



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

**FARINE DI INSETTO: NUOVI INGREDIENTI
PER LA PRODUZIONE DI LIEVITATI CON
CARATTERISTICHE NUTRIZIONALI
MIGLIORATE E/O FUNZIONALI**

**INSECT POWDERS: NOVEL INGREDIENTS
FOR THE MANUFACTURING OF LEAVENED
BAKERY PRODUCTS WITH IMPROVED
NUTRITIONAL AND/OR FUNCTIONAL
TRAITS**

TIPO TESI: SPERIMENTALE

Studente:
MANUEL MANGIATERRA

Relatore:
PROF.SSA LUCIA AQUILANTI

Correlatore:
DOTT.SSA FEDERICA CARDINALI

ANNO ACCADEMICO 2019-2020



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

FARINE DI INSETTO: NUOVI INGREDIENTI
PER LA PRODUZIONE DI LIEVITATI CON
CARATTERISTICHE NUTRIZIONALI
MIGLIORATE E/O FUNZIONALI

INSECT POWDERS: NOVEL INGREDIENTS FOR
THE MANUFACTURING OF LEAVENED
BAKERY PRODUCTS WITH IMPROVED
NUTRITIONAL AND/OR FUNCTIONAL TRAITS

TIPO TESI: SPERIMENTALE

Studente:
MANUEL MANGIATERRA

Relatore:
PROF.SSA LUCIA AQUILANTI

Correlatore:
DOTT.SSA FEDERICA CARDINALI

ANNO ACCADEMICO 2019-2020

INDICE

ELENCO DELLE TABELLE.....	5
ELENCO DELLE FIGURE	6
ACRONIMI E ABBREVIAZIONI	7
1. INTRODUZIONE	8
1.1. INSETTI EDIBILI: NUOVA FRONTIERA PER LA NUTRIZIONE UMANA IN OCCIDENTE.....	8
1.2. POLVERI DI INSETTI: NUOVI INGREDIENTI PER LA PRODUZIONE DI LIEVITATI.....	10
1.2.1. Industria panificatoria in Europa e in Italia	10
1.2.2. Principali caratteristiche nutrizionali e / o funzionali dei lievitati	11
1.2.3. Dati recenti sull'utilizzo di polveri di insetti per la produzione di lievitati	13
1.3. ASPETTI INERENTI LA SICUREZZA DEGLI ALIMENTI A BASE DI INSETTI: CONTAMINANTI CHIMICI	15
1.3.1. Micotossine.....	15
1.3.2. Metalli pesanti.....	17
1.4. ALLERGENI.....	18
1.5. RISCHIO MICROBIOLOGICO: PATOGENI E SPORIGENI.....	20
1.6. TRATTAMENTI E APPLICAZIONI RELATIVI AGLI INSETTI EDIBILI.....	22
1.6.1. Sonicazione.....	23
2. SCOPO DELLA TESI.....	25
3. MATERIALI E METODI	26
3.1. Campionamento.....	26
3.2. Preparazione dei campioni di farina di insetto e sonicazione	26
3.3. Allestimento diluizioni scalari decimali	27
3.4. Allestimento conte vitali in piastra	28
3.4.1. Determinazione mesofili aerobi.....	28
3.4.2. Determinazione batteri sporigeni.....	29
3.5. Utilizzo delle farine di insetto per la produzione di lievitati fortificati	30

3.5.1. Panificazione.....	30
3.5.2. Analisi microbiologiche dei pani	34
3.6. Analisi statistica.....	34
4. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	35
5. CONCLUSIONI	38
BIBLIOGRAFIA	39

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1. Composizione del terreno di crescita PCA (Plate Count Agar).	29
Tabella 2. Conte vitali in piastra di mesofili aerobi totali e batteri sporigeni su farina ottenuta da larve essiccate di <i>T. molitor</i> L.	35
Tabella 3. Conte vitali in piastra di mesofili aerobi totali e batteri sporigeni su farina ottenuta da larve essiccate di <i>A. diaperinus</i>	36
Tabella 4. Conte vitali di batteri sporigeni in pane di controllo (PC), pane prodotto con farina ottenuta da larve essiccate di <i>T. molitor</i> L. (PTm) e pane prodotto con farina ottenuta da larve essiccate di <i>A. diaperinus</i> (PAd).	37

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1. Piastra Petri usata per rilevare batteri sporigeni nella farina di T. molitor. Diluizione -2.	22
Figura 2. Stomacher 400 circulator.....	27
Figura 3. Diluizioni scalari decimali per conta vitale.	28
Figura 4. Piastra Petri utilizzata per il rilevamento di batteri sporigeni. Diluizione -1.....	30
Figura 5. Piastra Petri utilizzata per il rilevamento di batteri sporigeni. Diluizione -2.....	30
Figura 6. Ciabattine siciliane.	31
Figura 7. Diagramma di flusso della produzione di impasto acido di tipo I.	31
Figura 8. Diagramma di flusso del processo di panificazione.	32
Figura 9. Pane di controllo.....	33
Figura 10. Pane prodotto con farina di insetti.....	34

ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

DPR	Decreto del Presidente della Repubblica.
UE	Unione Europea.
CE	Comunità Europea.
ALARA	As Low As Reasonably Achievable.
ZEA	Zearalenone.
AfB1	Aflatossina B1.
FB ₁	Fumonisina B1.
FAO	Food Agriculture Organization.
OMS	Organizzazione Mondiale della Sanità.
HDM	House dust mite.
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Points.
LAB	Lactic Acid Bacteria.
UV	Raggi ultravioletti.
UFC	Unità formanti Colonia.
SEE	Sterile semolina extract.
PCA	Plate Count Agar.
mMRS	Man – Rogosa – Sharpe modificato.

1. INTRODUZIONE

1.1 INSETTI EDIBILI: NUOVA FRONTIERA PER LA NUTRIZIONE UMANA IN OCCIDENTE

La popolazione mondiale sta crescendo rapidamente e si prevede che raggiungerà 9–10 miliardi di individui entro il 2050; nutrire una popolazione in crescita, con consumatori sempre più esigenti, richiederà necessariamente un aumento della produzione alimentare, determinando inevitabilmente una forte pressione su risorse già limitate come terreno, acqua ed energia.

Attualmente, circa il 70% del territorio agricolo mondiale è sfruttato per l'allevamento di bestiame (FAO, 2006). Gli allevamenti su larga scala sono economicamente vantaggiosi a breve termine, grazie all'elevata produttività, ma nel lungo periodo determinano degli effetti negativi dovuti all'enorme impatto ambientale legato alla produzione di gas ad effetto serra, stimata attorno al 14% delle emissioni globali (FAO, 2006). La crescente attenzione della società civile nei confronti delle problematiche ambientali e l'aumento di consapevolezza sui rischi legati al cambiamento climatico hanno spinto, nell'ultimo decennio, molti ricercatori alla valutazione di fonti alimentari alternative. In questo contesto, l'opportunità di soddisfare la crescente domanda di alimenti ricchi in proteine alternativi alla carne attraverso l'allevamento di insetti è di grande attualità, in quanto questo richiede lo sfruttamento di una minore estensione di terreno agricolo per produrre un'unità di proteina e si caratterizza per una produzione di gas ad effetto serra estremamente ridotta (Mwangi *et al.*, 2018). Uno studio condotto da Oonincx & de Boer (2012) ha dimostrato che per produrre un kg di proteine a partire da camole della farina è necessario esclusivamente il 10% del terreno agricolo che sarebbe richiesto per la produzione di pari quantità di proteine da fonti animali tradizionali.

L'entomofagia, il regime alimentare che prevede l'assunzione di insetti come alimento, particolarmente diffusa in Africa e Asia orientale, mostra dunque aspetti vantaggiosi legati alla natura stessa degli insetti, non solo correlati all'abbattimento dell'emissione di gas serra e del consumo di acqua rispetto all'allevamento tradizionale, ma anche all'elevata efficienza di conversione del mangime in massa corporea (espressa come kg di mangime per kg di peso) e

al limitato rischio di trasmissione di zoonosi (malattie infettive che possono essere trasmesse dagli animali all'uomo). Inoltre, l'allevamento degli insetti, oltre ad offrire minori problematiche in termini di benessere animale, permette lo sfruttamento di scarti e sottoprodotti dell'industria agro-alimentare come substrato di crescita, contribuendo così alla riduzione degli sprechi e alla valorizzazione economica di tali residui (Collins *et al.*, 2019).

Oltre all'importanza degli aspetti di sostenibilità ambientale, aspetto ancor più importante che rende gli insetti una fonte alimentare estremamente accattivante ed interessante riguarda il loro valore nutrizionale. Gli insetti, infatti, mostrano una ricca composizione di aminoacidi e un interessante contenuto di minerali, vitamine e acidi grassi polinsaturi. In particolare, l'elevato contenuto di ferro, vitamina A e zinco degli insetti rappresenta un'importante possibilità per fronteggiare la diffusa carenza di micronutrienti nei paesi meno avanzati (Collins *et al.*, 2019). Inoltre, la crescente attenzione nei confronti di un'alimentazione sempre più equilibrata e bilanciata, nonché problemi di natura etica legati a particolari dettami religiosi o a particolari stili alimentari come vegetarianismo e veganismo, spingono ancor più verso la diffusione degli insetti come fonte proteica alternativa a quella animale.

Nonostante questi vantaggi, l'accettazione da parte dei consumatori rimane uno dei maggiori ostacoli all'utilizzo degli insetti come fonte proteica in molti paesi occidentali, sebbene molti insetti siano esteticamente simili ad aragoste, gamberi, granchi e molluschi.

In gran parte dell'Asia orientale è molto comune trovare *street food*¹ a base di scorpioni arrostiti o ragni fritti, o ancora locuste, grilli e bachi stufati, arrostiti o fritti, serviti con salse speziate. In diverse parti dell'Africa sono molto apprezzate le termiti e i bruchi, così come le farfalle fritte in pastella in Madagascar (Agea *et al.*, 2008; Hartmann *et al.*, 2015).

In occidente il consumo di insetti interi è estremamente più limitato e meno diffuso, seppur sia possibile acquistare ad esempio hamburger di farina di vermi in Olanda, frappè di grilli in una catena di fast food americana o snack a base di insetti in noti supermercati europei.

In Europa sono ancora rare le realtà che offrono questo tipo di alimenti perché i vantaggi legati alle proprietà nutrizionali non sono ritenuti sufficienti per superare il "fattore disgusto" nei confronti dei piatti a base di insetti (Deroy *et al.*, 2015).

Il background culturale e l'esperienza individuale sono fattori particolarmente rilevanti nel caso dell'accettazione del cibo a base di insetti; si ritiene infatti che il disgusto culturale sia la ragione principale per cui gli insetti non fanno parte della dieta in Europa e Nord America e

¹ cibi dolci o salati e bevande consumati velocemente, in piedi o seduti o mentre si sta passeggiando.

da tempo sono stati documentati forti ostacoli culturali alla loro diffusione in Occidente (Vane-Wright, 1991). Casi studio indicano che una piacevole esperienza organolettica è fondamentale per innescare l'interesse gastronomico verso i prodotti alimentari e questo aspetto è ancora più importante nel caso dei prodotti a base di insetti. Influenzare l'apertura a questa nuova esperienza alimentare sarà una sfida, e commercializzare prodotti a base di insetti che manifestino dei sapori familiari o nei quali gli insetti siano parzialmente o totalmente mascherati può essere una possibile soluzione. Aspetto fondamentale sarà inoltre l'adeguata informazione soprattutto per quanto concerne i possibili effetti benefici sull'organismo correlati all'assunzione di alimenti a base di insetti. Aspetto importante potrebbe essere legato al settore del mercato "green", attualmente molto ricercato dai consumatori, nel quale la commercializzazione di insetti potrebbe essere molto apprezzata (Berger *et al.*, 2018; Tobler *et al.*, 2011).

1.2 POLVERI DI INSETTI: NUOVI INGREDIENTI PER LA PRODUZIONE DI LIEVITATI

1.2.1 Industria panificatoria in Europa e in Italia

Per panificazione si intende il processo di produzione del pane che, secondo il *DPR 502/1998*, "è il prodotto ottenuto dalla cottura totale o parziale di una pasta lievitata, preparata con sfarinati di grano, acqua e lievito, con o senza aggiunta di sale comune". Questa definizione può essere applicata, con le dovute modifiche, anche a tutti gli altri prodotti lievitati da forno, come pizze, focacce, dolci, ecc.

Lo sfarinato rappresenta uno degli ingredienti chiave della panificazione e la più utilizzata nei prodotti da forno è lo sfarinato di frumento, nello specifico di grano tenero, uno dei cereali più diffusi al mondo. Le disponibilità nazionali di frumento sono fortemente influenzate dall'andamento dell'offerta interna che presenta forti variazioni annuali. A prescindere da tale andamento, per soddisfare la domanda dell'industria di prima e seconda trasformazione, è necessario ricorrere all'utilizzo di considerevoli quantitativi di materia prima estera (europea), che rappresentano in media il 60% del fabbisogno complessivo nazionale di grano tenero.

L'industria panificatoria ha vissuto una rivoluzione negli ultimi 150 anni. Le piccole panetterie artigianali, che offrono un'ampia gamma di prodotti di qualità, hanno lasciato il posto all'industria della panetteria ad alta tecnologia, che produce pochi tipi di pane in maniera più efficiente.

Infatti, mentre la ricerca ha generato un costante e impressionante progresso nella panificazione, sono stati introdotti nuovi materiali e ingredienti nella composizione del pane.

Tra i nuovi ingredienti attualmente in uso soprattutto in Nord Europa sono incluse le polveri di insetto. Infatti, combinare la farina di insetti al classico impasto del pane, difatti, comporta un miglioramento dei valori nutrizionali, in quanto i lievitati mediamente presentano un alto indice glicemico, un basso contenuto di proteine e di fibra alimentare, oltre a possedere limitate quantità di vitamine e minerali.

1.2.2 *Principali caratteristiche nutrizionali e / o funzionali dei lievitati*

I prodotti da forno comprendono un vasto insieme di alimenti cotti, sia lievitati che non, sia dolci che salati, sia semplici che addizionati in sale, zucchero, oli o grassi, altri cereali o altri ingredienti. È doveroso specificare che i prodotti da forno non sono tutti uguali, difatti differiscono, oltre che per gli ingredienti, per la consistenza e la densità energetica. Quest'ultima varia in base alla quantità d'acqua, alla presenza di lipidi, saccarosio e sale aggiunti all'impasto, oltre che al grado di raffinazione dello sfarinato, che determina notevoli differenze nella quantità di fibre, sali minerali e vitamine.

Il principale rappresentante dei prodotti da forno è il pane semplice (farina di tipo "0") che, per 100 g, presenta mediamente un valore energetico complessivo di circa 270 kcal. Questo alimento si caratterizza per la carenza di grassi (3,5 g 100 g⁻¹) e soprattutto per l'elevato contenuto di carboidrati (50 g 100 g⁻¹), che determina inevitabilmente un alto indice glicemico. Il basso contenuto proteico (9 g 100 g⁻¹) lo rende non particolarmente adatto al consumo, ad esempio, da parte di persone anziane, donne in gravidanza e sportivi, in quanto queste persone necessitano di assumere quotidianamente rilevanti quantità di proteine. In particolare, con l'aumentare dell'età i problemi legati alla masticazione possono ulteriormente ostacolare il consumo di alimenti maggiormente proteici, come la carne.

Il pane ottenuto con sfarinato raffinato (di tipo "0"), inoltre, contiene circa la metà della quantità di fibra alimentare che possiede il pane integrale (7 g 100 g⁻¹), oltre al minore quantitativo di sostanze protettive, come vitamine (in particolare quelle del gruppo B, colina e niacina) e minerali, quali ferro, fosforo e calcio, in quanto queste sostanze si trovano soprattutto negli strati esterni della cariosside. Difatti, il germe è ricco di lipidi e vitamine, l'endosperma è ricco di amidi, mentre la parte più esterna è ricca di fibra e di sostanze con proprietà antiossidanti.

Tuttavia, negli sfarinati ad alto tasso di estrazione e nella crusca sono presenti sostanze anti-nutrizionali, la cui attività influisce negativamente sull'assorbimento dei nutrienti nel lume intestinale o sui meccanismi dell'assorbimento stesso.

Gli antinutrienti più diffusi nei cereali sono i fitati, presenti con una percentuale dello 0,5-1,2% e concentrati per lo più nello strato aleuronico e nel germe. I fitati sono esteri dell'acido fitico ed hanno la capacità di chelare cationi come il ferro, il calcio e lo zinco, diminuendone la disponibilità per l'assorbimento (McKevith, 2004; Silva & Bracarense, 2016).

Altri antinutrienti noti sono i tannini, presenti in particolare nel sorgo e nel miglio indiano: sono sostanze fenoliche capaci di formare complessi con i minerali e con le proteine, facendole precipitare e riducendone così l'assorbimento. Nonostante influenzino negativamente l'assorbimento intestinale, sia i fitati che i tannini possono essere classificati come antiossidanti e ancor più lo sono i loro metaboliti (Dykes & Rooney, 2006; Hübner & Arendt, 2013).

Come evidenziato in precedenza, gli antinutrienti si trovano soprattutto negli strati esterni della cariosside: mediante la decorticazione è possibile ridurre la presenza negli sfarinati, riducendo però anche la quantità di componenti benefici, contenuti anch'essi negli strati rimossi.

Tecnologie tradizionali, come i trattamenti termici e l'ammollo in acqua o in soluzioni alcaline, sono in grado di ridurre i livelli di tannini e di flavonoidi nei prodotti cerealicoli trasformati (Taylor & Duodu, 2015). Viceversa, la tecnologia degli impasti acidi, mediante la fermentazione da parte di batteri lattici in appropriate condizioni, è in grado di ridurre il contenuto di fitati nei prodotti dal 50% fino all'85%, a seconda del tipo di cereali nell'impasto e della tecnica utilizzata (Buddrick *et al.*, 2014; McKevith, 2004).

Inoltre, prendendo in esame le caratteristiche organolettiche, i prodotti a base di cereali arricchiti con frazioni di fibra insolubile (come la crusca), vengono percepiti dal consumatore come più naturali e salutari, ma allo stesso tempo meno gradevoli. In particolare, l'aggiunta di crusca comporta una serie di effetti negativi sulle proprietà strutturali e organolettiche dei prodotti (Foschia *et al.*, 2013). L'incorporazione di fibra alimentare insolubile modifica alcune proprietà sensoriali del pane: oltre ad una differente percezione del gusto e un aumento della densità, si ottiene una riduzione di elasticità della mollica, di friabilità e del volume della pagnotta. Dato che la differenza di espansione del volume è correlata alla capacità di assorbimento di acqua, l'impiego di fibra solubile può portare ad una maggiore espansione di volume rispetto a quella insolubile (Robin *et al.*, 2012).

Le farine integrali ottenute da cereali, ricchi di fibra e di oligosaccaridi, presentano un effetto prebiotico che favorisce sia lo sviluppo di un microbiota sano e funzionale sia l'assorbimento dei minerali (Chanvrier *et al.*, 2007).

1.2.3 Dati recenti sull'utilizzo di polveri di insetti per la produzione di lievitati

Come già anticipato, nell'ultimo decennio in Europa, l'innovazione di prodotto nell'industria panificatoria ha visto la introduzione dell'uso di polveri di insetto per la produzione di lievitati. È del 2017 il lancio sul mercato europeo del primo pane prodotto da una azienda finlandese con una miscela di sfarinato di frumento e un 3% di farina ottenuta dalla macinazione di grilli essiccati. In base a quanto dichiarato dal produttore, questo pane risulta ricco di proteine, acidi grassi, calcio, ferro e vitamina B12.

Accanto alle sperimentazioni del mondo produttivo, anche ricercatori ed esperti di settore hanno esplorato, nell'ultimo decennio, le potenzialità delle polveri di insetto in panificazione. Nel 2018 Osimani e collaboratori hanno realizzato un pane con caratteristiche nutrizionali migliorate, grazie all'aggiunta di farina di grillo (*Acheta domesticus*) allo sfarinato di frumento, in percentuale variabile dal 10 al 30 %. Il prodotto finale ha mostrato un migliore profilo nutrizionale in termini di composizione in acidi grassi, un più alto contenuto proteico e la presenza di aminoacidi essenziali rispetto al pane di controllo, ottenuto con il solo sfarinato di frumento. Nel loro complesso, i dati raccolti, hanno evidenziato l'idoneità della polvere di grillo per la produzione di pane, sebbene alle percentuali di sostituzione studiate il prodotto finale non mostri eccellenti qualità reologiche e sensoriali.

Nello studio di Roncolini *et al.* (2019) è stata testata la sostituzione di sfarinato di grano tenero con una percentuale variabile dal 5 al 10 % di farina ottenuta da larve di *Tenebrio molitor*, per produrre pane arricchito in proteine. A differenza del precedente studio, in questo caso la sostituzione di parte dello sfarinato di frumento con farina di *Tenebrio* non ha influenzato negativamente le caratteristiche tecnologiche del pane. Inoltre, è stato rivelato un aumento del contenuto proteico e un significativo arricchimento in termini di aminoacidi essenziali, in particolare di tirosina, metionina, isoleucina e leucina.

Finora oltre 2000 specie di insetti sono state segnalate come cibo per l'uomo (Jongema, 2017), tra cui coleotteri (*Coleoptera*), bruchi (larve di farfalle e tarme; *Lepidoptera*), api, vespe e formiche (*Hymenoptera*), cavallette e grilli (*Orthoptera*). La maggior parte degli insetti destinati al consumo umano proviene da popolazioni selvatiche in natura, dove sono stati una fonte importante di proteine alimentari per millenni (FAO, 2006).

Il contenuto proteico medio degli insetti edibili differisce da quello degli insetti selvatici, in quanto è generalmente paragonabile agli alimenti tradizionali di alta qualità di origine animale (ad esempio carne bovina, uova, latte) e di origine vegetale (ad esempio la soia) ad alta densità proteica (Wolfe, 2015). Ad esempio, in base al peso fresco, il contenuto proteico ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$) degli insetti edibili varia dal 7% al 48%, paragonabile a quello della carne bovina (19% –

26%), del pesce (16% – 19%) e dei gamberetti (13% - 27%) (FAO, 2006). Al contrario, se valutati sulla sostanza secca, questo valore varia dal 40% circa per gli insetti appartenenti agli ordini *Isoptera* (termiti) e *Coleoptera* (coleotteri) a circa il 60% per quelli appartenenti agli ordini *Blattodea* (scarafaggi) e *Orthoptera* (grilli e cavallette) (Churchward-Venne *et al.*, 2017). La farina che si ricava da questi ultimi è la più usata nelle preparazioni di lievitati, seguita da quella ottenuta da camole della farina (mealworms o larve di *Tenebrio molitor*) e da verme bufalo (buffalo worms o larve di *Alphitobius diaperinus*).

Tali farine possono essere aggiunte a tutte le ricette in cui è presente lo sfarinato di frumento, di mais o di legumi, ad esempio, per il fatto che sono complete dal punto di vista amminoacidico: contengono tutti gli aminoacidi essenziali di cui il corpo umano necessita. Inoltre, sono ricche di fibre, vitamine, minerali, grassi insaturi e povere di grassi saturi. A questo proposito, non possono essere usate in percentuale pari al totale di un impasto per lievitati, altrimenti il risultato finale sarebbe troppo “pesante”, sbilanciato e non molto digeribile.

Difatti, la digeribilità delle proteine degli insetti varia molto a seconda della presenza di un esoscheletro duro (Churchward-Venne *et al.*, 2017): nella fattispecie quelli con un'alta percentuale di chitina sono particolarmente difficili da digerire (Schlüter *et al.*, 2017). Naturalmente, la rimozione di esoscheletro è un'opzione fattibile, volta ad aumentare la digeribilità delle proteine al 77-98% (Rumpold & Schlüter, 2013).

Per quanto riguarda la composizione nutrizionale degli insetti, è doveroso porre particolare attenzione al grasso, secondo solo alle proteine. Le larve e le pupe hanno più grasso degli insetti adulti, mentre le femmine sono più grasse rispetto ai maschi della stessa specie. Inoltre, il valore nutrizionale degli insetti varia a seconda della dieta, dello stadio di sviluppo, del sesso, della specie e dell'ambiente di crescita.

Prendendo in esame le caratteristiche organolettiche, il gusto degli alimenti, preparati con queste particolari farine, è mediamente molto delicato e può ricordare nelle sfumature quello della nocciola tostata o dei pinoli. Il gusto di tali prodotti è influenzato da diverse variabili, a cominciare dalla specie per finire con il mangime con cui viene nutrito l'insetto.

1.3 ASPETTI INERENTI LA SICUREZZA DEGLI ALIMENTI A BASE DI INSETTI: CONTAMINANTI CHIMICI

Nonostante l'ottimo valore nutrizionale degli insetti edibili, questi possono rappresentare un rischio per la salute umana, a causa della presenza di allergeni, tossine e microrganismi patogeni. Di conseguenza, le specie di insetti di interesse per l'alimentazione umana nell'UE devono essere prive di sostanze tossiche e microrganismi patogeni per l'uomo.

I principi fondamentali della legislazione dell'UE sui contaminanti negli alimenti sono descritti nel *Regolamento 315/93/CEE*: “*gli alimenti contenenti un contaminante in quantità inaccettabili dal punto di vista della salute pubblica non devono essere immessi sul mercato*”. Inoltre, i contaminanti devono essere mantenuti al livello più basso ottenibile in base alle buone pratiche (principio ALARA), mentre, al fine di proteggere la salute pubblica, devono essere fissati limiti massimi per i contaminanti specifici. È proprio il *Regolamento CE 1881/2006* a stabilire i limiti massimi per alcuni di essi, come le micotossine e i metalli, in determinati prodotti alimentari.

Per quanto riguarda il consumo umano nell'UE, gli insetti allevati e i relativi prodotti rientrano nella definizione di “*novel food*” nel regolamento *UE 2015/2283*, ovvero “*qualunque alimento non usato in misura significativa per il consumo umano nell'UE prima del 15 maggio 1997*”. Prima dell'immissione sul mercato nell'UE, i nuovi ingredienti alimentari devono essere sottoposti ad una procedura di autorizzazione, conformemente all'articolo 10 che comprende una valutazione della sicurezza per quanto riguarda la salute umana.

Gli insetti allevati dall'uomo e utilizzati per la produzione di alimenti sono considerati animali ai sensi dell'articolo 3 del *Regolamento CE 1069/2009*, per cui i regolamenti relativi all'alimentazione animale si applicano anche all'allevamento di insetti.

Inoltre, ai sensi del *regolamento CE 767/2009* è attualmente proibito l'uso di vari materiali di scarto come mangime animale, ad esempio i rifiuti domestici o il letame. L'allevamento di larve deve quindi avvenire utilizzando un substrato di composizione costante e di qualità specifica.

Tra i contaminanti chimici che possono essere presenti nelle farine di insetti compaiono maggiormente micotossine e metalli pesanti.

1.3.1 Micotossine

Le micotossine sono metaboliti secondari a basso peso molecolare prodotti dai funghi che possono causare effetti negativi nell'uomo. A causa della loro notevole termoresistenza, i procedimenti tecnologici di lavorazione degli alimenti, quali pastorizzazione (65-72°C) e

sterilizzazione (120°C) o le operazioni domestiche di cottura (70-90°C) non sono in grado di distruggere le micotossine presenti nelle derrate alimentari, ma solo di ridurre la quantità.

Tra le micotossine che si riscontrano più frequentemente nei mangimi e nelle materie prime alimentari ricordiamo lo zearalenone (ZEA), un noto interferente endocrino con attività estrogenica, prodotto da diverse specie del genere *Fusarium* ed identificato frequentemente nel mais e nel frumento.

Un'altra classe di micotossine è rappresentata dalle fumonisine, metaboliti secondari prodotti principalmente da *Fusarium verticilloides* e *Fusarium proliferatum*. Questi composti sono aminopolioli a catena lunga con due catene laterali di acido tricarballylico.

L'aflatossina B1 (Afb1), invece, rappresenta l'aflatossina più tossica prodotta dalle specie *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* ed è di grande importanza agricola in quanto può essere riscontrata frequentemente.

Uno dei primi studi riguardanti l'impatto tossicologico dei mangimi contaminati da funghi sulla crescita delle camole della farina (larve di *T. molitor*) è stato pubblicato da Reiss (1973): le larve sono state allevate su pane contaminato da *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium expansum*, *Cladosporium herbarum* e *Neurospora sitophila*. Solo quest'ultimo si è dimostrato atossico, al contrario di *A. flavus* che ha inibito in modo significativo lo sviluppo larvale. In un altro studio, le camole della farina si sono rivelate sensibili alle micotossine prodotte dalle specie *Fusarium* e dalle specie *Myrothecium* (Davis *et al.*, 1975).

Per di più, Abado-Becognee *et al.* (1998) hanno valutato gli effetti fisiologici della crescita e del metabolismo respiratorio delle camole della farina, a seguito della loro esposizione alla fumonisina B1 (FB₁) (450 g g⁻¹ di mangime), la più comune e più tossica. Secondo lo studio, circa il 40% della FB₁ ingerita è stato escreto con feci. Questa percentuale di escrezione è stata definita come la differenza tra la quantità assunta dalle larve e la quantità rilevata mediante titolazione al termine dell'esperimento, in relazione alla concentrazione iniziale nel mangime. Similmente, lo studio di van Broekhoven *et al.* (2014) descrive una prova di alimentazione condotta su due specie appartenenti alla famiglia dei Tenebrionidi (*Alphitobius diaperinus* e *T. Molitor*). Alla loro dieta sono state addizionate tre micotossine comuni (zearalenone, ocratossina A e tossina T2) in concentrazione elevata, al di sopra del limite appositamente per essere rilevate. Alla fine del periodo di alimentazione non sono stati riscontrati effetti negativi significativi sulla crescita e sulla sopravvivenza delle larve, sia alimentate con diete di controllo sia con diete contaminate da micotossine. Le concentrazioni sono diminuite rapidamente al di sotto del limite di rilevazione quando le larve digiunavano o consumavano mangime di controllo. Nel caso particolare di *T. molitor*, le concentrazioni di ocratossina A

sono diminuite più velocemente a digiuno rispetto all'alimentazione basata su mangimi di controllo.

Gli autori concludono dichiarando che le larve di entrambe le specie di insetti non hanno accumulato micotossine nel loro corpo, sebbene siano state allevate su substrati che superano i limiti CE di 25 volte, e fossero conformi ai valori indicativi delle micotossine per l'alimentazione animale. Uno dei principali risultati ottenuti dallo studio dichiara che, dopo 24 ore di digiuno, le larve non hanno rilevato alcuna sostanza collegata allo ZEA.

Pertanto, dagli studi si può dedurre che la maggior parte della tossina ingerita è stata escreta in modo rapido ed efficiente e dovrebbe essere trascurabile dopo un periodo di digiuno di 24 ore; tuttavia, la notevole formazione del metabolita α -zearalenolo come estrogeno potente potrebbe compromettere la capacità di riproduzione di *T. molitor* a lungo termine.

1.3.2 *Metalli pesanti*

I metalli pesanti tossici sono metalli o metalloidi che sono noti per la loro potenziale tossicità. Esempi di metalli e metalloidi tossici sono cadmio, mercurio, piombo, arsenico, cromo, cobalto, nichel e rame. La loro tossicità è dovuta all'interferenza con i componenti cellulari vitali, ad esempio la sostituzione di ioni metallici essenziali nelle proteine o l'induzione di stress ossidativo; nonostante ciò, piccole quantità di alcuni metalli pesanti sono essenziali per la salute umana.

Dato che quelli tossici non possono essere metabolizzati dovrebbero essere escreti dal corpo, altrimenti possono immagazzinarsi in esso in forma inattiva. A causa di questo potenziale accumulo di metalli pesanti nella catena alimentare, è rilevante analizzare questi contaminanti negli insetti per alimenti e mangimi.

Secondo lo studio di Borowska *et al.* (2004), l'allevamento di mosche domestiche su substrati contaminati da rame, zinco, piombo e cadmio porta all'accumulo di metalli pesanti nel corpo degli individui adulti. Inoltre, lo sviluppo larvale, la metamorfosi e la sopravvivenza delle larve e delle pupe sono stati influenzati negativamente dai metalli pesanti testati, ad eccezione del rame. Inoltre, lo studio dimostra che le mosche domestiche possono eliminare efficacemente il cadmio e il piombo, limitando i metalli alla superficie del loro esoscheletro che viene rimosso durante il processo di muta.

Vijver e collaboratori (2003), invece, hanno descritto l'assorbimento di metalli da parte di camole della farina su terreni naturali e su terreni addizionati da metalli. Gli autori hanno osservato che le concentrazioni di rame e zinco nel corpo delle larve erano quasi costanti, indipendentemente dalla concentrazione esterna di metallo a cui sono state esposte. Al

contrario, le concentrazioni di cadmio e piombo aumentavano proporzionalmente all'aumentare delle concentrazioni esterne.

Lindqvist *et al.* (1997) affermano che negli adulti di *T. molitor* il tenore di cadmio è sceso del 76% rispetto a quello delle larve all'ultimo stadio e questo fenomeno è stato correlato al processo di muta. Infatti, le larve defecano prima della pupazione o poco dopo l'emergenza dell'adulto poiché, durante la metamorfosi, l'epitelio intestinale viene rinnovato e quindi può essere escreto attraverso le feci.

I dati riportati sottolineano l'importanza di valutare i potenziali rischi per la sicurezza alimentare in un approccio caso per caso, poiché un eventuale accumulo di contaminanti dipende fortemente dalla specie e dallo stadio di sviluppo degli insetti. In particolare, le specie di insetti destinate ad essere usate negli alimenti non rappresentano un rischio imminente per la salute umana o animale, in quanto quest'ultimo è stato identificato provenire dal substrato utilizzato per allevare gli insetti.

I substrati contaminati da micotossine o da metalli pesanti possono causare effetti negativi sulla sopravvivenza e sul rendimento di crescita degli insetti. Pertanto, il monitoraggio regolare dei contaminanti è una parte essenziale della sicurezza dei mangimi e degli alimenti. Inoltre, gli attuali limiti UE per i contaminanti, come i metalli pesanti, nei mangimi per animali potrebbero dover essere adattati alla reazione specifica di ogni specie all'accumulo di queste sostanze.

1.4 ALLERGENI

Le reazioni allergiche alimentari sono definite come “*reazioni avverse ad un alimento o componente alimentare altrimenti innocuo che comporta una risposta anomala del sistema immunitario del corpo a proteine specifiche negli alimenti*” (FAO & OMS, 2001). In Europa, lo 0,1–5,7% dei bambini e l'1–3,2% degli adulti hanno un'allergia alimentare (Nwaru *et al.*, 2014).

Si ipotizza infatti che gli insetti, come qualsiasi altro tipo di alimento o componente alimentare, siano in grado di provocare delle reazioni allergiche, perciò risulta fondamentale valutare il possibile rischio di incorrere in allergie affinché il consumatore sia informato adeguatamente. L'allergia alimentare a seguito dell'ingestione di insetti edibili può essere suddivisa in sensibilizzazione primaria e in reattività crociata con altre specie allergeniche, e in particolare si sospetta che la chitina, una componente dell'esoscheletro degli insetti, di cui non si conosce il livello di digeribilità nell'uomo, possa essere un allergene.

Esistono dei casi documentati di reazioni allergiche e shock anafilattici a seguito del consumo di insetti da parte dell'uomo. Un'ipotesi attualmente in corso di validazione è legata alla elevata potenzialità di sviluppare allergie soprattutto per i soggetti a stretto contatto con gli insetti come entomologi, lavoratori industriali e agricoli.

Un ulteriore dato che riguarda la possibile allergenicità degli insetti è il colorante E120, ovvero il rosso carminio, estratto dal corpo femminile essiccato di *Dactylopius coccus* (conosciuto anche come cocciniglia del carminio) o dalle uova dello stesso. Tale colorante è ampiamente impiegato in numerose produzioni nell'industria alimentare e riconosciuto come causa di diverse reazioni allergiche e shock anafilattici.

Sono stati identificati diversi altri allergeni derivati da insetti, tra cui tropomiosina e arginina chinasi, entrambi panallergeni noti per la loro reattività crociata con proteine omologhe nei crostacei e nell'acaro domestico della polvere (HDM - acronimo di *house dust mite*). Queste due proteine, assieme alla miosina, sono state riconosciute in soggetti allergici alla camola della farina nello studio di Broekman *et al.* (2017), il quale ha rivelato tre nuovi allergeni: le proteine larvali della cuticola A1A, A2B e A3A.

Durante la ricerca, due allevatori di larve di *T. molitor* hanno mostrato sintomi allergici alimentari dopo aver mangiato snack a base di questo insetto. I ricercatori hanno dichiarato che l'allergene determinante consisteva nella proteina della cuticola larvale, in quanto anche la sola esposizione (ad esempio inalazione o contatto con la pelle) potrebbe giocare un ruolo importante nell'insorgenza dell'allergia primaria alla camola.

Nello studio di Van Broekhoven *et al.* (2016), è stato dimostrato, in entrambi i pazienti allergici all'HDM e ai crostacei, il legame delle IgE con la camola della farina, grazie all'identificazione di alcune proteine, inclusa la tropomiosina. Quest'ultima è stata definita come l'allergene maggiore nelle camole della farina perché, a seguito della digestione in vitro, era ancora intatta e il legame con le IgE era rimasto inalterato. Tuttavia, quest'ultimo è stato ridotto mediante digestione in vitro dopo la frittura.

È interessante notare che tropomiosina, arginina chinasi, ma anche altre proteine di insetti come quelle della cuticola larvale, la miosina e la troponina, sembrano essere coinvolte nel causare una reazione allergica e una reattività crociata con altre specie allergeniche, tra le altre HDM, gamberi, scampi e granchi.

In conclusione, gli individui allergici a queste specie sono potenzialmente a rischio quando consumano determinati insetti.

1.5 RISCHIO MICROBIOLOGICO: PATOGENI E SPORIGENI

La sicurezza alimentare è uno degli aspetti più importanti nell'ambito della microbiologia alimentare, la valutazione dei possibili rischi microbiologici legati alla presenza di microrganismi patogeni o sporigeni negli insetti e nei prodotti da essi derivati è dunque un aspetto di estremo interesse al fine di garantire un prodotto sicuro per il consumatore.

Risultano avere notevole importanza anche le modalità di allevamento di insetti e le successive fasi di lavorazione e packaging, che precedono il consumo. A tal proposito, risulta fondamentale l'implementazione di un adeguato sistema HACCP e di buone pratiche igieniche durante le fasi di produzione. Questa soluzione può inoltre scongiurare il rischio di contaminazioni crociate, a seguito di errata manipolazione del prodotto, e di contaminazioni derivanti da errate modalità di conservazione.

La presenza di microrganismi negli insetti, a livello dell'esoscheletro, ma ancor più del tratto intestinale, può essere influenzata da diversi parametri, tra i quali il pH, il potenziale redox e, relativamente al microbiota intestinale, la dieta.

Gli insetti edibili crudi generalmente contengono un alto numero di aerobi psicrotrofi e mesofili, tra cui i coliformi appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, che possono essere indice di condizioni di allevamento igienicamente non corrette. Ricordiamo inoltre i batteri lattici (LAB - acronimo di *lactic acid bacteria*), batteri protecnologici, patogeni o alterativi, in grado di svilupparsi in condizioni di anaerobiosi e a basse temperature. Sono da tenere in considerazione in quanto gli insetti edibili vengono conservati per lo più in queste condizioni.

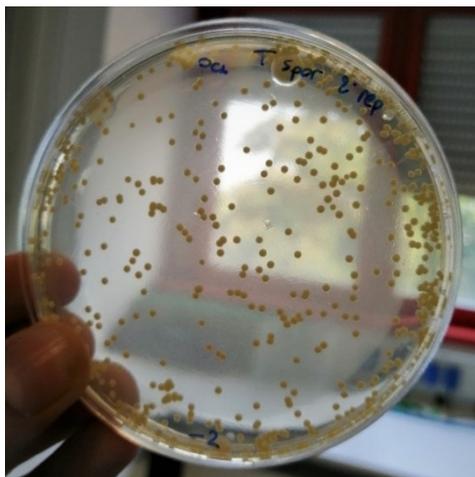
Al contrario, i funghi (ossia lieviti e muffe) fanno parte della normale flora degli insetti e sono comunemente presenti nell'ambiente. Tuttavia, possono contaminare i prodotti alimentari, causando deterioramento, perdita di valore nutrizionale, sapore sgradevole e riduzione della durata di conservazione (Garofalo *et al.*, 2012; Mpuchane *et al.*, 2000). In particolare, alcune muffe sono patogene e possono produrre tossine e micotossine, anche negli insetti edibili (Osimani *et al.*, 2016).

Uno studio condotto da Osimani *et al.* (2017) su insetti essiccati, polveri di insetto e insetti trattati, tra cui larve di *T. molitor* ha permesso di identificare la presenza dei lieviti *Debaryomyces hansenii* e *Trichosporon asahii* e della micotossina prodotta da *Aspergillus flavus*.

Nelle larve fresche di *T. molitor* sono stati ritrovati numerosi batteri appartenenti a più famiglie e generi diversi, rispettivamente

- famiglia *Enterobacteriaceae*:
 - *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter ludwigii* ed *Enterobacter hormaechei*;
 - *Klebsiella oxytoca* e *Klebsiella michiganensis*;
 - *Erwinia*;
- famiglia *Lactobacillaceae*:
 - *Lactobacillus spp.*, *Lactobacillus antri*;
 - *Lactococcus spp.*, *Lactococcus formosensis*, *Lactococcus garvieae*;
 - *Pediococcus lolii*;
 - *Leuconostoc spp.*, *Leuconostoc mesenteroides*;
 - *Weissella spp.*, *Weissella confusa*, *Weissella cibaria*, *Weissella viridescens*;
- famiglia *Enterococcaceae*:
 - *Enterococcus faecalis* ed *Enterococcus faecium*.

Gli insetti edibili potrebbero essere contaminati anche da batteri patogeni e sporigeni (Figura 1), associati al terreno, alla polvere e agli ortaggi usati come substrati per l'allevamento. La presenza degli sporigeni rappresenta un grave problema poiché questi microrganismi formano endospore, resistenti al calore, agli agenti chimici, ai raggi UV, ecc., che potrebbero germinare e moltiplicarsi negli alimenti qualora vengano conservati in maniera errata dopo la cottura. Nel corso di diversi studi, nelle camole della farina sono stati ritrovati diversi patogeni, quali *Pseudomonas spp.*, *Vibrio spp.*, *Salmonella spp.*, *Listeria ivanovii* (nelle larve essiccate) e *Staphylococcus aureus* (quest'ultimo anche in *A. diaperinus*), e alcuni sporigeni comuni: *Bacillus cytotoxicus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* e *Clostridium thermopalmarium* (Garofalo *et al.*, 2017; Osimani *et al.*, 2018; Wynants *et al.*, 2018; Milanović *et al.*, 2018; Stoops *et al.*, 2016; Wynants *et al.*, 2017).



**Figura 1. Piastra Petri usata per rilevare batteri sporigeni nella farina di *T. molitor*.
Diluizione -2.**

1.6 TRATTAMENTI E APPLICAZIONI RELATIVI AGLI INSETTI EDIBILI

Gli insetti edibili possono essere consumati come piatti principali, snack o come ingredienti, e sono commercializzati in diverse forme: interi grezzi o trattati (bolliti, arrostiti o fritti), o come farina e/o suoi derivati (pane e prodotti da forno).

Diversi studi si sono concentrati sulla riduzione della contaminazione microbica degli insetti edibili applicando trattamenti singolarmente o in combinazione tra di loro, come il digiuno, il risciacquo, i trattamenti termici, il raffreddamento, la fermentazione e la marinatura.

Sebbene siano pratiche comuni tra le aziende di allevamento il digiuno, prima, e il risciacquo degli insetti dopo il raccolto, non sono stati utili per ridurre la contaminazione microbica (Wynants *et al.*, 2017).

Sulla base della letteratura scientifica, i trattamenti termici sono risultati i metodi più efficienti per ridurre la carica microbica, sebbene siano state evidenziate delle variazioni a seconda della temperatura e della durata del trattamento e della specie di insetto.

Un breve trattamento di scottatura (blanching) o ebollizione di qualche minuto è generalmente sufficiente per ridurre drasticamente il numero di aerobi mesofili totali, *Enterobacteriaceae*, LAB, lieviti e muffe (Klunder *et al.*, 2012). Tuttavia, i batteri sporigeni sono risultati resistenti a questi trattamenti termici e per tale motivo è prevista la refrigerazione a seguito di tali trattamenti per impedire la germinazione delle spore.

Trattamenti come la sterilizzazione e la tindalizzazione sono risultati efficaci contro le spore, ma hanno avuto effetti dannosi sulla qualità nutrizionale e sensoriale degli insetti commestibili (Garofalo *et al.*, 2019).

Anche la fermentazione lattica, operata da *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus curvatus* e *Staphylococcus xylosus*, si è dimostrata promettente come strategia di mitigazione contro gli sporigeni: in particolare i batteri appartenenti al genere *Clostridium* sono risultati essere un ottimo target in quanto la rapida acidificazione della pasta di larve determina l'inibizione della solfito-reduttasi. Nonostante queste prime evidenze sono necessari ulteriori studi per l'ottimizzazione del processo (Borremans *et al.*, 2018).

Numerosi studi hanno rilevato la presenza di elevate cariche microbiche e di microrganismi potenzialmente dannosi negli insetti edibili affumicati, essiccati e in polvere. Al fine di inibire la crescita microbica, è stata suggerita la combinazione di diverse strategie di mitigazione (teoria degli ostacoli) abbinata a conservazione a basse temperature. A tal proposito, è emersa l'importanza di applicare adeguate condizioni igieniche durante la lavorazione degli insetti edibili, incluso l'allevamento e il trattamento all'interno di ambienti controllati.

Tuttavia, è stato dimostrato dallo studio di Garofalo *et al.* (2017) che la polverizzazione degli insetti aumenta la carica microbica di 1,6-2,2 logaritmi, probabilmente a causa del rilascio e della dispersione del microbiota, in quanto il tratto intestinale è la principale riserva microbica ed è molto difficile (se non impossibile) rimuoverlo.

Stoops *et al.* (2017) hanno determinato due differenti processi per la macinazione di camole della farina e di larve di *A. diaperinus*. I risultati degli studi hanno rivelato la fattibilità di questi processi data la bassa carica microbica dei prodotti finali; quelli a base di larve di *A. diaperinus* hanno una *shelf-life* di 14 giorni, mentre quelli a base di larve di *T. molitor* di 28 giorni, entrambi confezionati in atmosfera modificata.

Numerosi studi scientifici hanno valutato il potenziale uso degli insetti polverizzati nel settore della panificazione al fine di produrre lievitati con migliori valori nutrizionali, come ad esempio la fortificazione proteica del pane. Nello studio di Osimani *et al.* (2018) viene dimostrata l'idoneità della polvere derivata dalle larve di *T. molitor* per la produzione di pane, aggiunta in diverse percentuali (dal 5 al 30%) allo sfarinato di grano tenero. Ne risulta un prodotto con proprietà tecnologiche accettabili, buone caratteristiche sensoriali, maggiore profilo nutrizionale (aumento di proteine, aminoacidi essenziali, fibre e contenuto di grassi) rispetto al pane bianco (classico), usato come controllo. Nonostante questo, nel pane a base di insetti, gli autori hanno riportato la presenza di 2,8 log ufc g⁻¹ di batteri sporigeni, quali *Bacillus spp.* e *B. subtilis*, a causa della contaminazione da ingredienti crudi.

1.6.1 Sonicazione

I cambiamenti nei gusti dei consumatori e la necessità di produrre alimenti sicuri e di alta qualità stimolano l'evoluzione dei processi alimentari conosciuti o lo sviluppo di nuovi.

L'introduzione di nuove tecnologie potrebbe portare una riduzione dei tempi di elaborazione o un miglioramento delle condizioni, mediante la riduzione del fabbisogno energetico, riducendo così i costi ambientali e finanziari. Questi aspetti sono strettamente legati alla ricerca di tecniche di alta qualità che preservino le caratteristiche naturali di alimenti.

La tecnologia degli ultrasuoni ne è un esempio e la sua applicazione nella trasformazione di alimenti potrebbe apportare un miglioramento ai processi alimentari, influenzando la cinetica, la resa o la qualità del prodotto.

Nella sonicazione la frequenza applicata solitamente è nell'intervallo di 20-100 kHz e la potenza 1-10 W/cm² (T. Mason & Peters, 2002). L'uso di questa tecnologia nota come "ultrasuoni di potenza" o "ultrasuoni ad alta intensità" ha come scopo quello di indurre cambiamenti nei prodotti mediante l'alternanza di compressione e decompressione del mezzo. A questo proposito può risultare utile sfruttare tale processo per migliorare i processi industriali.

Nei liquidi, quando la potenza ultrasonica raggiunge una determinata soglia possono generarsi bolle di cavitazione (Soria & Villamiel, 2010). Questo fenomeno si verifica quando all'interno di un fluido in movimento si originano delle bolle di vapore, che accrescono il loro volume fino a quando implodono a causa dell'abbassamento di pressione del fluido. Queste implosioni sono asimmetriche se prodotte vicino ad una superficie solida, di conseguenza generano un microgetto che colpisce il solido (Mason, 1998). È proprio grazie a questo effetto che viene ridotta drasticamente la carica microbica negli alimenti, in quanto viene rotta la parete cellulare.

I maggiori responsabili della disinfezione dei batteri sono gli effetti meccanici della cavitazione, quali onde d'urto ad alta pressione, getti liquidi ad alta velocità e hot spots localizzati (cioè "punti caldi") ad alte temperature.

Il materiale da trattare influenza la potenza degli ultrasuoni e può rappresentare un fattore importante nell'estensione degli effetti degli stessi. Tuttavia, le variabili di processo influenzano l'entità degli effetti degli ultrasuoni ed è necessario stabilire il valore ottimale per ogni specifica applicazione. Ciò offre nuove possibilità per l'innovazione dei processi alimentari, che vanno dal risparmio energetico ad una migliore resa del processo o qualità del prodotto.

In conclusione, l'uso degli ultrasuoni sta aprendo un campo di attività nella trasformazione di alimenti e offre una promettente alternativa tra le tecniche di disinfezione.

2. SCOPO DELLA TESI

Nell'ultimo decennio in Europa si è andata affermando la ricerca di nuovi ingredienti da aggiungere alle ricette di prodotti da forno tradizionali, al fine di migliorarne le qualità nutrizionali. Un ingrediente che soddisfa questi requisiti è certamente rappresentato dalle farine ottenute a seguito dell'essiccazione e della macinazione di varie specie di insetti edibili. Gli insetti sono molto apprezzati nell'ambito alimentare e dal punto di vista della sostenibilità, in quanto possiedono ottimi valori nutrizionali e il loro allevamento ha un basso impatto ambientale.

A tal riguardo, l'entomofagia, ossia il consumo di insetti edibili, si sta sempre più diffondendo nei paesi industrializzati, così come sempre più numerose sono le applicazioni in ambito alimentare di ingredienti a base di insetti, quali le farine.

Obiettivo del presente lavoro di Tesi è stato verificare l'idoneità microbiologica di farine commerciali ottenute da larve di *Tenebrio molitor* e *Alphitobius diaperinus* per la produzione di lievitati con caratteristiche nutrizionali migliorate e/o funzionali nonché la carica e/o presenza di batteri sporigeni, ivi incluso *Bacillus cereus*, nei lievitati ottenuti con le suddette farine. A tal proposito, le analisi microbiologiche per la enumerazione di mesofili aerobi totali e sporigeni sono state effettuate prima e dopo sonicazione delle farine e sui prodotti finali.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Campionamento

Due farine di insetto ottenute dalle specie *Tenebrio molitor* L. e *Alphitobius diaperinus* sono state acquistate via Internet dall'azienda Kreca Ento-Food BV (Ermelo, Paesi Bassi), in confezioni da 100 gr cadauna; le confezioni, ermeticamente chiuse, sono state conservate a temperatura ambiente presso i laboratori di microbiologia del D3A e successivamente aperte in condizioni di sterilità.

Non è stato possibile recuperare informazioni relative alle condizioni di allevamento degli insetti, nonché le pratiche igienico-sanitarie applicate durante la produzione, lo stoccaggio e il trasporto antecedenti l'acquisto.

3.2 Preparazione dei campioni di farina di insetto e sonicazione

Per l'allestimento della prova sperimentale, 5 gr di ciascuna farina sono stati pesati all'interno di sacchetti sterili idonei al trattamento con sonicatore e aggiunti di 45 mL di acqua peptonata sterile (0,1% peptone p v⁻¹). Per ogni farina in studio sono state analizzate in doppio due diverse repliche biologiche (A e B) e i risultati sono stati espressi come media \pm deviazione standard. Ciascun campione è stato opportunamente trattato con omogeneizzatore peristaltico Stomacher 400 circulator (Figura 2) per 2 minuti a 260 rpm. La sospensione ottenuta è stata sottoposta ad analisi microbiologiche, sigillata utilizzando un dispositivo per il

confezionamento sottovuoto e successivamente sottoposta a sonicazione seguendo i protocolli operativi di seguito esplicitati.



Figura 2. Stomacher 400 circulator.

- ✓ trattamento per 30 minuti a 65 °C;
- ✓ trattamento per 90 minuti a 30 °C;

Le informazioni inerenti le caratteristiche tecniche e i parametri di processo non saranno discussi in questa Tesi per motivi di riservatezza legati al brevetto dello strumento utilizzato per la sonicazione.

3.3 Allestimento diluizioni scalari decimali

Per l'allestimento delle diluizioni scalari decimali 1 mL di ciascun campione, prelevato prima e dopo il trattamento di sonicazione, è stato aggiunto di 9 mL di acqua peptonata sterile (0,1% peptone p v-1) al fine di determinare la carica microbica dei batteri mesofili aerobi totali e dei batteri sporigeni.

Gli omogenati sono stati quindi utilizzati per l'allestimento di diluizioni scalari decimali (Figura 3), in duplicato.

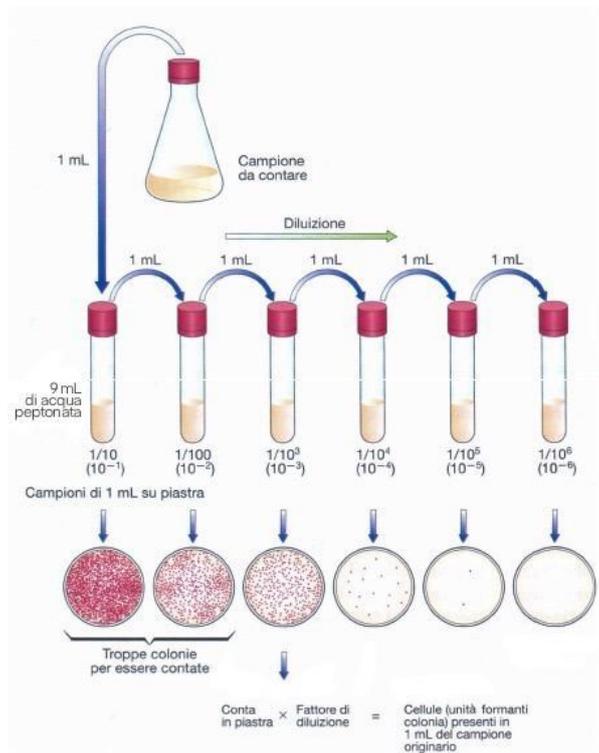


Figura 3. Diluizioni scalari decimali per conta vitale.

3.4 Allestimento conte vitali in piastra

3.4.1 Determinazione mesofili aerobi

L'enumerazione dei batteri mesofili aerobi totali è stata effettuata utilizzando la tecnica di semina per spandimento; 1 mL di omogenato e 100 μ L di ciascuna diluizione decimale sono stati seminati sul terreno solido PCA (*Plate Count Agar*), non selettivo e non differenziale, raccomandato dall'*American Public Health Association* nel 1978 per il conteggio dei microrganismi mesofili aerobi totali presenti negli alimenti, nel latte e nei prodotti lattiero-caseari.

La composizione completa del terreno è riportata in Tabella 1.

Tabella 1. Composizione del terreno di crescita PCA (Plate Count Agar).

Elemento	Concentrazione
Digerito enzimatico di caseina	5,0 g L ⁻¹
Estratto di lievito	2,5 g L ⁻¹
Glucosio anidro	1,0 g L ⁻¹
Agar	15 g L ⁻¹

Le piastre di terreno PCA inoculate sono state incubate a 30 °C per 48 h in aerobiosi e successivamente analizzate per la determinazione delle Unità Formanti Colonia (UFC); i risultati sono stati espressi come media del logaritmo delle UFC g⁻¹ di due repliche analizzate in doppio ± deviazione standard.

3.4.2 Determinazione batteri sporigeni

Per la determinazione della carica di batteri sporigeni, 2 mL di ciascun omogenato, prelevato prima e dopo sonicazione, sono stati sottoposti a incubazione a 80 °C per 15 minuti seguito da shock termico (5 minuti in ghiaccio), al fine di disattivare le forme vegetative e permettere la successiva germinazione delle spore (Milanović *et al.*, 2017). Un mL di ciascun campione trattato termicamente è stato utilizzato per la semina per spandimento sul terreno solido PCA; 1 mL dello stesso campione è stato utilizzato per l'allestimento di diluizioni decimali in acqua peptonata sterile e successiva conta vitale sul medesimo terreno solido.

Le piastre inoculate sono state incubate a 30 °C per 48 h in aerobiosi e successivamente analizzate per la determinazione della media del logaritmo delle UFC g⁻¹ di due repliche analizzate in doppio ± deviazione standard, come già descritto (Figura 4 e Figura 5).



Figura 4. Piastra Petri utilizzata per il rilevamento di batteri sporigeni. Diluizione -1.



Figura 5. Piastra Petri utilizzata per il rilevamento di batteri sporigeni. Diluizione -2.

3.5 Utilizzo delle farine di insetto per la produzione di lievitati fortificati

3.5.1 Panificazione

Entrambi i lotti di farine in studio sono stati utilizzati per la produzione di pani a base di semola di grano (Ciabattine siciliane, Figura 6) fortificate, presso il Dipartimento Scienze Agrarie, Alimentari e Forestali, dell'Università degli Studi di Palermo. Il processo di panificazione impiegato è illustrato nei diagrammi di flusso in Figura 7 e in Figura 8.

Ai fini della lievitazione, sono stati utilizzati due agenti lievitanti alternativi: panetto di lievito e impasto acido di tipo I, preparato con le colture *Lactobacillus brevis* GGS13 e

PON100289, *Weissella cibaria* PON10032 e *Leuconostoc citreum* PON100290, appartenenti alla Collezione di Colture del Dipartimento Scienze Agrarie, Alimentari e Forestali, dell'Università degli Studi di Palermo.



Figura 6. Ciabattine siciliane.

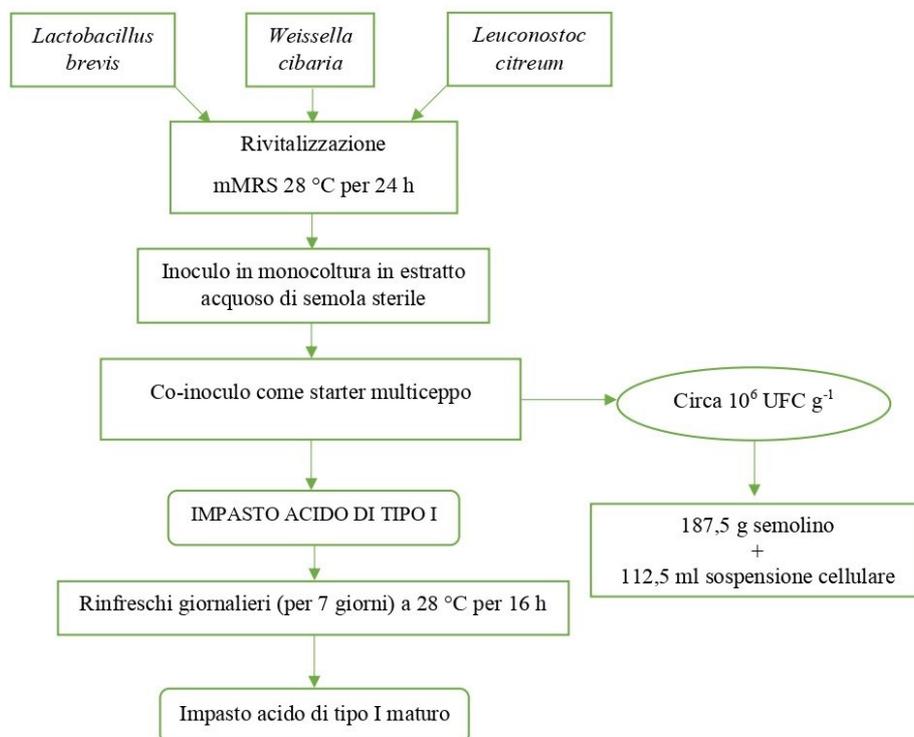


Figura 7. Diagramma di flusso della produzione di impasto acido di tipo I.

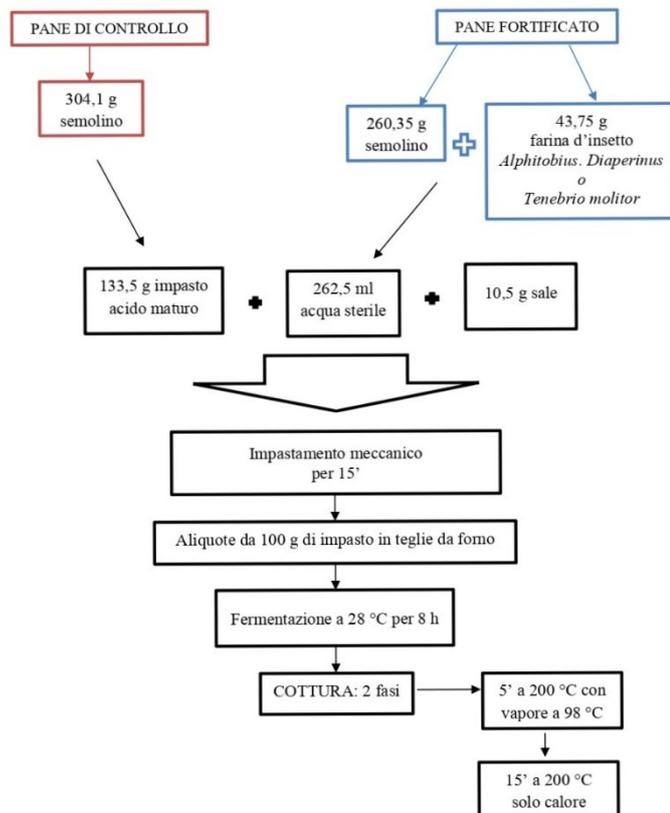


Figura 8. Diagramma di flusso del processo di panificazione.

Per la preparazione dell'impasto acido di tipo I le colture di batteri lattici selezionate sono state rivitalizzate su terreno de Man-Rogosa-Sharpe modificato (mMRS) incubato a 28°C per 24 h come descritto da Corona e collaboratori (2016). Le colture così ottenute sono state inoculate in monocultura in estratto acquoso di semola sterile (SEE - sterile semolina extract) come descritto da Alfonso e collaboratori (2016) e successivamente inoculate come starter multiceppo per la produzione dell'impasto acido alla carica finale di $\sim 10^6$ UFC g⁻¹.

In dettaglio, per la preparazione dell'impasto acido (300 g) 187,5 g di semolino sono stati aggiunti di 112,5 mL di sospensione cellulare, ottenuta diluendo gli estratti di semola fermentati con acqua di rubinetto, in modo tale da ottenere un impasto con una resa (*dough yield*) di 160. L'impasto acido così ottenuto è stato propagato per una settimana con rinfreschi giornalieri a 28 °C per 16 h secondo il protocollo descritto da Corona e collaboratori (2016). Per l'allestimento delle prove di panificazione il pane è stato prodotto seguendo la tipica ricetta della Ciabattina siciliana. In dettaglio, il pane di controllo (Figura 9) è stato preparato aggiungendo 133,4 g di impasto acido maturo (7 giorni) con 304,1 g di semolino, 262,5 mL di acqua di rubinetto sterile e 10,5 g di sale. Mentre il pane fortificato (Figura 10) è stato prodotto

come descritto da Osimani e collaboratori (2018) con aggiunta del 10% di farina di insetto; in dettaglio, 260,35 g di semolino sono stati aggiunti di 43,75 g di farina di insetto ottenuta dalle specie *Tenebrio molitor* L. o, alternativamente, *Alphitobius diaperinus*, 133,5 g di impasto acido maturo (7 giorni), 10,5 g di sale e 262,5 di acqua.

Gli impasti così ottenuti sono stati lavorati meccanicamente con un'impastatrice SilverCrest Bread Maker SBB 850 A1 (Kompernass GMBH, Bochum, Germania) per 15 minuti.

Aliquote di ~100 g di impasto sono state poste in teglie da forno rettangolare di acciaio inox (parte superiore interna 143 × 79 mm, parte inferiore esterna 129 × 64 mm, profondità interna 57 mm) e coperte con un foglio di alluminio (AACC, 2000). Il restante impasto è stato posto in un becher sterile coperto da parafilm. Entrambe le aliquote di impasto, in teglia e in becher, sono state fermentate a 28 °C per 8 h.

La cottura degli impasti lievitati è avvenuta mediante un programma di 2 fasi, che comprende 5 minuti a 200 °C, con la combinazione aria calda / vapore (temperatura del vapore 98 °C), seguita da 15 minuti alla stessa temperatura con solo calore per convezione (aria calda), con il forno Compact Combi (Electrolux, Pordenone, Italia).

Le prove sperimentali sono state condotte in duplicato in 3 esperimenti indipendenti per un totale di 6 processi di panificazione.

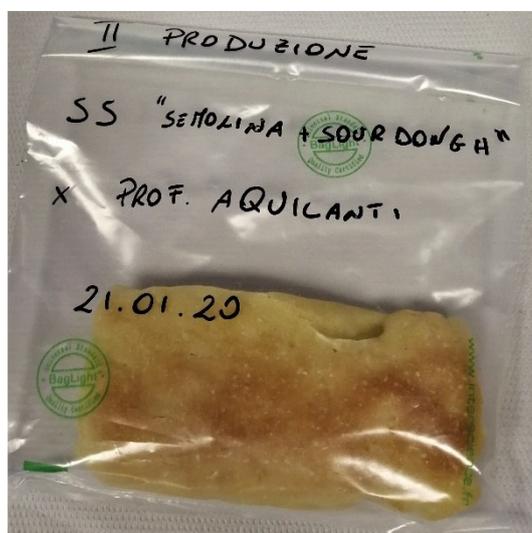


Figura 9. Pane di controllo.

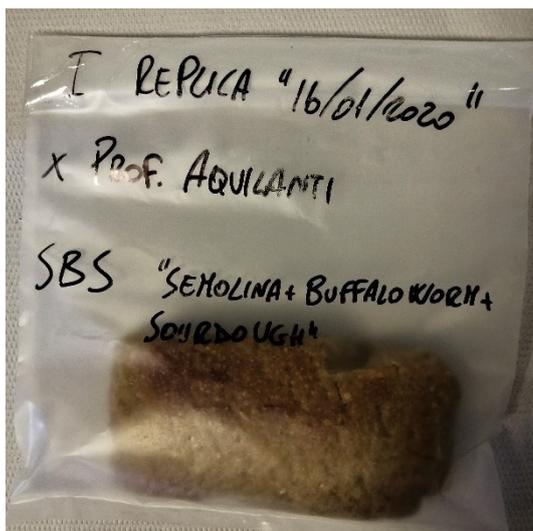


Figura 10. Pane prodotto con farina di insetti.

3.5.2 Analisi microbiologiche dei pani

Sia i pani di controllo che quelli fortificati sono stati sottoposti a enumerazione dei batteri sporigeni e alla ricerca/enumerazione di *Bacillus cereus*. La carica di sporigeni è stata determinata sul terreno solido PCA, come descritto al paragrafo 3.4.2. La ricerca ed eventuale enumerazione di spore di *Bacillus cereus* è stata effettuata presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche secondo il metodo standard UNI EN ISO 7932: 2005. I risultati delle conte sono stati espressi come logaritmo delle UFC g⁻¹ di due repliche analizzate in doppio \pm deviazione standard, come già descritto.

3.6 Analisi statistica

I dati ottenuti dalle analisi microbiologiche sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) con il test di *Tukey-Kramer* ($\alpha=0,05$) utilizzando il software JMP, Versione 11.0.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati delle conte vitali su piastra riferiti ai campioni di farina ottenuta da larve essiccate di *T. molitor* L. e *A. diaperinus* sono mostrati rispettivamente in Tabella 2 e Tabella 3.

In particolare, per i campioni di farina ottenuta da larve essiccate di *T. molitor* L. sottoposti a sonicazione a 65 °C per 30 minuti non sono state osservate differenze statistiche significative nella carica di mesofili aerobi totali prima e dopo il trattamento, con conte rispettivamente pari a $2,33 \pm 0,62$ e $2,29 \pm 0,21$ Log UFC g⁻¹. Analogamente, non sono state evidenziate differenze significative nella carica di batteri sporigeni prima e dopo il trattamento, con conte rispettivamente pari a $2,20 \pm 0,16$ e $2,20 \pm 0,27$ Log UFC g⁻¹.

Un quadro analogo è emerso dall'analisi dei campioni di farina di *T. molitor* L. sottoposti a sonicazione a 30 °C per 90 minuti, con conte pari a $2,47 \pm 0,32$ e $2,62 \pm 0,32$ Log UFC g⁻¹ per i mesofili aerobi totali e $2,20 \pm 0,13$ e $2,43 \pm 0,08$ Log UFC g⁻¹ per i batteri sporigeni, rispettivamente prima e dopo trattamento di sonicazione

I dati ottenuti dall'analisi dei batteri sporigeni nella farina ottenuta da larve essiccate di *T. molitor* prima del trattamento di sonicazione sono risultati in linea con quanto descritto da Klunder e collaboratori (2012) in insetti sottoposti a bollitura e triturazione, e con quanto descritto da Roncolini *et al.*, 2019 in farine di *T. molitor* utilizzati per la produzione di pane ad alto contenuto proteico.

Tabella 2. Conte vitali in piastra di mesofili aerobi totali e batteri sporigeni su farina ottenuta da larve essiccate di *T. molitor* L.

	Sonicazione 30 minuti a 65 °C	Sonicazione 90 minuti a 30 °C
Mesofili aerobi totali t ₀	$2,33 \pm 0,62^a$	$2,47 \pm 0,32^a$
Mesofili aerobi totali t _s	$2,29 \pm 0,21^a$	$2,62 \pm 0,32^a$
Sporigeni t ₀	$2,20 \pm 0,16^a$	$2,20 \pm 0,13^a$
Sporigeni t _s	$2,20 \pm 0,27^a$	$2,43 \pm 0,08^a$

t₀ campione di farina di *T. molitor* non trattato con sonicatore; t_s campione di farina di *T. molitor* trattato con sonicatore. La carica microbica è espressa come media dei Log UFC g⁻¹ ± deviazione standard, di due repliche biologiche analizzate in doppio. Le lettere in apice indicano le differenze sulla base del *Tukey test* ($\alpha=0,05$).

Relativamente ai campioni di farina ottenuta da larve di *A. diaperinus* sottoposti a sonicazione a 65 °C per 30 minuti, sono state riscontrate differenze significative nella carica di batteri mesofili aerobi totali con un incremento delle conte vitali da un valore di $4,34 \pm 0,15$ Log UFC g⁻¹ prima del trattamento a un valore di $4,69 \pm 0,05$ Log UFC g⁻¹ dopo il trattamento. Al contrario, non si osservano differenze significative nella carica di batteri sporigeni prima e dopo il trattamento con valori rispettivamente di $4,33 \pm 0,21$ e $4,60 \pm 0,09$ Log UFC g⁻¹. La carica di batteri sporigeni ottenuta dall'analisi di farina a base di *A. diaperinus* è risultata circa un ordine logaritmico superiore rispetto a quanto riportato da Roncolini e collaboratori (2020) su farine commerciali ottenuti da larve della stessa specie utilizzate per la produzione di pane ad alto contenuto proteico.

Tabella 3. Conte vitali in piastra di mesofili aerobi totali e batteri sporigeni su farina ottenuta da larve essiccate di *A. diaperinus*.

	Sonicazione 30 minuti a 65 °C	Sonicazione 90 minuti a 30 °C
Mesofili aerobi totali t ₀	$4,34 \pm 0,15^b$	$4,81 \pm 0,31^a$
Mesofili aerobi totali t _s	$4,69 \pm 0,05^a$	$4,63 \pm 0,29^a$
Sporigeni t ₀	$4,33 \pm 0,21^b$	$4,30 \pm 0,13^a$
Sporigeni t _s	$4,60 \pm 0,09^{ab}$	$4,46 \pm 0,40^a$

t₀ campione di farina ottenuta da larve di *A. diaperinus* non trattato con sonicatore; t_s campione di farina ottenuta da larve di *A. diaperinus* trattato con sonicatore per 30 minuti a 65 °C. La carica microbica è espressa come media dei Log UFC g⁻¹ ± deviazione standard, di due repliche biologiche analizzate in doppio. Le lettere in apice indicano le differenze sulla base del *Tukey test* ($\alpha = 0,05$).

In linea generale, i dati preliminarmente ottenuti nell'ambito della presente Tesi sperimentale hanno dimostrato come il trattamento di sonicazione, alle condizioni applicate, non è risultato efficace ai fini di una apprezzabile riduzione della carica di microrganismi indicatori di qualità microbiologica degli alimenti.

Relativamente alle prove di panificazione i risultati delle conte vitali dei batteri sporigeni sono mostrati in Tabella 4, mentre le conte vitali per la determinazione della carica di *Bacillus cereus* hanno evidenziato valori < 1 Log UFC g⁻¹ sia nei pani di controllo sia nei pani fortificati.

Tabella 4. Conte vitali di batteri sporigeni in pane di controllo (PC), pane prodotto con farina ottenuta da larve essiccate di *T. molitor* L. (PTm) e pane prodotto con farina ottenuta da larve essiccate di *A. diaperinus* (PAd).

Campione	Batteri sporigeni (Log UFC g ⁻¹)			Overall mean
	Batch 1	Batch 2	Batch 3	
PC	1.74 ± 0.37 ^a	1.67 ± 0.52 ^a	1.24 ± 0.34 ^a	1.55 ± 0.27 ^a
PTm	1.45 ± 0.21 ^a	1.50 ± 0.28 ^a	1.35 ± 0.49 ^a	1.43 ± 0.08 ^a
PAd	1.30 ± 0.43 ^a	1.60 ± 0.85 ^a	1.00 ± 0.00 ^a	1.30 ± 0.30 ^a

PC: pane di controllo prodotto con semolino; PTm: pane fortificato con aggiunta di farina ottenuta da larve essiccate di *T. molitor* L.; PAd: pane fortificato con aggiunta di farina ottenuta da larve essiccate di *A. diaperinus*. La carica microbica è espressa come media dei Log UFC g⁻¹ ± deviazione standard. Le lettere in apice indicano le differenze sulla base del *Tukey test* ($\alpha=0,05$).

Da un punto di vista microbiologico, uno dei principali pericoli legati alla produzione di alimenti arricchiti con farina ottenuta da larve di insetto è la presenza di batteri patogeni sporigeni, e in particolare di *B. cereus* (Garofalo *et al.*, 2019). Quest'ultimo è un patogeno Gram-positivo opportunista per l'uomo e per gli insetti (Song *et al.*, 2014) in grado di colonizzare il tratto intestinale dei due ospiti in studio nella presente Tesi (Lotte *et al.*, 2008). In particolare, la capacità di questo microrganismo di produrre tossine emetiche e diarroiche, nonché endospore termo-tolleranti, rendono la sua presenza negli alimenti un serio rischio per la salute umana.

Sebbene negli ultimi anni diversi autori abbiano indicato la possibilità per gli insetti di veicolare *B. cereus* (Banjo *et al.*, 2006; Fasolato *et al.*, 2018; Vandeweyer *et al.*, 2017; Vandeweyer *et al.*, 2018), nessuno studio ad oggi condotto su prodotti da forno arricchiti con farina o ottenuta da larve essiccate di *A. domesticus* (Osimani, Milanović, Cardinali, Roncolini, *et al.*, 2018), *T. molitor* (Roncolini *et al.*, 2019) e *A. diaperinus* (Roncolini *et al.*, 2020) hanno documentato la presenza di tale patogeno. Quest'ultima evidenza è in linea con i risultati del presente lavoro di Tesi, rivelando bassi livelli di batteri sporigeni e conte vitali di *B. cereus* al di sotto del limite di *detection* della tecnica applicata.

5. CONCLUSIONI

Fino a questo momento le analisi condotte sulla sonicazione, applicata a processi di risanamento di matrici alimentari, presentano grande variabilità. Al fine di verificare l'effettiva efficacia della stessa, nella presente Tesi vengono illustrate le analisi della carica microbica di due farine di insetto, usate nella produzione di lievitati dalle caratteristiche nutrizionali e/o funzionali migliorate.

L'ultrasonificazione si presenta come una tecnologia sostenibile, versatile e conveniente, come si evince dal basso dispendio economico e dal fatto che non altera le caratteristiche del prodotto.

La combinazione di ultrasuoni e calore può risultare una strategia interessante per rendere più efficace l'eliminazione e l'inattivazione microbica nelle farine di insetti. Dal punto di vista delle richieste di mercato, grazie al loro potenziale, gli ultrasuoni rappresentano un buon punto di partenza per ulteriori ricerche e applicazioni su scala industriale.

Tuttavia, sulla base delle evidenze ottenute nella presente Tesi, i risultati dei trattamenti fisici applicati alle polveri di insetto sembrano affermare che, in determinate condizioni, gli ultrasuoni non esercitano un effetto apprezzabile sulla riduzione delle cariche microbiche, che risultano comunque influenzate dalla specie, dalle condizioni di allevamento e dall'alimentazione degli insetti.

Di conseguenza, saranno fondamentali ulteriori studi al fine di migliorare l'utilizzo di questa tecnologia, mediante la ricerca della combinazione di tecniche, e dei relativi parametri, più adatta all'alimento da trattare.

BIBLIOGRAFIA

- Abado-Becognee, K., Fleurat-Lessard, F., Creppy, E. E., & Melcion, D. (1998). Effects of fumonisin B1 on growth and metabolism of larvae of the yellow mealworm, *Tenebrio molitor*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *86*(2). <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.1998.00274.x>
- Agea, J., Biryomumaisho, D., Buyinza, M., & Nabanoga, G. (2008). Commercialization of *Ruspolia nitidula* (nsenene grasshoppers) in Central Uganda. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, *8*(3). <https://doi.org/10.4314/ajfand.v8i3.19195>
- Alfonzo, A., Urso, V., Corona, O., Francesca, N., Amato, G., Settanni, L., & Di Miceli, G. (2016). Development of a method for the direct fermentation of semolina by selected sourdough lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, *239*, 65–78. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.027>
- Banjo A.D., O.A. Lawal, A. I. A. (2006). The microbial fauna associated with the larvae of *Oryctes Monocerus* J. *Appl. Sci. Res.*, *2*, 837–843.
- Berger, S., Bärtsch, C., Schmidt, C., Christandl, F., & Wyss, A. M. (2018). When Utilitarian Claims Backfire: Advertising Content and the Uptake of Insects as Food. *Frontiers in Nutrition*, *5*. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00088>
- Borowska, J., Sulima, B., Niklińska, M., & Pyza, E. (2004). Heavy metal accumulation and its effects on development, survival and immuno-competent cells of the housefly *Musca domestica* from closed laboratory populations as model organism. *Fresenius Environmental Bulletin*, *13*(12 A).
- Borremans, A., Lenaerts, S., Crauwels, S., Lievens, B., & Van Campenhout, L. (2018). Marination and fermentation of yellow mealworm larvae (*Tenebrio molitor*). *Food Control*, *92*, 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.036>

- Broekman, H. C. H. P., Knulst, A. C., de Jong, G., Gaspari, M., den Hartog Jager, C. F., Houben, G. F., & Verhoeckx, K. C. M. (2017). Is mealworm or shrimp allergy indicative for food allergy to insects? *Molecular Nutrition and Food Research*, 61(9). <https://doi.org/10.1002/mnfr.201601061>
- Buddrick, O., Jones, O. A. H., Cornell, H. J., & Small, D. M. (2014). The influence of fermentation processes and cereal grains in wholegrain bread on reducing phytate content. *Journal of Cereal Science*, 59(1). <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2013.11.006>
- Chanvrier, H., Appelqvist, I. A. M., Bird, A. R., Gilbert, E., Htoon, A., Li, Z., Lillford, P. J., Lopez-Rubio, A., Morell, M. K., & Topping, D. L. (2007). Processing of novel elevated amylose wheats: Functional properties and starch digestibility of extruded products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(25). <https://doi.org/10.1021/jf0718650>
- Churchward-Venne, T. A., Pinckaers, P. J. M., van Loon, J. J. A., & van Loon, L. J. C. (2017). Consideration of insects as a source of dietary protein for human consumption. *Nutrition Reviews*, 75(12), 1035–1045. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nux057>
- Collins, C. M., Vaskou, P., & Kountouris, Y. (2019). Insect Food Products in the Western World: Assessing the Potential of a New “Green” Market. *Annals of the Entomological Society of America*, 112(6), 518–528. <https://doi.org/10.1093/aesa/saz015>
- Corona, O., Alfonzo, A., Ventimiglia, G., Nasca, A., Francesca, N., Martorana, A., Moschetti, G., & Settanni, L. (2016). Industrial application of selected lactic acid bacteria isolated from local semolinas for typical sourdough bread production. *Food Microbiology*, 59. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.05.006>
- Davis, G. R. F., Smith, J. D., Schiefer, B., & Loew, F. M. (1975). Screening for mycotoxins with larvae of *Tenebrio molitor*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 26(3). [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(75\)90225-6](https://doi.org/10.1016/0022-2011(75)90225-6)
- de Gier, S., & Verhoeckx, K. (2018). Insect (food) allergy and allergens. *Molecular Immunology*, 100(May), 82–106. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.03.015>
- Deroy, O., Reade, B., & Spence, C. (2015). The insectivore’s dilemma, and how to take the West out of it. In *Food Quality and Preference* (Vol. 44). <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2015.02.007>
- Dykes, L., & Rooney, L. W. (2006). Sorghum and millet phenols and antioxidants. In *Journal of Cereal Science* (Vol. 44, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2006.06.007>

- FAO. (2006). Environmental opportunities for insect rearing for food and feed. *Edible Insects*
Edible Insects : Future Prospects For food and Feed Security, 59–66.
<http://www.fao.org/docrep/018/i3253e/i3253e05.pdf>
- Fasolato, Barbara Cardazzo, Lisa Carraro, Federico Fontana, Enrico Novelli, S. B. (2018).
 Edible processed insects from e-commerce: Food safety with a focus on the *Bacillus cereus*
 group. *Food Microbiology*, 76, 296–303.
- Foschia, M., Peressini, D., Sensidoni, A., & Brennan, C. S. (2013). The effects of dietary fibre
 addition on the quality of common cereal products. In *Journal of Cereal Science* (Vol. 58,
 Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2013.05.010>
- Fuping Song, Qi Peng, Julien Brillard, Didier Lereclus, and C. N.-L. (2014). An insect gut
 environment reveals the induction of a new sugar-phosphate sensor system in *Bacillus*
cereus. *Gut Microbes*, 5(1), 58–63.
- Garofalo, C., Milanović, V., Cardinali, F., Aquilanti, L., Clementi, F., & Osimani, A. (2019).
 Current knowledge on the microbiota of edible insects intended for human consumption:
 A state-of-the-art review. *Food Research International*, 125(June), 108527.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108527>
- Garofalo, C., Zannini, E., Aquilanti, L., Silvestri, G., Fierro, O., Picariello, G., & Clementi, F.
 (2012). Selection of sourdough lactobacilli with antifungal activity for use as
 biopreservatives in bakery products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(31).
<https://doi.org/10.1021/jf301173u>
- Hartmann, C., Shi, J., Giusto, A., & Siegrist, M. (2015). The psychology of eating insects: A
 cross-cultural comparison between Germany and China. *Food Quality and Preference*, 44.
<https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2015.04.013>
- Hübner, F., & Arendt, E. K. (2013). Germination of Cereal Grains as a Way to Improve the
 Nutritional Value: A Review. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 53,
 Issue 8). <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.562060>
- Jongema, Y. (2017). *World list of edible insects*. Wageningen University.
- Klunder, H. C., Wolkers-Rooijackers, J., Korpela, J. M., & Nout, M. J. R. (2012).
 Microbiological aspects of processing and storage of edible insects. *Food Control*, 26(2),
 628–631. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.02.013>

- Lindqvist, L., & Block, M. (1997). Losses of Cd, Hg, and Zn during metamorphosis in the beetle *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 58(1). <https://doi.org/10.1007/s001289900301>
- Lotte P. Stenfors Arnesen, A. F. & P. E. G. (2008). From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Rev*, 32, 579–606.
- Mason, T. J. (1998). Power ultrasound in food processing. The way forward. *Ultrasound in Food Processing*.
- Mason, T., & Peters, D. (2002). Applied Sonochemistry: The Uses of Power Ultrasound in Chemistry and Processing. In *Practical Sonochemistry*. <https://doi.org/10.1533/9781782420620.1>
- McKevith, B. (2004). Nutritional aspects of cereals. In *Nutrition Bulletin* (Vol. 29, Issue 2). <https://doi.org/10.1111/j.1467-3010.2004.00418.x>
- Milanović, V., Osimani, Andrea, Taccari, Manuela, Garofalo, Cristiana, Butta, Alessandro, Clementi, Francesca, Aquilanti, L. (2017). Insight into the bacterial diversity of fermentation woad dye vats as revealed by PCR-DGGE and pyrosequencing. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 44, 997–1004.
- Milanović, V., Osimani, A., Roncolini, A., Garofalo, C., Aquilanti, L., Pasquini, M., Tavoletti, S., Vignaroli, C., Canonico, L., Ciani, M., & Clementi, F. (2018). Investigation of the dominant microbiota in ready-to-eat grasshoppers and mealworms and quantification of carbapenem resistance genes by qPCR. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03036>
- Mpuchane, S., Gashe, B. A., Allotey, J., Siame, B., Teferra, G., & Dithlogo, M. (2000). Quality deterioration of phane, the edible caterpillar of an emperor moth *Imbrasia belina*. *Food Control*, 11(6). [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(00\)00010-4](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(00)00010-4)
- Mwangi, M. N., Ooninx, D. G. A. B., Stouten, T., Veenenbos, M., Melse-Boonstra, A., Dicke, M., & Van Loon, J. J. A. (2018). Insects as sources of iron and zinc in human nutrition. *Nutrition Research Reviews*, 31(2), 248–255. <https://doi.org/10.1017/S0954422418000094>
- Nwaru, B. I., Hickstein, L., Panesar, S. S., Roberts, G., Muraro, A., & Sheikh, A. (2014). Prevalence of common food allergies in Europe: A systematic review and meta-analysis. In *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* (Vol. 69, Issue 8, pp. 992–1007). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/all.12423>

- Oonincx, D. G. A. B., & de Boer, I. J. M. (2012). Environmental Impact of the Production of Mealworms as a Protein Source for Humans - A Life Cycle Assessment. *PLoS ONE*, 7(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051145>
- Osimani, A., Garofalo, C., Milanović, V., Taccari, M., Cardinali, F., Aquilanti*, L., Pasquini, M., Mozzon, M., Raffaelli, N., Ruschioni, S., Riolo, P., Isidoro, N., Clementi, F. (2017). Insight into the proximate composition and microbial diversity of edible insects marketed in the European Union. *European Food Research and Technology*, 243(7), 1157–1171.
- Osimani, A., Garofalo, C., Milanović, V., Taccari, M., Aquilanti, L., Polverigiani, S., & Clementi, F. (2016). Indoor air quality in mass catering plants: Occurrence of airborne eumycetes in a university canteen. *International Journal of Hospitality Management*, 59. <https://doi.org/10.1016/j.ijhm.2016.08.004>
- Osimani, A., Milanović, V., Cardinali, F., Garofalo, C., Clementi, F., Pasquini, M., Riolo, P., Ruschioni, S., Isidoro, N., Loreto, N., Franciosi, E., Tuohy, K., Petruzzelli, A., Foglini, M., Gabucci, C., Tonucci, F., & Aquilanti, L. (2018). The bacterial biota of laboratory-reared edible mealworms (*Tenebrio molitor* L.): From feed to frass. *International Journal of Food Microbiology*, 272 (November 2017), 49–60. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.001>
- Osimani, A., Milanović, V., Cardinali, F., Roncolini, A., Garofalo, C., Clementi, F., Pasquini, M., Mozzon, M., Foligni, R., Raffaelli, N., Zamporlini, F., & Aquilanti, L. (2018). Bread enriched with cricket powder (*Acheta domesticus*): A technological, microbiological and nutritional evaluation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 48(May), 150–163. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.06.007>
- Reiss, J. (1973). Toxicity of molds to the larvae of *Tenebrio molitor*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 21(1). [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(73\)90120-1](https://doi.org/10.1016/0022-2011(73)90120-1)
- Robin, F., Schuchmann, H. P., & Palzer, S. (2012). Dietary fiber in extruded cereals: Limitations and opportunities. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 28, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.06.008>

- Roncolini, A., Milanović, V., Aquilanti, L., Cardinali, F., Garofalo, C., Sabbatini, R., Clementi, F., Belleggia, L., Pasquini, M., Mozzon, M., Foligni, R., Federica Trombetta, M., Haouet, M. N., Serena Altissimi, M., Di Bella, S., Piersanti, A., Griffoni, F., Reale, A., Niro, S., & Osimani, A. (2020). Lesser mealworm (*Alphitobius diaperinus*) powder as a novel baking ingredient for manufacturing high-protein, mineral-dense snacks. *Food Research International*, *131* (September 2019). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109031>
- Roncolini, A., Milanović, V., Cardinali, F., Osimani, A., Garofalo, C., Sabbatini, R., Clementi, F., Pasquini, M., Mozzon, M., Foligni, R., Raffaelli, N., Zamporlini, F., Minazzato, G., Trombetta, M. F., Van Buitenen, A., Van Campenhout, L., & Aquilanti, L. (2019). Protein fortification with mealworm (*Tenebrio molitor* L.) powder: Effect on textural, microbiological, nutritional and sensory features of bread. *PLoS ONE*, *14*(2), 1–29. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211747>
- Rumpold, B. A., & Schlüter, O. K. (2013). Potential and challenges of insects as an innovative source for food and feed production. In *Innovative Food Science and Emerging Technologies* (Vol. 17). <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.11.005>
- Schlüter, O., Rumpold, B., Holzhauser, T., Roth, A., Vogel, R. F., Quasigroch, W., Vogel, S., Heinz, V., Jäger, H., Bandick, N., Kulling, S., Knorr, D., Steinberg, P., & Engel, K. H. (2017). Safety aspects of the production of foods and food ingredients from insects. In *Molecular Nutrition and Food Research* (Vol. 61, Issue 6). <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600520>
- Silva, E. O., & Bracarense, A. P. F. R. L. (2016). Phytic Acid: From Antinutritional to Multiple Protection Factor of Organic Systems. In *Journal of food science* (Vol. 81, Issue 6). <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13320>
- Soria, A. C., & Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: A review. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 21, Issue 7). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.04.003>
- Stoops, J., Crauwels, S., Waud, M., Claes, J., Lievens, B., & Van Campenhout, L. (2016). Microbial community assessment of mealworm larvae (*Tenebrio molitor*) and grasshoppers (*Locusta migratoria migratorioides*) sold for human consumption. *Food Microbiology*, *53*. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.09.010>

- Stoops, J., Vandeweyer, D., Crauwels, S., Verreth, C., Boeckx, H., Van Der Borght, M., Claes, J., Lievens, B., & Van Campenhout, L. (2017). Minced meat-like products from mealworm larvae (*Tenebrio molitor* and *Alphitobius diaperinus*): microbial dynamics during production and storage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *41*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.02.001>
- Taylor, J. R., & Duodu, K. G. (2015). Effects of processing sorghum and millets on their phenolic phytochemicals and the implications of this to the health-enhancing properties of sorghum and millet food and beverage products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *95*(2). <https://doi.org/10.1002/jsfa.6713>
- Tobler, C., Visschers, V. H. M., & Siegrist, M. (2011). Eating green. Consumers' willingness to adopt ecological food consumption behaviors. *Appetite*, *57*(3). <https://doi.org/10.1016/j.appet.2011.08.010>
- van Broekhoven, Sarah Quyen H.T. Doan, van huis, Arnold van Loon, J. J. . (2014). Exposure of tenebrionid beetle larvae to mycotoxin-contaminated diets and methods to reduce toxin levels. *Proc. Neth. Entomol. Soc. Meet*, *25*, 47 to 58. <https://www.nev.nl/pages/publicaties/proceedings/nummers/25/47-58.pdf>
- Van Broekhoven, S., Bastiaan-Net, S., De Jong, N. W., & Wichers, H. J. (2016). Influence of processing and in vitro digestion on the allergic cross-reactivity of three mealworm species. *Food Chemistry*, *196*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.033>
- Vandeweyer D., Lenaerts S., Callens A., & V. 2190 C. L. (2017). Effect of blanching followed by refrigerated storage or industrial 2191 microwave drying on the microbial load of yellow mealworm larvae (*Tenebrio molitor*). *Food 2192 Control*, *71*, 311–314.
- Vandeweyer D., Wynants E., Crauwels S., Verreth C., 2635 Viaene N., Claes J., Lievens B., & V. C. L. (2018). Microbial Dynamics during 2636 Industrial Rearing, Processing, and Storage of Tropical House Crickets (*Gryllodes sigillatus*) for 2637 Human Consumption. *Applied and Environmental Microbiology*, *84* (12), e00255-18.
- Vane-Wright, R. I. (1991). Why Not Eat Insects? In *Bulletin of Entomological Research* (Vol. 81, Issue 1). <https://doi.org/10.1017/S0007485300053165>
- Vijver, M., Jager, T., Posthuma, L., & Peijnenburg, W. (2003). Metal uptake from soils and soil–sediment mixtures by larvae of *Tenebrio molitor* (L.) (Coleoptera). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *54*(3), 277–289. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(02\)00027-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0147-6513(02)00027-1)

- Wolfe, R. R. (2015). Update on protein intake: Importance of milk proteins for health status of the elderly. *Nutrition Reviews*, 73. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuv021>
- Wynants, E., Crauwels, S., Lievens, B., Luca, S., Claes, J., Borremans, A., Bruyninckx, L., & Van Campenhout, L. (2017). Effect of post-harvest starvation and rinsing on the microbial numbers and the bacterial community composition of mealworm larvae (*Tenebrio molitor*). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 42, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.06.004>