UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Marina

Impiego di farina di *Hermetia illucens* come ingrediente per la formulazione di mangimi innovativi in acquacoltura

Hermetia illucens meal as a novel ingredient for the formulation of innovative aquafeeds

Tesi di Laurea Magistrale di:
Giorgia Gioia

Relatore:
Chiar.mo Prof. Ike Olivotto

Correlatore:

Basilio Randazzo

Sessione Straordinaria di Febbraio

Anno Accademico 2018/2019

Ai miei genitori, Paola e Angelo
a mia sorella Daniela,
grazie per il vostro sostegno e amore

INDICE

1. Introduzione **3**

1.1 Acquacoltura 3

1.1.2 Vantaggi e svantaggi acquacoltura 5

1.2 Farina di pesce ed olio di pesce 7

1.3 Alternative sostenibili alla farina di pesce e olio di pesce **10**

1.3.1 Proteine di origine vegetale 11

1.3.2 Microalghe 14

1.4 Insetti **15**

1.4.1 Problematiche degli insetti 19

1.4.2 Chitina 19

1.4.3 Acidi Grassi 20

1.5 Benessere animale **21**

1.5.1 Fattori di crescita 21

1.5.2 Appetito 22

1.5.3 Risposta immunitaria 24

1.5.4 Stress 24

2. Scopo della tesi **26**

3. Materiali e metodi **28**

3.1.1 *Danio rerio,* zebrafish 28

3.1.2 *Hermetia illucens*, mosca soldato nera 29

3.2 Etica 30

3.3 Preparazione del substrato di alimentazione degli insetti 30
3.4 Allevamento di insetti 31
3.5 Preparazione dieta per i pesci 32
3.6 Zebrafish 34
3.7 Disegno sperimentale 34
3.8 Protocollo alimentare 35
3.9 Biometrie 36
3.10 Composizione acidi grassi 36
3.11 Istologia 38
3.12 Analisi molecolari 39
3.12.1 Estrazione di RNA e sintesi Cdna 39
3.12.2 Real time PCR 40
3.13 Analisi statistica 41

4.Risultati 42
4.1 Crescita e sopravvivenza 42
4.2 Composizione e contenuto degli acidi grassi 44
4.3 Istologia 49
4.4 Real-time PCR 52

5. Discussione 64

6. Conclusioni 69

7. Ringraziamenti 70

8. Bibliografia 71

1. INTRODUZIONE

1.1 Acquacoltura

L'acquacoltura è l'allevamento degli organismi acquatici che può essere svolta sfruttando bacini e reti trofiche naturali (allevamento estensivo) oppure utilizzando impianti a terra o gabbie in mare dove il prodotto viene allevato ad alte densità con mangimi commerciali (allevamento intensivo). L'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura (FAO) mette in contrapposizione il settore dell'acquacoltura e della pesca in quanto, il primo è correlato al concetto di proprietà dello stock ittico durante il periodo di accrescimento mentre nella pesca gli organismi acquatici sono un bene comune accessibile con o senza uno specifico permesso.

L'acquacoltura è una tecnica molto antica che risale addirittura all'età dei romani. Si è sviluppata a partire da un sistema di produzione alimentare nei corsi di acqua dolce dei paesi asiatici. Oggi questo settore è in continuo sviluppo al punto tale da essersi diffuso in diversi continenti sfruttando diversi ecosistemi e un ampio range di specie (Subasinghe, Soto, & Jia, 2009). Questa forte espansione è dovuta alla continua e crescente domanda di prodotti alimentari acquatici che rappresentano una componente essenziale per l'uomo per il loro profilo nutrizionale.

La produzione mondiale dei pesci di allevamento infatti, ha superato nel 2011, per la prima volta, quella della carne. Già nel 2009, i prodotti acquatici rappresentavano il 20% della consumazione alimentare di circa 3 miliardi di persone (Tacon & Metian, 2008). La pesca e l'acquacoltura hanno fornito circa 148 tonnellate di pesce nel 2010 (per un valore totale di 217,5 miliardi di dollari) di cui solo 128 tonnellate di pesce sono state utilizzate come fonte di sostentamento per l'uomo (FAO, 2016). Inoltre, si stima un incremento del 60-70% del consumo dei prodotti acquatici entro il 2050 (Makkar, Tran, Heuzé, & Ankers, 2014a).

L'acquacoltura, infatti, gioca un ruolo importante nella lotta globale contro la malnutrizione (Subasinghe et al., 2009). Questo perché i prodotti ittici hanno un alto contenuto proteico e, un'alta concentrazione di omega3, fondamentali nella prevenzione delle malattie cardiovascolari e nella riduzione del livello del colesterolo nel sangue.

La produzione dell'acquacoltura supporta dunque la crescente domanda di prodotti acquatici da parte di una popolazione in continuo aumento, alleggerendo la pressione di pesca sulle popolazioni naturali di pescato che rappresentano una risorsa limitata.

Grazie alla continua e crescente domanda da parte della popolazione di prodotti ittici, il settore dell'acquacoltura è, quindi, in continua crescita.

La produzione globale delle risorse ittiche ha raggiunto il picco di circa 171 milioni di tonnellate nel 2016, con il settore dell'acquacoltura che rappresenta il 47% del totale, escludendo il 53% delle risorse non destinate al consumo umano ma alla produzione di farine di pesce ed olio di pesce (Figura 1).

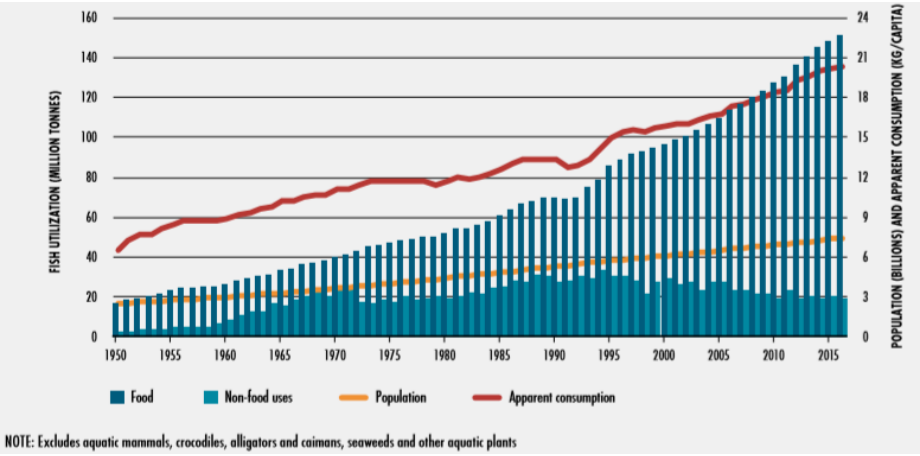

Figura 1. Trend pro capite basato sull'aumento della domanda di pesce nei settori della pesca e acquacoltura

1.1.2 Vantaggi e svantaggi acquacoltura

L'acquacoltura ad oggi rappresenta uno dei settori più importanti su scala internazionale e globale. Produce circa 91 milioni di tonnellate di pesce, di cui il 61% è destinato al consumo umano, mentre il 28% viene impiegato per la formulazione di mangimi (Tacon et al, 2006.). Inoltre, rappresenta una fonte di economia per i paesi e pone attenzione alla sicurezza alimentare, cercando di produrre cibo ricco in proteine e acidi grassi.

Nonostante ciò, presenta un grande svantaggio, che la allontana dal concetto di sostenibilità, ovvero lo sfruttamento delle risorse ittiche naturali destinate alla produzione di mangimi. Sono proprio le piccole specie pelagiche, come aringhe, sardine e lo spratto, a pagarne le conseguenze. Queste infatti, oltre ad essere destinate al consumo umano, vengono impiegate in acquacoltura per produrre farine e oli di pesce per la creazione di mangimi per i prodotti ittici. Le specie pelagiche, per questo, sono considerate sovra-sfruttate e se continueranno ad esserlo a lungo andare si assisterà al loro collasso. Per evitare il sovra-sfruttamento degli stock naturali si stanno cercando alternative per la sostituzione delle farine di pesce, poiché ad oggi, non è possibile stimare il loro utilizzo futuro.

Inoltre, la continua richiesta dell'utilizzo di farine a livello globale a lungo andare non riuscirà a sostenere gli elevati costi di produzione.

Da non sottovalutare è la richiesta da parte dei consumatori dei prodotti ittici di conoscere la provenienza e la qualità di ciò che consumano (Tacon, Hasan, & Subasinghe).

Quindi uno dei principali obiettivi dell'acquacoltura è quello di individuare delle alternative alle farine e oli di pesce. Uno dei validi sostituti sembra essere rappresentato dagli insetti grazie al loro contenuto proteico.

Un altro obiettivo è quello di creare un'economia circolare, cercando di fornire alimenti ecosostenibili rispettando il profilo nutrizionale, dei mangimi, garantendo il benessere dei pesci.

1.2 Farina di pesce ed olio di pesce

La farina di pesce e l'olio di pesce rappresentano gli ingredienti più utilizzati in acquacoltura, grazie al loro contenuto proteico e lipidico.

Le farine di pesce hanno un contenuto proteico elevato che garantisce un corretto sviluppo e una crescita adeguata, considerando che il 50 % del corpo è rappresentato da muscoli assiali con un contenuto proteico pari al 70% (Olvera-Novoa, Olivera-Castillo, & Martínez-Palacios, 2002). Nelle farine di pesce, le proteine devono costituire sempre il 40-55% della miscela. Inoltre, forniscono un corretto profilo di amminoacidi, comprensivo di quelli essenziali che i pesci non possono sintetizzare, ma devono introdurre con la dieta. Dal punto di vista del profilo lipidico, la farina e l'olio di pesce forniscono il corretto apporto di acidi grassi polinsaturi a lunga catena come EPA e DHA fondamentali per lo sviluppo della vista, del sistema nervoso centrale, oltre ad essere fonte di energia ed essere coinvolti nella risposta da stress. I pesci di acqua dolce riescono a sintetizzare questi acidi grassi a partire da precursori a catena più corta come l'acido linoleico (LA; 18:2 n-6)

e l'acido alfa-linoleico (ALA; 18:3 n-3). Queste conversioni, tuttavia, richiedono un grande dispendio energetico. I pesci marini, invece, hanno perso la via biosintetica per sintetizzare EPA e DHA e, quindi, devono assumerli in quanto tali attraverso la dieta. L'utilizzo di mangimi a base di farina ed olio di pesce permette di fornire il corretto apporto lipidico, necessario ad una crescita ottimale del prodotto allevato.

Una scarsa assunzione di lipidi può causare erosione delle pinne, diminuzione dei livelli di emoglobina, aumento dello stress e infine gameti di scarsa qualità. Al contrario, un eccesso di lipidi, può causare la sindrome da shock, provocando stress nell'organismo ed aumento del grasso nei tessuti dell'animale. È dunque fondamentale che il rapporto tra DHA/EPA sia ≥2.

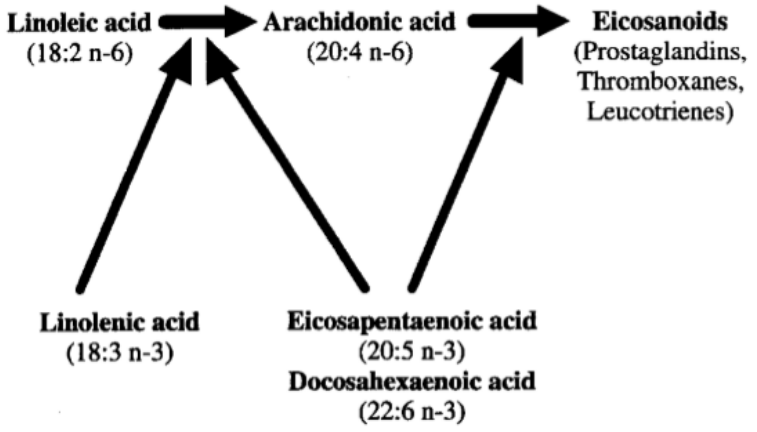

Figura 2- Pathway di sintesi dei PUFAs

Si stima che circa l'87% di olio di pesce viene utilizzato in acquacoltura per la formulazione di mangimi e che circa il 45% è rappresentato dalla farina di pesce.

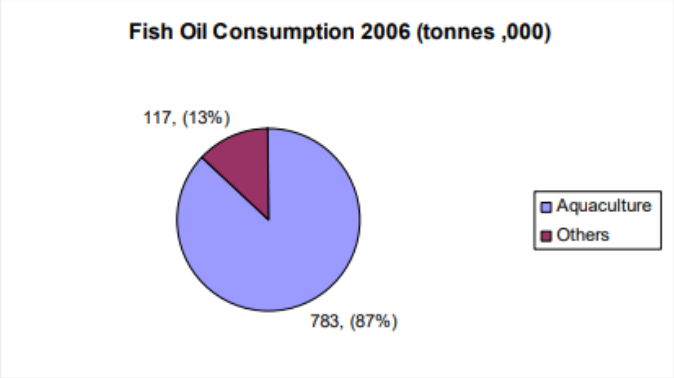

Figura 3- Consumo globale di olio di pesce in acquacoltura e in altri settori

L'utilizzo di queste farine, si riscontra principalmente nelle specie destinate ad un uso commerciale; ne è un esempio il salmone, il cui mangime è a base di farina di pesce e olio di pesce. Tuttavia, l'utilizzo di questi ingredienti non è più sostenibile. La rapida espansione del settore dell'acquacoltura e la crescente domanda da parte della popolazione di consumo di proteine hanno portato ad una maggior richiesta di prodotti ittici causando uno squilibro tra la domanda e l'offerta. Il sovra-sfruttamento degli stock ittici naturali finalizzato ad una maggiore produzione di mangimi ne ha causato il collasso. Di conseguenza, la ridotta disponibilità di pescato si è tradotta in un aumento del costo della farina e dell'olio di pesce, arrivando fino a circa 1000$ per tonnellata (Brown, 2007).

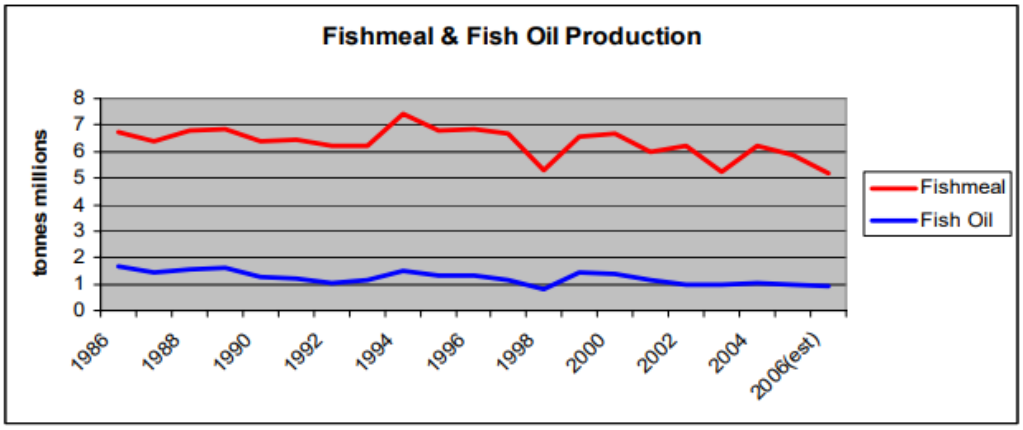

Figura 4- Produzione globale di farina di pesce e olio di pesce dal 1996 al 2006.

1.3 Alternative sostenibili alla farina di pesce e olio di pesce

Ad oggi il settore dell'acquacoltura non soddisfa i criteri di sostenibilità a causa dell'utilizzo di farine ed oli di pesce impiegati nella formulazione dei mangimi. Pertanto, al fine di un ulteriore sviluppo di questo settore, è necessaria la ricerca di ingredienti più sostenibili. Le alternative devono avere un profilo nutrizionale molto simile a quello degli ingredienti sostituiti al fine di garantire il corretto sviluppo e il benessere generale del prodotto ittico allevato. Attualmente si stanno studiando delle possibili alternative e degne di particolare attenzione sono le proteine di origine vegetale, le microalghe e gli insetti.

1.3.1 Proteine di origine vegetale

Le proteine di origine vegetale per essere considerate delle valide alternative alla farina e all'olio di pesce, devono avere le seguenti caratteristiche:

- devono essere di facile gestione e stoccaggio,
- avere un prezzo competitivo, per poter esser utilizzati nella formulazione di mangimi.

Mentre per quanto riguarda il profilo nutrizionale, le caratteristiche sono le seguenti:

- alta digeribilità,
- alto contenuto proteico
- buon profilo amminoacido (Delbertmiii et al., 2007).

I più utilizzati sono: la soia, la colza, il mais e il cotone.

Soia. *Glycine max* è il seme più coltivato a livello globale, con più di 200 milioni di tonnellate. Una parte di questa produzione, viene impiegata nell'estrazione dell'olio ricco dal punto di vista proteico. La soia infatti contiene circa il 48% di proteine. Dallo studio, condotto sul cobia, (*Rachycentroncanadum sp*) è emerso che la soia, può sostituire per il 94% la farina di pesce e olio di pesce, in quanto non sono stati individuati effetti negativi nell'organismo. Non ha avuto impatti negativi sui muscoli, ne ha

alterato lo stato del fegato (Sargent & Tacon, 1999). Nonostante la soia sia il prodotto più studiato, presenta delle limitazioni, in quanto include fattori anti-nutrizionali che inibiscono la proteasi, riducono la digeribilità proteica e causano problemi nella mucosa intestinale (Salze et al., 2010).
Un altro problema è strettamente legato all'ambiente, poiché la coltivazione della soia è una delle principali cause di deforestazione.

Colza. La farina di canola si ricava dall'olio, che è il prodotto primario di questa coltivazione. Contiene circa il 35 % di proteine, il 4% di fibre, acido fitico e glucoinolati. Dalla farina di canola si ricava la proteina concentrata della colza (CPC), che viene utilizzata in acquacoltura per salmoni e trote poiché il contenuto proteico è simile a quello delle farine di pesce. Anche la colza, così come la soia, presenta fattori anti-nutrizionali, inoltre contiene i glucosinati, che alterano il funzionamento della tiroide (Delbertmiii et al., 2007), riducono i livelli ormonali, alterano i livelli di iodio, riducono l'appetibilità e la digeribilità.

Mais. Il mais è uno dei prodotti più utilizzati nel settore della mangimistica. Durante il processo di lavorazione, il mais viene separato in diversi componenti: fibre, semi e glutine. Dal seme viene ricavato l'olio di mais, dal

quale verrà poi prodotta la farina. La farina di mais presenta un contenuto proteico pari al 70% e attualmente viene utilizzato come fonte di cibo per le spigole (*Dicentrarchus labrax)* e le orate (*Sparus aurata*) (Delbertmiii et al., 2007). Nonostante la farina di mais sia altamente digeribile, mostra una carenza di amminoacidi essenziali (EAA). Questa carenza rappresenta dunque, uno svantaggio nel suo utilizzo, con un limite di inclusione del 25%.

Cotone. *Gossypium irsute* è il terzo seme al mondo più coltivato. Anche questo seme contiene alti livelli di proteine ed un'elevata concentrazione di acido linoleico.

Dai risultati ottenuti, effettuati sulla trota iridea (*Oncorhinchus mykiss*), è stato visto che la farina di cotone può essere sostituita parzialmente o totalmente nella dieta, in quanto non sono stati riscontrati impatti negativi sulla crescita dei pesci (Güler & Yildiz, 2011). Il limite nell'utilizzo di cotone sono le proprietà anti-nutrizionali, in particolare il gossipolo, che svolge un'azione tossica nei pesci causando effetti dannosi sulla crescita e provocando stress. È stato dimostrato che il gossipolo, influenza: l'attività di trasporto dell'ossigeno, riducendo la respirazione, influenza il numero di eritrociti, causando anemia e infine, riduce l'efficienza riproduttiva.

Per questi motivi l'Europen Food Safety Authority ha stabilito un limite di utilizzo della farina contenente semi di cotone con un livello di inclusione di circa il 10%.

1.3.2 Microalghe

Le microalghe vengono spesso utilizzate in acquacoltura grazie alla loro facile coltivazione. Le alghe infatti, vengono coltivate utilizzando sistemi chiusi, quali i fotobioreattori e sistemi aperti come gli stagni. Non necessitano di particolari condizioni per crescere in quanto, sono in grado di crescere in diversi habitat, di riprodursi rapidamente e di produrre metaboliti secondari fondamentali per la crescita. Le specie più utilizzate in acquacoltura sono: *Nannochloropsis sp* (2-4 μm), *Isochrysis sp* (8-10 μm), *Chlorella sp*(10 μm) e *Rhodomoas baltica* (20 μm). Tali specie vengono impiegate come fonte di sostentamento per rotiferi e copepodi.

Dal punto di vista nutrizionale sono ricche di minerali, vitamine, prodotti bioattivi e acidi grassi e questa caratteristica fa in modo che vengano utilizzate come integratori nelle diete. Le alghe essendo produttori primari di acidi grassi, in particolare di omega3, sono considerati degli ottimi sostituti alla farina di pesce e olio di pesce. Sono stati fatti diversi studi per testare le microalghe come possibili fonti alternative. In particolare, è stata utilizzata la

Spirulina platensis come sostituto alla farina di pesce nella dieta della carpa comune (*Cyprinus carpio*). Sono stati presi in considerazione i seguenti parametri: crescita, proprietà organolettiche, digeribilità e attività enzimatica digestiva. Dallo studio è emerso che l'alga *Spirulina* può essere un ottimo sostituto alla farina di pesce grazie all'elevato contenuto proteico. Presenta, inoltre, gli amminoacidi essenziali, le vitamine e i minerali (Nandeesha, Gangadhar, Varghese, & Keshavanath, 1998). L'alga *Scenedesmus almeriensis* è stata testata come fonte proteica nella dieta dell'orata (*Sparus aurata*). Lo studio ha confermato l'utilizzo di questa alga come fonte sostitutiva in quanto una sostituzione parziale o totale di essa migliora la capacità di assorbimento della mucosa intestinale soprattutto nei pesci giovanili (Vizcaíno et al., 2014). L'unico svantaggio dell'utilizzo di queste alghe è l'elevato costo di produzione, poiché vengono coltivate all'interno di fotobioreattori che necessitano di un elevato dispendio di energia.

1.4 Insetti

Fin dall'antichità, gli insetti sono parte integrante della dieta umana in diversi continenti e vengono ancora oggi consumati in Asia, America Latina e Africa. Si stima che siano fonte di sostentamento per circa 2 milioni di persone (Makkar et al., 2014a). Gli insetti rappresentano il taxa più abbondante sulla

terra, con circa 1 milione di specie attualmente descritte. Il loro successo evolutivo e di colonizzazione è dovuto al ciclo vitale breve e alla capacità di colonizzare diverse nicchie ecologiche (Kelemu et al., 2015). Dal settembre del 2016 la Direzione Generale della commissione Europea per la salute e la sicurezza alimentare ha avviato un progetto, con gli stati membri dell'Unione Europea, con lo scopo di autorizzare farine di insetto come mangimi per i pesci allevati in acquacoltura (Müller, Wolf, & Gutzeit, 2017). L'utilizzo effettivo delle proteine di insetto, per la produzione di mangimi in acquacoltura, è avvenuto il 24 maggio del 2017, grazie all'autorizzazione della commissione Europea. Questa autorizzazione però è limitata solo ad una lista di sette specie quali:

1. *Hermetia illucens,*
2. *Musca domestica*
3. *Tenebrio molitor*
4. *Alphitobius diaperinus*
5. *Acheta domesticu,*
6. *Gryllodes sigillatus*
7. *Gryllus assimilis.*

Tra queste specie quella di maggiore interesse è *Hermetia illucens,* poiché presenta un profilo amminoacidico simile a quello della farina di pesce.

Hermetia illucens è stata proposta dal 1990 come un efficiente mezzo per smaltire i rifiuti organici, convertendoli in biomassa ricca di proteine e di grassi, adatta a scopi alimentari, viene utilizzata per produrre biodisel e chitina (Diener et al., 2011; van Huis et al., 2013). Il vantaggio dell'utilizzo di questo insetto è che non necessita di condizioni particolari per crescere. Durante lo stadio di adulto non si nutre e non necessita di cure particolari; inoltre non è portatore di malattie. Nonostante il contenuto lipidico degli insetti, dipenda dalla dieta e dagli stadi di sviluppo di quest'ultimi (Science, Extension, Science, Fish, & Experimental, 2007), si possono manipolare i substrati di crescita in modo tale da ottenere un arricchimento di acidi grassi. Le larve di *Hermetia illucens* presentano circa il 40-44% di proteine (Tabella 1) (Makkar et al., 2014a). Per quanto riguarda il contenuto lipidico, che dipende dalla dieta, si notano delle differenze; le larve cresciute su scarti di bovino mostrano un contenuto di omega 3 di circa 0,2% e di acido laurico di circa 21% mentre quelle allevate su rifiuti organici mostravano circa il 42% (Makkar et al., 2014a).

Crude protein (% in DM), n=5	Crude fibre (% in DM), n=1	Ether extract (% in DM), n=5	Ash (% in DM), n=5	Gross energy (MJ/kg DM)
42,1 ± 1.0 (41.1, 43.6)	7.0	26.0 ± 8.3 (15.0, 34.8)	20.6 ± 6.0 (14.6, 28.4)	22.1

DM, dry matter; values in parentheses are minimum and maximum values; values are mean ± standard deviation

Tabella 1- Contenuto proteico di Hermetia illucens

Le larve possono essere coltivate su diversi substrati, uno di questi è il caffè. Questo risulta essere un buon substrato per la crescita degli insetti grazie al ricco contenuto di polisaccaridi, proteine e minerali (Mussatto, Machado, Martins, & Teixeira, 2011).

Hermetia illucens (HI) è stata utilizzata in diversi studi. È stata testata come ingrediente per la produzione di mangimi per il pollame. In particolare sono state utilizzate le larve di HI e sono state fatte crescere sul letame di suino e pollame. Dagli studi è emerso che la sostituzione parziale di HI al mangime di uso commerciale non ha alterato le proprietà nutritive (K. B. Barragan-Fonseca, Dicke, & van Loon, 2017). Anche per le specie ittiche sono stati condotti diversi studi inerenti all'utilizzo di farine di insetto come fonte alternative di proteine; ne sono un esempio *Ictalurus puntatus* (pesce gatto), *Salmo salar* (salmone atlantico) e *Psetta maxima* (rombo chiodato). Anche da questi studi è emerso che i mangimi contenenti inclusione di *Hermetia illucens* mostravano valori nutrizionali simili a quelli dei mangimi commerciali.

1.4.1 Problematiche degli insetti

Nonostante gli insetti siano considerati validi sostituiti alla farina di pesce e olio di pesce, il loro utilizzo è ancora limitato a causa del contenuto di chitina e di acidi grassi.

1.4.2 Chitina

La chitina è uno dei più importanti polimeri presenti in natura e, negli insetti, rappresenta il maggior costituente dell'esoscheletro. Essa è costituita da unità di N-acetilglucosamina tenute insieme da legami β-(1,4). I polimeri di chitina tendono a formare microfibrille della dimensione di 3 mm di diametro, stabilizzati da legami idrogeno tra il gruppo dell'ammina e il carbonile (Merzendorfer & Zimoch, 2003). La degradazione della chitina avviene grazie all'attività enzimatica della dichitinasi e β-N-acetilglucossaminide che catalizzano l'idrolisi del legame glicosidico β-(1,4). Il problema principale della chitina è la sua digeribilità, dovuta al forte legame delle proteine alle fibre di chitina e dagli effetti negativi che provoca sul tratto digerente. Studi condotti su *Gadus morhua* (merluzzo bianco) hanno riscontrato l'attività della chitinasi nell'intestino, nello stomaco e nel tratto digerente. La chitina se presente ad alte concentrazioni può causare infiammazione al tratto digerente (Esteban, Mulero, Cuesta, Ortuño, & Meseguer, 2000). Al contrario, se

utilizzata a basse concentrazioni la chitina può svolgere una funzione immunostimolante. Infatti, studi effettuati su *Labeorohita*, hanno dimostrato che la chitina ha proprietà immonustimolanti, ovvero protegge il sistema immunitario da malattie batteriche. Per questo motivo spesso viene impiegata in acquacoltura come integratore alimentare. È stato visto che, alcuni pesci hanno la capacità di produrre chitinasi endogene (Danulat, 1986).

1.4.3 Acidi Grassi

Sebbene gli insetti siano considerati una fonte proteica alternativa, poiché sono in grado di fornire proteine biodisponibili, vitamine e fibre, mostrano carenze a livello lipidico e questo ne limita il loro utilizzo nei mangimi. Il profilo lipidico degli insetti risulta essere ricco di acidi grassi saturi, ma povero di acidi grassi polinsaturi (n-3 PUFA) (Barroso et al., 2017). Una possibile soluzione all'utilizzo di questi insetti nei mangimi è quella di arricchire il loro substrato di crescita in modo tale da aumentare il contenuto di n-3. I PUFAs rappresentano i maggiori costituenti dei fosfolipidi di membrana e contribuiscono a garantire la corretta funzione biologica delle membrane stesse e delle cellule. Una scarsa assunzione di lipidi può causare erosione delle pinne, diminuzione dei livelli di emoglobina, aumento dello stress e infine gameti di scarsa qualità. Al contrario, un eccesso di lipidi, può causare la sindrome da shock, causando stress nell'organismo ed aumento del

grasso nei tessuti dell'animale. E' bene dunque, che via sia un giusto apporto tra gli EPA e i DHA.

1.5 Benessere animale

Per valutare le risposte fisiologiche dei pesci, dovute all'impiego dell'utilizzo di farine di insetto come ingrediente innovativo, possono essere utilizzati diversi marker molecolari al fine di valutarne la crescita, l'appetito, la risposta allo stress e la risposta immunitaria.

1.5.1 Fattori di crescita

La crescita nei vertebrati è controllata da fattori genetici e fattori ambientali esterni quali: temperatura, fotoperiodo e disponibilità di cibo. Questi stimoli vengono trasmessi al cervello che portano l'ipotalamo a produrre l'ormone di rilascio della somatotropina (GHRH), che a sua volta stimola la ghiandola pituitaria a produrre l'ormone della crescita (GH). Quando l'ormone della crescita si lega ai propri recettori nel fegato, viene stimolata la sintesi e il rilascio del fattore di crescita insulino-simile (IGF-I) (Moriyama S, 2000). L'IGF-I è coinvolto nella regolazione delle proteine, lipidi, carboidrati, differenziazione e proliferazione delle cellule. Oltre all' IGF-I nei pesci ossei è presente anche l'IGF-II. Quest'ultimo, come l'IGF-I è coinvolto nella crescita somatica e in vari processi metabolici.

1.5.2 Appetito

Leptina e grelina sono molecole che controllano il metabolismo. Questi due ormoni vengono definiti antagonisti, poiché il primo causa il senso di sazietà mentre l'altro stimola l'appetito. La leptina, prodotta negli adipociti, è considerata una molecola neuroendocrina che controlla differenti funzioni biologiche quali: riproduzione e metabolismo. In particolare, è un indicatore ormonale delle riserve energetiche.

La grelina, al contrario, è un ormone peptidico costituito da 28 amminoacidi. Normalmente la grelina viene prodotto nello stomaco, ma nei pesci agastrici, come nel caso dello zebrafish, viene prodotta nell'intestino posteriore e induce il senso di fame. Essa viene codificata da un preproormone, chiamato pregrelina, che presenta un segnale peptide, un peptide maturo e una regione c terminale.

Nei pesci la funzione principale della grelina è quella di regolare la secrezione di ormoni nella ghiandola pituitaria e di stimolare la richiesta di cibo (Unniappan & Peter, 2005). Il gene delle grelina è stato scoperto per la prima volta nei pesci rossi (*Carassius auratus*) ed costituito da 3 introni corti e 4 esoni. Nei pesci rossi la grelina viene espressa a livello dell'intestino, dell'ipotalamo e del telencefalo. Recentemente è stata individuata la struttura del gene della grelina nella tilapia (*Oreochromis niloticus*) e nella trota iridea

(*Onchorynchus mykiss*). Nella tilapia, la struttura del gene è identica a quella dei pesci rossi mentre nella trota iridea è costituita da 4 introni e 5 esoni. Nella trota iridea, la grelina viene espressa nello stomaco, intestino e cervello. La grelina che viene prodotta nello stomaco, entra in circolo e va nella ghiandola pituitaria, dove stimola il rilascio degli ormoni pituitari quali: l'ormone della crescita (GH), l'ormone luteinizzante (LH) e la prolattina (PRL). Questo ormone viene anche prodotto nel cervello, dove induce la richiesta di cibo indispensabile per la crescita e riproduzione.

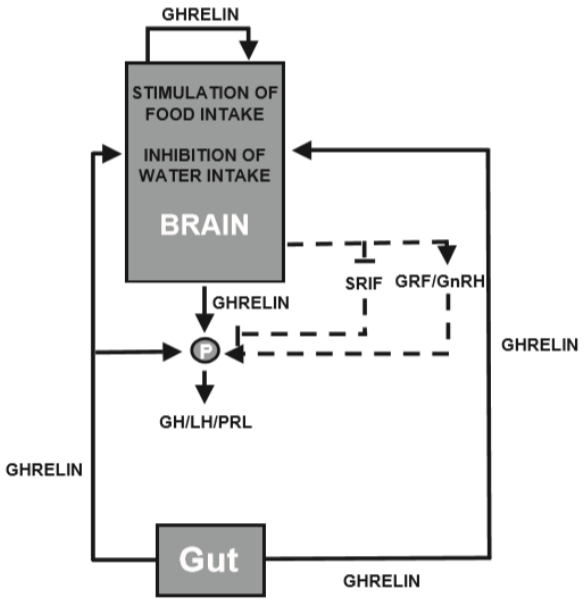

Figura 5- Pathway di sintesi della grelina

1.5.3 Risposta immunitaria

Il TNF-α (Tumor Necrosis Factor) è una citochina coinvolta nella regolazione e nella funzione del sistema immunitario. Le citochine sono proteine di piccole dimensioni che si legano a specifici recettori presenti sulla membrana. Vengono prodotte da diversi tipi di cellule e inducono le cellule adiacenti a differenziarsi e crescere. Il TNF-α esercita la sua funzione interagendo con due recettori: TNFR1 e TNFR2. Il primo è espresso in tutte le cellule, mentre il secondo è presente solo in quelle del sistema immunitario e quelle endoteliali (García-Castillo et al., 2004). Il TNF-α viene attivato tramite molecole patogene ed endotossine e, per questo motivo è stato proposto come marker per monitorare la salute dei pesci e l'efficacia delle vaccinazioni. Durante la risposta immunitaria vengono secrete le interleuchine, IL-1 e IL-10, che sono citochine aventi la funzione anti-infiammatoria.

1.5.4 Stress

Le HSP70,(heat shock proteins), sono delle proteine coinvolte nella risposta in condizioni di stress in un organismo. Nei pesci si riscontrano due particolari condizioni di stress: stress ambientali e stress patofisiologici (Iwama, Vijayan, Forsyth, & Ackerman, 1999). Gli stress ambientali sono dovuti soprattutto al cambiamento dei parametri chimico-fisici dell'acqua

quali temperatura e inquinanti che talvolta possono causare morte nel pesce. Gli stress patofisiologici invece coinvolgono disturbi fisici e fisiologici. Essi si riscontrano soprattutto in condizioni di allevamenti intensivi. Nel momento in cui viene percepito un fattore di stress,viene innescato un meccanismo che coinvolge il sistema neuroendrocrino. Si assiste ad un rilascio degli ormoni dello stress, quali le catecolamine e il cortisolo. L'ipotalamo riceve il segnale dello stress ed una volta captato rilascia l'ormone della corticotropina (CRH). Questo agisce sull'adenoipofisi che rilascia l'ormone adrenocorticotropo (ATCH), che a sua volta agirà sulla corticale del surrene che produrrà il cortisolo. È stato dimostrato che il cortisolo ha effetti negativi sulla riproduzione di alcune specie. Ne è un esempio la trota (*Salmo trutta*) che ha elevate concentrazioni di ATCH nel plasma con una riduzione del testosterone e 11 k-testosterone (Schreck, 2010).

2. SCOPO DELLA TESI

L'obiettivo dell'acquacoltura, finalizzato a garantire un ulteriore sviluppo di questo settore produttivo, è la sostituzione della farina e dell'olio di pesce utilizzati nella mangimistica, con ingredienti alternativi più sostenibili e altrettanto nutrienti. Inoltre, promuovere un processo di circolarità nel settore dell'acquacoltura attraverso la conversione di substrati organici di scarto prodotti da aziende terrestri, può essere una valida strategia per raggiungere l'obiettivo prefissato. A questo proposito, *Hermetia illucens*, rappresenta un ottimo esempio di organismo bio-convertitore. Tuttavia, il suo impiego come ingrediente per mangimi in acquacoltura è ancora limitato dal suo elevato contenuto di chitina e dallo scarso contenuto di acidi grassi polinsaturi. L'obiettivo di questa tesi è stato applicare un approccio di economia circolare all'allevamento di *Hermetia illucens* e di migliorare il suo profilo lipidico utilizzando un substrato di crescita derivato dallo scarto della torrefazione del caffè (coffee silverskin) arricchito con il 10% di *Schizochytrium sp*. Le prepupe di *Hermetia illucens* sono state quindi utilizzate per formulare 5 diete isolipidiche, isoproteiche e isoenergetiche contenti 0, 25, 50, 75, 100% di *Hermetia illucens* in sostituzione alla farina di pesce. Le diete sono state somministrate a zebrafish (*Danio rerio*), utilizzato come modello sperimentale per una prova della durata complessiva di sei mesi. Al fine di

valutarne le risposte fisiologiche, i pesci sono stati campionati in fase giovanile (2 mesi) e in fase adulta (6 mesi, fine dell'esperimento). Al fine di interpretare le risposte dei pesci alle diete è stato utilizzato un approccio multidisciplinare comprensivo di analisi biometriche, istologiche, gas-cromatografiche e molecolari.

3. MATERIALI E METODI

3.1.1 Danio rerio, Zebrafish

Danio rerio è un pesce di acqua dolce proveniente dall'Asia, appartiene alla famiglia dei Ciprinidi. Il corpo è allungato, compresso lateralmente con quattro strisce orizzontali di colore blu metallizzato, alternate a strisce bianche. Le strisce si estendono fino alla pinna caudale, mentre la pinna dorsale mostra una colorazione uniforme argentata come il ventre. In fase adulta può raggiungere una dimensione di 6 cm. Questa specie è caratterizzata da un dimorfismo sessuale: le femmine mostrano una forma arrotondata, colori meno vivaci e sono più grandi dei maschi. *Danio rerio* è una specie ovipara con fecondazione esterna. Grazie a studi condotti sul genoma di questo organismo è stato possibile notare caratteristiche genetiche simili a quelle umane (Seth, Stemple, & Barroso, 2013).

Figura 6- Danio rerio

3.1.2 Hermetia illucens, mosca soldato nera

Hermetia illucens, conosciuta come mosca soldato nera, appartiene alla famiglia delle Stratiomyidae. È una specie tropicale, nativa dell'America ma attualmente è stata trovata anche in Europa, Africa e Asia. La mosca soldato nera (HI) è polifaga ovvero consuma tutti tipi di cibo, per questo motivo è considerata un organismo detritivoro in quanto consuma materia organica derivante da frutta, carcasse, foglie e scarti derivati dall'uomo (Kim et al., 2011). Per crescere necessita di una temperatura di 20° C e un'umidità del 75%. *Hermetia illucens* è un insetto olometabolo, caratterizzato dalla trasformazione del corpo attraverso vari stadi (da larva ad adulto). Il ciclo vitale di *Hermetia illucens* dura circa 45 giorni ed inizia con la deposizione delle uova dalle quali schiudono delle larve. Segue la fase di pre-pupa, di pupa e infine la fase adulta. Lo sviluppo delle uova dura circa 4 giorni mentre lo stadio larvale dura dai 13 ai 18 giorni. Quando avviene il passaggio dalla fase di pre-pupe a quella adulta, si allontanano dal substrato di crescita per trovare un posto asciutto per poter completare la metamorfosi. Una delle caratteristiche di questo insetto è la capacità di convertire la materia organica di scarto in biomassa (Barragan-Fonseca et al., 2017). Studi condotti su questo insetto mostrano che ha un alto contenuto di acidi grassi saturi e un elevato profilo amminoacidico adatto per essere utilizzato, solo parzialmente,

come sostituto della farina e dell'olio di pesce (Barragan-Fonseca et al., 2017), a causa del basso contenuto di acidi grassi polinsaturi. Nonostante ciò, il profilo degli acidi grassi può essere modificato alimentando le larve su substrati arricchiti con fonte di HUFA n-3 (acidi grassi polinsaturi), rendendo *Hermetia illucens* una fonte di cibo sostenibile nel settore dell'acquacoltura (Barroso et al., 2017).

3.2 Etica

Le procedure che richiedono l'utilizzo di animali sono state svolte in linea con la legislazione italiana sugli animali da esperimento. Tali procedure sono state approvate dal Comitato Etico dell'Università Politecnica delle Marche (Ancona, Italia) e dal Ministero della Salute italiano (626/2018-PR). Le condizioni di allevamento applicate durante tutto lo studio, sono state ottimali (per dettagli vedere la sezione successiva) ed è stata ridotta al minimo la sofferenza dell'animale utilizzando un anestetico durante il campionamento (MSS222; Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA.)

3.3 Preparazione del substrato di alimentazione degli insetti

Hermetia illucens è stata allevata su un substrato formato da scarti provenienti dalla torrefazione del caffè (coffee silverskin) forniti dall'industria Saccaria

Caffè S.R.L. (Marina di Montemarciano, Ancona, Italia). Il sottoprodotto del caffè, avente umidità del 44%, è stato raccolto e macinato in un robot da cucina Ariete 1769 (De Longhi Appliances Srl, Italia) in modo tale da ottenere una dimensione delle particelle di 0,4 ± 2 mm. La dieta degli insetti è stata formulata includendo il 10% di *Schizochytrium sp* al sottoprodotto del caffè. *Schizochytrium sp,* è stata fornita liofilizzata da AlghItaly: Società Agricola S.R.L. (Sommacampana, VR, Italia). Al substrato di alimentazione degli insetti è stata aggiunta una quantità di acqua distillata per raggiungere un'umidità finale pari a circa il 70% (Makkar et al., 2014b).

3.4 Allevamento degli insetti

Gli insetti sono stati allevati al buio in una camera ad una temperatura di circa 27± 1° C con un'umidità relativa di circa 65±5% (Sprangers et al., 2017). Le larve di sei giorni, acquistate da Smart Bugs s.s Ponzano Veneto (TV), Italia, sono state contate a mano e divise in gruppi di 640 larve per replicato (n=65) per un totale di 41.600 esemplari. Ogni replicato consisteva di una scatola di plastica (57x38x16 cm) protetta con una garza di cotone a maglia fine e chiusa con un coperchio dotato di fori per la ventilazione di 0,5 cm di diametro (Sprangers et al., 2017). La densità di allevamento era pari a 0,3 / cm^2 (Barragan-Fonseca and Dicke 2018). Ciascuna larva è stata alimentata con razione di 100mg/giorno (Diener et al., 2009) e il cibo è stato aggiunto

una volta a settimana (448g per ciascun box). Gli insetti venivano ispezionati ogni giorno e quando le pre-pupe cambiavano colore da bianco a nero (May, 1961), venivano raccolte, lavate,idratate e conservate a -80°C.

3.5 Preparazione dieta per i pesci

Le prepupe sono state liofilizzate, macinate con Retsch Centrifugal Grinding Mill ZM 1000 (Retsch GmbH, Haan, Germany) e usate per preparare le diete per la sperimentazione. La dieta di controllo (HI0) conteneva farina di pesce (FM), glutine di grano, proteine di piselli concentrati e olio di pesce come ingrediente principale, ed è stata preparata in accordo con la dieta standard disponibile in commercio per zebrafish (Zebrafeed, Sparos ltd, Portugal). Le diete sperimentali sono isolipidiche (13%) e isoproteiche (50%). Le diete sperimentali sono state formulate aggiungendo percentuali crescenti di farina di *Hermetia illucens* (25%, 50%, 75% e 100%, indicate rispettivamente come HI25, HI50, HI75 e HI100) partendo da HI0. La componente vegetale (concentrato di proteine di piselli e glutine di grano) usata per la formulazione delle diete nella sperimentazione è stata mantenuta approssimativamente costante in tutte le diete (0.7 w:w). Infine, tutti gli ingredienti (0.5mm) e l'olio di pesce sono stati miscelati per 20 minuti (utilizzando il Kenwood kMix KMX53 stand Mixer; Kenwood, De LonghiS.p.a, Treviso, Italy) e successivamente è stata aggiunta dell'acqua al composto per ottenere

un'appropriata consistenza del pellet. Il pellet è stato ottenuto usando un tritacarne dallo spessore di 1mm ed essiccato ad una temperatura di 40°C per 48-72h. Una volta macinate, le diete sono state messe dentro a delle buste sottovuoto e conservate a -20°C. Le diete sono state analizzate per vedere il contenuto di umidità (AOAC #950.46), proteine grezze, CP(AOAC #976.05) e l'estratto di etere (EE, AOAC #991.36) in accordo con AOAC 2006.

La frazione totale lipidica di queste diete è stata estratta utilizzando una miscela di cloroformio-metanolo (2:1 v:v) (Merck KGaA, Darmstadt, Germania) in accordo con Folch et al., 1957. La formulazione della dieta e l'approssimativa composizione sono mostrate nella tabella 2.

	Hi0 (Control)	**Hi25**	**Hi50**	**Hi75**	**Hi100**
Ingredients (g/kg)					
Fish meal [1]	470	400	250	110	-
Vegetable mix [2]	220	230	298	385	440
Hi meal	-	150	275	350	460
Wheat flour [3]	198	172	120	110	72
Fish oil	80	51	25	10	-
Soy lecithin	8	8	8	11	4
Mineral and Vitamin supplements [$]	14	14	14	14	14
Binder	10	10	10	10	10
Proximate composition (%)					
Dry Matter	97.08 ± 0.06	95.78 ± 0.13	94.93 ± 0.05	93.63 ± 0.05	92.70 ± 0.04
Crude protein, CP	51.57 ± 0.13	50.75 ± 2.57	50.39 ± 0.28	51.23 ± 1.49	50.50 ± 3.15
Ether extract, EE	14.38 ± 0.64	13.10 ± 0.42	12.93 ± 0.38	13.24 ± 0.46	12.99 ± 0.51
NFE	21.32 ± 0.34	20.82 ± 1.00	20.64 ± 0.55	19.03 ± 0.67	18.47 ± 1.26
Ash	9.81 ± 0.25	11.11± 0.01	10.97 ± 0.00	10.13 ± 0.06	10.74 ± 0.13

Tabella 2. Ingredienti (g/kg) e composizione espressa in percentuale delle diete sperimentali utilizzate in questo studio

3.6 Zebrafish

Gli embrioni di zebrafish sono stati mantenuti in un sistema Tecniplast (Varese, Italy) per 48h alle seguenti condizioni: una temperatura di 28°C, pH 7,0, concentrazioni di NO_2 e NH_3< 0,01 mg/L, concentrazioni di NO_3< 10 mg/L e fotoperiodo di 12L/ 12D. Dopo questo periodo gli embrioni sono stati raccolti e contati allo stereo-microscopio (Leica Wild M3B, Leica Microsystems, Nussloch, Germania) e divisi casualmente in cinque gruppi sperimentali (ciascuno in triplicato) secondo le cinque diete sperimentali.

3.7 Disegno sperimentale

Le larve di zebrafish sono state messe in quindici vasche, tre vasche per gruppo sperimentale, da 20L ciascuna. Ciascun gruppo sperimentale era composto da 1500 larve (500 larve per vasca). L'acqua delle vasche aveva le stesse condizioni chimico-fisiche di quelle dei riproduttori ed era ricambiata 10 volte al giorno da un sistema di gocciolamento (Olivotto et al., 2004). I lati delle vasche erano coperti da pannelli neri per ridurre il riflesso della luce. Dopo 30 giorni dalla nascita i pesci di ciascuna vasca sono stati trasferiti in vasche più grandi (80L, 15 in totali, 3 per gruppi sperimentali) dotati di un filtro meccanico e biologico (Panaque, Roma, Italia). Tutte le vasche venivano sifonate due volte al giorno, 30 minuti dopo aver alimentato i pesci,

per rimuovere l'eccesso di cibo e gli eventuali individui morti. I giovanili sono stati campionati a 60 giorni dopo la fecondazione delle uova (days post fertilization;dpf) mentre gli adulti a 180 giorni dpf e sacrificati con una dose letale di MS222 (1g/L) e correttamente conservate per ulteriori analisi.

3.8 Protocollo alimentare

Gli zebrafish sono stati alimentati per 180 giorni come segue:

- HI0, il controllo, è stato alimentato con un mangime di controllo composto da farina ed olio di pesce
- HI25: con una dieta contenente il 25% di farina di prepupe di HI rispetto alla farina di pesce
- HI50: con una dieta contenente il 50% di farina di prepupe di HI rispetto alla farina di pesce
- HI75: con una dieta contenete il 75% di farina di prepupe di HI rispetto alla farina di pesce
- HI100: con una dieta contenente il 100% di farina di prepupe di HI rispetto alla farina di pesce

La granulometria del mangime era <100 μm da 5 a 15dpf, 101-200 μm da 16 a 30 dps, 201-400 μm da 31 a 60 dpf e 401-600 μm da 61 dpf fino a 180 dpf (fine dell'esperimento). I pesci sono stati alimentati due volte al giorno (2%

del peso corporeo) per tutta la durata dell'esperimento, in aggiunta, da 5 a 10 dps, a tutti i gruppi venivano somministrati una volta al giorno, al mattino, i rotiferi della specie *Brachionus plicatilis* (5ind/mL) in accordo con Lawrence et al., 2012 e Piccinetti et al., 2014.

3.9 Biometrie

Per misurare la crescita sono stati selezionati casualmente 20 pesci per vasca (60 per ciascun gruppo sperimentale), a 60 e 180 dpf, pesati e misurati individualmente. La lunghezza standard è stata determinata utilizzando un calibro (Measy 2000 Typ 5921, Svizzera; precisione: 0.1 mm) mentre per il peso umido è stata utilizzata una bilancia analitica OHAUS Explorer (OHAUS Europe GmbH, Svizzera; precisione: 0.1 mg) in accordo con Zarantoniello et al., 2018. La sopravvivenza degli individui è stata valutata alla fine dell'esperimento (180 dpf), contando il numero di pesci finali rispetto al numero di larve iniziali.

3.10 Composizione acidi grassi

Le diete sperimentali e i pesci appartenenti ai diversi gruppi sperimentali privati delle interiora (5 pesci per vasca, 15 per ciascuna dieta) sono stati analizzati per valutare la composizione degli acidi grassi. I campioni sono stati macinati e omogeneizzati (omogeneizzatore MZ 4110, DCG Eltronic,

Monza, Italia) infine liofilizzati (Edwards EF4, Crawley, Sussex, Inghilterra). Aliquote di 200 mg di ciascun campione sono state addizionate di 100 µl di standard interno (estere metilico di acido nonadecanoico, 99,6%, Dr. Ehrenstorfer GmbH, Germania), e: (i) le diete sperimentali sono state estratte overnight con il metodo di Folch et al. (1957); (ii) l'estrazione dei lipidi dai pesci eviscerati è stata condotta seguendo una Microwave-Assisted extraction (MAE). Tutti i lipidi estratti sono stati fatti evaporare sotto gas inerte a flusso laminare (N_2) fino a peso costante e risospesi in 0,5 ml di n-eptano. Gli esteri metilici di acidi grassi (FAME) sono stati preparati secondo Canonico et al. (2016) utilizzando estere metilico dell'acido nonadecanoico (19:0; Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Germania) come standard interno. I FAMEs(esteri metilici di acidi grassi) sono stati determinati dal sistema GC Agilent-6890 (Milano, Italia) accoppiato ad un rilevatore selettivo di massa quadruplo Agilent-5973N (MSD) (Milano, Italia). Una colonna capillare CPS ANALITICA CC-wax-MS (30m x 0,25mm ID, spessore film 0,25 µm) è stata utilizzata per separare i FAMEs. Le condizioni sperimentali e degli strumenti sono state settate per le matrici analizzate secondo (Truzzi et al., 2017; Truzzi et al., 2018). Per ciascun' aliquota di campione analizzate sono state eseguite almeno tre prove su GCMS.

3.11 Istologia

Per le analisi istologiche, sono stati campionati, a 60dpf e a 180dpf, i pacchetti viscerali (comprensivi di fegato e intestino) da 5 pesci per vasca (15 per gruppo sperimentale) e sono stati conservati in una soluzione di Bouin (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) ad una temperatura di 4°C per 24 ore. Sono stati eseguiti dei lavaggi in etanolo al 70% per 10 minuti, per tre volte e, successivamente, i campioni sono stati conservati nella soluzione di etanolo dell'ultimo passaggio. Allo scopo di includerli in paraffina, sono stati sottoposti ad un processo di disidratazione tramite soluzioni crescenti di etanolo (80, 95, 100%), e Xilene (Bio-Optica, Milano, Italia). Infine, sono stati inclusi in paraffina (Bio-Optica). I blocchetti di paraffina sono stati tagliati in sezioni di 5µm di spessore con il microtomo (Leica RM2125 RTS, Nussloch, Germania). Le sezioni sono state colorate con ematossilina ed eosina (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) e osservate al microscopio Zeiss Axio Imager.A2 (Oberkochen, Germania) per studiare il parenchima epatico e la morfologia dell'intestino. Le immagini sono state ottenute per mezzo di una fotocamera digitale a colori combinata Axiocam 503(Zeiss, Oberkochen, Germania). Inoltre, per accertare l'accumulo di grasso nel fegato, è stata eseguita un'analisi quantitativa su un numero significativo di sezioni istologiche, prese in triplicato, da ciascun gruppo sperimentale (n=9), nei due

tempi di campionamento. Le aree in cui erano presenti vasi sanguigni non sono state prese in considerazione. La percentuale della frazione di grasso (PFF) riscontrata sulle aree totali dei tessuti è stata calcolata mediante il software ImageJ impostando un valore soglia omogeneo.

3.12 Analisi molecolari

3.12.1 Estrazione RNA e sintesi cDNA

Per le analisi molecolari di fegato e intestino sono stati campionati 5 pesci per vasca (15 per dieta sperimentale) e per l'estrazione è stato utilizzato il reagente RNAzol RT (Sigma-Aldrich, R4533) secondo Piccinetti et al., 2013. Le soluzioni di RNA sono state diluite con 40 μm di acqua RNase-free (Qiagen). La concentrazione finale di RNA è stata misurata da uno spettrofotometro Nano-photometer P-class (Implen, Monaco, Germania). L'integrità dell'RNA è stata verificata mediante l'utilizzo di GelRed™, mediante la colorazione di bande 28S e 18S di RNAsu un gel di agarosio all'1%. I campioni di RNA sono stati conservati a -80°C. Infine, sono stati utilizzati 2 μg di RNA per la sintesi del cDNA e il kit di reagenti utilizzato è High Capacity Reverse Transcription Kit (Bio-Rad, Milano, Italia).

3.12.2 Real time PCR

Le PCR sono state eseguite con SYBR Green in un termociclatore iQ5 iCycler (Bio-Rad). La quantificazione dell'espressione relativa dei geni coinvolti nella crescita dei pesci (*igfl, igf2a e mstnb*), risposta dello stress (*nr3c1 e hsp70.1*), biosintesi degli acidi grassi polinsaturi a lunga catena (*elovl2, elovl5 e fads*), risposta all'appetito *(ghrl, cnrl, e lepa*), risposta immunitaria (*illb, il10 e tnfa*) e idrolisi enzimatica della chitina (*chia.2 e chia.3*) è stata eseguita utilizzando *arp* e *rpll3* come geni housekeeping. I dati ottenuti sono stati analizzati utilizzando il software iQ5 versione 2.0 (Bio-Rad) inclusi i file GeneEx Macro iQ5 Conversion e Genex Macro iQ5. Le sequenze di Primer sono state disegnate usando Primer3 (210 v. 0.4.0) a partire dalle sequenze di zebrafish disponibili in ZFIN. Le sequenze dei Primer utilizzate sono state riportate nella Tabella 3.

Gene	*Forward primer (5'- 3')*	*Reverse primer (5'- 3')*	*ZFIN ID*
igf1	5'-GGCAAATCTCCACGATCTCTAC-3'	5'-CGGTTTCTCTTGTCTCTCTCAG-3'	ZDB-GENE-010607-2
igf2a	5'-GAGTCCCATCCATTCTGTTG-3'	5'-GTGGATTGGGGTTTGATGTG-3'	ZDB-GENE-991111-3
mstnb	5'-GGACTGGACTGCGATGAG-3'	5'-GATGGGTGTGGGGATACTTC-3'	ZDB-GENE-990415-165
nr3c1	5'-AGACCTTGGTCCCCTTCACT-3'	5'-CGCCTTTAATCATGGGAGAA-3'	ZDB-GENE-050522-503
hsp70.1	5'-TGTTCAGTTCTCTGCCGTTG-3'	5'-AAAGCACTGAGGGACGCTAA-3'	ZDB-GENE-990415-91
elovl2	5'-CACTGGACGAAGTTGGTGAA-3'	5'-GTTGAGGACACACCACCAGA-3'	ZDB-GENE-060421-5612
elovl5	5'-TGGATGGGACCGAAATACAT-3'	5'-GTCTCCTCCACTGTGGGTGT-3'	ZDB-GENE-040407-2
fads2	5'-CATCACGCTAAACCCAACA-3'	5'-GGGAGGACCAATGAAGAAGA-3'	ZDB-GENE-011212-1
ghrl	5'-CAGCATGTTTCTGCTCCTGTG-3'	5'TCTTCTGCCCACTCTTGGTG-3'	ZDB-GENE-070622-2
cnr1	5'-AGCAAAAGGAGCAACAGGCA-3'	5'GTTGGTCTGGTACTTTCACTTGAC-3'	ZDB-GENE-040312-3
lepa	5'-CTCCAGTGACGAAGGCAACTT-3'	5'GGGAAGGAGCCGGAAATGT-3'	ZDB-GENE-081001-1
il1b	5'-GCTGGGGATGTGGACTTC-3'	5'-GTGGATTGGGGTTTGATGTG-3'	ZDB-GENE-040702-2
il10	5'-ATTTGTGGAGGGCTTTCCTT-3'	5'AGAGCTGTTGGCAGAATGGT-3'	ZDB-GENE-051111-1
tnfα	5'-TTGTGGTGGGGTTTGATG-3'	5'-TTGGGGCATTTTATTTTGTAAG-3'	ZDB-GENE-050317-1
chia.2	5'-GGTGCTCTGCCACCTTGCCTT-3'	5'-GGCATGGTTGATCATGGCGAAAGC-3'	ZDB-GENE-040426-2014
chia.3	5'-TCGACCCTTACCTTTGCACACACCT-3'	5'-ACACCATGATGGAGAACTGTGCCGA-3'	ZDB-GENE-040426-2891
arpc1a	5'-CTGAACATCTCGCCCTTCTC-3'	5'-TAGCCGATCTGCAGACACAC-3'	ZDB-GENE-040116-1
rpl13	5'-TCTGGAGGACTGTAAGAGGTATGC-3'	5'-AGACGCACAATCTTGAGAGCAG-3'	ZDB-GENE-031007-1

Tabella 3. Sequenze dei Primer utilizzate

3.13 Analisi statistica

Tutti i dati sono stati analizzati tramite one-way ANOVA utilizzando la dieta come variabile esplicativa. A tutti i test ANOVA è eseguito un Tukey post-hoc test. È stato utilizzato il pacchetto software statistico Prism5 (GraphPad Software). Il livello di significatività è stato impostato a $p<0.05$ e tutti i risultati sono stati presentati come media ± deviazione standard.

4. RISULTATI

4.1 Crescita e sopravvivenza

In Figura 7 sono riportati i dati biometrici di zebrafish a 60 dpf (giovanili) e 180 dpf (adulti). Considerando la lunghezza standard, si osservano valori significativamente più alti ($p<0.05$) in tutti i gruppi sperimentali alimentati con farina di HI (13.6 ± 2.4, 13.8±2.6, 15.1±1.1 e 15.7±1.2 mm per Hi25, Hi50,Hi75 e Hi100, rispettivamente), rispetto al Controllo (9.8±1.7mm). Per quanto riguarda il peso umido, invece, solo i gruppi alimentati con le diete a maggiore percentuale di inclusione di HI (Hi75 e Hi100) mostrano valori (61.5±12.1 e 72.1±14.5 mg per Hi75 e Hi100) significativamente più alti ($p<0.05$) rispetto al Controllo (43.2±13.2 mg). Non sono invece evidenti differenze significative ($p>0.05$) tra i gruppi Controllo, Hi25, Hi50 (55.0±15.2 e 56.4±16.2 mg per Hi25 e Hi50, rispettivamente). Riguardo la sopravvivenza, non si osservano differenze significative ($p<0.05$) tra tutti gruppi sperimentali.

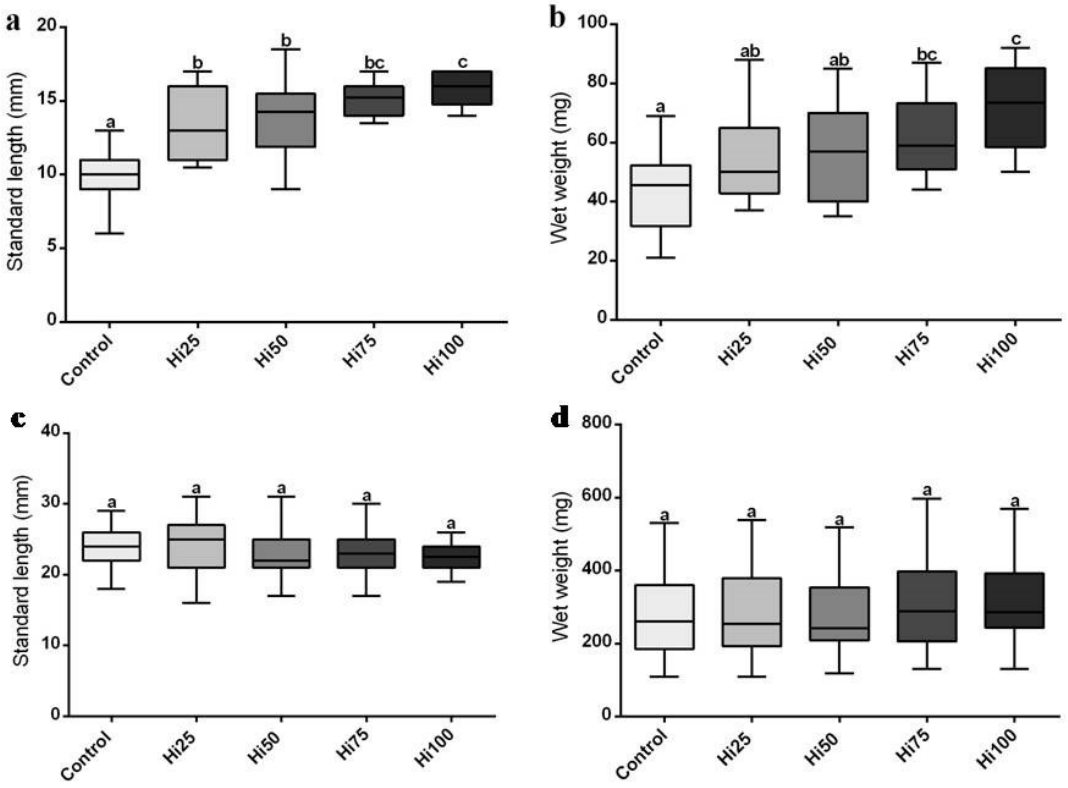

Figura 7. Zebrafish dati biometrici. (**a**) lunghezza standard dei giovanili; (**b**)peso umido dei giovanili e (**c**)lunghezza standard degli adulti e (**d**)peso umido degli adulti. La dieta di Zebrafish include 0, 25, 50, 75 e 100% di HI (Controllo, Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100).Boxplots mostrano un massimo e un minimo, primo quartile, mediana e terzo quartile(box). Lettere diverse denotano differenze statisticamente significative tra i gruppi sperimentali ($p<0.05$).

4.2 Composizione e contenuto degli acidi grassi

Diete. La Figura 8 mostra un aumento significativo ($p<0.05$) degli acidi grassi (SFA) e una bassa percentuale di PUFAs rispetto alla dieta del Controllo. Inoltre, un aumento dell'inclusione dei livelli di HI nelle diete mostra un valore significativamente più basso ($p<0.05$) della percentuale di n3, mentre, in parallelo, si nota un aumento significativo ($p<0.05$) della percentuale di n6. Infine, il rapporto tra n6/n3 mostra differenze significative ($p<0.05$) tra le diete sperimentali, aumentando dalla dieta di Controllo alla dieta Hi100 (Fig8b.).

Zebrafish. La Figura (8b) mostra le percentuali delle varie classi di FAs di zebrafish alimentati con le diete sperimentali. All'aumentare dei livelli di inclusione di HI si osserva un aumento significativo ($p<0.05$) di SFA (rispettivamente, 28.0±0.7, 30.0±0.5, 35.2±0.6, 36.6±0.8 e 39.2±0.4 % per il Controllo, Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100), n6 (rispettivamente 12.9±0.2, 14.1±0.2, 15.9±0.2, 19.2±0.2 e 19.5±0.2 % per il Controllo, Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100) e una diminuzione significativa ($p<0.05$) nella percentuale di PUFA (rispettivamente 42.7±0.7, 40.5±0.8, 35.6±0.8, 35.0±1.1 e 31.9±0.8 % per il Controllo, Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100) e n3 (rispettivamente, 29.3±0.7, 26.5±0.8, 19.7±0.8, 15.7±1.1 e 12.3±0.7 % per il Controllo, Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100). Riguardo al contenuto dei MUFA, le diete con alto contenuto di HI

mostrano percentuali significativamente ($p<0.05$) basse rispetto al Controllo, HI 25 e HI 50 (rispettivamente, 29.3±0.4, 29.5±0.3 e 29.2±0.3), che non mostrano differenze significative ($p>0.05$). Considerando il contenuto di n9, tutti i gruppi alimentati con le diete sperimentali (rispettivamente, 16.8±0.1, 16.8±0.2, 16.8±0.2 e 16.6±0.2 % per il Hi25, Hi50, Hi75 e Hi 100) sono caratterizzati da una percentuale significativamente più bassa ($p<0.05$) rispetto al Controllo. Infine, il rapporto tra n6/n3 aumenta all'aumentare dell'inclusione di HI nelle diete sperimentali (rispettivamente 0.43±0.01, 0.53±0.02, 0.81±0.03, 1.22±0.09 e 1.60±0.10 per il Controllo, Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100). Riguardo alla composizione di FAs negli zebrafish, in tutti i gruppi gli SFAs sono principalmente rappresentati dall'acido palmitico (16:0) e l'acido stearico (18:0). Inoltre, la maggior (1%) percentuale di acidi grassi saturi (escluso 18:0) aumenta significativamente ($p<0.05$) all'aumentare dell'inclusione di HI nelle diete. In particolare, il contenuto di acido laurico aumenta di ~30 volte.

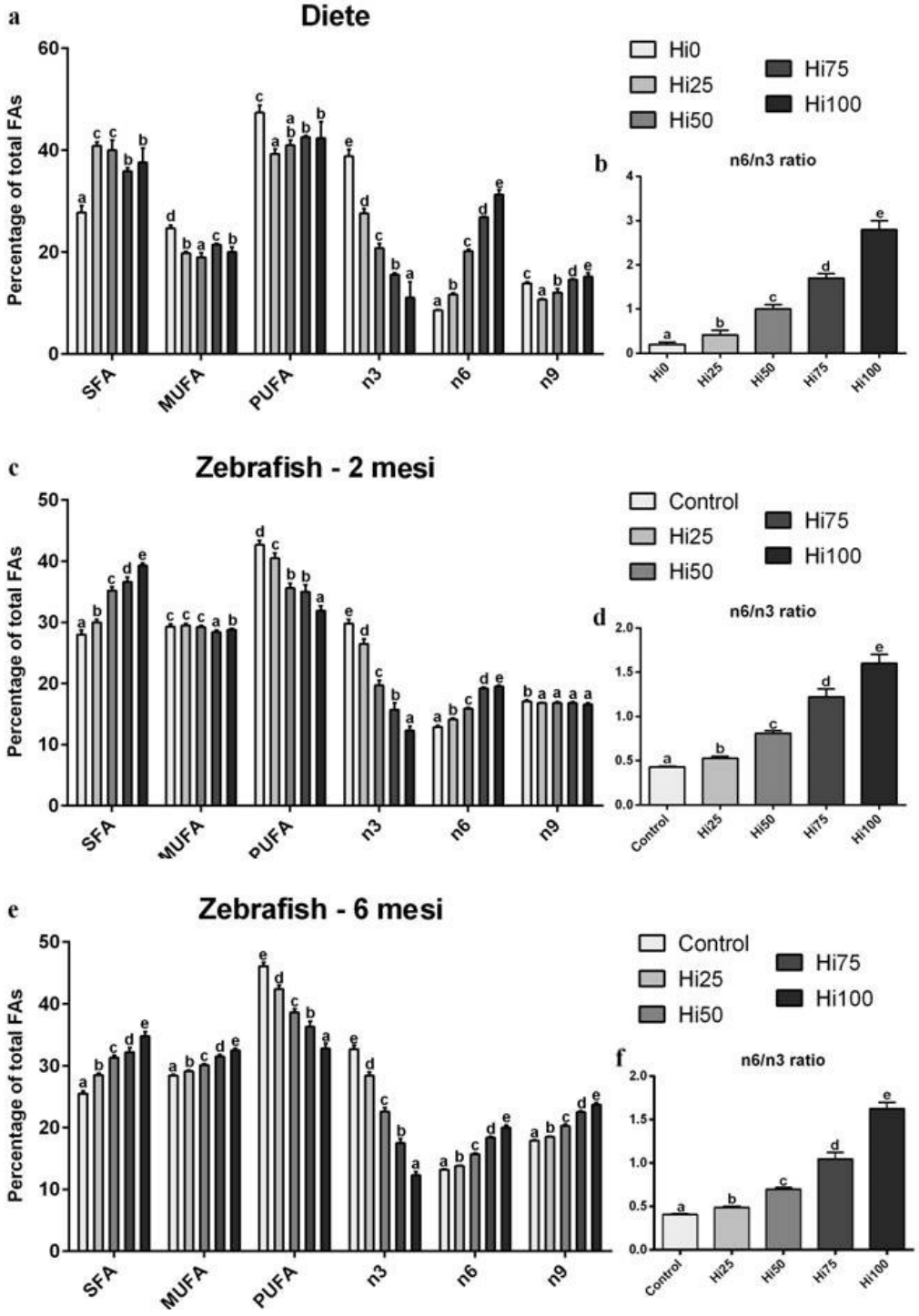

Figura 8. Contenuto di SFA, MUFA e PUFA (come % del totale di FA) e il contributo degli acidi grassi omega 3 (n3), omega 6 (n6) e omega 9 (n9) nel profilo lipidico. (**a,b**) diete sperimentali; (**c,d,e,f**) zebrafish. Le diete dei gruppi Controllo,Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100 contengono rispettivamente un' inclusione di HI pari a 0, 25, 50, 75 e 100%. Per ogni classe di acidi grassi, lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($p<0.05$) tra i gruppi sperimentali. I valori sono rappresentati come valore medio ± SD (n= 12).

TABELLA 4: Composizione degli acidi grassi (come % del totale dei FAs) in zebrafish alimentati con diete aventi un inclusione del 25, 50, 75 e 100 % di HI (dei gruppi Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100).

	Zebrafish				
	CTRL	Hi25	Hi50	Hi75	Hi100
10:0	0.02±0.01	0.04±0.01	0.12±0.01	0.13±0.01	0.15±0.02
12:0	0.27±0.01^{a}	3.0±0.3^{b}	6.2±0.2^{c}	7.2±0.3^{d}	8.3±0.5^{e}
13:0	0.04±0.01	0.05±0.01	0.07±0.01	0.08±0.02	0.08±0.02
14:0	4.3±0.3^{a}	4.5±0.3^{a}	5.1±0.3^{bc}	4.9±0.1^{b}	5.2±0.4^{c}
14:1n5	0.27±0.02	0.33±0.05	0.40±0.03	0.45±0.07	0.59±0.09
15:0	0.78±0.03	0.79±0.02	0.81±0.06	0.84±0.13	0.84±0.16
16:0	16.8±1.5^{b}	15.9±0.3^{a}	16.9±0.9^{b}	17.9±1.1^{c}	18.2±0.8^{c}
16:1n9	0.76±0.05	0.78±0.03	0.90±0.17	0.89±0.12	0.87±0.07
16:1n7	7.7±0.2^{b}	7.8±0.3^{b}	7.8±0.1^{b}	7.2±0.3^{a}	7.1±0.1^{a}
17:0	0.81±0.03	0.84±0.1	0.75±0.1	0.81±0.1	0.90±0.1
17:1n7	0.81±0.12^{a}	1.1±0.04^{b}	1.2±0.04^{c}	1.4±0.11^{d}	1.6±0.02^{e}
18:0	4.8±0.8^{a}	4.7±0.5^{a}	5.0±1.0^{a}	4.7±0.6^{a}	5.4±1.1^{a}
18:1n9	14.6±0.8^{a}	14.7±0.5^{a}	15.1±0.1^{a}	15.3±0.9^{a}	15.4±1.4^{a}
18:1n7	3.4±0.2^{c}	3.5±0.2^{c}	3.0±0.2^{b}	2.7±0.1^{a}	2.9±0.1^{b}
18:2n6	10.7±0.6^{a}	11.3±0.2^{b}	12.9±0.1^{c}	15.7±1.0^{e}	15.2±0.6^{d}
18:3n6	0.33±0.02	0.38±0.02	0.40±0.04	0.58±0.06	0.52±0.03
18:3n3	2.2±0.2^{c}	2.2±0.1^{c}	2.0±0.2^{ab}	2.1±0.3^{bc}	1.8±0.2^{a}
20:0	0.18±0.01	0.16±0.01	0.18±0.03	0.19±0.02	0.18±0.04
20:1n9	1.0±0.04^{e}	0.83±0.06^{d}	0.56±0.03^{c}	0.43±0.05^{b}	0.33±0.02^{a}
20:2n6	0.32±0.03	0.32±0.02	0.32±0.05	0.32±0.01	0.44±0.06
20:3n6	0.38±0.04^{a}	0.50±0.02^{b}	0.68±0.03^{c}	0.85±0.10^{d}	1.2±0.1^{e}
20:4n6	1.2±0.1^{a}	1.5±0.1^{b}	1.6±0.1^{b}	1.8±0.1^{c}	2.2±0.1^{d}
20:3n3	0.18±0.02	0.16±0.01	0.13±0.02	0.11±0.02	0.13±0.04
20:5n3	10.7±0.7^{e}	9.5±0.8^{d}	6.1±0.8^{c}	3.6±0.4^{b}	2.0±0.5^{a}
22:1n9	0.51±0.1	0.36±0.02	0.18±0.01	0.11±0.04	0.03±0.01
22:6n3	16.8±1.8^{e}	14.7±1.1^{d}	11.5±0.8^{c}	10.0±0.2^{b}	8.4±0.7^{a}
24:1n9	0.21±0.03	0.13±0.01	0.04±0.01	0.02±0.01	0.01±0.01
DHA/EPA	1.6±0.1^{a}	1.6±0.1^{a}	1.9±0.1^{b}	2.8±0.3^{c}	4.4±0.4^{d}

I valori medi contrassegnati da diverse lettere hanno differenze significative($p<0.05$). L'analisi statistica è stata realizzata solo per FAs>1%. FAs con una percentuale <1% è stata esclusa da tutte le analisi statistiche poiché le loro concentrazioni sono prossime al limite rilevabile.

Considerando i MUFA, l'acido grasso predominate in tutti i gruppi sperimentali è l'acido oleico (18:1n9) che non mostra differenze significative ($p>0.05$) rispetto agli altri gruppi sperimentali. Inoltre, i MUFAs quali 16:1n7 e 18:1n7 mostrano una diminuzione significativa nei pesci alimentati con un' inclusione di HI del 50% (Hi50) e del 100% (Hi100) rispetto al controllo. L'acido linoleico (18:2 n6) e l'acido docosaesanoico (22:6 n3; DHA) sono i PUFAs più abbondanti nelle diete. L'acido linoleico e l'acido arachidonico (20:4 n6) mostrano un aumento significativo ($p<0.05$) all'aumentare della percentuale di inclusione di HI in tutte le diete. Al contrario, una diminuzione significativa della percentuale dell'acido eicosapentaenoico (20:5n3; EPA) è stata osservata nelle diete, all'aumentare dei livelli di inclusione di HI, i DHA, mostrano un trend simile agli EPA. Quindi, il rapporto tra DHA/EPA, aumenta significativamente ($p<0.05$) all'aumentare dell'inclusione dei livelli di HI nelle diete.

4.3 Istologia

Le analisi istologiche sono state effettuate con lo scopo di verificare possibili infiammazioni nell'intestino dei pesci e di valutare l'accumulo di lipidi e l'eventuale steatosi nel fegato. Per quanto riguarda l'intestino, in tutti i gruppi sperimentali non si evidenziano alterazioni morfologiche o segni di infiammazione, sia nei giovanili (Fig. 9a-e) sia negli adulti (Fig. 10a-e).

Dall'analisi del fegato sui giovanili e sugli adulti, si rileva un accumulo lipidico variabile tra vari gruppi sperimentali. Infatti, nei gruppi Controllo, Hi25 e Hi50 (Fig. 3f-h e Fig. 4f-h per giovanili e adulti, rispettivamente), il fegato mostra una presenza diffusa di epatociti con citoplasma ricco di grasso, intervallati da epatociti con morfologia regolare.

Al contrario, i gruppi Hi75 e Hi100 (Fig. 9i,j e Fig. 10i,j per giovanili e adulti, rispettivamente), mostrano steatosi con epatociti di grosse dimensioni e un abbondante accumulo lipidico intracitoplasmatico.

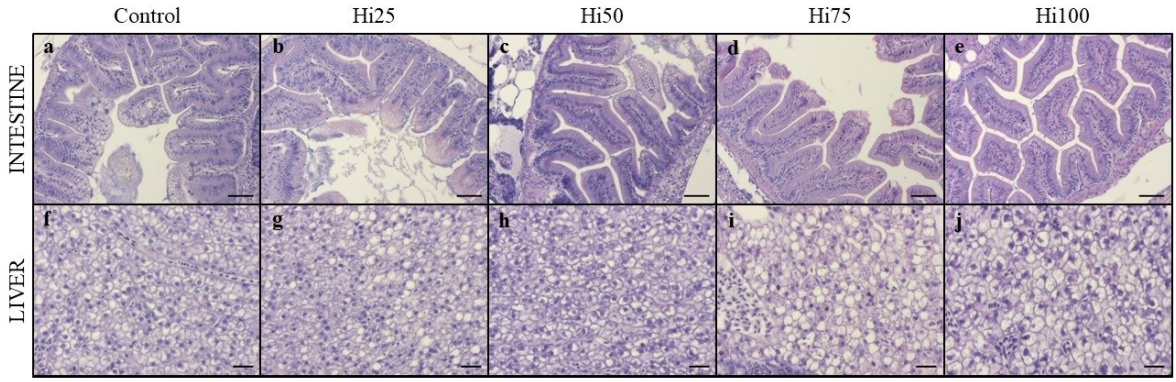

Figura 9. Esempio di istomorfologia dell'intestino e fegato nei giovanili di zebrafish. a-e) intestino; (**f-j**) fegato. La dieta di zebafish include 0, 25, 50, 75 e 100% di HI (rispettivamente, Controllo, Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100). Scala bars: **(a-e)** 50 µm; **(f-j)** 20 µm.

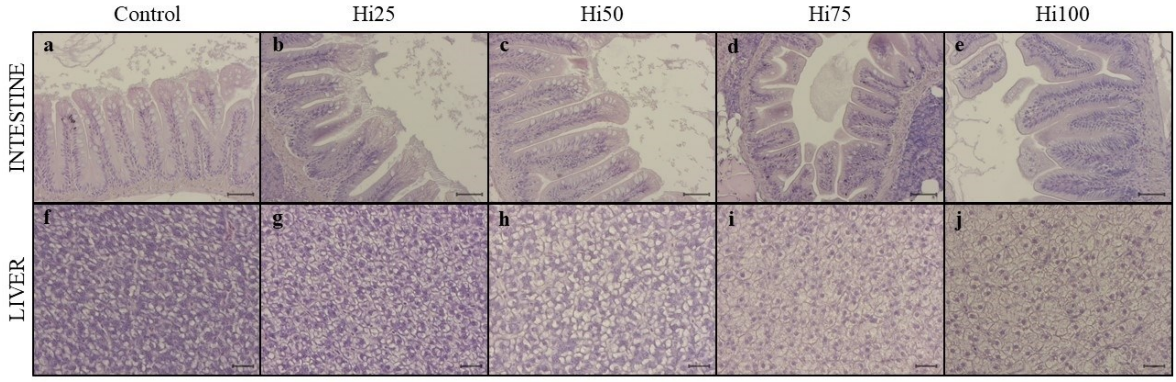

Figura 10. Esempio di istomorfologia dell'intestino e fegato negli adulti di zebrafish. a-e) intestino; (**f-j**) fegato. La dieta di zebafish include 0, 25, 50, 75 e 100% di HI (rispettivamente, Controllo, Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100). Scala bars: **(a-e)** 50 μm; **(f-j)** 20 μm.

La quantificazione statistica della percentuale di grasso (PFF) nelle sezioni di fegato ha confermato i risultati (Fig.11). Considerando i giovanili (Fig.11a), la PFF non mostra differenze significative tra i gruppi Controllo, Hi25 e Hi50 (rispettivamente, 50.3±2.6, 48.3±1.7, 50.0±2.0 % per Controllo, Hi25 e Hi50), mentre i suoi valori risultano, rispetto a tutti gli altri gruppi sperimentali, significativamente più alti nei gruppi alimentati con una elevata inclusione di HI, ovvero Hi75 e Hi100 (rispettivamente 55.6±1.7 e 58.0±1.4 % per Hi75 e Hi100).

Per quanto riguarda gli adulti (Fig.11b), Hi50, Hi75 e Hi100 (56.0±0.8, 59.0±1.0, 59.4±1.6) mostrano valori significativamente più alti ($p<0.05$) rispetto a Controllo e Hi25 (50.7±2.0 e 47.0±2.5).

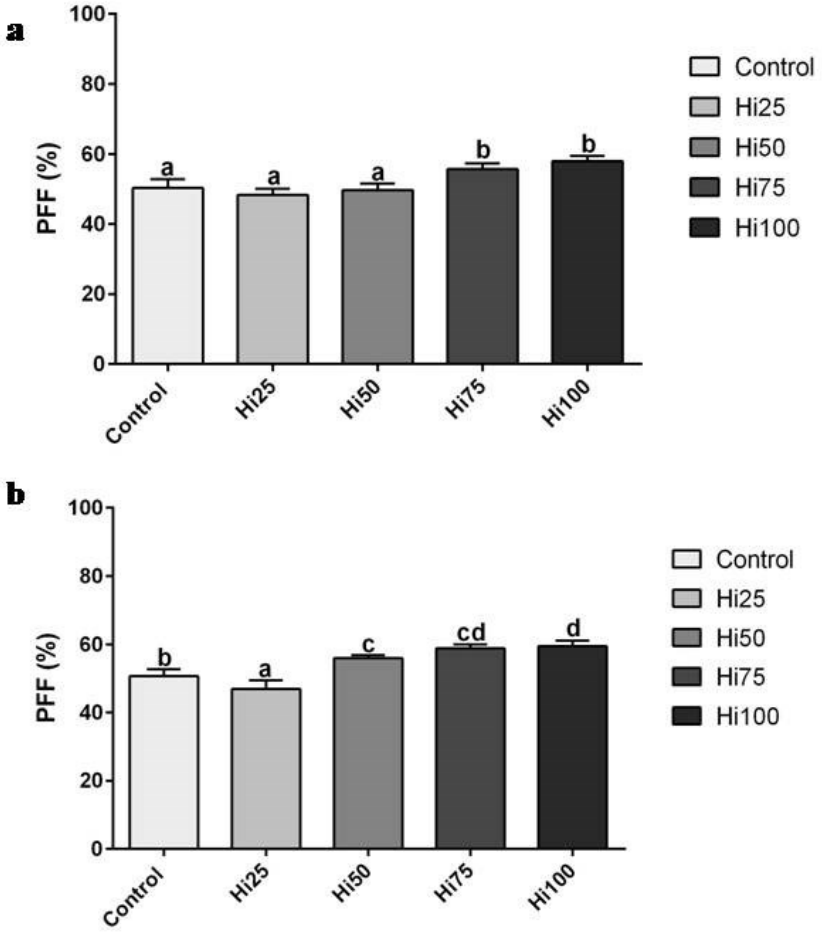

Figura 11. Percentuale PFF.(**a**) giovanili; (**b**) adulti in tutti i gruppi sperimentali. Le diete dei gruppi Controllo,Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100 contengono rispettivamente un' inclusione di HI pari a 0, 25, 50, 75 e 100%.

4.4 Real-time PCR

L'espressione dei geni coinvolti nella crescita dei pesci (*igf1*, *igf2a* e *mstnb*), nella risposta allo stress (*nr3* e *chsp70.1*) e nella biosintesi degli acidi grassi polinsaturi (*elovl2,elovl5* e *fads2*), è stata analizzata su campioni di fegato. Inoltre, utilizzando campioni di intestino, sono stati esaminati i geni coinvolti nella risposta immunitaria (*il1b, il10* e *tnfa*), nell'appetito (*ghrl,cnr1* e *lepa)* e nell'idrolisi enzimatica della chitina (*chia.2* e *chia.3*).

Fattori di crescita. Come riportato in Figura 12a, l'espressione di *igf1* nei giovanili mostra un andamento decrescente dose dipendente, ma solo Controllo e Hi100 mostrano una differenza significativa ($p<0.05$). Al contrario, negli adulti (Fig.12d) tutti i gruppi alimentati con diete a base di HI mostrano un'espressione di *igf1* significativamente ($p<0.05$) più bassa rispetto al Controllo. Considerando l'espressione genica di *igf2a* (Fig.12b) nei giovanili, tutti i gruppi trattati con HI sono caratterizzati da un valore significativamente più basso ($p<0.05$) rispetto al Controllo. Negli adulti (Fig.12e), invece, non è rilevata alcuna differenza significativa ($p>0.05$) tra i gruppi sperimentali. Il gene *mstnb* (Fig.12c) nei giovanili presenta valori significativamente ($p<0.05$) più alti nei gruppi Hi75 e Hi100 rispetto al Controllo. Negli adulti (Fig.12f) tale gene non mostra differenze significative ($p<0.05$).

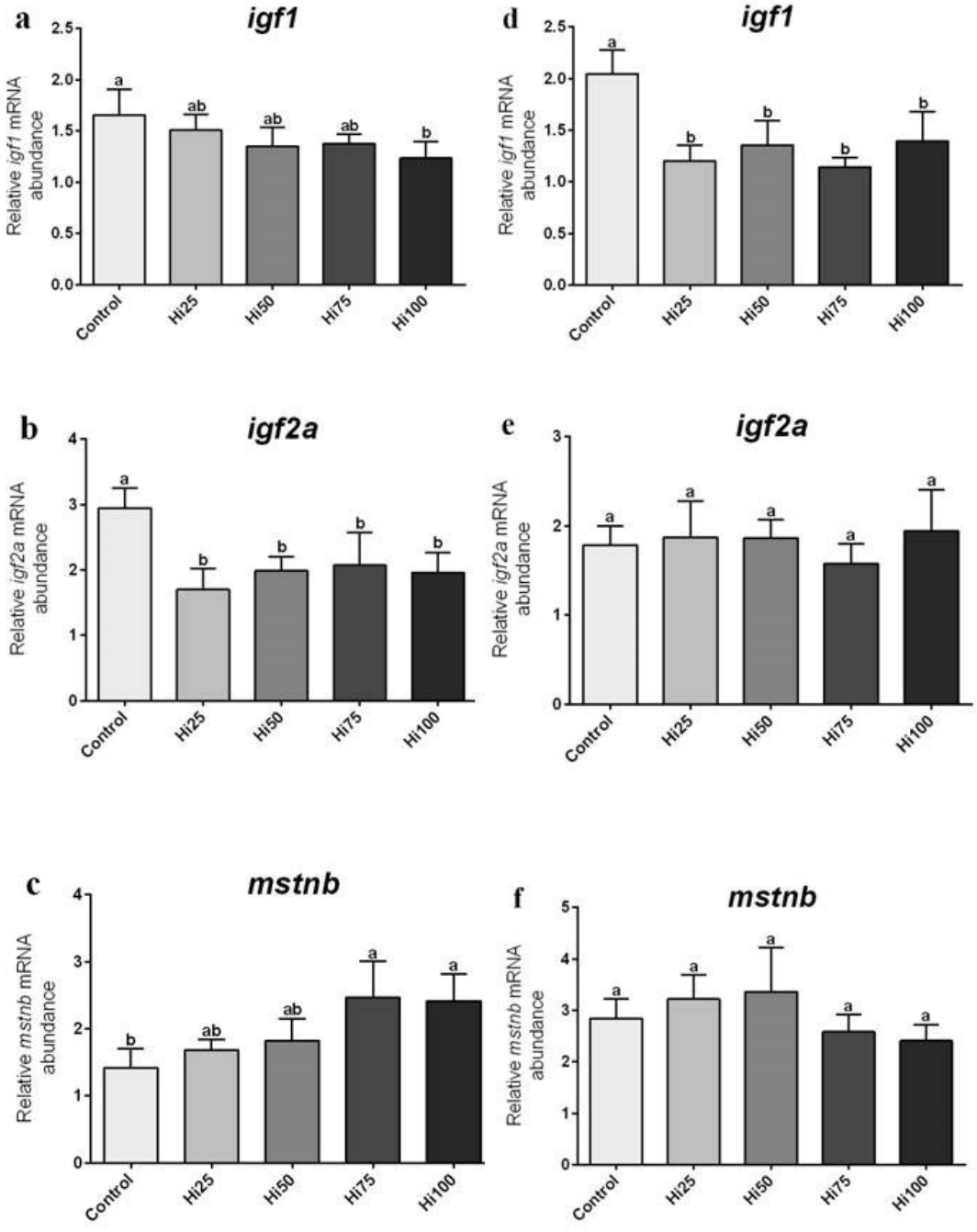

Figura 12. Espressione relativa ai livelli di mRNA nei geni coinvolti nella crescita analizzati in zebrafish. (**a**) *igf1*, (**b**) *igf2a*, (**c**) *mstnb* nei giovanili; (**d**) *igf1*, (**e**) *igf2a,* (**f**) *mstnb* negli adulti. La dieta di zebrafish include 0, 25, 50, 75 e 100% di HI (Controllo, Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100). Lettere diverse denotano differenze statisticamente significative tra i gruppi sperimentali ($p<0.05$). I valori sono rappresentati come media ± deviazione standard (n=5).

Stress. Per quanto riguarda l'espressione del gene *nr3c1* nei giovanili (Fig.13a), tutti i gruppi sperimentali alimentati con diete a base di HI sono caratterizzati da valori significativamente più alti ($p<0.05$) rispetto al Controllo. Negli adulti (Fig.13c), invece, il gruppo Hi100 presenta un valore di espressione genica significativamente ($p<0.05$) più alto rispetto ai gruppi Controllo, Hi25 e Hi50. Considerando l'espressione di *hsp70.1,* sia nei giovanili (Fig.13b) che negli adulti (Fig. 13d) l'espressione risulta significativamente ($p<0.05$) più alta nei gruppi Hi50, Hi75 e Hi100 rispetto a Controllo e Hi25 (ad eccezione del gruppo Hi50 negli adulti che, invece, non presenta differenze significative con Controllo e Hi25; $p>0.05$).

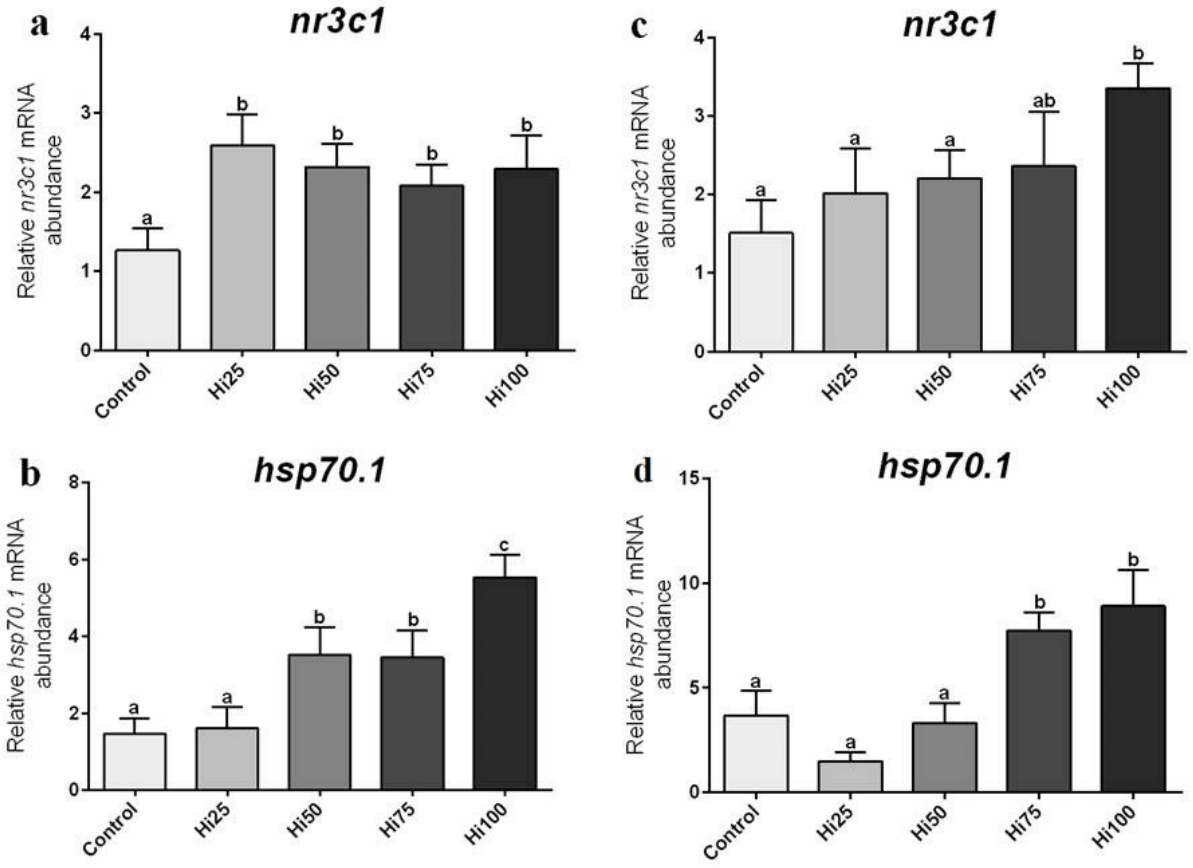

Figura 13. Espressione relativa ai livelli di mRNA nei geni coinvolti nello stress analizzati in zebrafish. (**a**) *nr3c1*, (**b**) *hsp70.01*, nei giovanili; (**c**) *nr3c11*, (**d**) *hsp70.1*, negli adulti. La dieta di zebrafish include 0, 25, 50, 75 e 100% di HI (Controllo, Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100). Lettere diverse denotano differenze statisticamente significative tra i gruppi sperimentali ($p<0.05$). I valori sono rappresentati come media ± deviazione standard (n=5).

Metabolismo lipidico. Nei giovanili, l'espressione genica di *elovl2* (Fig.14a) e *fads* (Fig.14c) non evidenza differenze significative tra i gruppi sperimentali ($p>0.05$). Differentemente, l'espressione di *elovl5* (Fig.14b) assume valori significativamente più alti ($p<0.05$) nei gruppi Hi75 e Hi100 rispetto agli altri gruppi.

Negli adulti, invece, i tre geni analizzati (Fig.14d,e,f) mostrano lo stesso andamento, con il gruppo Hi100 caratterizzato da un valore di espressione genica significativamente ($p<0.05$) più alto rispetto agli altri gruppi sperimentali.

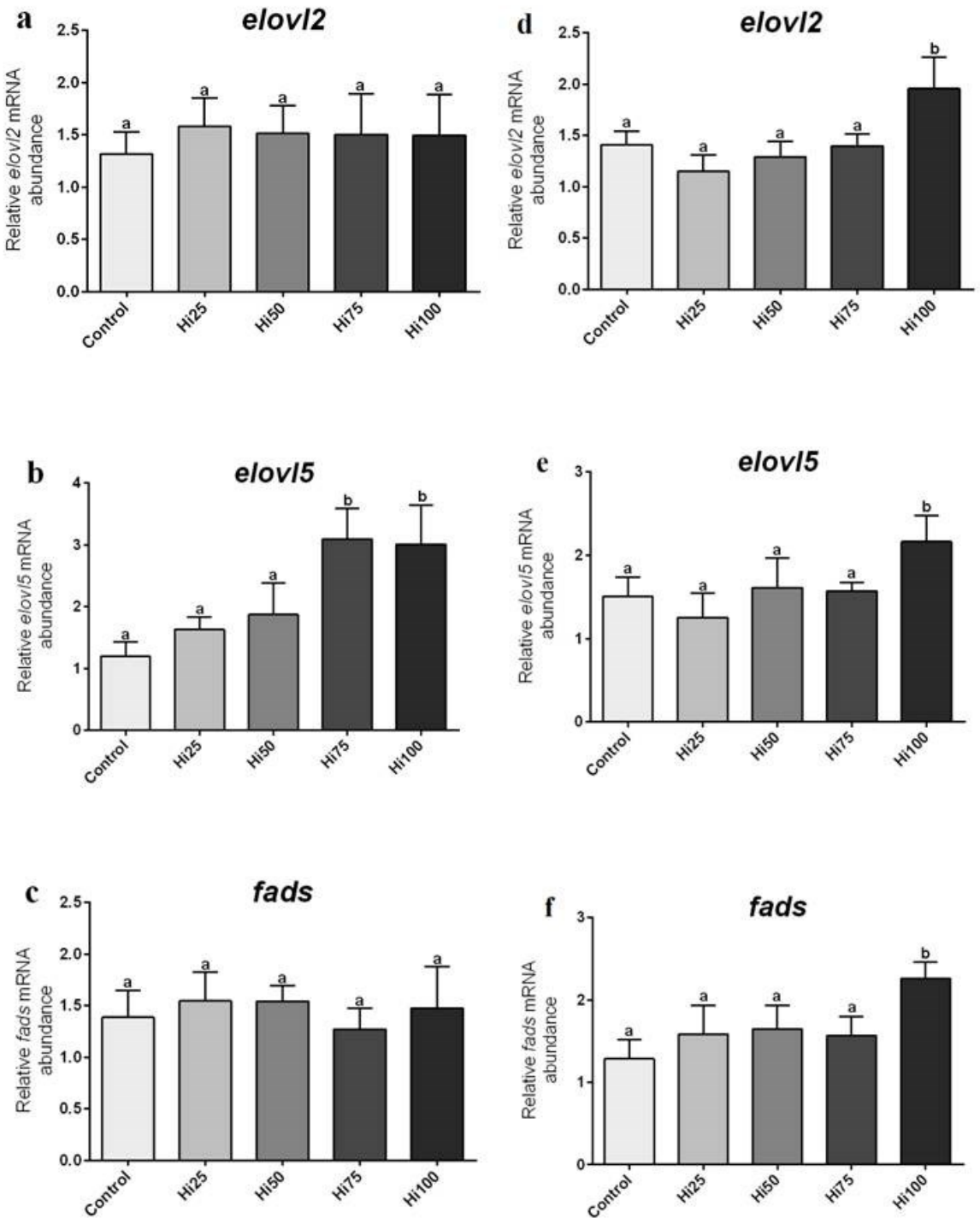

Figura 14. Espressione relativa ai livelli di mRNA nei geni coinvolti nel metabolismo lipidico analizzati in zebrafish. (**a**) *elovl2*, (**b**) *elovl5*, (**c**) *fads* nei giovanili*;* (**d**) *elovl2*, (**e**) *elovl5,* (**f**) *fad* negli adulti. La dieta di Zebrafish include 0, 25, 50, 75 e 100% di HI (Controllo, Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100). Lettere diverse denotano differenze statisticamente significative tra i gruppi sperimentali ($p<0.05$). I valori sono rappresentati come media ± deviazione standard (n=5).

Appetito. I gruppi sperimentali alimentati con HI mostrano un aumento significativo ($p<0.05$) dell'espressione del gene *ghrl* (Fig.15a). Nei giovanili, il gene *ghrl* mostra valori significativamente ($p<0.05$) più alti rispetto a Controllo e Hi25. Considerando l'espressione del gene *cnrl* (Fig.15b) non si evidenziano differenze significative ($p>0.05$) tra i gruppi del Controllo, Hi25 e Hi50. Diversamente, i gruppi Hi75 e Hi100 mostrano valori significativamente ($p<0.05$) più alti nell'espressione del gene *cnrl* rispetto agli altri gruppi (ad eccezione dei gruppi del Controllo e Hi75 che non mostrano differenze significative ($p>0.05$). Infine, per quanto riguarda il gene *lepa* (Fig.15c), nel gruppo Hi50 l'espressione del gene è significativamente ($p<0.05$) più bassa rispetto a Controllo e Hi100. Solo i gruppi del Controllo e Hi100 mostrano differenze significative ($p<0.05$) rispetto al gruppo Hi50. Negli adulti, l'espressione del gene *ghrl*, (Fig.15d) mostra valori significativamente più alti ($p<0.05$) dal gruppo Hi25 fino a Hi100 rispetto al Controllo, con la massima espressione nei gruppi Hi50 e Hi75. Il gene *cnr1* (Fig.15e) presenta valori significativamente più alti ($p<0.05$) nei gruppi Hi25, Hi50 e Hi75 rispetto a Controllo e Hi100. Infine, il gene *lepa* (Fig.15f), mostra valori significativamente più alti ($p<0.05$) nel gruppo Hi100 rispetto alle altre diete.

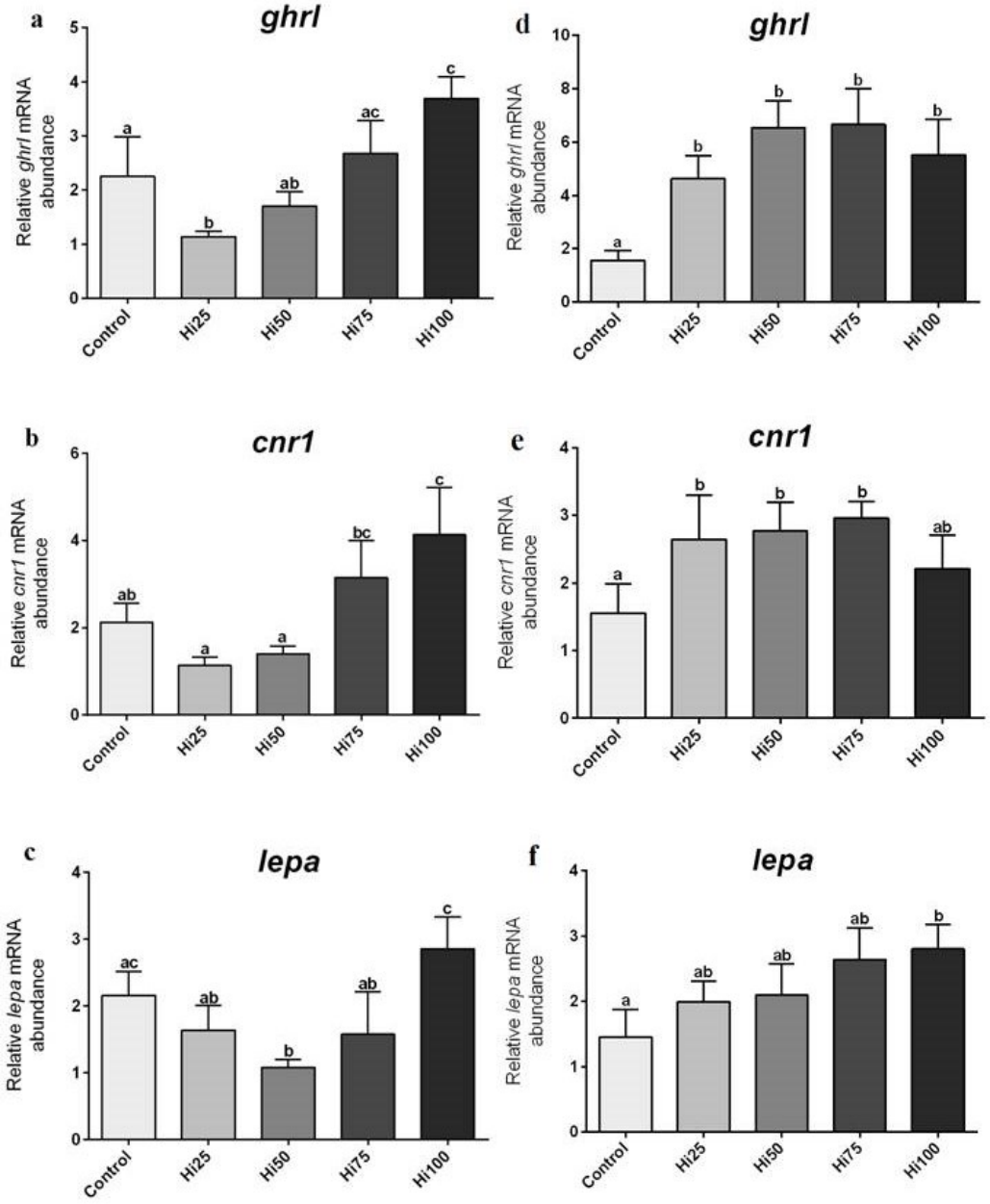

Figura 15. Espressione relativa ai livelli di mRNA nei geni coinvolti nell'appetito analizzati in zebrafish.(**a**) *ghrl*, (**b**) *cnr1*, (**c**) *lepa* nei giovanili; (**d**) *ghrl*, (**e**) *cnr1,* (**f**) *lepa* negli adulti. La dieta di Zebrafish include 0, 25, 50, 75 e 100% di HI (Controllo, Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100). Lettere diverse denotano differenze statisticamente significative tra i gruppi sperimentali ($p<0.05$). I valori sono rappresentati come media ± deviazione standard (n=5).

Risposta immunitaria. Considerando i geni coinvolti nell'espressione della risposta immunitaria (*il1b, il10 e tnf*a) (Fig.16a), le diete con un'alta inclusione di HI (Hi75 e Hi100) mostrano valori di espressione del gene significativamente ($p<0.05$) più alti rispetto ai gruppi del Controllo, Hi 25 e Hi75, mentre non si evidenziano differenze significative ($p<0.05$) tra i gruppi sperimentali (fatta eccezione del gene *il10* del gruppo Hi50 la cui espressione risulta essere significativa rispetto al controllo ($p>0.05$). Negli adulti, si evidenzia una crescita dell'espressione dei geni *il1b* e *il10* (Fig.16d ed e) all'aumentare dell'inclusione di HI a partire dal Controllo fino a Hi100. Hi100 mostra valori significativamente più alti ($p<0.05$) rispetto agli altri gruppi sperimentali. Per quanto riguarda il gene *tnfa*, non si evidenziano valori di espressione significativi ($p<0.05$) tra le diete sperimentali.

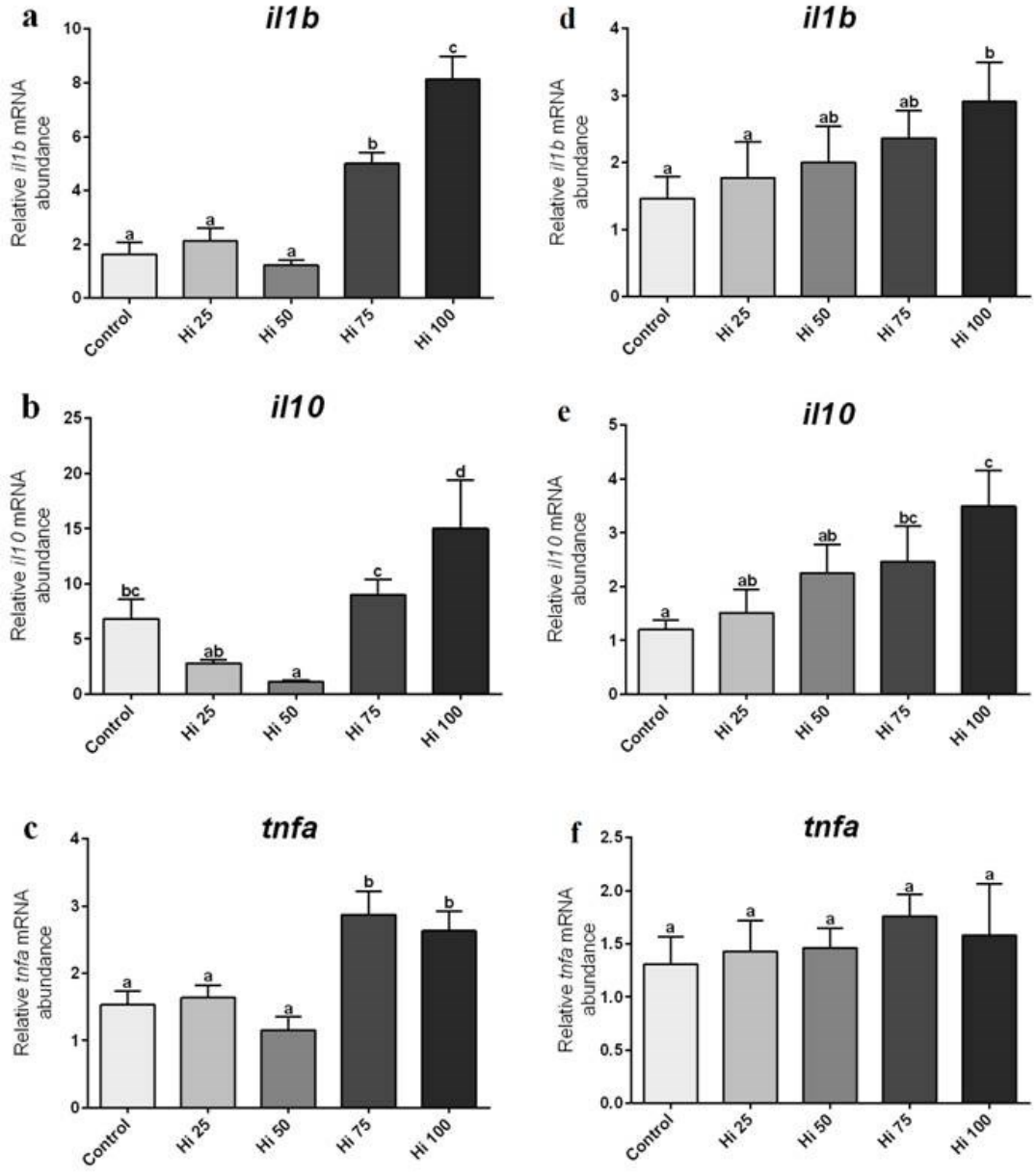

Figura 16. Espressione relativa ai livelli di mRNA nei geni coinvolti nella risposta immunitaria analizzati in zebrafish.(**a**) *il1b*, (**b**) *il10*, (**c**) *tnfa* nei giovanili; (**d**) *il1b*, (**e**) *il10,* (**f**) *tnfa* negli adulti. La dieta di Zebrafish include 0, 25, 50, 75 e 100% di HI (Controllo, Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100). Lettere diverse denotano differenze statisticamente significative tra i gruppi sperimentali ($p<0.05$). I valori sono rappresentati come media ± deviazione standard (n=5).

Chitinasi. Considerando i geni coinvolti nell'idrolisi enzimatica della chitina (*chia.2* e *chia.3*) nei giovanili (Fig.17a,b), si evidenzia una differenza significativa ($p<0.05$) nel gruppo Hi100 rispetto a Controllo, Hi25, Hi50 e Hi75. Negli adulti, il gene *chia.2* (Fig.17.c) mostra valori significativamente più alti ($p<0.05$), nei gruppi Hi75 e Hi100 rispetto a Controllo e Hi25. Il gene *chia.3* invece, mostra valori significativamente ($p<0.05$) più alti nei gruppi Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100 rispetto al Controllo.

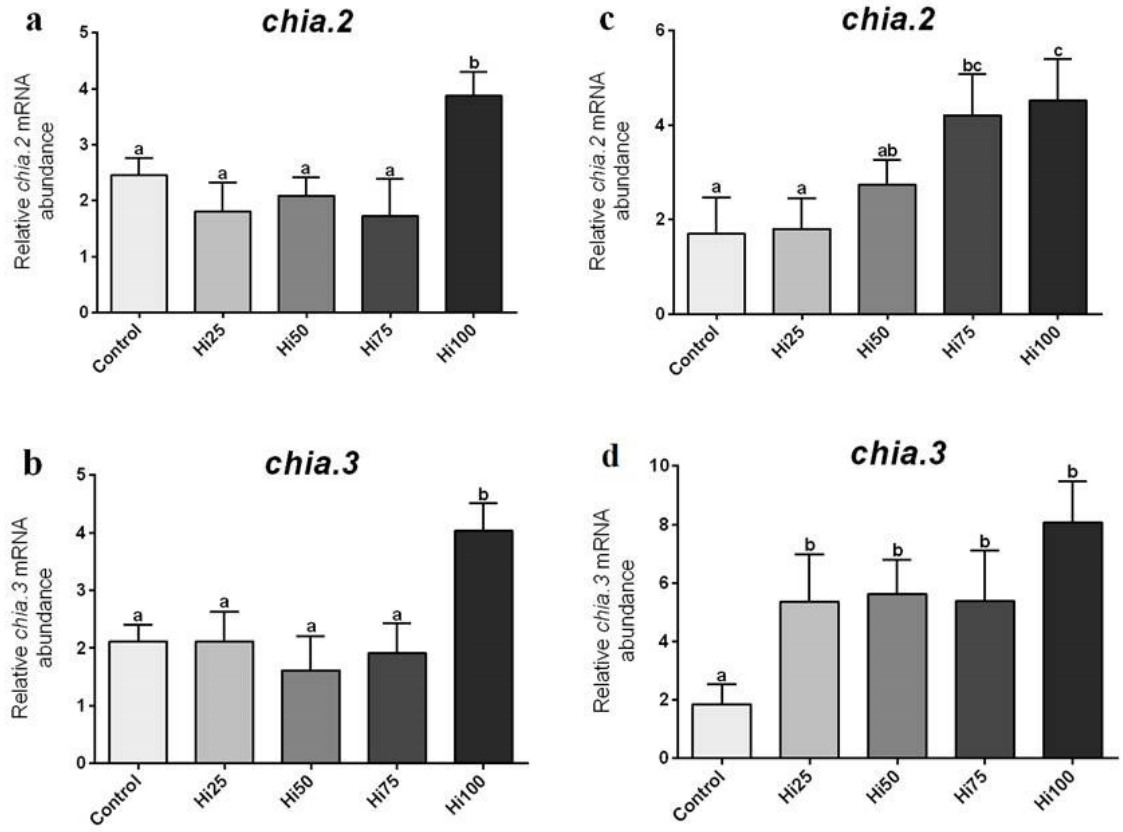

Figura 17.Espressione relativa ai livelli di mRNA nei geni coinvolti nell'idrolisi enzimatica della chitinasi analizzati in zebrafish.(**a**)*chia.2*, (**b**) *chia.3* nei giovanili; (**c**) *chia.2*, (**d**) *chia.3* negli adulti. La dieta di Zebrafish include 0, 25, 50, 75 e 100% di HI (Controllo, Hi25, Hi50, Hi75 e Hi100). Lettere diverse denotano differenze statisticamente significative tra i gruppi sperimentali ($p<0.05$). I valori sono rappresentati come media ± deviazione standard (n=5).

5. DISCUSSIONE

L'utilizzo di farine e oli di pesce, impiegati nella formulazione dei mangimi, non soddisfa i criteri di sostenibilità dell'acquacoltura. A tale proposito gli scienziati stanno cercando di individuare ingredienti alternativi, al fine di creare mangimi che garantiscano il corretto sviluppo e il benessere generale del prodotto ittico allevato ma anche di garantire il concetto di sostenibilità. Attualmente si stanno studiando gli insetti, tra cui *Hermetia illucens,* come ingredienti innovativi, ma ciò che limita il loro utilizzo nella formulazione dei mangimi è la presenza di chitina e un profilo sbilanciato in termini di acidi grassi (maggiore contenuto di acidi grassi saturi rispetto ai polinsaturi) (Barroso et al., 2017). Diversi studi hanno dimostrato che può essere incluso fino al 40% di HI nei mangimi senza registrare effetti avversi sulla salute dei pesci (Sánchez-Muros, Barroso, & Manzano-Agugliaro, 2014).

Gli insetti, generalmente, vengono allevati su scarti alimentari o sottoprodotti di rifiuti organici e, poiché il profilo lipidico degli insetti riflette il substrato di crescita sul quale vengono allevati, è possibile manipolare quest'ultimo al fine di incrementare, in particolare, il contenuto di acidi grassi polinsaturi (Cardinaletti et al., 2019; Sánchez-Muros et al., 2014; Sprangers et al., 2017).

A questo proposito, nel presente studio, il substrato selezionato per la crescita di *Hermetia illucens* (costituito da fondi di caffè) è stato arricchito con l'alga

Schizochytrium sp (10% W/W) come fonte di PUFAs. Studi precedenti sull'utilizzo di diete di HI testate su larve di zebrafish (Vargas et al., 2018; Zarantoniello et al., 2018), hanno mostrano buone performance di crescita all'aumentare dell'inclusione di HI. Tuttavia, una riduzione della crescita è stata registrata considerando una somministrazione della dieta a lungo termine (Zarantoniello et al., 2019; Zarantoniello et al., 2019). Nel presente studio si evidenzia una diminuzione dei parametri biometrici (lunghezza e peso) dei giovanili e degli adulti all'aumentare dell'inclusione di HI. Questo risultato è supportato dalle analisi molecolari effettuate sui fattori di crescita *igf1 e igf2*, ed è in linea con diversi studi che riportano una riduzione della crescita e del benessere dei pesci alimentati con diete a base di insetto per lunghi periodi di tempo e con alte percentuali di inclusione (Laura Gasco et al., 2016; Kroeckel et al., 2012; Sánchez-Muros et al., 2014).

Le diete a base di HI impiegate nel presente studio, mostrano un contenuto di SFA maggiore e un contenuto di PUFA minore rispetto al Controllo. Nello specifico, considerando il profilo di PUFAs delle diete, escludendo il Controllo, si osserva però un aumento del contenuto di questi acidi grassi all'aumentare dell'inclusione di HI. Questo evidenzia una corretta procedura di arricchimento. Il profilo lipidico degli zebrafish giovanili e degli zebrafish adulti riflette quello delle diete, ma è evidente una riduzione delle differenze

tra le diverse classi di acidi grassi. Zebrafish, essendo un pesce di acqua dolce è in grado di sintetizzare acidi grassi polinsaturi a lunga catena a partire da precursori a catena più corta, sfruttando un pathway di sintesi che comprende enzimi come elongasi e desaturasi (Tocher, 2010). Tuttavia, queste conversioni biochimiche necessitano di energia e questo potrebbe spiegare il ritardo nella crescita osservato sia nei giovanili che negli adulti alimentati con diete contenenti percentuali crescenti di HI.

Per quanto riguarda i markers molecolari coinvolti nell'appetito (*ghrl, cnr1*), si evidenzia un aumento dell'espressione genica all'aumentare dell'inclusione di HI nelle diete sperimentali. Tale condizione si riscontra sia negli zebrafish giovanili che negli zebrafish adulti.

Tuttavia, l'espressione della leptina mostra un andamento analogo e opposto a quanto atteso. La leptina è il principale segnale anoressigenico e agisce in maniera antagonista ai segnali oressizzanti come la grelina. Una possibile spiegazione potrebbe risiedere nel maggiore contenuto di grasso periviscerale osservato, soprattutto, nei pesci alimentati con le diete contenenti le più alte inclusioni di HI. Il tessuto adiposo è, infatti, il sito principale di produzione di leptina (Chisada et al., 2014; Park & Ahima, 2015; Li et al., 2016). Un'altra spiegazione potrebbe essere collegata all'interconnessione esistente tra livelli di leptina ed espressione di citochine pro-infiammatorie (Carlton et al., 2012;

Lafrance et al., 2010). La leptina, infatti, è in grado di aumentare la produzione delle citochine pro-infiammatorie, allo stesso modo anche le citochine possono aumentare la richiesta di leptina, (Carlton et al., 2012).

Nonostante la maggiore espressione di citochine infiammatorie nei gruppi alimentati con inclusioni più alte di HI (condizione che si riscontra sia negli zebrafish giovanili che negli zebrafish adulti), non si osservano segni di infiammazione nell'intestino in tutti i gruppi sperimentali analizzati. Questo risultato è in linea con altri studi condotti su zebrafish (Vargas et al., 2018; Zarantoniello, Randazzo, et al., 2019; Zarantoniello, Zimbelli, et al., 2019)

ed è supportato dal contenuto di chitina delle diete sperimentali che risulta avere effetti benefici sul tratto intestinale (Esteban, Mulero, Cuesta, Ortuño, & Meseguer, 2000; Gasco, Finke, & van Huis, 2018; Gopalakannan & Arul, 2006; Harikrishnan, Kim, Balasundaram, & Heo, 2012; Ringø et al., 2012; Zhang et al., 2012), oppure dalle proprietà anti-infiammatorie e antibatteriche degli acidi grassi a media catena (in particolare dell'acido laurico) che sono risultate particolarmente abbondanti nelle diete a base di HI utilizzate in questo studio (Cardinaletti et al., 2019; Feng et al., 2018; Liland et al., 2017).

Contrariamente a quanto osservato nell'intestino, il fegato mostra delle differenze tra i gruppi sperimentali. In particolare, sia nella fase giovanile che nella fase adulta, i gruppi alimentati con le maggiori inclusioni di HI

mostrano una condizione di steatosi epatica, riconducile al profilo sbilanciato di acidi grassi caratteristico delle diete sperimentali. Come dimostrato da diversi studi, un alto apporto di SFA nella dieta, accoppiato ad un alto rapporto n6/n3 porta ad una condizione di steatosi epatica nei pesci alimentati con diete a base di HI (Di Minno et al., 2012; Leamy, Egnatchik, & Young, 2013; Wang, Wei, & Pagliassotti, 2006). Questa condizione patologica potrebbe, inoltre, essere la causa della maggiore espressione genica dei markers dello stress nei pesci alimentati con maggiore inclusione di HI.

6. CONCLUSIONI

Il presente studio ha dimostrato l'efficacia dell'aggiunta del 10% (W/W) di *Schizochytrium sp*. al substrato di crescita di HI come modalità di arricchimento in PUFAs della biomassa di insetti. Tale arricchimento ha permesso di utilizzare il 50% di inclusione di *Hermetia illucens* nella dieta dei pesci senza indurre effetti negativi sulla salute e sul benessere dei pesci allevati. Alte inclusioni di HI (Hi75 e Hi100) nella dieta inducono, invece, una condizione di steatosi epatica e una maggiore espressione dei markers infiammatori e dello stress. Questo approccio innovativo rappresenta un interessante esempio di come, nel lungo termine, il concetto di economia circolare applicata al settore dell'acquacoltura, possa sostenere il benessere del prodotto allevato ed incoraggiare criteri di sostenibilità.

7. RINGRAZIAMENTI

Questo lavoro di tesi è parte del progetto NUTRIFISH, finanziato da Ricerca scientifica 2017 Cariverona, progetto n°2017.0571.

Ringrazio il Prof. Olivotto per avermi permesso di prendere parte al progetto, per avermi fatto appassionare alla sua materia e per la passione che trasmette nell'insegnarla.

Grazie a Basilio per avermi insegnato le tecniche di istologia, per le lezioni di anatomia e per i campionamenti divertenti.

Ringrazio Matteo per la disponibilità, per la pazienza e per il supporto durante tutto questo anno.

Grazie a Martina, compagna di tesi e di cantate in stabulario.

Ringrazio la Prof. Cristina Truzzi e il Dott. Matteo Antonucci per le analisi gas-cromatografiche.

Ringrazio la Prof. Francesca Tulli e la Dott. Gloriana Cardinaletti per la produzione delle diete. Ringrazio la Prof. Paola Riolo e il Dott. Nino Loreto per aver allevato *Hermetia illucens.*

E, infine, ringrazio i compagni di laboratorio con i quali ho condiviso questo percorso.

Grazie,

Giorgia

8. BIBLIOGRAFIA

Barragan-Fonseca, K. B., Dicke, M., & van Loon, J. J. A. (2017). Nutritional value of the black soldier fly (Hermetia illucens L.) and its suitability as animal feed - a review. *Journal of Insects as Food and Feed*, *3*(2), 105–120. https://doi.org/10.3920/JIFF2016.0055

Barragan-Fonseca, Karol B., Dicke, M., & van Loon, J. J. A. (2018). Influence of larval density and dietary nutrient concentration on performance, body protein, and fat contents of black soldier fly larvae (Hermetia illucens). *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *166*(9), 761–770. https://doi.org/10.1111/eea.12716

Barroso, F. G., Sánchez-Muros, M. J., Segura, M., Morote, E., Torres, A., Ramos, R., & Guil, J. L. (2017). Insects as food: Enrichment of larvae of Hermetia illucens with omega 3 fatty acids by means of dietary modifications. *Journal of Food Composition and Analysis*, *62*(October), 8–13. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.04.008

Brown, J. (2007). Fishmeal and fish oil. Will they limit the development of aquaculture? *Feed Technology Update*, *2*(1).

Canonico, L, S Ashoor, M Taccari, F Comitini, M Antonucci, and C Truzzi. 2016. "Conversion of Raw Glycerol to Microbial Lipids by New Metschnikowia and Yarrowia Lipolytica Strains." *Annals of Microbiology,* 1409-18. https://doi.org/10.1007/s13213-016-1228-0.

Cardinaletti, G., Randazzo, B., Messina, M., Zarantoniello, M., Giorgini, E., Zimbelli, A., … Tulli, F. (2019). Effects of graded dietary inclusion level of full-fat hermetia illucens prepupae meal in practical diets for rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *Animals*, *9*(5), 1–21. https://doi.org/10.3390/ani9050251

Carlton, E. D., Demas, G. E., & French, S. S. (2012). Leptin, a neuroendocrine mediator of immune responses, inflammation, and sickness behaviors. *Hormones and Behavior*, *62*(3), 272–279. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.04.010

Chisada, S., Kurokawa, T., Murashita, K., Rønnestad, I., & Taniguchi, Y. (2014). *Author ' s personal copy General and Comparative Endocrinology chronical up-regulated levels of orexigenic neuropeptides , elevated food intake and stage specific effects on growth and fat allocation*. *195*, 9–20.

Danulat, E. (1986). The effects of various diets on chitinase and ß-glucosidase activities and the condition of cod, Gadus morhua (L.). *Journal of Fish Biology*, *28*(2), 191–197. https://doi.org/10.1111/j.1095-

8649.1986.tb05157.x
Delbertmiii, G., Frederict, B., Paul, B., Konrad, D., Tgibson, G., Ronaldw, H., … Richard, N. (2007). Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture Research*, *38*(6), 551–579.
Di Minno, M. N. D., Russolillo, A., Lupoli, R., Ambrosino, P., Di Minno, A., & Tarantino, G. (2012). Omega-3 fatty acids for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*. https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i41.5839
Diener, S., Zurbrügg, C., & Tockner, K. (2009). Conversion of organic material by black soldier fly larvae: Establishing optimal feeding rates. *Waste Management and Research*, *27*(6), 603–610. https://doi.org/10.1177/0734242X09103838
Diener, S., Zurbrugg, C., Gutierez, F. R., Nguyen, D. H., Morel, A., Kootatep, T., Tockner, K. (2011). Black soldier fly larvae for organic waste treatment-prospect and constrain.
Esteban, M. A., Mulero, V., Cuesta, A., Ortuño, J., & Meseguer, J. (2000). Effects of injecting chitin particles on the innate immune response of gilthead seabream (Sparus aurata L.). *Fish and Shellfish Immunology*, *10*(6), 543–554. https://doi.org/10.1006/fsim.2000.0271
FAO 2016. *The State of World Fisheries and Aquaculture-Contributing to Food Security and Nutrition for All.*
Folch, J, M Lees and G H Sloane Stanley. 1957. "A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipidies from Animal Tissues".
Feng, W., Qian, L., Wang, W., Wang, T., Deng, Z., Yang, F., … Wang, C. (2018). Exploring the potential of lipids from black soldier fly: New paradigm for biodiesel production (II)—Extraction kinetics and thermodynamic. *Renewable Energy*. https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.11.076
García-Castillo, J., Chaves-Pozo, E., Olivares, P., Pelegrin, P., Meseguer, J., & Mulero, V. (2004). The tumor necrosis factor α of the bony fish seabream exhibits the in vivo proinflammatory and proliferative activities of its mammalian counterparts, yet it functions in a species-specific manner. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *61*(11), 1331–1340. https://doi.org/10.1007/s00018-004-4068-1
Gasco, L., Finke, M., & van Huis, A. (2018). Can diets containing insects promote animal health? *Journal of Insects as Food and Feed*, *4*(1), 1–4. https://doi.org/10.3920/JIFF2018.x001
Gasco, Laura, Henry, M., Piccolo, G., Marono, S., Gai, F., Renna, M., … Chatzifotis, S. (2016). Tenebrio molitor meal in diets for European sea bass (Dicentrarchus labrax L.) juveniles: Growth performance, whole

body composition and in vivo apparent digestibility. *Animal Feed Science and Technology*. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.07.003

Gopalakannan, A., & Arul, V. (2006). Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of Cyprinus carpio and control of Aeromonas hydrophila infection in ponds. *Aquaculture*, *255*(1–4), 179–187. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.01.012

Güler, M., & Yildiz, M. (2011). Effects of dietary fish oil replacement by cottonseed oil on growth performance and fatty acid composition of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, *35*(3), 157–167. https://doi.org/10.3906/vet-1002-252

Harikrishnan, R., Kim, J. S., Balasundaram, C., & Heo, M. S. (2012). Dietary supplementation with chitin and chitosan on haematology and innate immune response in Epinephelus bruneus against Philasterides dicentrarchi. *Experimental Parasitology*, *131*(1), 116–124. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.03.020

Iwama, G. K., Vijayan, M. M., Forsyth, R. B., & Ackerman, P. A. (1999). Heat shock proteins and physiological stress in fish. *American Zoologist*, *39*(6), 901–909. https://doi.org/10.1093/icb/39.6.901

Kim, W., Bae, S., Kim, A., Park, K., Lee, S., Choi, Y., Han, S., Park, Y. and Koh, Y., 2011. Characterization of the molecular features and expression patterns of two serine proteases in Hermetia illucens (Diptera: Stratiomyidae) larvae. BMB Reports 44: 387.

Kelemu, S., Niassy, S., Torto, B., Fiaboe, K., Affognon, H., Tonnang, H., … Ekesi, S. (2015). African edible insects for food and feed: Inventory, diversity, commonalities and contribution to food security. *Journal of Insects as Food and Feed*, *1*(2), 103–119. https://doi.org/10.3920/JIFF2014.0016

Kroeckel, S., Harjes, A. G. E., Roth, I., Katz, H., Wuertz, S., Susenbeth, A., & Schulz, C. (2012). When a turbot catches a fly: Evaluation of a pre-pupae meal of the Black Soldier Fly (Hermetia illucens) as fish meal substitute - Growth performance and chitin degradation in juvenile turbot (Psetta maxima). *Aquaculture*. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.08.041

Lafrance, V., Inoue, W., Kan, B., & Luheshi, G. N. (2010). Leptin modulates cell morphology and cytokine release in microglia. *Brain, Behavior, and Immunity*, *24*(3), 358–365. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.11.003

Lawrence, C., Adatto, I., Best, J., James, A., & Maloney, K. (2012). Generation time of zebrafish (Danio rerio) and medakas (Oryzias latipes) housed in the same aquaculture facility. *Lab Animal*, *41*(6), 158–165.

https://doi.org/10.1038/laban0612-158
Leamy, A. K., Egnatchik, R. A., & Young, J. D. (2013). Molecular mechanisms and the role of saturated fatty acids in the progression of non-alcoholic fatty liver disease. *Progress in Lipid Research*. https://doi.org/10.1016/j.plipres.2012.10.004
Li, A., Yuan, X., Liang, X. F., Liu, L., Li, J., Li, B., … Tao, Y. X. (2016). Adaptations of lipid metabolism and food intake in response to low and high fat diets in juvenile grass carp (Ctenopharyngodon idellus). *Aquaculture*, *457*, 43–49. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.01.014
Liland, N. S., Biancarosa, I., Araujo, P., Biemans, D., Bruckner, C. G., Waagbø, R., … Lock, E. J. (2017). Modulation of nutrient composition of black soldier fly (Hermetia illucens) larvae by feeding seaweed-enriched media. *PLoS ONE*. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183188
May, B., 1961. The occurrence in New Zealand and the life-history of the soldier fly Hermetia illucens (L.)(Diptera: Stratiomyidae). New Zealand Journal Science 4: 55-65.
Makkar, H. P. S., Tran, G., Heuzé, V., & Ankers, P. (2014a). State-of-the-art on use of insects as animal feed. *Animal Feed Science and Technology*, *197*, 1–33. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.07.008
Makkar, H. P. S., Tran, G., Heuzé, V., & Ankers, P. (2014b). State-of-the-art on use of insects as animal feed. *Animal Feed Science and Technology*, *197*, 1–33. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.07.008
Merzendorfer, H., & Zimoch, L. (2003). Chitin metabolism in insects: Structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *Journal of Experimental Biology*, *206*(24), 4393–4412. https://doi.org/10.1242/jeb.00709
Moriyama S, A. F. G. . K. H. (2000). Growth regulation by IGF in fish.pdf. *Bioscience, Biotechnology Biochemical*, Vol. 64, pp. 1553–1562.
Müller, A., Wolf, D., & Gutzeit, H. O. (2017). The black soldier fly, Hermetia illucens - A promising source for sustainable production of proteins, lipids and bioactive substances. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, *72*(9–10), 351–363. https://doi.org/10.1515/znc-2017-0030
Mussatto, S. I., Machado, E. M. S., Martins, S., & Teixeira, J. A. (2011). Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues. *Food and Bioprocess Technology*, *4*(5), 661–672. https://doi.org/10.1007/s11947-011-0565-z
Nandeesha, M. C., Gangadhar, B., Varghese, T. J., & Keshavanath, P. (1998). Effect of feeding Spirulina platensis on the growth, proximate

composition and organoleptic quality of common carp, Cyprinus carpio L. *Aquaculture Research*, *29*(5), 305–312. https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1998.00163.x

Olivotto, I., Yasumasu, S., Gioacchini, G., Maradonna, F., Cionna, C., & Carnevali, O. (2004). Cloning and expression of high choriolytic enzyme, a component of the hatching enzyme system, during embryonic development of the marine ornamental fish Chrysiptera parasema. *Marine Biology*, *145*(6), 1235–1241. https://doi.org/10.1007/s00227-004-1404-9

Olvera-Novoa, M. A., Olivera-Castillo, L., & Martínez-Palacios, C. A. (2002). Sunflower seed meal as a protein source in diets for Tilapia rendalli (Boulanger, 1896) fingerlings. *Aquaculture Research*, *33*(3), 223–229. https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2002.00666.x

Park, H. K., & Ahima, R. S. (2015). Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism. *Metabolism: Clinical and Experimental*, *64*(1), 24–34. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.08.004

Piccinetti, C. C., Migliarini, B., Olivotto, I., Simoniello, M. P., Giorgini, E., & Carnevali, O. (2013). Melatonin and peripheral circuitries: Insights on appetite and metabolism in danio rerio. *Zebrafish*, *10*(3), 275–282. https://doi.org/10.1089/zeb.2012.0844

Piccinetti, C. C., Montis, C., Bonini, M., Laurà, R., Guerrera, M. C., Radaelli, G., … Olivotto, I. (2014). Transfer of silica-coated magnetic (Fe3O4) nanoparticles through food: A molecular and morphological study in zebrafish. *Zebrafish*, *11*(6), 567–579. https://doi.org/10.1089/zeb.2014.1037

Ringø, E., Zhou, Z., Olsen, R. E., & Song, S. K. (2012). Use of chitin and krill in aquaculture - the effect on gut microbiota and the immune system: A review. *Aquaculture Nutrition*, *18*(2), 117–131. https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2011.00919.x

Salze, G., McLean, E., Battle, P. R., Schwarz, M. H., & Craig, S. R. (2010). Use of soy protein concentrate and novel ingredients in the total elimination of fish meal and fish oil in diets for juvenile cobia, Rachycentron canadum. *Aquaculture*, *298*(3–4), 294–299. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.11.003

Sánchez-Muros, M. J., Barroso, F. G., & Manzano-Agugliaro, F. (2014). Insect meal as renewable source of food for animal feeding: A review. *Journal of Cleaner Production*, *65*, 16–27. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.11.068

Sargent, J. R., & Tacon, A. G. J. (1999). Development of farmed fish: a nutritionally necessary alternative to meat Stagnating fisheries

production: expanding aquaculture. *Proceedings of the Nutrition Society*, *58*, 377–383. Retrieved from http://www.aquahana.com/wp-content/uploads/2015/08/Sargent-Tacon-.pdf

Schreck, C. B. (2010). Stress and fish reproduction: The roles of allostasis and hormesis. *General and Comparative Endocrinology*, *165*(3), 549–556. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.07.004

Science, V., Extension, T. C., Science, D., Fish, H., & Experimental, C. (2007). *Fish Offal Recycling by the Black Soldier Fly Produces a Foodstuff High in Omega-3 Fatty Acids*. *38*(2), 309–313.

Seth, A., Stemple, D. L., & Barroso, I. (2013). The emerging use of zebrafish to model metabolic disease. *DMM Disease Models and Mechanisms*, *6*(5), 1080–1088. https://doi.org/10.1242/dmm.011346

Sprangers, T., Ottoboni, M., Klootwijk, C., Ovyn, A., Deboosere, S., Meulenaer, B. De, … Smet, S. De. (2017). Nutritional composition of black soldier fly (. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, (97), 2594–2600. https://doi.org/10.1002/jsfa.8081

Subasinghe, R., Soto, D., & Jia, J. (2009). Global aquaculture and its role in sustainable development. *Reviews in Aquaculture*, *1*(1), 2–9. https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2008.01002.x

Tacon, A. G. J., Hasan, M. R., & Subasinghe, R. P. (2006). *Use of Fishery Resources As Feed Inputs To Aquaculture Development : Trends and Policy Implications*. *1018*(1018).

Tacon, A. G. J., & Metian, M. (2008). Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture*, *285*(1–4), 146–158. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.08.015

Tocher, D. R. (2010). Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquaculture Research*, *41*(5), 717–732. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02150.x

Truzzi, C., Illuminati, S., Annibaldi, A., Antonucci, M., & Scarponi, G. (2017). Quantification of fatty acids in the muscle of Antarctic fish Trematomus bernacchii by gas chromatography-mass spectrometry: Optimization of the analytical methodology. *Chemosphere*, *173*, 116–123. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.140

Truzzi, C., Illuminati, S., Antonucci, M., Scarponi, G., & Annibaldi, A. (2018). Heat shock influences the fatty acid composition of the muscle of the Antarctic fish Trematomus bernacchii. *Marine Environmental Research*, *139*, 122–128. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.03.017

Unniappan, S., & Peter, R. E. (2005). Structure, distribution and physiological functions of ghrelin in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology -*

A Molecular and Integrative Physiology, *140*(4), 396–408. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.02.011

Van Huis, A., 2013. Potential of insects as food and feed in assuring food security. Annu. Rev. Entomol. 58, 563–583. https://doi.org/10.1146/annurev- ento-120811-15370

Vargas, A., Randazzo, B., Riolo, P., Truzzi, C., Gioacchini, G., Giorgini, E., … Olivotto, I. (2018). Rearing Zebrafish on Black Soldier Fly (Hermetia illucens): Biometric, Histological, Spectroscopic, Biochemical, and Molecular Implications. *Zebrafish*, *15*(4), 404–419. https://doi.org/10.1089/zeb.2017.1559

Vizcaíno, A. J., López, G., Sáez, M. I., Jiménez, J. A., Barros, A., Hidalgo, L., … Alarcón, F. J. (2014). Effects of the microalga Scenedesmus almeriensis as fishmeal alternative in diets for gilthead sea bream, Sparus aurata, juveniles. *Aquaculture*, *431*(July 2014), 34–43. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.010

Wang, D., Wei, Y., & Pagliassotti, M. J. (2006). Saturated fatty acids promote endoplasmic reticulum stress and liver injury in rats with hepatic steatosis. *Endocrinology*. https://doi.org/10.1210/en.2005-0570

Zarantoniello, M., Bruni, L., Randazzo, B., Vargas, A., Gioacchini, G., Truzzi, C., … Olivotto, I. (2018). Partial Dietary Inclusion of Hermetia illucens (Black Soldier Fly) Full-Fat Prepupae in Zebrafish Feed: Biometric, Histological, Biochemical, and Molecular Implications. *Zebrafish*, *15*(5), 519–532. https://doi.org/10.1089/zeb.2018.1596

Zarantoniello, M., Randazzo, B., Truzzi, C., Giorgini, E., Marcellucci, C., Vargas-Abúndez, J. A., … Olivotto, I. (2019). A six-months study on Black Soldier Fly (Hermetia illucens) based diets in zebrafish. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–12. https://doi.org/10.1038/s41598-019-45172-5

Zarantoniello, M., Zimbelli, A., Randazzo, B., Compagni, M. D., Truzzi, C., Antonucci, M., … Olivotto, I. (2019). Black Soldier Fly (Hermetia illucens) reared on roasted coffee by-product and Schizochytrium sp. as a sustainable terrestrial ingredient for aquafeeds production. *Aquaculture*, (July), 734659. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734659

Zhang, Y., Feng, S., Chen, J., Qin, C., Lin, H., & Li, W. (2012). Stimulatory effects of chitinase on growth and immune defense of orange-spotted grouper (Epinephelus coioides). *Fish and Shellfish Immunology*, *32*(5), 844–854. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.02.009