T., Kouloura, E., Matijevic, L., Precup, G., Roldan-Torres, R., Rossi, A., Svejstil, R., Turla, E., & Gelbmann, W. Novel foods in the European Union: Scientific requirements and challenges of the risk assessment process by the European Food Safety Authority. *Food Research International*, (2020), 137. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109515>

Ververis, E., Boué, G., Poulsen, M., Pires, S. M., Niforou, A., Thomsen, S. T., Tesson, V., Federighi, M., & Naska, A. A systematic review of the nutrient composition, microbiological and toxicological profile of *Acheta domesticus* (house cricket). *Journal of Food Composition and Analysis*, (2022), (Vol. 114). Academic Press Inc.  
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104859>

Vetter, W., & Thurnhofer, S. Analysis of fatty acids by mass spectrometry in the selected ion monitoring mode. *Lipid Technology*, (2007), 19(8), 184–186.  
<https://doi.org/10.1002/lite.200700062>

Ufficiale, G. Gazzetta Ufficiale delle Repubblica Italiana, 2023, n°46.

- Wollmann, F., Dietze, S., Ackermann, J. U., Bley, T., Walther, T., Steingroewer, J., & Krujatz, F. Microalgae wastewater treatment: Biological and technological approaches. *Engineering in Life Sciences*, (2019), (Vol. 19, Issue 12, pp. 860–871). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/elsc.201900071>
- Zarbà, C., Chinnici, G., & D'Amico, M. Novel food: The impact of innovation on the paths of the traditional food chain. *Sustainability (Switzerland)*, (2020), 12(2). <https://doi.org/10.3390/su12020555>
- Zhang, L., Li, P., Sun, X., Hu, W., Wang, X., Zhang, Q., & Ding, X. Untargeted fatty acid profiles based on the selected ion monitoring mode. *Analytica Chimica Acta*, (2014), 839, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.06.040>