



UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICO-VETERINARIE

Tesi di Laurea Magistrale in
Produzioni Animali Innovative e Sostenibili

**EFFETTO DEL METODO DI UCCISIONE E DELLO STADIO DI SVILUPPO SULLA
COMPOSIZIONE ED ESTRAZIONE DELLA CHITINA DA *Acheta domesticus***

**EFFECT OF THE KILLING METHOD AND DEVELOPMENTAL STAGE OF *Acheta
domesticus* ON THE PROXIMATE COMPOSITION AND CHITIN EXTRACTION**

Relatore:

Prof.ssa Augusta Caligiani

Laureando:

Matteo Profeti

Correlatore:

Dott.ssa Clara Pedrazzani

Anno Accademico 2022-2023

Sommario

1. INTRODUZIONE.....	5
1.1 Nuovi ingredienti per mangimi: l'opportunità degli insetti.....	5
1.2 Valore nutrizionale.....	7
1.3 Influenza dei metodi di lavorazione ed estrazione sulla composizione nutrizionale.....	12
1.3.1 Qualità nutrizionale della farina di insetto in funzione del metodo di uccisione.....	15
1.4 Insetti nell'alimentazione animale.....	17
1.5 Aspetti sensoriali.....	22
2. SCOPO DELLA TESI.....	24
3. MATERIALI E METODI.....	25
3.1 Campioni.....	25
3.2 Analisi centesimale di <i>Acheta domesticus</i>	25
3.2.1 Determinazione del contenuto di umidità.....	25
3.2.2 Determinazione del contenuto di lipidi.....	26
3.2.3 Determinazione del contenuto di ceneri.....	27
3.2.4 Determinazione del contenuto di proteine e chitina mediante UPLC-MS.....	27
3.2.4.1 Idrolisi acida di proteine e chitina.....	28
3.2.4.2 Costruzione delle rette di calibrazione.....	29
3.2.4.3 Derivatizzazione ACQ.....	30
3.2.4.4 Analisi UPLC-MS.....	30
3.3 Protocollo di estrazione della chitina.....	31
3.3.1 Rimozione lipidi.....	31
3.3.2 Rimozione proteine (deproteinizzazione).....	31
3.3.3 Rimozione dei minerali (demineralizzazione).....	31
3.3.4 Determinazione del contenuto di chitina estratta e proteine residue mediante UPLC-MS.....	32
3.5 Analisi statistica.....	32
4. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	32
4.1 Effetto del blanching o congelamento come metodi di uccisione sulla composizione centesimale di <i>Acheta domesticus</i> nei vari stadi di sviluppo.....	33

4.1.1 Analisi sulla frazione lipidica.....	35
4.1.2 Analisi sulla frazione chitinica.....	37
4.1.3 Analisi sulla frazione proteica totale e profilo amminoacidico.....	40
4.2 Effetto del blanching o congelamento come metodi di uccisione sulla composizione centesimale degli estratti di chitina di <i>Acheta domesticus</i> nei vari stadi di sviluppo.....	44
4.2.1 Analisi sulla frazione chitinica.....	45
4.2.2 Analisi sulla frazione proteica totale residua e profilo amminoacidico.....	46
4.2.1.1 Confronto profilo amminoacidico estratti e insetti tal quali.....	51
5. CONCLUSIONI.....	53
6. BIBLIOGRAFIA.....	56

1. Introduzione

La crescente richiesta di materie prime proteiche nell'alimentazione di animali da allevamento, ha fatto recentemente aumentare l'interesse verso l'allevamento di insetti, essendo questo in grado di fornire elevati quantitativi di proteine di alto valore biologico con cicli di allevamento rapido (<https://www.alimenti-salute.it/doc/allevamentousoinsetti>). Tale tipologia di allevamento è anche capace di utilizzare una serie di materiali derivati ad esempio dalle industrie alimentari, quali fonti nutritive degli insetti stessi, favorendo l'economia circolare e l'utilizzo di prodotti di scarto.

Recentemente, gli insetti hanno ricevuto una maggiore attenzione come fonte importante di materie prime sostenibili per l'alimentazione degli animali, in particolare nei pesci, nel pollame e nei suini. Inoltre, poiché gli insetti vengono consumati naturalmente da molti animali, tra cui pesci, uccelli selvatici e pollame, possiamo presumere che questi animali siano evolutivamente adattati a mangiarli come parte della loro dieta naturale (Biasato *et al.*, 2016; Sealey *et al.*, 2011). Pertanto, sembra ragionevole considerare le proteine degli insetti come una plausibile fonte di mangime commerciale nei prossimi anni.

Inoltre, l'utilizzo di insetti come mangimi deve essere considerato non solo per il loro ridotto impatto ambientale ma come dimostrato dalla Food and Agriculture Organization (FAO, 2012), anche come componente di una dieta completa in quanto tali mangimi hanno dimostrato di supportare una buona crescita di polli, maiali e pesci soprattutto d'acqua dolce come trota e tilapia.

1.1 Nuovi ingredienti per mangimi: l'opportunità degli insetti

L'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura (FAO) stima che il mondo dovrà produrre circa il 70% in più di cibo entro il 2050. Per quanto riguarda la produzione di proteine animali, l'International Feed Industry Federation (IFIF) ritiene che la produzione di carne (pollame, suino e bovino) raddoppierà. Ciò pone gravi sfide alla capacità globale di fornire cibo sufficiente per gli animali. (International Feed Industry Federation IFIF, 2012).

Uno dei principali problemi per la disponibilità alimentare mondiale è quello di dover riuscire a produrre sufficienti quantità di proteine ad alto valore biologico e questo compito al

momento è svolto principalmente dagli allevamenti di bestiame. Tuttavia, questi allevamenti richiedono più del 70% della terra coltivabile e contribuiscono gravemente sulle emissioni di gas serra e quindi sui cambiamenti climatici. Questo è dovuto principalmente al fatto che prodotti consumabili dall'uomo vengono usati come mangime per gli allevamenti, con un coefficiente di conversione del mangime in carne inefficiente, soprattutto per quanto riguarda il bestiame (Oonincx & de Boer, 2012). Ad esempio, tra le attuali fonti di mangime animale ci sono cereali che sono in competizione la dieta umana. Tra il 2012 e il 2014, circa il 34% della produzione globale di cereali è stata utilizzata come mangime per animali invece che per l'alimentazione umana (OECD/FAO, 2015) e questa quantità si pensa aumenterà notevolmente entro il 2050. Questo fattore è chiaramente indicato dal rapido aumento della terra coltivata a mais e soia, le due principali colture usate come mangime.

Al momento, gli ingredienti utilizzati per alimentare animali da carne e i pesci comprendono farina di pesce, olio di pesce, soia e diversi cereali e uno dei principali ostacoli per la crescita degli allevamenti è rappresentato proprio dai costi proibitivi di questi, che rappresentano il 60-70% dei costi di produzione.

Inoltre, l'acquacoltura è il settore di produzione animale più in crescita e dovrà aumentare la sua sostenibilità per poter fronteggiare un ulteriore aumento della domanda di pesce. Al momento, circa il 10% della produzione mondiale di pesce è destinata alla produzione di farina di pesce a sua volta usata principalmente per l'acquacoltura (FAO, 2012).

Gli insetti possono avere un mercato simile a quello della farina di pesce ed essere utilizzati per alimentare gli allevamenti di pesce, avicoli e suini, oltre che per il petfood. Il recente aumento della domanda e del prezzo della farina di pesce, così come l'incremento della pressione sull'acquacoltura, hanno portato all'interesse della ricerca per lo sviluppo delle proteine ricavate da insetti per sostituire proprio la farina di pesce.

Gli insetti costituiscono un'interessante alternativa come fonte di proteine: la qualità nutrizionale degli insetti è comparabile a quella della carne (Van Huis *et al.*, 2015), sebbene i primi abbiano un impatto ecologico minore in termini di utilizzo di acqua e terra e di emissione di gas serra rispetto alle produzioni di polli, maiali e bovini (Van Huis *et al.*, 2013). Questo è dovuto al rapporto di conversione del mangime in proteine più favorevole e anche al fatto che

molte specie di insetti possono essere allevate su substrati non destinabili al consumo umano come residui di colture e materie di scarto derivate dalla produzione alimentare.

Il sistema normativo relativo all'uso degli insetti come mangime differisce ampiamente tra i vari paesi del mondo.

Fino a poco tempo fa in Europa, secondo il regolamento UE 2017/893, era consentito l'utilizzo di tutti i prodotti degli insetti solamente per la produzione di mangimi destinati all'acquacoltura e per il petfood, mentre per suini e avicoli mancava ancora l'autorizzazione per quanto riguarda le PAP (*processed animal proteins*), cioè le proteine animali trasformate, mentre era già possibile utilizzare le larve vive, i lipidi e le proteine idrolizzate. Da poco tempo invece, grazie al regolamento UE 2021/1372, anche avicoli e suini possono essere nutriti con PAP. Per quanto attiene all'alimentazione dei ruminanti, dalle informazioni attualmente disponibili, non esistono studi relativi all'uso delle farine di insetti. Studi che hanno riguardato l'uso della farina di baco da seta hanno portato a risultati promettenti (Choudhury *et al.*, 2021). In Europa, tuttavia, permane il divieto dell'uso di farine di origine animale nell'alimentazione dei ruminanti stabilito dal Reg. CE 999/2001 in seguito alle crisi alimentari degli anni '90 riguardanti l'encefalopatia spongiforme bovina (BSE), in quanto rappresenta una seria minaccia per la salute e la sicurezza dei consumatori (Marberg, A *et al.*, 2017; Belluco, S *et al.*, 2017).

Finora, solo sette specie sono consentite per l'uso come mangimi: il grillo domestico (*Acheta domestica*), il grillo fasciato (*Grylloides sigillatus*), il grillo campestre (*Gryllus assimilis*), la tarma della farina (*Tenebrio molitor*), la locusta migratoria (*Acridium migratorio*), la mosca nera soldato (*Hermetia illucens*) e la mosca comune (*Musca domestica*).

1.2 Valore nutrizionale

Il valore nutrizionale degli insetti è molto variabile, non solo per la grande diversità di specie, ma anche a seconda del loro habitat, della dieta e dello stadio metamorfico dell'insetto (FAO 2013; Rumpold & Schluter, 2013). Si distinguono, sotto quest'ultimo aspetto, due differenti tipologie di insetti, gli olometaboli, che attraversano una fase di completa metamorfosi, come le mosche, i lepidoteri e i coleotteri e gli eterometaboli, i quali accrescono in dimensioni, ma le forme giovanili rimangono simili a quelle adulte, come i grilli e le cavallette (Van Huis *et al.*, 2013).

Gli insetti con il più alto potenziale di produzione industriale nel settore mangimistico sono le specie di Diptera, come *Hermetia illucens* e *Musca domestica*. Possono crescere su un ampio spettro di substrati (rifiuti organici inclusi), hanno tassi di riproduzione elevati e cicli di vita brevi (Pastore, Velasquez, Gobbi e Rojo, 2015). Invece *Tenebrio molitor*, specie di coleotteri, è meno efficiente degli insetti citati prima, ma considerato ideale per la nutrizione umana (Oonincx, Broekhoven, Huis & Loon, 2015). Tutte queste specie sono molto efficienti nel trasformare flussi di scarti a basso valore nutritivo in biomasse contenenti proteine di alto valore (Sun-Waterhouse *et al.*, 2016).

Dal punto di vista energetico, uno studio condotto da Ramos Elorduy *et al.*, 1997, su 78 differenti specie di insetti presenti nel centro America, ha determinato che il valore energetico medio per 100 g di sostanze secca, derivante da insetti, oscillava tra le 293 e le 762 kcal (Van Huis *et al.*, 2013).

Dal punto di vista proteico, gli insetti rappresentano una buona possibilità, poiché la loro percentuale proteica varia dal 35,3% al 61,3% (sulla sostanza secca) e la loro qualità, in termini di amminoacidi essenziali, è promettente e comparabile con caseina e soia (Rumpold & Schluter, 2013). Il tenore proteico si è mostrato essere molto influenzato, oltre che dall'Ordine e dalla specie di insetto, dal substrato di crescita. Ad esempio, Ortotteri del genere *Locusta migratoria* allevati in Nigeria che sono stati alimentati con crusca, la quale contiene un elevato livello di acidi grassi, hanno manifestato un contenuto proteico pari al doppio rispetto a quello di altre cresciute su residui di granturco.

Tra gli insetti con il più alto contenuto proteico troviamo i grilli. Anche nei grilli appartenenti alla specie *Acheta domesticus* il contenuto nutrizionale è fortemente influenzato dal mangime fornito agli insetti. In media 100 g di farina di grillo contengono 67,8 g di proteine, 5,5 g di carboidrati e 5,6 g di grassi fornendo fino a 350 kilocalorie (European Journal of Clinical Nutrition, 2016; Finsect Oy, 2017). La tabella 1 presenta i 13 amminoacidi presenti nei grilli domestici, di cui sette sono essenziali per il metabolismo umano. Gli amminoacidi essenziali sono istidina, iso-leucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina.

I grilli domestici contengono anche arginina, cisteina, e glutammina che pur non essendo essenziali contribuiscono ad aumentare le difese immunitarie (Organizzazione per l'alimentazione e l'agricoltura delle Nazioni Unite, 2013, Nature Education, 2010).

Tabella 1. Composizione amminoacidica *Acheta domesticus* (Finke, 2002)

Aminoacids	g/16g nitrogen
Alanine	8.1 ± 0.2 ^a
Arginine	7.5 ± 0.9
Aspartic acid	7.8 ± 0.1
Cystine	6.3 ± 0.2
Methionine	3.9 ± 0.4
Lysine	4.4 ± 0.1 ^a
Isoleucine	7.8 ± 0.1 ^a
Leucine	1.6 ± 0.0 ^c
Phenylalanine	5.6 ± 0.5
Threonine	5.9 ± 0.0 ^a
Tryptophan	5.3 ± 0.2 ^a
Glutamic acid	5.8 ± 0.2
Histidine	6.5 ± 0.2 ^a

Altre analisi su insetti eterometaboli hanno evidenziato che, il contenuto proteico varia anche a seconda dello stadio di sviluppo. La percentuale di proteine oscilla molto quando gli insetti sono ancora neanidi e ninfe, mentre, raggiunta la fase adulta, questo valore si innalza. Nel caso della mosca nera soldato il contenuto amminoacidico delle larve non è condizionato da fattori esterni nella stessa misura degli altri componenti nutrizionali; tuttavia, studi hanno mostrato che esso varia nel corso del ciclo vitale delle larve, con livelli maggiori di amminoacidi nelle larve più giovani, solitamente tra i 4 e i 6 giorni di vita (Liu *et al.*, 2017).

Lo studio condotto da Bußler *et al.*, 2016 si è concentrato sul capire l'effetto del contenuto di lipidi sulle proprietà della farina di mosca nera soldato. È stato dimostrato come un alto contenuto di lipidi impatti negativamente sulle proprietà funzionali delle proteine e che tramite vari procedimenti di rimozione della frazione lipidica è possibile migliorare tali proprietà. Inoltre, è stato anche studiato come il solvente utilizzato per l'estrazione delle proteine impatti sulla qualità delle proteine e dopo aver testato vari solventi, il 2-metilossolano è stato indicato come il più efficace nel produrre proteine di alta qualità (Ravi *et al.*, 2019).

Una delle problematiche più importanti nel determinare le proprietà funzionali delle proteine di insetti è la mancanza di standardizzazione del metodo di estrazione. Alcuni studi

evidenziano come il metodo di estrazione influenzi molto le proprietà funzionali delle proteine (Bußler *et al.*, 2016; Ravi *et al.*, 2019). L'idrolisi enzimatica con proteasi di *Bacillus licheniformis* è stata utilizzata per purificare le proteine estratte dagli insetti ed è stato riscontrato come sotto determinate condizioni possa rappresentare un metodo efficace per migliorarne le proprietà funzionali (Leni *et al.*, 2020). In uno studio condotto da Leni *et al.*, nel 2020, la percentuale di idrolisi è stata identificata come fattore influente sulle proprietà funzionali delle proteine di insetti, mentre tempi prolungati di idrolisi portano ad una riduzione di alcune proprietà.

Gli insetti sono da considerare anche un'interessante fonte di lipidi. Womeni *et al.*, 2009, mostra il contenuto e la composizione di oli estratti da vari insetti. I loro oli si mostrano essere ricchi in acidi grassi polinsaturi, e frequentemente presentano l'acido linoleico e l'alfa-linoleico. Questi due acidi grassi sono degli importantissimi acidi grassi essenziali e sono principalmente conosciuti per le loro proprietà benefiche. Altro aspetto importante è la presenza di acidi grassi omega 3 e omega 6. La composizione lipidica, così come quella proteica, è determinata dal substrato di crescita impiegato. La presenza di acidi grassi insaturi in grandi quantitativi ha una problematica legata all'irrancidimento.

Nei grilli domestici i lipidi si trovano sotto forma di trigliceridi, all'interno degli adipociti unitamente al glicogeno. Sono la forma più comune di lipidi e agiscono come riserva energetica degli animali (Solunetti, 2006). I trigliceridi sono costituiti da una molecola di glicerolo esterificata con tre molecole di acido grasso. Gli acidi grassi maggiormente presenti nei grilli domestici sono: acido linoleico, oleico, palmitico e stearico, e piccole quantità di acido palmitoleico, miristico e linolenico (Hutchins e Martin, 1968).

Oltre ad essere una riserva di energia nel corpo, i grassi aiutano l'assorbimento di alcune vitamine e minerali e svolgono un ruolo chiave nelle diverse funzioni corporee (Harvard Medical School, 2015).

Secondo vari studi, le larve di mosca soldato nera risultano avere un alto contenuto di acidi grassi saturi. L'acido laurico (C12:0) è di gran lunga l'acido grasso più abbondante ed è ritenuto responsabile di attività antimicrobica nei confronti di batteri gram positivi (Caligiani *et al.*, 2019; Meneguz *et al.*, 2018). A esso seguono alte concentrazioni di acido oleico (C18:1), acido palmitico (C16:0) e acido linoleico (C18:2) (Caligiani *et al.*, 2019). Il loro profilo in acidi grassi è

il più influenzato dalla dieta delle larve; alcuni studi mostrano come sia possibile manipolarlo variando il substrato nutrizionale delle larve.

L'età delle larve è un altro elemento che ha un forte impatto sul profilo lipidico, con un incremento in acidi grassi saturi e diminuzione di quelli insaturi nelle larve più mature (Liu *et al.*, 2017).

Gli insetti, anche dal punto di vista dei micronutrienti come vitamine e minerali, rappresentano una interessante fonte nutritiva. Nella letteratura scientifica si afferma che il contenuto di micronutrienti negli insetti è molto vario e cambia a seconda di specie, ordini, stadio di sviluppo e alimentazione (Van Huis *et al.*, 2013). Gli insetti sono anche una ricca fonte di ferro.

Nello specifico, circa il 3% della massa corporea dei grilli domestici è costituito da minerali come fosforo, potassio, calcio, magnesio e zolfo. Inoltre, si possono trovare piccole quantità di zinco, manganese, ferro, rame, alluminio e sodio (Defoliart *et al.*, 1992).

Inoltre, gli insetti sono anche un'ottima fonte vitaminica. Uno studio condotto da Bukkens 2005 mostra che la presenza di tiamina (nota come vitamina B1, essenziale vitamina che agisce come principale co-enzima per metabolizzare i carboidrati in energia) oscilla in concentrazioni tra 0,1 e 4 mg per 100 g di sostanza secca. La riboflavina (nota come vitamina B2) oscilla tra 0,11 e 8,9 mg per 100 g di sostanza secca. La vitamina B12 invece, la quale si trova soltanto in alimenti di origine animale, è molto ben rappresentata in larve di *T. molitor* con valori di circa 0,47 microgrammi su 100 g, ma anche di *Acheta domesticus* dove si registrano valori di 5,4 microgrammi per 100 g negli adulti, fino a raggiungere gli 8,7 microgrammi nelle ninfe (Bukkens 2005; Finke, 2002). Anche il retinolo e il beta-carotene (vitamina A) sono stati trovati in alcune larve con valori molto vari. Per il retinolo il valore oscilla tra i 10 e i 30 microgrammi su 100 g di sostanza secca, mentre per il beta-carotene, il valore si attesta genericamente a meno di 20 microgrammi per 100 g. Tuttavia, gli insetti non possono essere indicati come buone fonti di vitamina A e E, le quali si trovano in maggiori concentrazioni in altri alimenti (Bukkens 2005; Finke, 2002).

Gli insetti contengono inoltre un alto tenore di fibre. La tipologia di fibra più presente negli insetti è la chitina, una fibra insolubile che costituisce principalmente il loro esoscheletro. Anche se l'azione antivirale e antitumorale della chitina e dei suoi derivati è da sempre

riportata, gli effetti immunologici della chitina sono stati riconosciuti recentemente (Muzzarelli, 2010).

Il contenuto di chitina negli insetti non è così facile da indicare, data la forte eterogeneità nella loro struttura, ma possiamo affermare che si presenti in valori compresi tra 11,6 mg a 137,2 mg per kg di sostanza secca.

La chitina è una lunga catena polimerica di N-acetil-glucosamina. Solitamente la chitina viene estratta dai crostacei mediante metodi chimici che comprendono uno step di demineralizzazione ed uno step di deproteizzazione. Successivamente può essere condotto uno step di deacetilazione per convertire la chitina in chitosano. Questi metodi sono stati studiati per applicarli anche agli insetti per isolare e purificare la chitina e convertirla in chitosano. L'efficienza di estrazione della chitina e della sua conversione in chitosano nella mosca soldato nera, ad esempio, è risultata essere inferiore rispetto a quello dei crostacei e quindi economicamente meno conveniente (Hahn *et al.*, 2020). Altri metodi alternativi come l'idrolisi enzimatica tramite proteasi o l'utilizzo di solventi eutettici attualmente risultano meno efficienti del metodo chimico, ma in futuro potrebbero essere migliorati per ottenere una resa maggiore di estrazione di chitina, proteine e grassi, senza ottenere i rifiuti generati dalla purificazione chimica (Caligiani *et al.*, 2018).

1.3 Influenza dei metodi di lavorazione ed estrazione sulla composizione nutrizionale

Come la maggior parte degli alimenti, anche i metodi di estrazione e lavorazione applicati agli insetti prima della trasformazione in mangime per animali influenzano la composizione nutrizionale (EFSA, 2015; FAO, 2013). In particolar modo, la lavorazione degli insetti dovrebbe prestare attenzione agli effetti sulla frazione proteica finale, poiché per scopi industriali alimentari, oltre al contenuto proteico e alla resa, è importante anche la qualità delle frazioni isolate. Tra le diverse tecniche che potrebbero essere utilizzate per la separazione delle proteine, i metodi chimici (per esempio, il salting out, precipitazione isoelettrica e frazionamento con solvente) sono quelli maggiormente riportati in letteratura. Un recupero proteico totale è stato ottenuto da Yi, Van e Lakemond (2016) utilizzando un pH di estrazione elevato in combinazione con NaCl su *Tenebrio molitor*. Più recentemente, uno studio condotto da Caligiani *et al.*, 2018 ha mostrato che è possibile ottenere elevate rese di estrazione sia con

alcali che con frazionamento Osborne su proteine di *Hermetia illucens*, anche se nel primo caso sono stati osservati chiari segni di degradazione delle frazioni proteiche.

Di solito, le frazioni proteiche degli insetti, raccolte dopo l'estrazione, mostrano un caratteristico colore scuro, possibile segno di modificazione proteica (Bußler, Rumpold, Jander, Rawel, & Schluter, 2016; Yi *et al.*, 2013; Zhao, Vasquez- Gutierrez, Johansson, Landberg e Langton, 2016). Anche l'imbrunimento che si verifica durante la macinazione degli insetti può influenzare sia gli aspetti visivi del cibo contenente proteine di insetti sia le proprietà delle proteine (nutrizionali e tecnologiche), quindi potrebbe rappresentare un ostacolo per ampie applicazioni delle proteine di insetti negli alimenti (Sosa & Fogliano, 2017). Pertanto, è importante acquisire conoscenze sui meccanismi coinvolti nell'imbrunimento e sulla loro influenza sulla frazione proteica degli insetti, al fine di adottare le strategie più idonee per ridurre o prevenire questo fenomeno. Alcuni studi dimostrano il ruolo delle attività enzimatiche nelle reazioni di imbrunimento e in particolare il ruolo della fenolo ossidasi come attore principale nell'imbrunimento (Janssen *et al.*, 2017). Il colore scuro osservato indica che durante la lavorazione avvengono reazioni chimiche.

Le fenolo ossidasi degli insetti sono presenti negli emociti, nel plasma e nel tegumento (Ashida *et al.*, 1990; Charalambidis *et al.*, 1996). Negli insetti sono presenti due tipi distinti di fenolossidasi: le tirosinasi (presenti negli emociti, plasma e tegumento) e le laccasi (presenti solo nel tegumento) (Ashida *et al.*, 1990; Charalambidis *et al.*, 1996). Mentre la tirosinasi catalizza due diverse reazioni: l'idrossilazione dei monofenoli a o-difenoli (attività monofenolasica) e l'ossidazione degli o-difenoli a o-chinoni (attività difenolasica), la laccasi, invece, ossida solo i difenoli.

Le tirosinasi sono enzimi fenolossidanti contenenti rame che ossidano i substrati fenolici come la L-tirosina, utilizzando l'ossigeno molecolare come ossidante. I prodotti, o-chinoni, sono reattivi e possono diffondersi dal sito attivo dell'enzima per subire reazioni non enzimatiche (Mayer, 2006) (Figura 1).

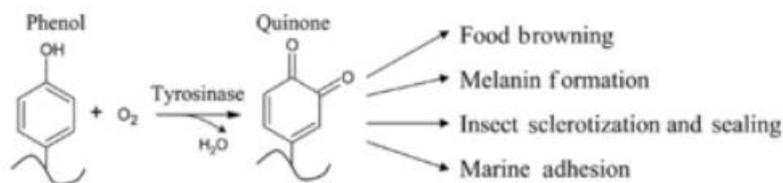


Figura 1. Formazione degli o-chinoni attraverso l'ossidazione del fenolo da parte della tirosinasi.

Tipicamente, queste reazioni sono responsabili dei colori scuri generati durante processi così diversi come l'imbrunimento enzimatico del cibo, la sintesi dei pigmenti di melanina e la sclerotizzazione (Riley, 1997). In particolare, nella sclerotizzazione o concia del chinone i chinoni reticolano e scuriscono la cuticola dell'insetto (Sugumaran, 2002). Inoltre, gli insetti usano la tirosinasi per generare una rete reticolata che sigilla le ferite (Marmaras *et al.*, 1993; Sugumaran, 2002) e si difendono incapsulando particelle estranee (ad esempio batteri patogeni invasori) in corpi di melanina (Sugumaran, 1991).

Più precisamente, durante il processo di melanizzazione, i chinoni sono reticolati e polimerizzati in complessi pigmenti marroni, rossi o neri chiamati melanine (Fortea, Lopez-Miranda, Serrano-Martinez, Carreno, & Nunez-Delicado, 2009; Sugumaran, 2002; Sugumaran & Barek, 2016). È stato anche suggerito che i derivati chinonici generati dalla fenolo ossidasi potrebbero utilizzare componenti proteici endogeni per la sintesi della melanina negli artropodi (Figura 2) (Lee *et al.*, 2003). Questi studi mostrano che oltre alle modifiche del colore, la reazione di imbrunimento può avere conseguenze dirette e forse importanti sulla qualità delle proteine degli insetti. Le modifiche indotte dalla fenolo ossidasi (ma anche da altri enzimi) potrebbero eventualmente influenzare la qualità, l'estraibilità e la digeribilità delle proteine.

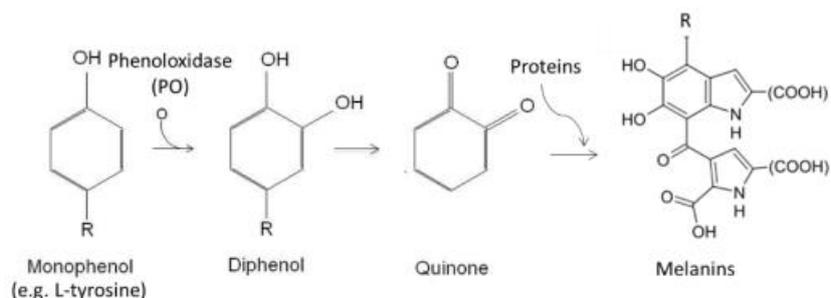


Figura 2. Processo di melanizzazione a partire dall'attività della fenolossidasi sul monofenolo.

Inoltre, gli o-chinoni generati dalla tirosinasi sono in grado di legarsi con i gruppi amminici di chitosano e chitina. Infatti, i gruppi amminici primari dei residui di glucosamina, essendo nucleofili reagiscono prontamente con gli o-chinoni generati dall'ossidazione dei fenoli catalizzata dalla tirosinasi (Sun *et al.*, 1996) (Figura 3).

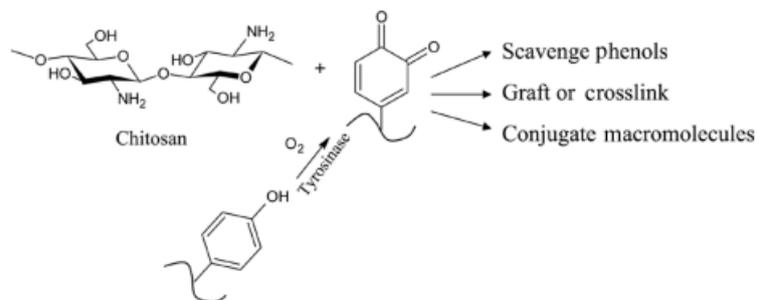


Figura 3. Accoppiamento di chinoni generati dalla tirosinasi con chitina o chitosano.

Il chitosano è un polisaccaride lineare composto da D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina, legate tramite legami $\beta(1-4)$ ed ottenuto mediante parziale deacetilazione della chitina (tipicamente il grado di acetilazione è inferiore al 20%).

L'osservazione che la tirosinasi può iniziare l'accoppiamento covalente di fenoli a basso peso molecolare su chitina e chitosano ha suggerito il potenziale per la tirosinasi di generare chitine e chitosani innestati con proprietà strutturalmente e funzionalmente modificate (Payne *et al.*, 1996). Per alcuni fenoli, gli o-chinoni generati dalla tirosinasi sembrano essere in grado di formare legami multipli e possono quindi portare alla reticolazione di chitina e chitosano (Chen *et al.*, 2001). La capacità della tirosinasi di attivare substrati macromolecolari è stata considerata un mezzo per legare peptidi, proteine e persino polimeri sintetici a chitina e chitosano (Aberg *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2001).

Inoltre, lo studio condotto da (Bußler *et al.*, 2016), mostra che la fase di rimozione della frazione proteica porta ad avere un colore più acceso e un indice di imbrunimento più basso, che può essere più desiderabile rispetto a una farina molto scura.

1.3.1 Qualità nutrizionale della farina di insetto in funzione del metodo di uccisione

Anche il metodo di uccisione ha un importante effetto sulla qualità nutrizionale della farina. In particolare, alcuni studi dimostrano che il metodo di uccisione influenza le reazioni enzimatiche sopra citate.

Dal punto di vista del contenuto di amminoacidi, e quindi la qualità delle proteine, l'uccisione tramite congelamento attiva percorsi enzimatici che portano ad una perdita di cisteina e lisina, mentre tramite bollitura o *blanching* non si osservano effetti negativi sul profilo amminoacidico. Questo è dovuto al fatto che cisteina e lisina sono coinvolte nell'imbrunimento enzimatico (Leni, *et al.*, 2019).

L'alterazione della frazione amminoacidica totale, con la notevole diminuzione di cisteina e lisina mediante l'uccisione per congelamento è stata osservata anche nello studio condotto da Caligiani *et al.*, 2019, sostenendo che questi amminoacidi sono probabilmente coinvolti nel processo di melanizzazione, reagendo con i chinoni con le loro catene laterali, anche quando sono legati alle proteine, quindi la loro quantità disponibile diminuisce. Inoltre, sempre in quest'ultimo studio, in modo piuttosto notevole, e un po' inaspettatamente, si è notato che la tirosina totale sembra non diminuire dalle prepupe sbollentate a quelle congelate, indicando che il processo di melanizzazione riguarda principalmente la tirosina libera e non quella totale.

La melanizzazione ha anche l'effetto di modificare le proprietà di solubilizzazione delle proteine, diminuendo la loro solubilità ed estraibilità in condizioni più blande, possibile segno di aggregazione proteica (Caligiani *et al.*, 2019).

Inoltre, lo stato fisico degli insetti (interi o macinati) e il metodo di uccisione influenza molto anche la suscettibilità proteica alla proteolisi. In particolar modo, come mostra lo studio condotto da Caligiani *et al.*, 2019, gli insetti interi, rispetto a quelli macinati, mostrano livelli inferiori di azoto rilasciato nei surnatanti, data la minore superficie di contatto. Inoltre, tale studio mostra anche che le prepupe sbollentate rilasciano in soluzione più azoto rispetto a quelle congelate (circa il 79% contro il 53%). Questo indica che la denaturazione delle proteine gioca un ruolo sull'accessibilità degli enzimi ai legami peptidici, ma l'effetto significativo è correlato al trattamento termico applicato come metodo di abbattimento. Considerando che la distribuzione dell'azoto tra proteine e chitina è di circa 80:20, tale studio mostra che il contenuto proteico totale rilasciato in soluzione è del 97% nel caso delle prepupe sbollentate, mentre questo valore per le prepupe congelate scende del 68% del contenuto proteico totale.

Inoltre, è stato ipotizzato che gli insetti uccisi per congelamento subiscono una maggiore aggregazione delle proteine, rendendole meno suscettibili all'attacco enzimatico. Questa

aggregazione è probabilmente legata al processo di melanizzazione, ma forse anche agli altri cambiamenti metabolici indotti dalla risposta di stress dell'insetto alla bassa temperatura.

D'altra parte, il *blanching* non solo blocca la melanizzazione e altri fenomeni di aggregazione proteica, ma probabilmente ha anche l'effetto di denaturare le proteine, rendendole più suscettibili alla digestione enzimatica. Ciò ha forti implicazioni non solo sull'estraibilità delle proteine in soluzione mediante enzimi, ma anche sull'eventuale digeribilità delle frazioni proteiche utilizzate come ingredienti per alimenti o mangimi. Questo significa che una frazione proteica estratta da insetti uccisi per congelamento potrebbe avere un profilo di digeribilità peggiore.

Invece dal punto di vista della frazione lipidica, l'uccisione per congelamento incide in maniera maggiore sulla qualità dei lipidi rispetto alla bollitura o *blanching*. Questo perché la tecnica della bollitura o del *blanching* permette di inattivare le lipasi, ottenendo così una frazione lipidica meno alterata e più stabile all'irrancidimento. Al contrario, il metodo per congelamento sembra stimolare l'azione delle lipasi, con un conseguente rilascio di acidi grassi liberi, una minore stabilità nel tempo e una minore possibilità di applicazione (Caligiani *et al.*, 2018).

1.4 Insetti nell'alimentazione animale

La produzione di mangimi per animali è sempre più in competizione per risorse come terra, acqua e concimi con il settore alimentare ed energetico e questo comporta un aumento della pressione ambientale (ad esempio su fornitura di acqua, deforestazione e impoverimento dei terreni nei paesi produttori).

La ricerca di nuove e più sostenibili fonti di proteine per aiutare a ridurre i rischi legati al cambiamento climatico dell'agricoltura tradizionale ha portato a un aumento dell'attenzione verso l'utilizzo degli insetti come nuova fonte alimentare umana e animale (van Huis *et al.*, 2013). Molti insetti edibili hanno un contenuto di proteine simile a quello di altri animali da allevamento e contengono tutti gli amminoacidi essenziali richiesti dall'uomo (Bukkens, 2005). Gli insetti costituiscono un'interessante alternativa come fonte proteica nell'alimentazione animale. Inoltre, sono ricchi di acidi grassi, vitamine e sali minerali.

Come citato nella parte introduttiva, dalla ricerca, emergono molti fattori che indicano come gli insetti abbiano anche molte possibilità di contribuire alla produzione di mangimi animali,

in particolare mangimi utilizzati in ambito ittico e suinicolo. In queste specie animali, gli insetti possono rappresentare un ottimo ingrediente da tenere in considerazione per la formulazione di mangimi innovativi, non solo per le loro qualità nutrizionali che permettono di conferire al mangime ma anche perché rappresentano già una fonte di alimentazione naturale.

Tra tutte le specie promettenti per la formulazione di mangimi animali, le più interessanti possono essere considerate le mosche nere soldato (*H. illucens*), larve di mosca comune (*M. domestica*), larve di baco da seta (*B. mori*) e larve di tenebrio mugnaio (*T. molitor*). Anche alcune specie di Ortotteri (tra cui *A. domesticus*), Lepidotteri e gli Isotteri sono delle altre valide alternative, seppure meno impiegate.

Queste specie essendo le più usate, possono vantare la presenza di una letteratura scientifica molto vasta che ne tratta al meglio le proprietà e i possibili impieghi.

Nello specifico, la mosca soldato nera presenta un contenuto di proteine che va dal 37 al 63% della sostanza secca e con un contenuto di micronutrienti quali, ferro, zinco e vitamine efficace a garantire lo sviluppo e il benessere degli animali (Rumpold & Schluter, 2013). Per quanto riguarda invece *Acheta domesticus* nella formulazione di mangimi animali, nonostante lo scarso utilizzo, è da considerare un'ottima alternativa visto le ottime proprietà nutrizionali descritte nel paragrafo 1.2 come l'elevato contenuto di proteine e minerali.

Nel settore dell'acquacoltura, diverse specie di insetti possono potenzialmente essere considerate per l'inclusione nella dieta dei pesci. Sebbene esistano diversi articoli scientifici riguardo l'impiego di farina di insetti in mangimi per pesci d'acqua dolce (Henry *et al.*, 2015), pochi studi si sono concentrati sugli effetti di questo ingrediente su salmonidi o specie marine. I risultati degli attuali studi differiscono molto a seconda della specie ittica considerata, la percentuale di inclusione della farina di insetto e la formulazione del mangime. Includere un nuovo ingrediente significa l'esclusione di un altro dalla dieta. In molti studi, a essere sostituita è proprio la farina di pesce; tuttavia, altri studi hanno sostituito ingredienti di origine vegetale, dando così risultati tra loro non comparabili.

Dagli studi presenti in letteratura emergono aspetti importanti nell'utilizzo della mosca soldato nera come mangime per pesci. In particolar modo, può portare ad un risparmio sull'utilizzo sia della farina di pesce che dell'olio di pesce senza impattare negativamente la capacità di crescita del pesce (St-Hilaire *et al.*, 2017; Renna *et al.*, 2017). Di contro però, gli

autori hanno riscontrato un generale peggioramento delle performance a livelli di inclusione superiori al 33%. Gli autori hanno concluso che la chitina e la modificazione del profilo lipidico della dieta, in particolar modo l'aumento degli acidi grassi saturi e la riduzione di quelli insaturi, sono gli elementi responsabili della diminuzione di ingestione di mangime e anche della digeribilità e quindi della biodisponibilità dei nutrienti.

Oltre alla mosca soldato nera anche i grilli appartenenti alla specie *G. bimaculatus* e *Acheta domesticus* potrebbero essere incorporate con successo come fonte proteica per l'alimentazione dei pesci (Perera. GSC *et al.*, 2022). Data l'assenza di effetti negativi sulla crescita e sulle prestazioni riproduttive di *P. reticulata*, gli autori hanno confermato che la farina di pesce potrebbe essere sostituita con successo da entrambe le farine di insetti.

Altri studi mostrano invece che mangimi formulati con *A. domesticus* in quantità elevate (>60%) possono causare effetti negativi sugli avannotti di tilapia ibrida rossa, in particolare sul fegato e sulle prestazioni di crescita (Lee. S.W *et al.*, 2017). Pertanto, non è consigliabile sostituire completamente la farina di pesce con la farina di grilli domestici.

Gli studi riguardanti l'impiego di farine di insetto per la produzione di mangimi per pesci si sono finora concentrati soprattutto sulla sostituzione della farina di pesce e sul comprendere le differenze di performance di crescita, che rappresentano i primi passi obbligatori per lo sviluppo di un nuovo ingrediente mangimistico. Altri aspetti, sia positivi che negativi, della farina di insetto sul benessere dei pesci devono ancora essere valutati nel tempo, come la salute intestinale, cambiamenti nel microbiota e problemi immunologici. Si deve anche prestare attenzione all'importanza del processo di trasformazione (rimozione del grasso, isolamento proteico, idrolisi), che può influenzare molto la qualità della farina di insetto. L'effetto della chitina, invece, è ancora poco studiato e non c'è ancora evidenza assoluta del suo ruolo sull'organismo. Inoltre, il ruolo del substrato di crescita delle larve sulla qualità finale della farina è di grande importanza, in quanto influisce in parte sulla composizione nutrizionale e sulla presenza di sostanze indesiderate.

Infine, sebbene alcuni studi preliminari sull'accettabilità da parte del consumatore abbiano mostrato un'attitudine positiva di questi ultimi verso pesci alimentati con insetti (Verbeke, 2015; Mancuso *et al.*, 2016), occorreranno ulteriori studi quando questi prodotti verranno immessi sul mercato.

Anche nel settore dell'avicoltura, molti insetti, tra cui grilli, mosche, scarafaggi, termiti e altri, sono stati proposti come fonte proteica complementare per il mangime degli avicoli (Ravindran & Blair, 1993). Proteine animali e vegetali forniscono gli aminoacidi necessari all'alimentazione dei polli (tra tutti lisina, metionina e cisteina).

La chitina può avere un effetto benefico sul sistema immunitario degli avicoli. A tal proposito, recenti ricerche hanno evidenziato come, questa molecola, riesca a stimolare la produzione di citochine, il reclutamento leucocitario e l'attivazione di alcune tipologie di macrofagi (Komi *et al.*, 2018). Per cui, alimentando il pollame con mangimi a base di insetti verrebbe ridotto l'impiego di antibiotici, diminuendo così il rischio di sviluppo di ceppi batterici resistenti, potenziale minaccia di infezione per il genere umano.

Anche nel settore avicolo, l'utilizzo della mosca nera soldato come mangime presenta degli aspetti molto interessanti visto l'ottima composizione aminoacidica (vedi paragrafo 1.2). Per esempio, lo studio condotto da Marono *et al.*, 2017, mostra che l'utilizzo di larve di *Hermetia illucens* possono rappresentare un'interessante fonte di proteine per le galline ovaiole, in grado di sostenere la produzione di uova senza avere effetti negativi sul benessere animale. Tuttavia, quando usate in totale sostituzione alla soia, hanno un effetto negativo sul consumo di mangime e quindi sulle performance produttive, nonostante il rapporto di conversione risulti migliore (Figura 4). Questo forse può essere dovuto al colore più scuro delle larve rispetto alla soia. Una soluzione può essere quella di ridurre la percentuale di farina di insetto oppure di nutrire con insetti le galline già dal primo giorno di vita (Marono *et al.*, 2017).

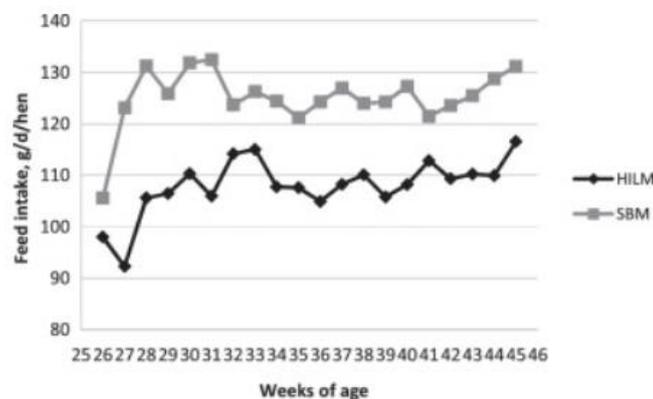


Figura 4 consumo di mangime di larve di *Hermetia illucens larvae meal* (HILM) e *soyabean meal* (SBM) dei due gruppi di galline. Fonte immagine: Marono *et al.*, 2017

Inoltre, un recente studio condotto Schiavone *et al.*, 2018, ha invece testato l'utilizzo dei lipidi estratti dalle larve di mosca soldato come sostituito dell'olio di soia nella dieta di polli da carne. A termine dello studio hanno concluso che una sostituzione del 50% o del 100% dell'olio di soia con lipidi di mosca soldato nera garantiva performance produttive soddisfacenti, sia in termini di crescita dell'animale sia per quanto riguarda la qualità della carne.

Questo ha portato a pensare che le larve di mosca soldato nera possano rappresentare un promettente nuovo ingrediente per la dieta dei polli da carne, anche in relazione al fatto che per i polli il gradimento verso la nuova dieta è risultato pari alla normale dieta.

Anche i grilli domestici (*Acheta domesticus*) possono essere considerati un ulteriore nuovo ingrediente per la dieta dei polli da carne. A tal proposito, nello studio condotto da Nieto *et al.*, 2023, è stato rivelato che l'inclusione di un'alta percentuale di farina di insetti nella dieta dei pulcini a crescita lenta durante il loro primo mese di vita influisce negativamente sulle loro prestazioni produttive, contrariamente a quanto avviene nel secondo mese in poi. Questi risultati concordano con quelli di Nieto *et al.*, 2022, nel loro lavoro con *Tenebrio molitor*, ma in contrasto con quelli trovati da Nakagaki *et al.*, 1987, che non hanno mostrato differenze nel tasso di crescita dei pulcini causate dalla sostituzione della farina di soia con farina di grilli durante i primi 14 giorni di vita.

Alla luce di questi risultati, si potrebbe affermare che l'inclusione di alte concentrazioni di farina di grillo domestico (>10%) nella dieta dei polli durante le prime fasi della loro vita potrebbe essere dannosa, poiché disinibisce i polli dal consumo del mangime e, quindi, influisce negativamente sul loro tasso di crescita. Altri studi condotti da Wang *et al.*, 2005, hanno sostenuto che l'uso della farina di grilli nelle diete isoproteiche e isoenergetiche del pollame era più produttivo e benefico a bassi livelli di inclusione. Questo dato potrebbe essere estrapolato ad altre specie di insetti, come nel caso della farina di larvale di *Tenebrio molitor* (Biasato *et al.*, 2017, 2018; Nieto *et al.*, 2022) e nel caso precedentemente descritto di *Hermetia illucens*.

Pertanto, la farina di *Acheta domesticus* può essere un'interessante fonte proteica da includere nei pulcini a crescita lenta come sostituto parziale della farina di soia durante il primo mese di vita dei pulcini e come sostituto completo da quel momento in poi fino alla fine del ciclo produttivo.

1.5 Aspetti sensoriali

Numerosi studi sono stati condotti per capire se esiste un “effetto modifica” delle caratteristiche sensoriali della carne relativa ad animali nutriti con farine di insetto.

A tal proposito, Sealey *et al.*, 2011, utilizzando un test sensoriale, non hanno rilevato differenze sensoriali distinguibili tra i pesci alimentati con le *prepupae* di *Hermetia illucens* e quelli alimentati con una dieta di controllo con farina di pesce.

Mentre in uno studio condotto da Borgogno *et al.*, 2017, è stata riscontrata una predominanza di sapore metallico nei filetti di pesce nutriti con diete a base di *Hermetia illucens* che potrebbero essere percepite come poco familiari al consumatore, mentre Belghit *et al.*, 2019, non hanno riportato alcuna relazione significativa tra il livello di inclusione dietetica di *Hermetia illucens* e nessuna delle proprietà sensoriali valutate.

Khan *et al.*, 2018, hanno condotto uno studio per confrontare le caratteristiche organolettiche della carne di pollo da carne alimentata con diversi tipi di farina di insetti (farina di vermi, farina di bachi da seta e verme della farina) e non hanno riscontrato effetti sul profilo sensoriale.

Uno studio condotto da Sun *et al.*, 2013 ha trovato punteggi significativamente più alti per la masticabilità, il sapore, l'aroma e l'apprezzamento generale per la carne del petto e della coscia dei polli da carne maschi, che sono stati allevati su prati contenenti una grande popolazione di cavallette piuttosto che un campione di controllo allevato con una dieta a base di mais e soia. Invece, non sono state rilevate differenze significative rispetto al colore e alla succosità tra i due trattamenti. Tuttavia, nel loro studio, come affermato dagli autori, era difficile capire se gli attributi sensoriali superiori potessero essere dovuti all'alimentazione della cavalletta o alla scelta dietetica più ampia e all'aumento della locomozione offerti in un ambiente ruspante.

Inoltre, Feng *et al.*, 1985 nel loro studio hanno studiato le differenze tra la carne dei broiler alimentati con grilli macinati e con farina di mais e soia. Tuttavia, non hanno riscontrato differenze significative nel gusto dei due campioni ($p > 0,05$).

In conclusione, dagli studi sopracitati, la sostituzione di componenti di farina di pesce/soia nella dieta di alcune specie ittiche e avicole di allevamento non presenta effetti negativi sul sapore, sulla succosità o sulla consistenza dei prodotti finali.

2. Scopo della tesi

Negli ultimi anni, gli insetti sono stati identificati come un'importante futura fonte di materie prime sostenibili per l'alimentazione degli animali in molti paesi del mondo. In primo luogo, gli insetti soddisfano le esigenze dietetiche degli animali in termini di composizione nutrizionale, profilo amminoacidico e, come parte della dieta naturale di diverse specie animali (Makkar *et al.*, 2014).

Lo scopo del presente lavoro è valutare l'importanza del frazionamento degli insetti, in particolare, *Acheta domesticus* in diversi stadi di sviluppo nei suoi costituenti principali (proteine, lipidi, chitina e minerali) per la formulazione di mangimi aventi una determinata quantità di proteine.

I fattori presi in considerazione e, che potrebbero influenzare l'estrazione delle proteine sono:

- Il metodo di uccisione (bollitura o blanching e congelamento)
- Il diverso stadio di sviluppo degli insetti
- I possibili legami tra chitina e proteine tramite il processo di melanizzazione

3. Materiali e metodi

3.1 Campioni

I campioni di insetto di *Acheta domesticus* (grillo domestico), in diversi stadi del ciclo vitale, utilizzate nell'ambito di questa tesi, sono stati forniti da Bugslab (Parma, Italia). I differenti stadi di sviluppo erano i seguenti: 1 giorno (neanidi), 20, 28 e 33 giorni (ninfe) e 45 giorni (adulti).

I grilli *Acheta Domesticus* sono stati sacrificati con due metodi di uccisione diversi: i) mediante congelamento a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 20 minuti e ii) scottatura in acqua bollente a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 40 secondi.

Successivamente tutti i campioni sono stati macinati mediante macinino da laboratorio IKA A10, e conservati in congelatore ad una temperatura di $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in sacchetti con chiusura lampo fino al momento delle analisi.

Nella Fig.5 sono visualizzati i campioni dopo la macinazione.

3.2 Analisi centesimale di *Acheta domesticus*

La caratterizzazione del contenuto di umidità, lipidi, e minerali è stata condotta utilizzando la procedura standard (AOAC, 2002), mentre per la determinazione del contenuto di proteine e chitina è stato applicato il metodo UPLC-MS (Luparelli et al., 2022).

3.2.1 Determinazione del contenuto di umidità

Al fine di comprendere il contenuto di acqua all'interno dell'insetto, considerando il diverso metodo di uccisione ed il diverso stadio di sviluppo, è stato necessario determinare il contenuto di umidità residua nei campioni.

Strumentazione:

- Bilancia analitica
- Stufa
- Essiccatore

Procedimento:

Al fine di eliminare ogni residuo di umidità, i cristallizzatori sono stati posti in stufa a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 30 minuti. Successivamente, sono stati lasciati freddare all'interno di un essiccatore di

modo che l'agente assorbente "gel di silice" in esso presente, elimini eventuali residui di umidità rimasti.

Dopodiché, sono stati pesati 0.5 g circa di insetto *Acheta domesticus* all'interno di un cristallizzatore tarato (operazione fatta in duplicato per ciascun campione) e sono stati posti in stufa a 105°C per 24 ore. Una volta raffreddati in essiccatore, i campioni sono stati ripesati ed è stato determinato il contenuto di umidità in grammi, poi rapportato in percentuale sul campione.

3.2.2 Determinazione del contenuto di lipidi

Per l'estrazione dei lipidi dai campioni è stato utilizzato l'estrattore Soxhlet (SER 148/3 VELP SCIENTIFICA, Usmate Velate, Italy), un apparecchio capace di estrarre i grassi dal campione usando un solvente volatile.

Strumentazione:

- Bilancia analitica
- Soxhlet SER 148 VELP, SCIENTIFIC
- Bicchierini per Soxhlet
- Ditali di cellulosa

Reagenti:

- Dietiletere

Procedimento:

5 g di campione finemente macinato sono stati inseriti in un ditale di cellulosa tra due strati di cotone. I ditali sono stati quindi fissati allo strumento mediante l'ausilio di un fermaditale di metallo e una calamita.

Successivamente, i becher precedentemente tarati sono stati riempiti con 70 mL di dietiletere e posizionati sulla piastra riscaldante sotto a ciascun ditale.

Il programma di estrazione si compone di tre fasi di estrazione successive di diversa durata:

1. Immersione dei ditali nel solvente (60 minuti)
2. Lavaggio (30 minuti)

3. Recupero del solvente (15 minuti)

Il programma di estrazione prevede il raggiungimento di una temperatura di lavoro pari a 130°C.

Durante la fase di immersione il ditale di cellulosa contenente il campione è immerso nel solvente in ebollizione che, continuando ad evaporare e a condensare, esegue l'estrazione "a caldo". Successivamente, nella fase di lavaggio, il ditale viene sospeso estraendolo dal recipiente contenente il solvente che viene raccolto nel condensatore ed utilizzato per il lavaggio finale del campione. Infine, nella fase di recupero del solvente tutto il solvente viene fatto evaporare ottenendo quindi l'estratto di grasso.

Dopo il completamento del programma di estrazione, i becher sono stati rimossi dall'apparecchiatura e posti sotto cappa di modo da far evaporare il solvente rimanente. Una volta avvenuto il completo raffreddamento di essi sono stati nuovamente pesati.

3.2.3 Determinazione del contenuto di ceneri

Strumentazione:

- Crogioli in ceramica
- Muffola
- Pinza metallica

Procedimento:

Il contenuto di minerali è stato calcolato partendo dai campioni macinati.

Per ciascun campione sono stati pesati circa 0.25 grammi all'interno di crogioli tarati. Successivamente i campioni sono stati messi all'interno di una muffola a una temperatura di 550 °C per 5 ore per far avvenire la mineralizzazione. Dopodiché, attraverso l'utilizzo di una pinza metallica sono stati estratti e lasciati raffreddare all'interno di un essiccatore e nuovamente pesati per la determinazione del contenuto di ceneri.

3.2.4 Determinazione del contenuto di proteine e chitina mediante UPLC-MS

La quantificazione degli amminoacidi e della N-acetilglucosamina rilasciati rispettivamente dalle proteine e dalla chitina dopo l'idrolisi acida totale, è stata effettuata mediante analisi UPLC-MS ed eseguita utilizzando un sistema Waters ACQUITY Ultra Performance LC.

L'UPLC-MS è una tecnica analitica che utilizza la cromatografia liquida (Ultra Performance Liquid Chromatography) come sistema di separazione e la spettrometria di massa come sistema di rilevamento. Essa basa il proprio principio di funzionamento sulla separazione degli analiti del campione mediante cromatografia liquida in funzione del rapporto massa/carica (m/z).

I campioni vengono inseriti all'interno di un ago capillare e ne fuoriescono sotto forma di goccioline di diametro di 1-2mm. La differenza di potenziale che si viene a creare tra l'ago e il mantello della camera determina una ionizzazione degli analiti. A causa delle loro ridotte dimensioni, il solvente evapora rapidamente da ogni gocciolina che diventa sempre più piccola.

A questo punto le molecole dell'analita cariche elettricamente verranno condotte tramite un analizzatore fino allo spettrometro di massa. Gli ioni sono separati dall'analizzatore di massa in base a diversi rapporti m/z e gli spettri di massa ottenuti nell'ordine dei rapporti m/z .

Il primo step è stato l'ottenimento degli amminoacidi e della N-acetilglucosamina mediante idrolisi acida; successivamente si è proceduto con la costruzione delle rette di calibrazione. Infine, retta e campioni sono stati derivatizzati.

3.2.4.1 Idrolisi acida di proteine e chitina

Strumentazione:

- Bilancia analitica
- Piastra ad agitazione magnetica
- Bagnetto ad olio

Reagenti:

- HCl 6M
- Norleucina (standard interno per gli amminoacidi)
- Galattosamina (standard interno per l'N acetilglucosamina)

Procedimento:

Circa 25 mg di campioni di insetti macinati (*Acheta domesticus* a vari stadi di sviluppo) sono stati pesati in provette di vetro Pyrex, miscelati direttamente con 0,6 mL di HCl 6M e idrolizzati a 110°C per 23 ore. Al termine dell'idrolisi, dopo raffreddamento dei campioni, sono stati

addizionati 0,75 mL di Norleucina 5 mM in HCl 0,1 N, utilizzato come standard interno per la determinazione degli amminoacidi totali. Gli idrolizzati sono stati filtrati con filtro buchner e portati a volume di 10 ml in matracci con acqua bidistillata.

Quindi, 900 μ L di campione ottenuto dall'idrolisi sono stati prelevati e addizionati a 16 μ L di galattosamina 46 mM, utilizzata come standard interno per la determinazione della chitina e 84 μ L di acqua bidistillata. Gli idrolizzati contenenti i due standard interni sono stati conservati a -20°C fino alla derivatizzazione.

3.2.4.2 Costruzione delle rette di calibrazione

Per la determinazione degli amminoacidi e della N-acetilglucosamina è stata eseguita la costruzione delle rette di calibrazione, come riportato da Caligiani *et al.*, 2018, con alcune modifiche. Per lo standard di N-acetilglucosamina 50 mg di chitina *practical grade* proveniente da gusci di gambero sono stati pesati in tubi di vetro Pyrex, miscelati direttamente con 0,6 mL di HCl 6 M e idrolizzati a 110 °C per 23 ore. Gli idrolizzati sono stati quindi filtrati utilizzando un filtro Buchner e portati a volume di 10 mL con acqua bidistillata. Quindi, diversi volumi di miscela standard di amminoacidi (2,5 mM) e di chitina *practical grade* idrolizzata (22,6 mM) sono stati prelevati e miscelati con diversi volumi di galattosamina (46 mM) e norleucina (5 mM). Le diverse soluzioni sono state portate a volumi diversi aggiungendo acqua bidistillata per ottenere cinque concentrazioni 1,5; 1,0; 0,1; 0,05; 0,01 mM e 3,35; 1,8; 1,0; 0,5; 0,27 mM rispettivamente per gli amminoacidi e la N-acetilglucosamina (Tabella 2).

Tabella 2. Concentrazioni dei componenti utilizzati per la costruzione dei punti delle rette.

mM AA (μ l)	mM chitina (μ l)	2,5 mM STD AA (μ l)	5 mM Norleucina (μ l)	22,6 mM Chitina <i>practical</i> <i>grade</i> (μ l)	46 mM Galatto samina (μ l)	Acqua bidistillata (μ l)	Volume finale (μ l)
/	3,53	/	/	78	8	414	500
1,5	1,8	150	5	20	4	71	250
1,0	1,0	200	10	22	8	260	500
0,1	0,5	20	10	11	8	451	500
0,05	0,27	20	20	12	16	932	1000
0,01	/	4	20	/	/	976	1000

3.2.4.3 Derivatizzazione ACQ

Per permettere l'analisi degli amminoacidi mediante UPLC-MS si necessita della derivatizzazione, mediante l'utilizzo del kit AccQ-Fluor (Waters) per aumentare la massa degli amminoacidi facendoli rientrare nel range m/z analizzabile in UPLC-MS.

A 10 μ L di campione ottenuto dall'idrolisi o della retta sono aggiunti 70 μ L di tampone borato AccQ-Fluor Borate Buffer (per stabilizzare il pH) e 20 μ L di fluoroforo AccQ-Fluor Reagent Powder 2A precedentemente ricostituito con 1 mL di Reagent Diluent 2B. Dopo una prima incubazione a temperatura ambiente per 1 minuto e successivamente dopo una seconda incubazione a 55°C per 10 minuti sono stati aggiunti 200 μ L di acqua bidistillata. Dopodiché, l'intera soluzione è stata trasferita nelle vials per l'analisi UPLC-MS.

3.2.4.4 Analisi UPLC-MS

- Strumento: ACQUITY UPLC con rivelatore ESI-MS
- Fase stazionaria: Acquity uplc peptide BEH C18, 300 A, 1,7 μ m, 2,1 mm x 150 mm (Waters)
- Eluenti:

A) H₂O + 0,1% HCOOH + 0,2% CH₃CN

B) CH₃CN + 0,1% HCOOH

- Temperatura della colonna: 35°C

- Volume iniettato: 5 μ L (per i bianchi 10 μ L)
- Flusso: 0,2 mL/min
- Tempo di analisi: 45 minuti
- Gradiente degli eluenti:
 - isocratico 100%A per 7 minuti
 - 75,6%A, 24,4%B dopo 28 minuti
 - isocratico 100%B da 29 a 32 minuti
 - isocratico 100%A da 33 a 45 minuti
- Modalità di acquisizione: Positive electrospray mode in Selected Ion Monitoring (SIM) acquisition

3.3 Protocollo di estrazione della chitina

Per l'estrazione della chitina è stato applicato il metodo descritto da Caligiani et al., 2018, con alcune modifiche. I campioni sono stati posti in stufa a 40°C per 24 ore al fine di eliminare gran parte dell'umidità presente e favorire il successivo processo estrattivo.

3.3.1 Rimozione lipidi

5 g di ciascun campione finemente macinato sono stati sottoposti come primo passaggio all'estrazione dei lipidi secondo il metodo descritto nel paragrafo 3.2.2.

3.3.2 Rimozione proteine (deproteinizzazione)

Al fine di favorire l'estrazione delle proteine, il pellet di insetti sgrassato è stato trattato con 40 mL di 1 M NaOH (1:10) in un bagnetto ad acqua a 40°C per 1 ora. Successivamente, i campioni sono stati centrifugati per 30 minuti a 3900 rpm a temperatura ambiente, ottenendo quindi la separazione del surnatante dal precipitato (pellet). Dopodiché, il pellet è stato sottoposto a una serie di lavaggi con acqua distillata fino alla neutralità.

3.3.3 Rimozione dei minerali (demineralizzazione)

Il pellet ottenuto dalla rimozione delle proteine è stato sottoposto a demineralizzazione con 40 mL di 2 N HCl per 24 ore a temperatura ambiente. Successivamente, i campioni sono stati centrifugati per 30 minuti a 3900 rpm a temperatura ambiente, ottenendo nuovamente la

separazione del surnatante dal pellet. Dopodiché, il pellet è stato lavato più volte con acqua distillata fino alla neutralità.

I procedimenti di deproteinizzazione e demineralizzazione descritti nel paragrafo 3.3.2 e nel paragrafo 3.3.3 sono stati ripetuti due volte per favorire la rimozione delle proteine e dei minerali.

3.3.4 Determinazione del contenuto chitina estratta e proteine residue mediante UPLC-MS

Sono stati pesati circa 15 mg di campioni di chitina estratta. L'analisi è stata eseguita come descritto nel paragrafo 3.2.4.

3.5 Analisi statistica

Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software IBM SPSS v.23.0 (SPSS Italia, Bologna, Italia).

Tutti i dati relativi agli esperimenti condotti sui grilli *Acheta domesticus* nei diversi stadi di crescita (1, 20, 28, 33 e 45 giorni) e uccisi con due differenti metodi (blanching e congelati) sono espressi come media \pm deviazione standard. I dati sono stati sottoposti al test T indipendente o all'analisi della varianza a una via (ANOVA) per determinare le differenze tra i campioni. Le differenze significative sono state confrontate con un livello di $p < 0,05$.

4. Risultati e discussione

In questo capitolo verranno innanzitutto riportati i risultati relativi alla composizione centesimale di *Acheta Domesticus* prendendo in considerazione il metodo di uccisione e lo stadio di sviluppo. In particolar modo, le analisi si concentrano sui tre principali componenti dell'insetto, ovvero la frazione lipidica, chitinica e proteica. Per ciascuna delle tre componenti analizzate è stato eseguito il confronto con il diverso metodo di uccisione applicato e il diverso stadio di sviluppo.

Dopo di che sono stati estratti in successione i diversi componenti fino ad arrivare al campione finale contenente principalmente chitina. Le analisi condotte sui campioni di chitina estratta, si concentrano soltanto sulla frazione chitinica e sulla frazione residua proteica. In maniera analoga ai campioni di insetto tal quale, anche per gli estratti di chitina i risultati ottenuti dalle due analisi sono state confrontate con il diverso metodo di uccisione e per stadio di sviluppo.

Successivamente verranno descritte le differenze riscontrate nella composizione amminoacidica degli insetti di *Acheta Domesticus* tal quali e negli estratti di chitina facendo particolare attenzione al quantitativo e alla tipologia di amminoacidi che sono coinvolti nel processo di melanizzazione.

Indipendentemente dal campione utilizzato per le varie analisi, tutti valori sono espressi in percentuale rispetto alla sostanza secca (DW) così da normalizzare i risultati.

4.1 Effetto del blanching o congelamento come metodi di uccisione sulla composizione centesimale di *Acheta Domesticus* nei vari stadi di sviluppo

Prima di procedere con l'analisi centesimale i campioni sono stati seccati a 40°C per eliminare la maggior parte dell'umidità presente nei grilli (circa 75%). Dopo di che i campioni sono stati macinati con un mulino IKA A10.

Le caratteristiche relative al colore erano complessivamente diverse nelle polveri di grillo ottenute dai due diversi metodi di abbattimento (congelamento e blanching). Le polveri di grillo derivanti dal blanching hanno mostrato un colore più chiaro rispetto alle polveri derivanti dal congelamento (Figura 5).

Alcuni modelli previsionali prevedono che le cuticole degli insetti nelle località geografiche più fredde, si riempiano di melanina, che scurisce la cuticola e aumenta l'assorbimento della radiazione solare (Watt, 1968; Trullas. C., *et al* 2007). Questa previsione è stata confermata in diverse specie di insetti, le cui popolazioni ad alta latitudine e/o altitudine presentano cuticole più scure e più melanizzate (Majerus, 1998). L'oscuramento della cuticola è facilitato dall'enzima fenolossidasi, che converte la dopamina in melanina (True, 2003). Tuttavia, lo stesso processo guidato dalla fenolossidasi che scurisce la cuticola aiuta anche a difendersi dagli agenti infettivi all'interno dell'emocele (Cerenius e Soderhall, 2004). Quando vengono infettati, gli emociti dell'ospite agglutinano attorno a un invasore (ad es. batteri e parassiti) e formano una capsula melanizzata. Quando la capsula si scurisce, vengono prodotti intermedi citotossici che riducono la capacità di sopravvivenza dell'organismo invasore.

Nel nostro caso i campioni di grilli sono cresciuti nella stessa località e quindi sono stati soggetti alle stesse temperature. Di conseguenza il differente colore dei grilli, indice di più o meno melanina, è influenzato da altri fattori, tra cui il metodo di uccisione.

Come dimostrato nello studio condotto da Caligiani *et al.*, 2019, infatti, il metodo di uccisione lento mediante congelamento, rispetto al blanching, provoca l'attivazione di diverse vie enzimatiche, tra cui la melanizzazione con consumo di tirosina, il che spiega il colore più scuro dei grilli uccisi per congelamento.

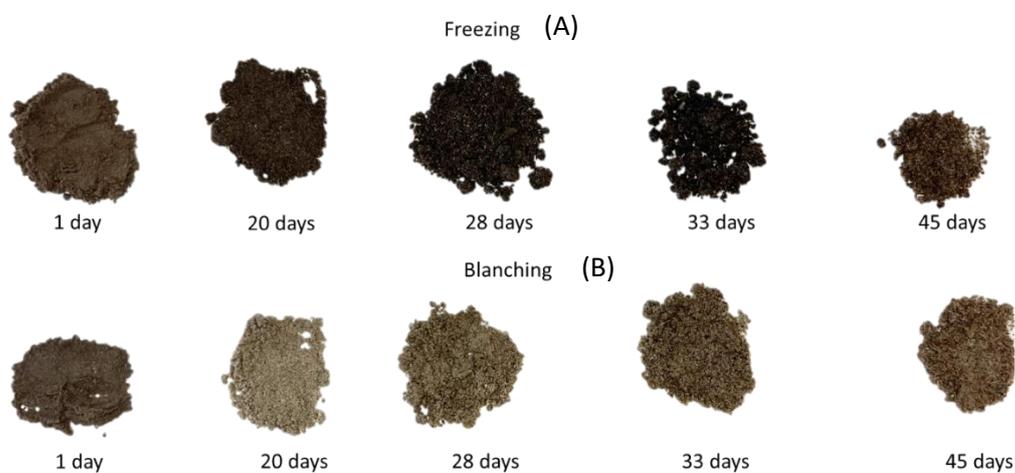


Figura 5: Immagine di *Acheta domesticus* nei vari stadi di sviluppo macinate. (A) Uccise mediante congelamento (B); Uccise mediante blanching

Inoltre, il metodo di uccisione attiva altre vie tra cui il metabolismo energetico, la lipolisi e l'imbrunimento enzimatico. Questi cambiamenti metabolici hanno un impatto anche sulla qualità nutrizionale delle proteine, con perdita di cisteina e lisina, probabilmente coinvolte nel processo di melanizzazione e imbrunimento enzimatico.

Per questo motivo è stata determinata la composizione centesimale degli insetti di *Acheta Domesticus* tal quali nei vari stadi di sviluppo, in termini di lipidi, proteine, chitina e minerali. Ciascuno dei quattro componenti è stato determinato sia per gli insetti sacrificati mediante congelamento che blanching. I risultati sono riportati in figura 6 (a-b).

Il grillo domestico appartiene all'ordine degli ortotteri, che comprende specie che si ritiene siano tra le migliori fonti proteiche a base di insetti (Sanchez-Muros *et al.*, 2014). In

particolare, sono ricchi di contenuto proteico, che può raggiungere fino a 70 g/100 g di sostanza secca (SS) e il loro livello lipidico di solito non supera di molto i 20 g/100 g di SS (Barroso *et al.*, 2014; Chakravorty *et al.*, 2014; Finke 2002). Anche la percentuale di chitina risulta confrontabile con i dati presenti in letteratura (7-8g/100 g). Possiamo dunque affermare che i dati ottenuti sulla composizione centesimale di *Acheta domesticus* sono risultati in linea con i range riportati in letteratura.

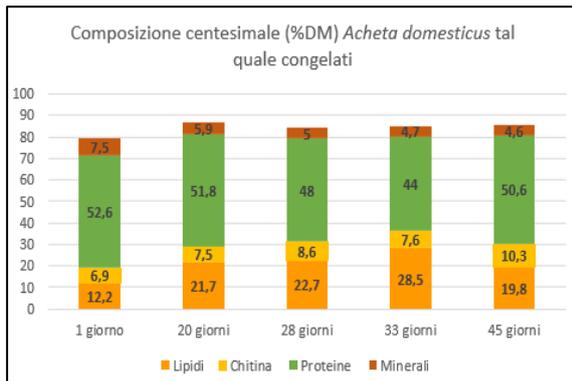


Figura 6a: Composizione centesimale (%DM) di *Acheta Domesticus* tal quale nei vari stadi di sviluppo sacrificati mediante congelamento

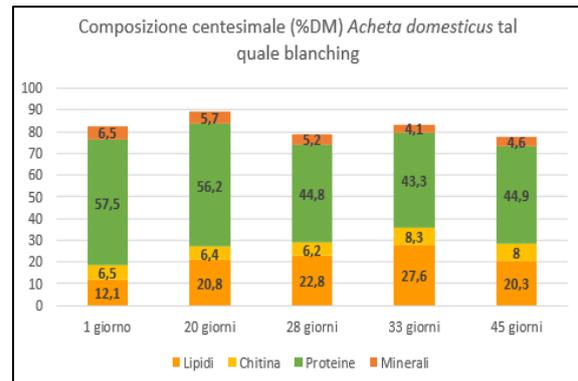


Figura 6b: Composizione centesimale (%DM) *Acheta Domesticus* tal quale nei vari stadi di sviluppo sacrificati mediante blanching

Il confronto più dettagliato per ciascuna frazione è riportato di seguito.

4.1.1 Analisi sulla frazione lipidica

Gli insetti sacrificati mediante congelamento e blanching nei vari stadi di sviluppo (1, 20, 28, 33 e 45 giorni) sono stati caratterizzati per quanto riguarda la loro quantità totale di lipidi.

Il contenuto della frazione lipidica mostra un modello di variazione con l'età pressoché simile in funzione del diverso metodo di uccisione. Confrontando il diverso metodo di abbattimento con lo stadio di sviluppo non sono risultate differenze statisticamente significative ad eccezione che per il giorno 20. Nei grilli di 20 giorni uccisi mediante congelamento si è osservato un lieve maggior contenuto di lipidi rispetto ai grilli di 20 giorni uccisi mediante blanching ($p < 0,016$) (Figura 7). I risultati ottenuti dal presente studio differiscono dallo studio condotto da Caligiani *et al.*, 2019, che hanno osservato un aumento del contenuto lipidico nelle prepupe di Black soldier fly uccise mediante blanching piuttosto che negli insetti uccisi mediante congelamento in quanto il trattamento termico è in grado di inattivare gli enzimi lipasi endogeni. Le lipasi si attivano invece durante la lenta uccisione per congelamento, e

rimangono attive dopo la morte. Nonostante nei nostri campioni non si abbiano particolari differenze tra i campioni uccisi per blanching ed i campioni uccisi per congelamento in termini quantitativi potrebbe esserci tuttavia una variazione a livello qualitativo. Sono necessarie quindi analisi più approfondite.

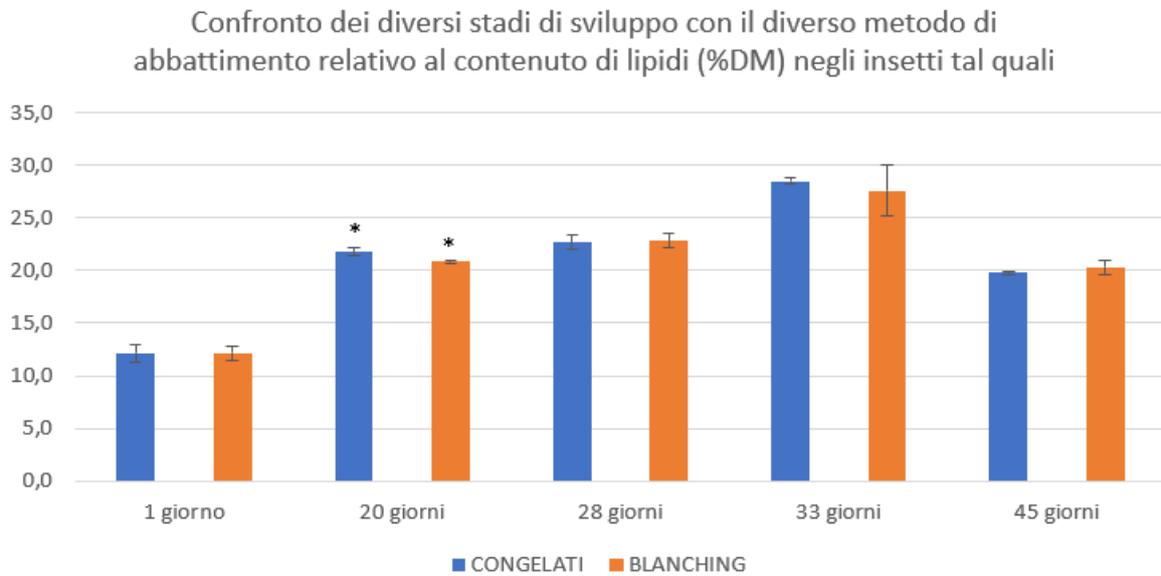


Figura 7: Confronto dei diversi stadi di sviluppo con il diverso metodo di abbattimento relativo al contenuto di lipidi (%DM) negli insetti tal quali

Come mostrato nella figura 8 (a-b), il contenuto lipidico più basso è stato riscontrato nei grilli di 1 giorno, seguito da un aumento per i 19 giorni successivi, fino a raggiungere un plateau tra il giorno di sviluppo 20 e 28. Dal giorno di sviluppo 28 fino al giorno di sviluppo 33, si è registrato un notevole incremento del contenuto di lipidi per poi diminuire al giorno 45.

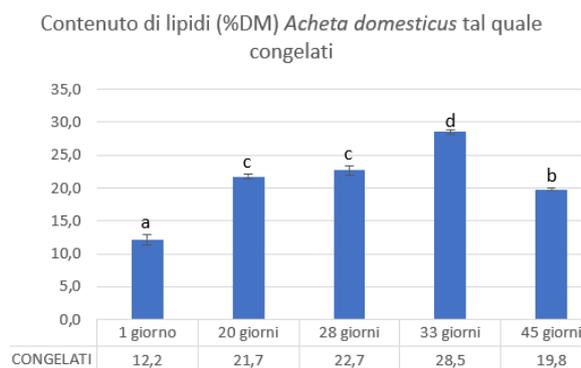


Figura 8a: Contenuto di lipidi (%DM) *Acheta domestica* tal quale nei vari stadi di sviluppo sacrificati mediante congelamento

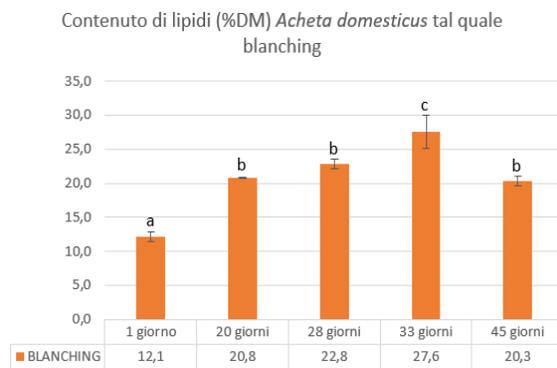


Figura 8b: Contenuto di lipidi (%DM) *Acheta domestica* tal quale nei vari stadi di sviluppo sacrificati mediante blanching

Questi risultati sono in accordo con lo studio condotto da Nowosielski. J.W, et al 1965 e Lipsitz. E. Y 1969, i quali, sostengono una marcata differenza del contenuto di grasso a partire dal quindicesimo giorno di vita adulta (quindi circa a 45 giorni del ciclo di vita dell'insetto), soprattutto nelle femmine, dove il calo sembra essere maggiore e più rapido rispetto ai maschi. Questo periodo corrisponde al primo periodo di deposizione delle uova.

Inoltre, una quantità apprezzabile di riserve energetiche immagazzinate viene solitamente trasferita dall'ultimo stadio larvale, aumentata da un'intensa alimentazione durante la prima vita adulta e successivamente mobilitata per alimentare il volo e la riproduzione intorno al 30-33 giorno (Gilbert e Chino, 1974; Arrese *et al.*, 2001). A causa dell'intensa alimentazione (Woodring *et al.*, 2007) e dell'alto tasso di sintesi lipidica (Lorenz, 2001; Lorenz e Anand, 2004), la quantità di lipidi nel corpo adiposo è più che raddoppiata in breve tempo e raggiunge il massimo il secondo giorno dopo l'emergenza adulta. Quantità considerevoli di substrati ricchi di energia vengono poi trasferite ai muscoli del volo in via di sviluppo.

4.1.2 Analisi sulla frazione chitinica

La chitina, un polimero di N-acetil- β -glucosamina, è un componente importante della cuticola dell'insetto.

Per quanto riguarda la struttura cristallina della chitina, sono stati riportati in letteratura tre tipi (α, β, γ) con caratteristiche diverse. L' α -chitina è considerata la più cristallina (Kurita, 2001) mentre la β -chitina è un materiale più morbido con una maggiore affinità per i solventi e una maggiore reattività (Cho *et al.*, 2000). La γ -chitina, è considerata una miscela o una forma intermedia di α - e β - chitina (Kurita, 2001). La maggior parte dei dati della letteratura afferma che la chitina degli insetti ha una cristallinità α . Tuttavia, Merzendorfer e Zimoch hanno riferito che tutte e tre le forme cristalline possono essere trovate negli insetti.

Tuttavia, l'alto peso molecolare della chitina, la sua insolubilità in acqua e nella maggior parte degli altri solventi, e la peculiare associazione che si verifica tra le proteine cuticolari e la chitina durante il processo di indurimento dell'esoscheletro dell'insetto rendono molto difficile l'isolamento e la caratterizzazione del polimero (Rudall 1963; Brigode *et al* 2020). La chitina potrebbe avere effetti negativi sulla consistenza del cibo o, una volta ingerita, sull'assorbimento intestinale dei nutrienti (Shahidi e Abuzaytoun, 2005). Infatti, oltre a tutte le sue caratteristiche positive (biodegradabilità, biocompatibilità, atossicità, potenziale

attività prebiotica, antimicrobica), è noto che la chitina potrebbe avere effetti antinutrizionali. Un eccesso di concentrazione di chitina nei mangimi può essere controproducente (Hahn *et al.*, 2020). Quindi la necessità di disporre di un metodo preciso e accurato per quantificare la chitina è principalmente correlata al previsto aumento della sua assunzione da alimenti/mangimi a base di insetti.

In questo progetto di tesi, la chitina è stata determinata sottoponendo i campioni a idrolisi acida. Infatti, ad oggi, quantificare la chitina dopo idrolisi in un ambiente acido forte sembrerebbe il modo migliore per ottenere valori di chitina accurati nei campioni di insetti (Luparelli *et al.*, 2022).

Dalla quantificazione della chitina ottenuta dagli insetti di *Acheta domesticus* sacrificati mediante blanching è emerso un aumento del contenuto di chitina più regolare all'aumentare dello stadio di sviluppo. Viceversa, i campioni sacrificati mediante congelamento hanno mostrato un andamento più irregolare all'aumentare dello stadio di sviluppo. In particolare, i grilli congelati allo stadio di sviluppo 20 presentavano un contenuto di chitina significativamente maggiore rispetto ai grilli appartenenti allo stadio di sviluppo 1 e 20 giorni. Dopo di che si ha un calo allo stadio di sviluppo 33, fino ad arrivare al più alto contenuto di chitina nei grilli a 45 giorni (Figura 9 (a-b)). Questo andamento irregolare potrebbe essere dovuto all'attivazione di differenti meccanismi metabolici che si verificano in seguito all'uccisione più lenta per congelamento.

Per i campioni di *Acheta domesticus* sacrificati mediante blanching, durante le prime fasi del ciclo di vita dell'insetto (1, 20 e 28), il contenuto di chitina è rimasto simile (non significativamente diverso). Valori significativamente più alti sono stati invece misurati nello stadio di sviluppo 33 e 45 giorni.

In generale, per entrambi i metodi di uccisione è emerso che i grilli nei primi stadi di sviluppo presentavano percentuali di chitina più basse mentre nello stadio di sviluppo 45 contenevano il maggior quantitativo di chitina.

Come previsto, durante la transizione dall'insetto giovane all'insetto adulto, il contenuto di chitina è aumentato gradualmente e il più alto contenuto di chitina è stato osservato negli individui adulti. Questo è causato dal processo di sclerotizzazione che diventa sempre più completo all'avanzare dello stadio di sviluppo, conferendo all'insetto una maggiore resistenza

meccanica. Allo stesso modo, in uno studio condotto da Kaya *et al.*, 2014, è stato riscontrato che il contenuto di chitina in peso secco degli scarafaggi della patata adulti (20%) era molto più alto di quello delle larve (7%).

Negli insetti emimetaboli come le cavallette e i grilli, le ninfe presentano ali e organi riproduttivi sottosviluppati rispetto all'adulto (Erdogan e Kaya, 2016). La mancanza di ali completamente sviluppate e di un esoscheletro completamente sclerotizzato può spiegare il minor contenuto di chitina che si osserva negli stadi giovanili degli insetti di *Acheta domesticus*.

Attualmente, nessuna ricerca è stata riportata sulla variazione della concentrazione di chitina estratta nelle varie fasi del ciclo di vita di *Acheta domesticus*.

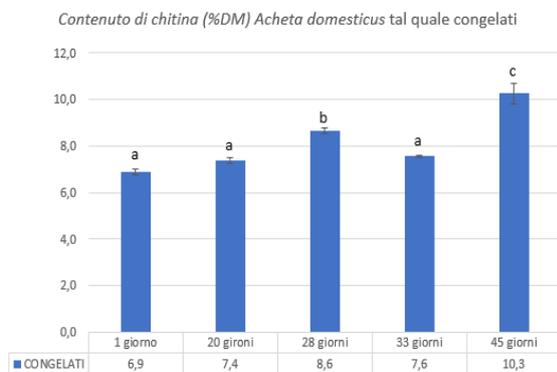


Figura 9a: Contenuto di chitina (%DM) *Acheta domesticus* tal quale nei vari stadi di sviluppo sacrificati mediante congelamento

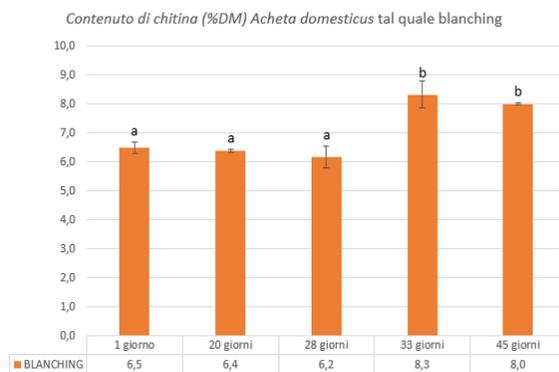


Figura 9b: Contenuto di chitina (%DM) *Acheta domesticus* tal quale nei vari stadi di sviluppo sacrificati mediante blanching

Confrontando il diverso metodo di abbattimento con lo stadio di sviluppo, sono risultate differenze statisticamente significative per i campioni di *Acheta domesticus* allo stadio di sviluppo 20, 28 e 45 giorni relative al contenuto di chitina. In particolar modo, nei campioni sacrificati mediante congelamento è stato rilevato un maggior contenuto di chitina rispetto ai campioni sacrificati mediante blanching, Figura 10. Questo potrebbe essere in accordo con il fatto che i grilli morti per congelamento, avendo una morte più lenta, hanno il tempo di proteggersi producendo melanina e indurendo l'esoscheletro. È noto, infatti, che i grilli che vivono in zone geografiche più fredde presentino una melanizzazione e sclerotizzazione più marcata (Trullas. C., *et al* 2007).

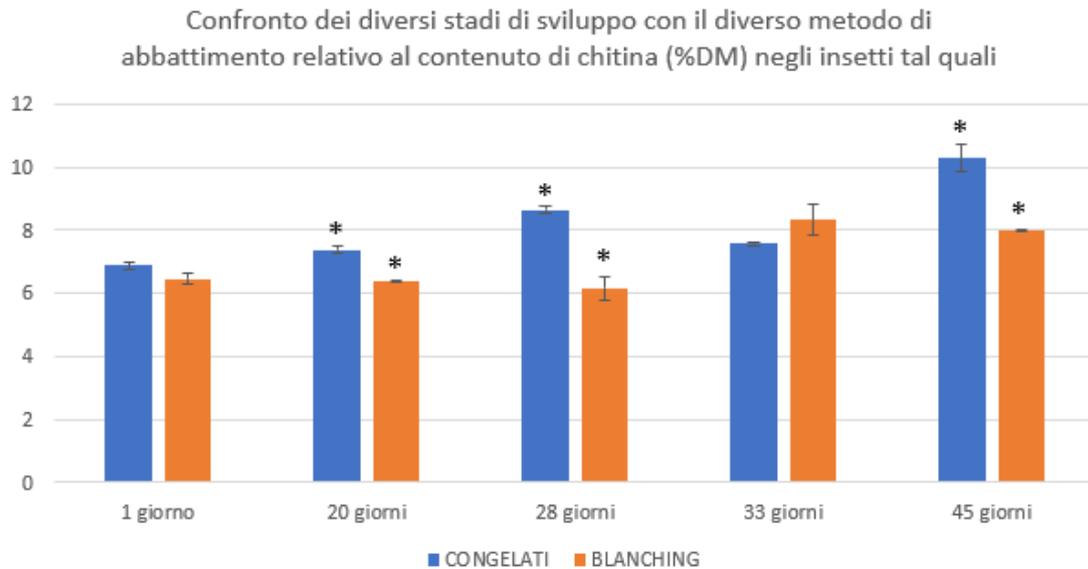


Figura 10: Confronto dei diversi stadi di sviluppo con il diverso metodo di abbattimento relativo al contenuto di chitina (%DM). Gli asterischi si riferiscono agli stadi di sviluppo di *Acheta domesticus* che presentano un contenuto di chitina statisticamente significativo.

4.1.3 Analisi sulla frazione proteica totale e profilo amminoacidico

Relativamente alle analisi condotte sulla frazione proteica totale, allo stesso modo delle analisi condotte sulla frazione chitinica, è stato registrato un andamento più regolare per i campioni sacrificati mediante blanching rispetto ai campioni sacrificati mediante congelamento. Anche in questo caso, l'andamento più irregolare osservato nei campioni congelati è probabilmente dovuto all'attivazione di specifici meccanismi metabolici durante il congelamento degli insetti. Tuttavia, non sono stati trovati dati di letteratura a supporto di questa ipotesi.

Per i campioni congelati allo stadio di sviluppo 1, 20 e 45 giorni è stato riscontrato un contenuto significativamente maggiore di proteine rispetto allo stadio di sviluppo 33, nel quale è emerso un minore contenuto di proteine.

Invece, per i campioni uccisi mediante blanching è stato osservato un andamento più regolare e in linea con il contenuto di chitina, ovvero all'aumentare dello stadio di sviluppo dell'insetto aumenta il contenuto di chitina e diminuisce il contenuto di proteine. Il maggior contenuto di proteine, infatti, si è osservato negli stadi di sviluppo più giovanili (1 e 20 giorni) mentre per gli stadi di sviluppo 28, 33 e 45 giorni si è osservato un minor contenuto di proteine, figura

11(a-b). Questo minore contenuto di proteine osservato negli stadi di sviluppo più avanzati è dovuto all'incremento del contenuto di chitina, Figura 9b.

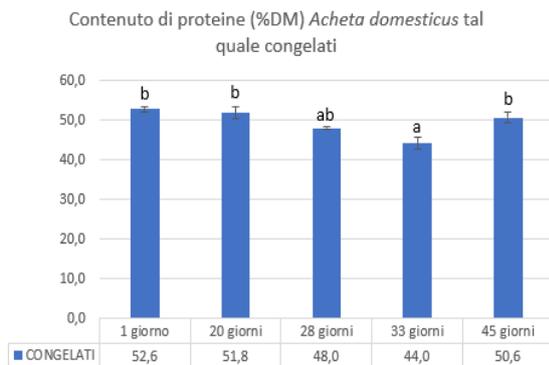


Figura 11a: Contenuto di proteine (%DM) *Acheta domesticus* tal quale nei vari stadi di sviluppo sacrificati mediante congelamento

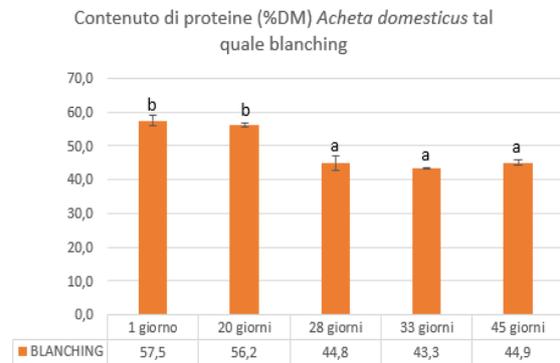


Figura 11b: Contenuto di proteine (%DM) *Acheta domesticus* tal quale nei vari stadi di sviluppo sacrificati mediante blanching

Confrontando il diverso metodo di abbattimento con il diverso stadio di sviluppo, il contenuto di proteine è risultato essere statisticamente significativo soltanto per i campioni appartenenti allo stadio di sviluppo 45 ($p < 0,039$), figura 12. Tuttavia, anche in questo caso, come per il contenuto di chitina, i campioni sacrificati mediante congelamento contenevano un maggior quantitativo di proteine rispetto ai campioni sacrificati mediante blanching.

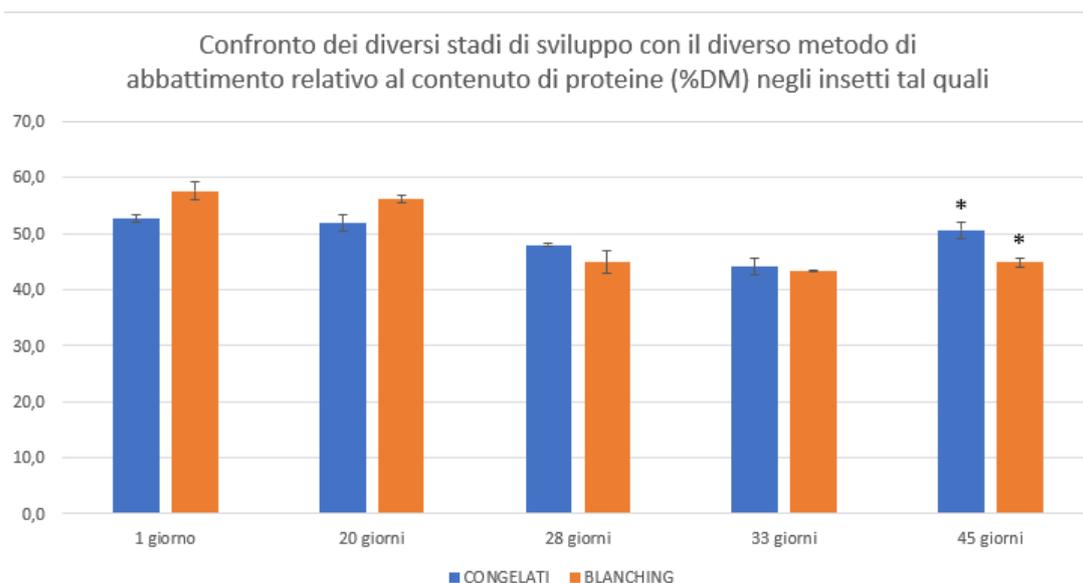


Figura 12: Confronto dei diversi stadi di sviluppo con il diverso metodo di abbattimento relativo al contenuto di proteine (%DM) negli insetti tal quali. L'asterisco si riferisce allo stadio di sviluppo di *Acheta domesticus* che presenta un contenuto di proteine statisticamente significativo

Il profilo amminoacidico degli insetti di *Acheta domesticus* è stato determinato analizzando la frazione proteica idrolizzata attraverso la tecnica UPLC-MS. È stato dunque possibile ottenere il contenuto di amminoacidi essenziali e non essenziali presenti nei campioni di *Acheta domesticus* nei vari stadi di sviluppo e sacrificati mediante congelamento e blanching.

La composizione amminoacidica di *Acheta domesticus* non è risultata particolarmente influenzata dal diverso stadio di sviluppo in quanto il patrimonio genetico è lo stesso. Tra gli amminoacidi essenziali, l'istidina è risultata significativamente più alta nei campioni congelati al giorno 45 ($p < 0,031$), mentre la metionina è risultata significativamente più alta nei campioni uccisi mediante blanching al giorno 20 ($p < 0,008$), 33 ($p < 0,005$) e 45 ($p < 0,034$). Invece, tra gli amminoacidi non essenziali, l'alanina è risultata significativamente più alta nei campioni congelati al giorno 28 ($p < 0,042$), 33 ($p < 0,048$) e 45 ($p < 0,049$); la glicina è risultata significativamente più alta nei campioni congelati 1 giorno ($p < 0,024$); infine, la prolina è risultata significativamente più alta nei campioni uccisi mediante blanching allo stadio di sviluppo 1 giorno ($p < 0,008$) e 33 giorni ($p < 0,024$), tabella 3.

Tuttavia, sebbene si possano identificare alcune differenze statisticamente significative, sono di scarsa rilevanza per quanto riguarda il valore nutrizionale, poiché le differenze sono piccole.

Indipendente dallo stadio di sviluppo e dal metodo di uccisione, la composizione amminoacidica riscontrata nel nostro studio è risultata simile alla composizione amminoacidica riscontrata da Brogan *et al.*, 2021 nello studio condotto sulla caratterizzazione delle proteine nelle polveri di insetti (*Acheta domesticus*), locuste (*Locusta migratoria*) e pupe di bachi da seta (*Bombyx mori*). Alcuni amminoacidi essenziali e non, variano leggermente in termini quantitativi. Questo potrebbe essere spiegato dalle differenze nelle condizioni di allevamento degli insetti, in particolare il loro mangime. È stato anche riportato in precedenza che il mangime per insetti influenza notevolmente la loro composizione nutrizionale, insieme allo stato metamorfico e al metodo di preparazione (Van Huis *et al.*, 2013).

Un aspetto molto importante emerso dal nostro studio è relativo al contenuto di lisina e metionina, amminoacidi essenziali tipicamente considerati limitanti per la sintesi proteica nell'uomo. Sia per entrambi i metodi di uccisione che nei vari stadi di sviluppo analizzati in questo studio, i campioni di *Acheta domesticus* contenevano rispettivamente 3,9-6,0 e 0,5-1,6 g di lisina e metionina/100g di proteine DM. Sebbene i campioni superassero la

raccomandazione giornaliera FAO/WHO/UNU per la lisina per gli adulti (1,6 g/100g di proteine DM), non soddisfacevano questa raccomandazione per la metionina (1,7 g/100g di proteine DM). A causa delle raccomandazioni più rigorose per i neonati, i campioni analizzati non hanno soddisfatto queste raccomandazioni né per la lisina (6,6/100g di proteine DM) né per la metionina (4,2/100g di proteine DM). Lisina e metionina sono quindi amminoacidi limitanti in *Acheta domesticus*.

Tabella 3: Composizione percentuale amminoacidi *Acheta domesticus* tali quali sacrificati mediante blanching e congelamento per stadio di sviluppo espressi in g/100g di proteine DM

Amminoacidi Acheta domesticus tali quali sacrificati mediante congelamento per stadio di sviluppo espressi in g/100g di proteine DM

Amminoacidi essenziali	1 gg	20 gg	28 gg	33 gg	45 gg
His	3.9 ± 0.4	2.7 ± 0.5	2.9 ± 0.1	3.0 ± 0.3	3.3 ± 0.0
Leu	7.8 ± 0.1 ^a	8.2 ± 0.1 ^{ab}	8.2 ± 0.1 ^{ab}	8.6 ± 0.3 ^b	8.7 ± 0.1 ^b
Ile	4.4 ± 0.1 ^a	4.6 ± 0.1 ^{ab}	4.5 ± 0.1 ^{ab}	4.8 ± 0.1 ^b	4.6 ± 0.0 ^{ab}
Lys	4.8 ± 0.4	6.0 ± 0.8	4.9 ± 0.9	5.0 ± 1.2	3.9 ± 0.4
Met	1.6 ± 0.0 ^c	0.9 ± 0.0 ^b	0.9 ± 0.2 ^b	0.5 ± 0.0 ^a	0.8 ± 0.1 ^b
Phe	5.6 ± 0.5	4.3 ± 0.7	4.7 ± 0.5	4.7 ± 0.5	4.7 ± 0.2
Thr	5.8 ± 0.2	4.9 ± 0.3	5.4 ± 0.3	5.7 ± 0.5	5.2 ± 0.3
Val	6.5 ± 0.2 ^a	6.8 ± 0.1 ^{ab}	6.9 ± 0.2 ^{ab}	7.3 ± 0.1 ^b	7.0 ± 0.1 ^{ab}
Amminoacidi non essenziali	1 gg	20 gg	28 gg	33 gg	45 gg
Ala	8.1 ± 0.2 ^a	9.4 ± 0.5 ^b	9.5 ± 0.0 ^b	9.7 ± 0.3 ^b	9.5 ± 0.2 ^b
Asp + Asn	7.5 ± 0.9	9.6 ± 0.9	8.2 ± 0.3	7.8 ± 1.2	8.2 ± 0.8
Arg	7.8 ± 0.1	7.1 ± 0.8	7.5 ± 0.3	7.2 ± 0.5	8.4 ± 0.9
Gly	6.3 ± 0.2	5.2 ± 0.3	5.5 ± 0.3	5.8 ± 0.6	5.6 ± 0.3
Pro	5.9 ± 0.0 ^a	6.5 ± 0.2 ^b	6.5 ± 0.1 ^b	7.2 ± 0.1 ^c	6.5 ± 0.2 ^b
Ser	5.3 ± 0.2 ^a	4.6 ± 0.3 ^a	4.8 ± 0.1 ^o	5.3 ± 0.2 ^o	6.4 ± 0.1 ^b
Tyr	6.3 ± 0.6	5.5 ± 0.9	7.2 ± 1.2	6.4 ± 1.1	5.7 ± 0.4
Glu + Gln	12.5 ± 0.9	13.7 ± 1.2	12.1 ± 0.8	11.0 ± 1.3	11.3 ± 0.8

Amminoacidi Acheta domesticus tali quali sacrificati mediante blanching per stadio di sviluppo espressi in g/100g di proteine DM

Amminoacidi essenziali	1 gg	20 gg	28 gg	33 gg	45 gg
His	3.2 ± 0.1	2.8 ± 0.2	2.7 ± 0.4	2.9 ± 0.1	3.1 ± 0.1
Leu	8.3 ± 0.2	8.2 ± 0.1	8.3 ± 0.1	8.5 ± 0.1	8.5 ± 0.1
Ile	4.4 ± 0.1	4.4 ± 0.1	4.4 ± 0.1	4.5 ± 0.2	4.7 ± 0.0
Lys	5.9 ± 0.0	5.0 ± 0.9	4.9 ± 1.3	4.5 ± 0.6	4.7 ± 0.4
Met	1.6 ± 0.0 ^c	1.2 ± 0.0 ^b	1.2 ± 0.1 ^b	0.9 ± 0.0 ^a	1.2 ^b ± 0.0
Phe	4.9 ± 0.0	5.4 ± 0.5	4.9 ± 0.8	5.0 ± 0.6	4.5 ± 0.3
Thr	5.5 ± 0.1	5.6 ± 0.3	5.4 ± 0.6	5.9 ± 0.2	5.6 ± 0.5
Val	6.4 ± 0.2	6.5 ± 0.2	6.4 ± 0.1	6.8 ± 0.3	7.0 ± 0.1

Amminoacidi non essenziali	1 gg	20 gg	28 gg	33 gg	45 gg
Ala	7.3±0.4	7.7±0.3	7.9±0.5	8.1±0.4	8.2±0.4
Asp + Asn	8.9±0.2	8.9±0.8	9.1±1.6	8.4±0.1	9.1±0.3
Arg	8.1±0.1	8.0 ± 0.4	7.8 ± 1.2	8.0 ± 0.1	8.1 ± 0.5
Gly	5.2 ± 0.0	5.0 ± 0.2	5.0 ± 0.4	5.3 ± 0.0	5.2 ± 0.0
Pro	5.6 ± 0.0 ^a	6.1 ± 0.3 ^{ab}	6.2 ± 0.1 ^{ab}	6.4 ± 0.2 ^b	6.4 ± 0.1 ^b
Ser	5.3 ± 0.4 ^o	5.2 ± 0.2 ^o	5.3 ± 0.5 ^o	5.4 ± 0.1 ^{ab}	6.6 ± 0.3 ^b
Tyr	6.0 ± 0.2	7.6 ± 0.9	6.9 ± 0.9	7.6 ± 0.6	6.1 ± 0.0
Glu + Gln	13.4 ± 0.3	12.3 ± 0.2	13.4 ± 11.6	11.7 ± 0.1	11.3 ± 0.4

4.2 Effetto del blanching o congelamento come metodi di uccisione sulla composizione centesimale degli estratti di chitina di *Acheta Domesticus* nei vari stadi di sviluppo

La composizione degli estratti di chitina è stata determinata in termini di contenuto di chitina considerando anche il contenuto proteico residuo e il corrispondente profilo amminoacidico. Tali analisi, sono state condotte sui campioni di *Acheta domesticus* nei diversi stadi di sviluppo e sacrificati con i due diversi metodi di uccisione (congelamento e blanching), figura 13(a-b). In generale, la chitina estratta variava da un 58.4 % ad un 74.5%. Non è stato quindi possibile estrarre chitina con un elevato grado di purezza ma sono rimaste legate proteine con una percentuale che variava da 8.9% a 21.2%.

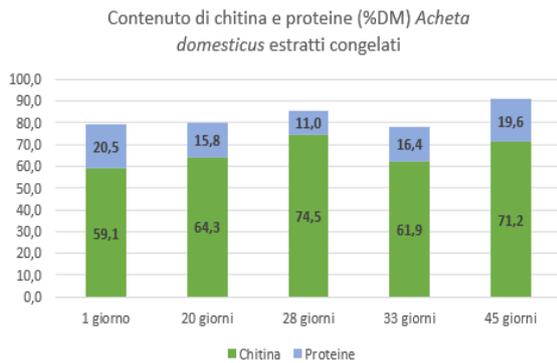


Figura 13a: Contenuto di chitina e proteine (%DM) negli estratti di *Acheta domesticus* congelati

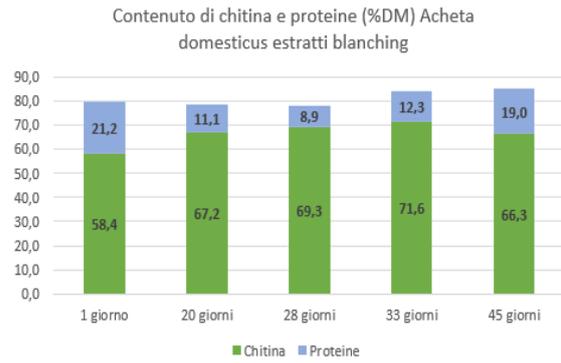


Figura 13b: Contenuto di chitina e proteine (%DM) negli estratti di *Acheta domesticus* blanching

4.2.1 Analisi sulla frazione chitinica

Allo stesso modo delle analisi condotte sulla frazione chitinica degli insetti tal quali, anche per i campioni estratti derivanti da *Acheta domesticus* sacrificati mediante blanching si è registrato un andamento del contenuto di chitina più regolare rispetto ai campioni estratti derivanti da *Acheta domesticus* sacrificati mediante congelamento, figura 14(a-b).

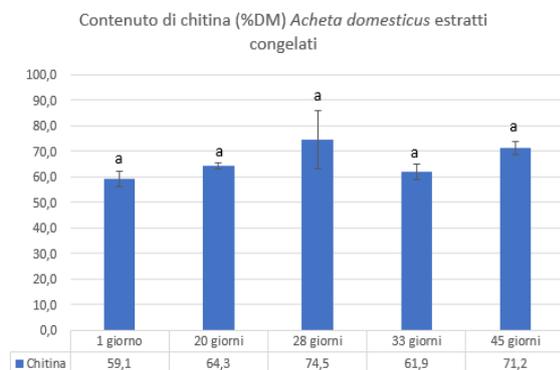


Figura 14a: Contenuto di chitina (%DM) negli estratti di *Acheta domesticus* congelati

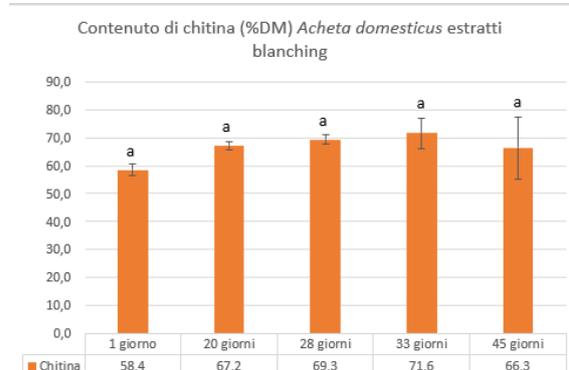


Figura 14b: Contenuto di chitina (%DM) negli estratti di *Acheta domesticus* blanching

Come si può notare dalla figura 14(a), gli estratti congelati che hanno mostrato un maggior contenuto di chitina sono stati gli stadi di sviluppo 28 e 45 giorni, mentre gli estratti sbollentati che hanno mostrato un maggior contenuto di chitina sono stati gli stadi di sviluppo centrali, ovvero 20, 28 e 33 giorni, figura 14(b). Questi valori però, non sono risultati statisticamente differenti con i valori ottenuti per gli altri stadi di sviluppo.

Dai risultati ottenuti dall'analisi sulla frazione chitinica degli estratti, il contenuto di chitina non ha mai presentato valori statisticamente significativi né in funzione allo stadio di sviluppo e né in funzione al diverso metodo di abbattimento (figura 15).

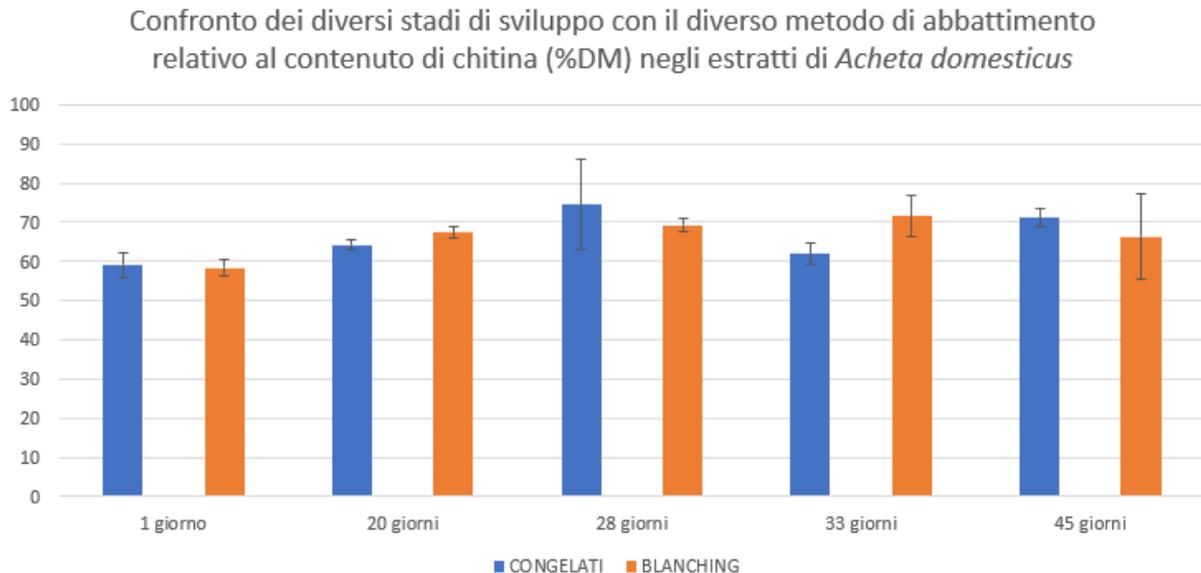


Figura 15: Confronto dei diversi stadi di sviluppo con il diverso metodo di abbattimento relativo al contenuto di chitina (%DM) negli estratti di *Acheta domesticus*

4.2.2 Analisi sulla frazione proteica totale residua e profilo amminoacidico

La chitina si trova quasi sempre in associazione con numerose proteine che influenzano le proprietà meccaniche e fisico-chimiche complessive della matrice chitina-proteine, che possono variare da molto rigide (ad esempio la capsula cranica e le parti della bocca) a completamente flessibili (ad esempio, il corpo larvale e la cuticola delle ali), (Muthukrishnan. S., *et al* 2012).

Esistono tre grandi gruppi di proteine di insetti che contengono sequenze associate alla capacità di legare la chitina. Il primo gruppo consiste in un numero molto elevato di proteine cuticolari di insetti, appartenenti alla famiglia CPR (*Cuticular proteins R*), che contengono una sequenza amminoacidica nota come consenso esteso di Rebers e Riddiford (consenso R&R esteso) costituita da circa 70 amminoacidi (Muthukrishnan. S., *et al* 2012; Tynyakov. J., *et al* 2015).

Il secondo gruppo di proteine è costituito da una sequenza amminoacidica nota come “peritrofina A” (Tellam *et al.*, 1999). Questo gruppo di proteine è ulteriormente suddiviso in tre gruppi: proteine della matrice peritrofica (con 1-19 domini, finora determinati); proteine cuticolari analoghe alle peritrofine-3 (con 3 domini); e proteine cuticolari analoghe alle peritrofine-1 (con 1 dominio) (Jasrapuria *et al.*, 2010). Il secondo gruppo comprende anche enzimi del metabolismo della chitina (chitinasi, chitina deacetilasi e una proteasi).

Il terzo gruppo di proteine che legano la chitina è costituito dalla famiglia di peptidi antimicrobici.

Le proteine CPR possono essere suddivise in gruppi a seconda della variante di consenso R&R esteso che possiedono. Due gruppi principali sono stati denominati RR-1 e RR-2 mentre un terzo gruppo RR-3 è stato identificato ma solo da un piccolo numero di sequenze (Andersen, 1998; Andersen, 2000).

La classe RR-1 del consenso R&R esteso ha un tasso evolutivo più elevato rispetto alla classe RR-2, mentre quest’ultimo gruppo ha una maggiore diversità di composizione amminoacidica. I principali amminoacidi che compongono il consenso R&R esteso sono glicina e alanina (Cornman *et al.*, 2008).

Proteine cuticolari ricche di alanina sono state descritte anche in pupe di *Bombyx mori* (Nakato *et al.*, 1990), in pupe di *Galleria mellonella* (Kollberg *et al.*, 1995), in larve, pupe e adulti di *Tenebrio molitor* (Mathelin *et al.*, 1995; Rondot *et al.*, 1996; Andersen *et al.*, 1995; Haebel *et al.*, 1995) e in adulti di *D. melanogaster* (Qiu e Hardin, 1995).

Inoltre, la prolina è un altro amminoacido importante in molte delle proteine CPR. Entrambe le coppie di prolina-prolina e glicina-glicina tendono a introdurre attorcigliamenti nelle catene proteiche e quindi influenzare il ripiegamento della catena proteica (Andersen *et al.*, 1995).

Gli amminoacidi cisteina, metionina e triptofano sono generalmente assenti nelle proteine CPR mature (Jensen *et al.*, 1997).

Invece, una delle caratteristiche comuni al secondo gruppo di proteine che ha la capacità di legare la chitina, ovvero le peritrofine, è la presenza di uno o più domini ricchi di cisteina. I residui di cisteina in questi domini probabilmente formano rispettivamente tre o quattro legami disolfuro intradominio, fornendo una struttura architettoria sulla quale potrebbe

essere costruita una varietà di strutture. Le dimensioni di queste proteine possono variare sostanzialmente a seconda del numero e del tipo di domini contenuti all'interno della proteina. Inoltre, molte delle peritrofine hanno domini ricchi di prolina e treonina (Tellam *et al.*, 1999).

Nel presente progetto di tesi, dai risultati ottenuti dall'analisi della frazione proteica totale degli estratti di chitina di *Acheta domesticus* nei vari stadi di sviluppo, utilizzando lo stesso metodo di analisi dei campioni tal quali, è emerso un andamento della quantità di proteine molto simile per entrambi i metodi di uccisione. In particolar modo, per entrambi i metodi di uccisione, il contenuto di proteine presente negli estratti di chitina è risultato maggiore nello stadio di sviluppo 1 e 45 giorni e minore allo stadio di sviluppo 28 giorni, figura 16 (a-b).

Questo andamento del contenuto di proteine nella frazione chitinica potrebbe essere dovuto al fatto che, nonostante negli stadi giovanili degli insetti tali quali di *Acheta domesticus* (1 e 20 giorni) ci sia un maggior contenuto di proteine, queste siano debolmente legate alla chitina. Ciò, quindi, rende più facile la separazione e permette di ottenere un estratto di chitina maggiormente puro. Successivamente, con l'avanzare del ciclo di vita, gli insetti riducono il contenuto di proteine ma aumenta la forza di legame con la chitina, probabilmente dovuto al processo di melanizzazione maggiormente presente negli stadi più avanzati. Questo, quindi, spiega la maggior difficoltà di separare le proteine dalla chitina all'avanzare del ciclo di vita dell'insetto.

La riduzione del contenuto di proteine che notiamo all'avanzare del ciclo di vita negli insetti di *Acheta domesticus* è particolarmente evidente negli insetti sacrificati mediante blanching rispetto agli insetti sacrificati mediante congelamento, figura 11(a-b).

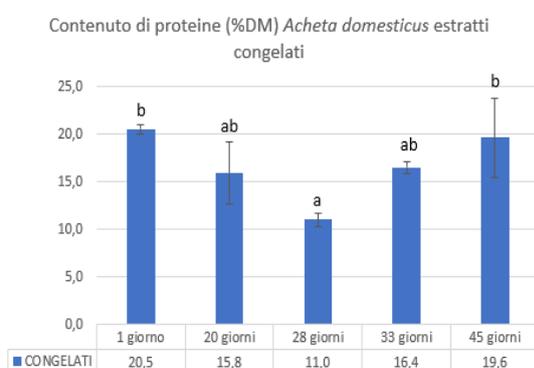


Figura 16a: Contenuto di proteine (%DM) negli estratti di *Acheta domesticus* congelati

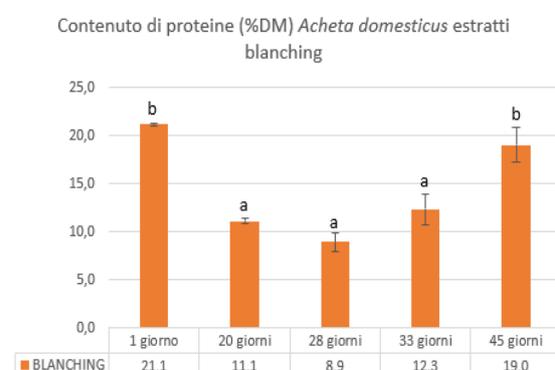


Figura 16b: Contenuto di proteine (%DM) negli estratti di *Acheta domesticus* blanching

Dal confronto della quantità totale di proteine residue presenti nella frazione chitinica, facendo riferimento allo stadio di sviluppo e il diverso metodo di uccisione, i campioni non hanno mostrato valori statisticamente significativi (figura 17).

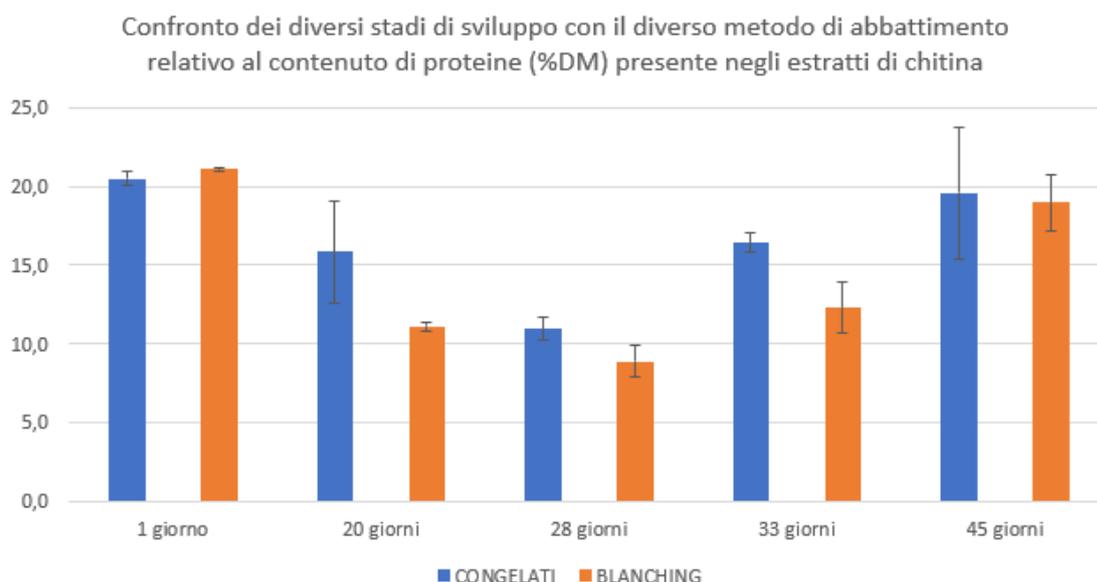


Figura 17: Confronto dei diversi stadi di sviluppo con il diverso metodo di abbattimento relativo al contenuto di proteine (%DM) presente negli estratti di chitina

Il profilo amminoacidico degli estratti di chitina, allo stesso modo del profilo amminoacidico degli insetti tal quali, è stato determinato analizzando la frazione proteica idrolizzata e analizzata attraverso la tecnica UPLC-MS. In questo modo, è stato dunque ottenuto il contenuto di amminoacidi essenziali e non presenti negli estratti in funzione del diverso stadio di sviluppo e del diverso metodo di uccisione, Tabella 4.

Come mostrato nella tabella 4, la composizione amminoacidica degli estratti nei vari stadi di sviluppo non ha mostrato variazioni importanti in funzione del diverso metodo di uccisione. Notiamo però, una maggiore variazione della composizione amminoacidica all'interno dello stesso metodo di uccisione. In particolar modo, nei vari stadi di sviluppo, negli estratti derivanti da *Acheta domesticus* sacrificati mediante congelamento è stato riscontrato un maggior numero di differenze significative nella composizione amminoacidica rispetto ai campioni sacrificati mediante blanching.

Tabella 4. Composizione percentuale amminoacidi degli estratti di *Acheta domesticus* per stadio di sviluppo sacrificati mediante congelamento e blanching espressi in g/100g di proteine DM

Amminoacidi Acheta domesticus estratti sacrificati mediante congelamento per stadio di sviluppo espressi in g/100g di proteine DM

Amminoacidi essenziali	1 gg	20 gg	28 gg	33 gg	45 gg
His	6.6 ± 0.0 ^b	7.6 ± 0.0 ^c	7.9 ± 0.3 ^d	5.1 ± 0.4 ^o	5.8 ± 0.3 ^{ab}
Leu	7.4 ± 0.1	7.0 ± 0.2	6.9 ± 0.2	7.1 ± 0.4	7.5 ± 0.2
Ile	3.1 ± 0.0 ^b	3.0 ± 0.0 ^b	2.7 ± 0.1 ^o	3.0 ± 0.1 ^b	2.9 ± 0.1 ^o
Lys	2.1 ± 0.1 ^c	1.8 ± 0.1 ^c	1.2 ± 0.1 ^b	1.0 ± 0.1 ^b	0.3 ± 0.1 ^o
Met	0.2 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Phe	2.3 ± 0.0 ^a	4.0 ± 0.2 ^b	2.9 ± 0.5 ^o	1.9 ± 0.0 ^a	2.0 ± 0.2 ^o
Thr	2.3 ± 0.1	2.6 ± 0.2	2.3 ± 0.0	2.1 ± 0.1	2.0 ± 0.3
Val	12.4 ± 0.2 ^b	11.3 ± 0.4 ^o	13.2 ± 0.1 ^{bc}	13.4 ± 0.2 ^c	13.7 ± 0.1 ^c
Amminoacidi non essenziali	1 gg	20 gg	28 gg	33 gg	45 gg
Ala	14.0 ± 0.6 ^b	11.2 ± 0.4 ^o	13.8 ± 0.4 ^b	19.5 ± 1.2 ^c	20.5 ± 0.4 ^c
Asp + Asn	4.5 ± 0.2	3.9 ± 1.0	2.9 ± 1.2	3.5 ± 0.7	1.3 ± 0.5
Arg	2.9 ± 0.2 ^o	3.8 ± 0.2 ^c	3.5 ± 0.1 ^{bc}	2.7 ± 0.2 ^o	2.7 ± 0.1 ^o
Gly	9.3 ± 0.1	10.8 ± 0.8	11.6 ± 1.1	9.1 ± 0.2	9.8 ± 0.7
Pro	12.3 ± 0.0 ^{ab}	10.8 ± 0.4 ^o	12.1 ± 0.4 ^o	13.8 ± 0.6 ^{bc}	14.2 ± 0.0 ^c
Ser	4.3 ± 0.2 ^{bc}	4.6 ± 0.3 ^c	4.6 ± 0.4 ^c	3.4 ± 0.0 ^{ab}	2.9 ± 0.2 ^o
Tyr	8.9 ± 0.1 ^o	10.2 ± 0.8 ^{ab}	9.2 ± 0.6 ^{ab}	8.4 ± 0.8 ^o	11.8 ± 0.7 ^b
Glu + Gln	7.5 ± 0.2 ^b	7.0 ± 1.3 ^b	5.4 ± 1.3 ^{ab}	5.9 ± 1.0 ^{ab}	2.3 ± 0.6 ^o

Amminoacidi Acheta domesticus estratti sacrificati mediante blanching per stadio di sviluppo espressi in g/100g di proteine DM

Amminoacidi essenziali	1 gg	20 gg	28 gg	33 gg	45 gg
His	6.1 ± 0.1	6.8 ± 0.1	7.5 ± 0.3	6.2 ± 0.6	6.0 ± 1.3
Leu	7.5 ± 0.1	7.4 ± 0.3	7.3 ± 0.1	7.2 ± 0.3	7.7 ± 0.2
Ile	3.3 ± 0.1	2.9 ± 0.2	3.0 ± 0.3	3.0 ± 0.4	3.2 ± 0.0
Lys	1.6 ± 0.1 ^b	1.6 ± 0.3 ^b	1.0 ± 0.3 ^{ab}	1.1 ± 0.4 ^{ab}	0.4 ± 0.0 ^a
Met	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Phe	2.5 ± 0.4	2.5 ± 0.0	3.5 ± 1.4	2.4 ± 0.3	2.3 ± 0.1
Thr	2.3 ± 0.3	2.1 ± 0.1	2.1 ± 0.4	1.8 ± 0.2	1.9 ± 0.0
Val	12.4 ± 0.2	13.3 ± 0.2	12.3 ± 0.5	14.0 ± 0.9	13.3 ± 0.6
Amminoacidi non essenziali	1 gg	20 gg	28 gg	33 gg	45 gg
Ala	14.3 ± 0.4 [°]	14.1 ± 0.7 ^a	15.5 ± 1.7 ^{ab}	17.6 ± 0.5 ^{ab}	19.4 ± 1.8 ^b
Asp + Asn	4.5 ± 0.1 ^b	3.7 ± 0.3 ^{ab}	2.8 ± 1.2 ^{ab}	3.0 ± 0.5 ^{ab}	1.7 ± 0.4 [°]
Arg	1.6 ± 1.2	3.1 ± 0.0	3.8 ± 0.2	2.9 ± 0.2	2.8 ± 0.0
Gly	9.6 ± 0.6	10.2 ± 0.0	10.0 ± 0.8	9.6 ± 0.4	9.8 ± 0.1
Pro	12.3 ± 1.0	11.8 ± 0.2	10.6 ± 1.0	12.1 ± 1.4	13.4 ± 0.6
Ser	4.4 ± 0.2 ^b	4.3 ± 0.5 ^b	3.6 ± 0.2 ^{ab}	3.0 ± 0.1 [°]	3.3 ± 0.0 ^a
Tyr	10.2 ± 0.8	8.1 ± 0.9	8.0 ± 2.0	7.7 ± 0.8	11.2 ± 0.1
Glu + Gln	7.3 ± 0.3 ^{ab}	7.8 ± 0.1 ^{ab}	9.1 ± 0.8 ^b	8.2 ± 2.4 ^{ab}	3.8 ± 0.0 ^a

4.2.1.1 Confronto profilo amminoacidico estratti e insetti tal quali

Al fine di rilevare la tipologia di amminoacidi che sono maggiormente coinvolti nel processo di melanizzazione è stato eseguito il confronto della composizione amminoacidica dei campioni di *Acheta domesticus* tal quale con la composizione amminoacidica della frazione proteica residua degli estratti di chitina. In figura 19 sono riportati i risultati relativi al contenuto di amminoacidi nei campioni estratti e tal quali dei grilli uccisi per congelamento di 1 giorno come esempio in quanto questo andamento è lo stesso per tutti i campioni.

Indipendentemente dal metodo di abbattimento e dal ciclo di vita degli insetti, vi è un'alterazione del contenuto della frazione amminoacidica totale tra i campioni tal quali e i campioni di chitina estratta. Nello specifico, negli estratti, si nota un aumento significativo ($p < 0.05$) di alanina, glicina, istidina, prolina, valina e tirosina.

Questi amminoacidi sono probabilmente coinvolti nel processo di melanizzazione, quindi la loro quantità disponibile diminuisce ed è più difficile rimuoverli durante la fase di deproteinizzazione. Questo non è di secondaria importanza visto che tra questi amminoacidi vi sono amminoacidi essenziali come l'istidina e la valina.

In particolare, La tirosina è l'amminoacido precursore della melanizzazione. Questo amminoacido può quindi essere immagazzinato o sequestrato sotto forma di coniugati per essere successivamente convertito in difenoli, che sono la principale classe di composti che fungono da precursori degli agenti sclerotizzanti della cuticola e del processo di melanizzazione (Kramer *et al.*, 1987).

Tra i gruppi di proteine di insetti che contengono sequenze associate alla capacità di legare la chitina precedentemente citati ci sono un numero molto elevato di proteine cuticolari di insetti, appartenenti alla famiglia CPR le quali sono costituite principalmente da alanina, glicina e prolina. Essendo questi amminoacidi in percentuale elevata negli estratti ottenuti, si suppone che queste proteine cuticolari siano quelle coinvolte nel processo di melanizzazione.

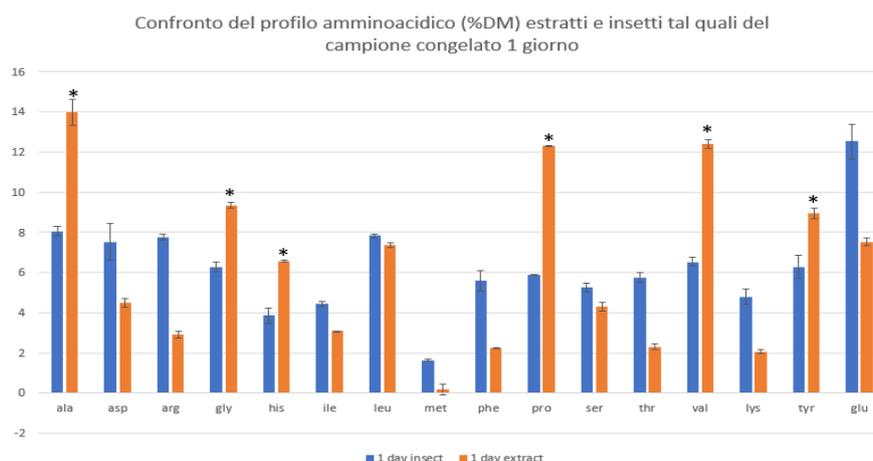


Figura 19: Confronto del profilo amminoacidico di estratti e insetti tal quali del campione congelato 1 giorno espressi in g/100g di proteine DM. L'asterisco indica solo gli amminoacidi presenti in percentuale significativamente maggiore ($p < 0.05$) nei campioni di chitina estratta rispetto ai campioni tal quali

5. Conclusioni

In questo studio, per la prima volta, è stato confrontato l'effetto di due diversi metodi di abbattimento (congelamento e blanching) e dello stadio di sviluppo (1, 20, 28, 33 e 45 giorni) sulla composizione centesimale e l'estrazione della chitina da *Acheta domesticus*.

Alla luce dei risultati precedentemente descritti, è emerso che dal confronto del diverso metodo di uccisione con lo stesso stadio di sviluppo dei grilli appartenenti alla specie *Acheta domesticus*, vi sono alcune differenze quantitative in termini di lipidi, chitina e proteine.

Gli stadi di sviluppo in cui sono state evidenziate differenze significative dal punto di vista quantitativo sono stati: 20 giorni ($p < 0,016$) per la frazione lipidica; 20 ($p < 0,009$), 28 ($p < 0,012$) e 45 giorni ($p < 0,018$) per la frazione chitinica; 45 giorni ($p < 0,039$) per la frazione proteica.

Il maggior contenuto di lipidi, chitina e proteine riscontrate negli stadi di sviluppo sopra descritti appartengono ai campioni sacrificati mediante congelamento.

Inoltre, anche all'interno dello stesso metodo di uccisione sono emerse differenze quantitative delle stesse componenti. Dal punto di vista della frazione lipidica, i campioni uccisi mediante congelamento e blanching appartenenti allo stadio di sviluppo 33 sono quelli in cui è stato riscontrato un maggior contenuto di lipidi.

L'andamento del contenuto della frazione chitinica e proteica degli insetti tal quali, rispetto alla frazione lipidica, ha mostrato differenze maggiori tra i due diversi metodi di uccisione. In particolar modo, negli insetti sacrificati mediante congelamento è stato riscontrato un andamento del contenuto di chitina e proteine molto più irregolare nei vari stadi di sviluppo rispetto agli insetti sacrificati mediante blanching. Tuttavia, per entrambi i metodi di uccisione, nei grilli allo stadio di sviluppo 45 è stato riscontrato un maggior contenuto di chitina, indice del fatto che all'aumentare dello stadio di sviluppo si completa lo sviluppo corporeo e la sclerotizzazione dell'esoscheletro, determinando quindi negli adulti un maggior contenuto di chitina (Erdogan e Kaya, 2016), indipendentemente dal metodo di uccisione applicato.

L'analisi del contenuto di proteine in funzione al diverso stadio di sviluppo, invece, è risultata maggiore negli insetti appartenenti agli stadi di sviluppo più giovanili (1, 20 e 28 giorni) e negli insetti adulti (45 giorni) per i campioni uccisi mediante congelamento, e maggiore nei primi due stadi di sviluppo (1 e 20 giorni) per i campioni uccisi mediante blanching. Ciò che si osserva

dunque negli insetti sacrificati mediante blanching, è un andamento del contenuto di chitina e proteine più regolare. Questo dato è in accordo con gli studi presenti in letteratura.

Inoltre, le differenze statisticamente significative riscontrate nella composizione amminoacidica degli insetti tal quali è risultata di scarsa rilevanza per quanto riguarda il valore nutrizionale, sia per il diverso metodo di abbattimento che per il diverso stadio di sviluppo.

L'andamento del contenuto di chitina degli estratti, in maniera analoga a quanto osservato nei vari stadi di sviluppo di *Acheta domesticus* tal quali, ha mostrato una maggiore irregolarità nei campioni congelati. Tuttavia, dall'analisi eseguita sulla frazione chitinica degli estratti, il contenuto di chitina non ha mai presentato valori statisticamente significativi né in funzione allo stadio di sviluppo e né in funzione al diverso metodo di abbattimento.

Viceversa, l'andamento del contenuto di proteine nei vari stadi di sviluppo degli estratti è risultato simile per entrambi i metodi di uccisione. In particolar modo, il maggior contenuto di proteine è stato riscontrato nei campioni di 1 giorno e negli estratti appartenenti agli insetti adulti (45 giorni). L'andamento così particolare del contenuto di proteine riscontrato per entrambi i metodi di uccisione è probabilmente dovuto alla variazione della forza di legame proteine-chitina nel corso della vita dell'insetto. A tal proposito, è stato ipotizzato che negli stadi giovanili degli insetti, seppur il contenuto di proteine sia maggiore si ha che la forza di legame proteine-chitina è debole. Successivamente, con l'avanzare del ciclo di vita, gli insetti diminuiscono il contenuto di proteine ma aumenta la forza di legame proteine-chitina che ostacola quindi la rimozione delle proteine. Questo è probabilmente dovuto al processo di melanizzazione maggiormente presente negli stadi più avanzati.

Dal confronto dello stadio di sviluppo con il diverso metodo di uccisione, il contenuto di proteine negli estratti non ha mostrato valori statisticamente significativi.

Inoltre, le variazioni più importanti del profilo amminoacidico degli estratti sono state riscontrate all'interno dello stesso metodo di uccisione, piuttosto che in funzione al diverso metodo di uccisione. In particolar modo, nei campioni congelati è stato riscontrato un maggior numero di differenze significative nella composizione amminoacidica rispetto ai campioni uccisi mediante blanching.

In conclusione, sono anche stati individuati gli amminoacidi che, indipendentemente dal metodo di uccisione, rimangono maggiormente legati alla chitina. Tra questi, vi è la tirosina, il

principale precursore del processo di melanizzazione ed altri amminoacidi come alanina, prolina e glicina che sono i principali costituenti delle proteine cuticolari che presentano sequenze associate alla capacità di legare la chitina.

I risultati ottenuti in questa tesi offrono quindi spunti interessanti relativi alla variazione della composizione centesimale ed estrazione della chitina da grilli appartenenti alla specie *Acheta domesticus* in funzione al diverso metodo di uccisione e al diverso stadio di sviluppo. Questi risultati rappresentano quindi un primo tassello per la formulazione di una nuova produzione di mangimi animali bilanciati a base di farina di insetto.

6. Bibliografia

- Aberg. C.M, Chen. T, Olumide. A, Raghavan. S.R, Payne. E.G.F. (2004). Enzymatic Grafting of Peptides from Casein Hydrolysate to Chitosan. Potential for Value-Added Byproducts from Food-Processing Wastes. *Journal of Agricultural and food chemistry* 52, 788-793.
- Andersen. S.O (1998). Amino acids sequence studies on endocuticular proteins from the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 28(5-6), 421-434.
- Andersen. S.O (2000). Studies on proteins in post-ecdysial nymphal cuticle of locust, *Locusta migratoria*, and cockroach, *Blaberus craniifer*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30(7), 569-577.
- Andersen. S.O, Hojrup. P, Roepstorff. P (1995). Insect cuticular proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 25(2), 153-176.
- Arrese. E.L, Canavoso. L.E, Jouni. Z.E, Pennington. J.E, Tsuchida. K, Wells. M.A (2001). Lipid storage and mobilization in insects: current status and future directions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31(1), 7-17.
- Ashida. M, Kinoshita. K, T.Brey. P. (1990). Studies on prophenoloxidase activation in the mosquito *Aedes aegypti* L. *European Journal of Biochemistry* 188, 507-515.
- 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.
- Barroso. F.G, de Haro. C, Sanchez-Muros. M.J, Venegas. E, Martinez-Sanchez. A, Perez-Banon. C (2014). The potential of various insect species for use as food for fish. *Aquaculture* 422-423, 193-201.
- Belghit. I, Liland. N.S, Gjesdal. P, Biancarosa. I, Menchetti. E, Li. Y, Waagbo. R, Krogdahl. A, Lock. E.J. (2019). Black soldier fly larvae meal can replace fish meal in diets of seawater phase Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 503, 609-619.
- Belluco. S, Halloran. A, Ricci. A. (2017). New protein sources and food legislation: the case of edible insects and EU law. *Food security* 9, 803-814.
- Biasato. I, De Marco M, Rotolo. L, Signor Renna, Lussiana. C, Dabbou. S, Capucchio MT, Biasibetti. E, Costa. P, Gai. F, Pozzo. L, Dezzutto. D, Bergagna. S, Martinez. S, Tarantola.

- M, Gasco. L, Schiavone. A. (2016). Effects of dietary *Tenebrio molitor* meal inclusion in free-range chickens. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 100, 1104-1112.
- Borgogno. M, Dinnella. C, Iaconisi. V, Fusi. R, Scarpaleggia. C, Schiavone. A, Monteleone. E, Gasco. L, Parisi. G. (2017). Inclusion of *Hermetia illucens* larvae meal on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) feed: effect on sensory profile according to static and dynamic evaluations. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97, 3402-3411.
 - Brigode. C, Hobbi. P, Jafari. H, Verwilghen. F, Beaten. E, Shavandi. A (2020). Isolation and physicochemical properties of chitin polymer from insect farm side stream as a new source of renewable biopolymer. *Journal of Cleaner Production*, 275.
 - Brogan. E.N, Park. Y.L, Matak. K.E, Jaczynski. J (2021). Characterization of protein in cricket (*Acheta domesticus*), locust (*Locusta migratoria*), and silk worm pupae (*Bombyx mori*) insect powders. *LWT* 152.
 - Bubler. S, Rumpold. B.A, Jander. E, Rawel. H.M, Schluter. O.K. (2016). Recovery and techno-functionality of flours and proteins from two edible insect species: Meal worm (*Tenebrio molitor*) and black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. *Heliyon* 2.
 - Bukkens, S.G.F. (2005). Insects in the human diet: nutritional aspects. *Ecological implications of minilivestock: potential of insects, rodents, frogs and snails* 545-577.
 - Caligiani. A, Marseglia. A, Leni. G, Baldassarre. S, Maistrello. L, Dossena. A, Sforza. S. (2018). Composition of black soldier fly prepupae and systematic approaches for extraction and fractionation of proteins, lipids, and chitin. *Food Research International* 105, 812-820
 - Caligiani. A, Marseglia. A, Sorci. A, Bonzanini. F, Lolli. V, Maistrello. L, Sforza. S. (2019). Influence of the killing method of the black soldier fly on its lipid composition. *Food Research International* 116, 276-282.
 - Cerenius. L, Soderhall. K (2004). The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol. Rev.* 198, 116-126.
 - Chakravorty. J, Ghosh. S, Jung. C, Mayer-Rochow. VB (2014). Nutritional composition of *Chondacris rosea* and *Brachytrupes orientalis*: two common insects used as food by tribes of Arunachal Pradesh, India. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 17(3), 407-415.

- Chen. L, Du. Y, Wu. H, Xiao. L. (2001). Relationship between molecular structure and moisture-retention ability of carboxymethyl chitin and chitosan. *Journal of Applied Polymer Science* 83, 1233-1241.
- Cho. YW, Jang. J, Park. C.R, Ko. SW (2000). Preparation and Solubility in Acid and Water of Partially Deacetylated Chitins. *Biomacromolecules* 1(4), 609-614.
- Choudhury. M, Barman. K, Banik. S, Jyoti Das. P. (2021). Effect of dietary inclusion of muga silkworm pupa meal on the growth performance of large white Yorkshire grower pigs. *International journal of creative research thoughts* 9, 2320-2882.
- Cornman. R.S, Togawa. T, Dunn. W.A, He. N, Emmons. A.C, Willis. J.H (2008). Annotation and analysis of a large cuticular protein family with the R&R Consensus in *Anopheles gambiae*. *BMC Genomics* 22.
- D. Charalambidis. N, C. Fuokas. L, G. Zervas. C, J. Marmaras. V. (1996). Hemocyte surface phenoloxidase (PO) and immune response to Lipopolysaccharide (LPS) in *Ceratitidis capitata*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 26, 867-874.
- DeFoliart. G.R, Finke. M.D, Sunde. M.L (1982). Potential Value of the Marmon Cricket (Orthoptera: Tettgoniidae) Harvested as a High-Protein Feed for Poultry. *Journal of Economic Entomology* 75(5), 848-852.
- Erdogan. S, Kaya. M (2016). High similarity in physicochemical properties of chitin and chitosan from nymphs and adults of a grasshopper. *International Journal of Biological Macromolecules* 89, 118-126.
- Finke. M.D. (2002). Complete nutrient composition of commercially raised invertebrates used as food for insectivores. *ZooBiology* 21, 269-285.
- Fortea. M.I, Lòpez-Miranda. S, Serrano-Martínez. A, Carreno. J, Nùñez-Delicado. E. (2009). Kinetic characterization and thermal inactivation study of polyphenol oxidase and peroxidase from table grape (Crimson Seedless). *Food Chemistry* 113, 1008-1014.
- Gilbert. L.I, Chino. H (1974). Transport of lipids in insects. *Journal of lipid research* 15(5), 439-456.
- Haebel. S, Jensen. C, Roepstorff. P, Andersen. S.O (1995). Isoforms of a cuticular protein from larvae of the meal beetle, *Tenebrio molitor*, studied by mass spectrometry in combination with Edman degradation and two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Protein Science* 4(3), 394-404.

- Hahn. T, Tafi. E, Paul. A, Salvia. R, Falabella. R, Zibek. S. (2020). Current state of chitin purification and chitosan production from insects. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 95, 2775-2795.
- Henry. M, Gasco. L, Piccolo. G, Fountoulaki. (2015). Review on the use of insects in the diet of farmed fish: Past and future. *Animal Feed Science and Technology* 203, 1-22.
- Hutchins. R.F.N, Martin. M.M (1968). The lipids of the common house cricket, *Acheta domesticus* L. II. Hydrocarbons. *Lipids* 3, 250-255.
- J. Marmaras. V, N. Bournazos. S, G. Katsoris. P, Lambropoulou. M. (1993). Defense mechanisms in insects: Certain integumental proteins and tyrosinase are responsible for nonself-recognition and immobilization of *Escherichia coli* in the cuticle of developing *Ceratitis capitata*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 23, 169-180.
- Janssen. R.H, Lakemond. C.M.M, Fogliano. V, Renzone. G, Scaloni. A, Vincken. J.P. (2017). Involvement of phenoloxidase in browning during grinding of *Tenebrio molitor* larvae. *PLoS ONE* 13(1).
- Jasrapuria. S, Arakane. Y, Osman. G, Kramer. K.J, Beeman. R.W, Muthukrishnan. S (2010). Genes encoding proteins with peritrophin A-type chitin-binding domains in *Tribolium castaneum* are grouped into three distinct families based on phylogeny, expression and function. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40(3), 214-227.
- Jensen. U.G, Rothmann. A, Skou. L, Andersen. S.O, Reopstorff. P, Hojrup.P (1997). Cuticular proteins from the giant cockroach *Blaberus craniifer*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27(2), 109-120.
- Kaya. M, Baublys. V, Can. E, Satkauskiene. I, Bitim. B, Tubelyté. V, Baran. T (2014). Comparison of physicochemical properties of chitins isolated from an insect (*Melolontha melolontha*) and a crustacean species (*Oniscus asellus*). *Zoomorphology* 133, 285-293.
- Khan. S, Khan. R.U, Alam. W, Sultan. A. (2018). Evaluating the nutritive profile of three insect meals and their effects to replace soya bean in broiler diet. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 102, 662-668.
- Kollberg. U, Obermaier. B, Hirsch. H, Kelber. G, Wolbert. P (1995). Expression cloning and characterization of a pupal cuticle protein cDNA of *Galleria Mellonella* L. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 25(3), 355-363.

- Komi. E.A.D, Sharma. L, Dela Cruz. C.S. (2018). Chitin and its effects on inflammatory and immune responses. *Clin Rev Allergy Immunol* 54(2), 213-223.
- Kramer. K.J, Hopkins. T.L (1987). Tyrosine metabolism for insect cuticle tanning. *Archives of insect biochemistry and physiology* 6(4), 279-301.
- 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* 364, 345-352.
- 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 Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) as fish meal substitute-growth performance and chitin degradation in juvenile turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* 364-365, 345-352.
- Kurita. K (2001). Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Progress in Polymer Science* 26(9), 1921-1971.
- Latunde-Dada. G.O, Yang. W, Aviles. M.A. (2016). In Vitro Iron Availability from Insects and Sirloin Beef. *American Chemical Society* 44, 8420-8424.
- Lee. K.M, Lee. K.Y, Choi. H.W, Cho. M.Y, Kwon. T.H, Kawabata. S, Lee. B.L. (2003). Activated phenoloxidase from *Tenebrio molitor* larvae enhances the synthesis of melanin by using a vitellogenin-like protein in the presence of dopamine. *European Journal of Biochemistry* 267, 3695-3703.
- Lee. S.W, Tey. H.C, Wendy.W, Wan Zahari. M (2017). The effect of house cricket (*Acheta domesticus*) meal on growth performance of red hybrid tilapia (*Oreochromis* sp.). *International Journal of Aquatic Science* 8(2), 78-82.
- Leni. G, Caligiani. A, Sforza. S. (2019). Killing method affects the browning and quality of the protein fraction of Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) prepupae: a metabolomics and proteomic insight. *Food Research International* 115, 116-125.
- Leni. G, Soetemans. L, Caligiani. A, Sforza. S, Bastiaens. L. (2020). Degree of Hydrolysis Affects the Techno-Functional Properties of Lesser Mealworm Protein Hydrolysates. *Foods* 9(4).
- Lipsitz. E.Y (1969). Analysis of lipid during the life cycle of the house cricket, *Acheta domesticus* (L.). *Entomology*.

- Liu. X, Chen. X, Wang. H, Yang. Q, ur Rehman. K, Li. W, Cai. M, Li. Q, Mazza. L, Zhang. J, Yu, Z. Zheng. L. (2017). Dynamic changes of nutrient composition throughout the entire life cycle of black soldier fly. *PLoS ONE* 12(8).
- Lock. E.R, Arsiwalla. T, Waagbo. R. (2016). Insect larvae meal as an alternative source of nutrients in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*) postsmolt. *Aquaculture nutrition* 22, 1202-1213.
- Lorenz. M.W (2001). Synthesis of lipids in the fat body of *Gryllus bimaculatus*: age-dependency and regulation by adipokinetic hormone. *Arch Insect Biochem Physiol* 47, 198- 214.
- Lorenz. M.W, Anand. A.N (2004). Changes in the biochemical composition of fat body stores during adult development of female crickets, *Gryllus bimaculatus*. *Archives of insect biochemistry and physiology* 56(3), 110-119.
- Luparelli. A.V, Leni. G, Fuso. A, Pedrazzani. C, Palini. S, Sforza. S, Caligiani. A (2022). Development of a Quantitative UPLC-ESI/MS Method for the Simultaneous Determination of the Chitin and Protein Content in Insects. *Food Analytical Methods* 16, 252-265.
- M. Mayer. A. (2006). Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. *Phytochemistry* 67, 2318-2331.
- Majerus. M.E.N (1998). *Melanism: Evolution in Action*. Oxford: Oxford University Press.
- Makkar. H.P, Tran. G, Heuzé. V, Ankers. P (2014). State of the art on use of insects as animal feed. *Anim. Feed Sci. Technol* 197, 1-33.
- Makkar. H.P.S, Tran. G, Heuzé. V, Ankers. P. (2014). State of the art on use of insects as animal feed. *Animal Feed Science and Technology* 197, 1-33.
- Mancuso. T, Baldi. L, Gasco. L. (2016). An empirical study on consumer acceptance of farmed fish fed on insect meals: the Italian case. *Aquaculture International* 24, 1489-1507.
- Marberg. A, Van Kranenburg. H, Korzilius. H. (2017). The big bug: The legitimization of the edible insect sector in Netherlands. *Food Policy* 71, 111-123.
- Marono. S, Loponte. R, Lombardi. P, Vassalotti. G, Pero. M.E, Russo. F, Gasco. L, Parisi. G, Piccolo. G, Nizza. S, Di Meo. C, Attia. Y.A, Bovera. F. (2017). Productive performance and blood profiles of laying hens fed *Hermetia illucens* larvae meal as total

replacement of soybean meal from 24 to 45 weeks of age. *Poultry Science* 96, 1783-1790.

- Mathelin. J, Quennedey. B, Bouhin. H, Delachambre. J (1998). Characterization of two new cuticular genes specifically expressed during the post-ecdysial molting period in *Tenebrio molitor*. *Gene* 211(2), 351-359.
- Meneguz. M, Schiavone. A, Gai. F, Dama. A, Lussiana. C, Renna. M, Gasco. L. (2018). Effect of rearing substrate on growth performance, waste reduction efficiency and chemical composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 98.
- 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.
- Muthukrishnan. S, Merzendorfer. H, Arakane. Y, Kramer. K.J (2012). Chitin Metabolism in Insects. *Insect Molecular Biology and Biochemistry*, 193-235.
- Muzzarelli. R. (2010). Chitins and Chitosans as Immunoadjuvants and Non-Allergenic Drug Carriers. *Marine chitin and Chitosan* 8.
- Nakato. H, Toriyama. M, Izumi. S, Tomino. S (1990). Structure and expression of mRNA for a pupal cuticle protein of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry* 20(7), 667-678.
- Nowosielski. J.W, Patton, R.L (1965). Variation in the hemolymph protein, amino acid, and lipid levels in adult house crickets, *Acheta domesticus* L., of different ages. *Journal of Insect Physiology* 11(3), 263-270.
- Oonincx, D.G., & de Boer, I.J. (2012). Environmental Impact of the Production of Mealworms as a Protein Source for Humans – A Life Cycle Assessment. *PloS ONE*, 7.
- Oonincx. D.G.A.B, Van Broekhoven. S, Van Huis. A, Van Loon. J.J.A. (2015). Feed Conversion, Survival and Development, and Composition of Four Insect Species on Diets Composed of Food By-Products. *PloS ONE* 14(10).
- Pastor. B, Velasquez. Y, Gobbi. P, Rojo. S. (2015). Conversion of organic wastes into fly larval biomass: bottlenecks and challenges. *Journal of Insects as Food and Feed* 1(3), 179-193.

- Payne. G.F, Chaubal. M.V, Barbari. T.A. (1996). Enzyme-catalysed polymer modification: reaction of phenolic compounds with chitosan films. *Polymer* 37, 4643-4648.
- Qui. J, Hardin. P.E (1995). Temporal and Spatial Expression of an Adult Cuticle Protein Gene from *Drosophila* Suggests That Its Protein Product May Impart Some Specialized Cuticle Function. *Developmental Biology* 167(2), 416-425.
- Ramos-Elorduy. J, Moreno. J.M.P, Prado. E.E, Perez. M.A, Otero. J.L, De Guevara. O.L. (1997). Nutritional Value of Edible Insects from the State of Oaxaca, Mexico. *Journal of Food Composition and Analysis* 10, 142-157.
- Ravi. H.K, Vian. M.A, Tao. Y, Degrou. A, Costil. J, Trespeuch. C, Chemat, F. (2019). Alternative solvents for lipid extraction and their effect on protein quality in black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. *Journal of Cleaner Production* 238.
- Ravindran. V, Blair. R. (1993). Feed resources for poultry production in Asia and the Pacific. Animal protein sources. *World's Poultry Science Journal* 49, 219-235.
- Renna. M, Schiavone. A, Gai. F, Dabbou. S, Lussiana. C, Malfatto. V, Prearo. M, Capucchio. M.T, Biasato. I, Biasibetti. E, De Marco. M, Brugiapaglia. A, Zoccarato. I, Gasco. L. (2017). Evaluation of the suitability of a partially defatted black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) larvae meal as ingredient for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) diets. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 8(57).
- Riley. P.A. (1997). Melanin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 29, 1235-1239.
- Rondot. I, Quenedey. B, Courrent. A, Lemoine. A, Delachambre. J (1996). Cloning and Sequencing of a cDNA Encoding a Larval- Pupal-Specific Cuticular Protein in *Tenebrio Molitor* (Insecta, Coleoptera). *European Journal of Biochemistry* 235(1-2), 138-143.
- Rudall. K.M (1963). The Chitin/Protein Complexes of Insect Cuticles. *Advances in Insect Physiology* 1, 257-313.
- Rumpold. B.A, Schluter. O.K. (2013). Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Molecular Nutrition food Research* 57, 802-823.
- Sanchez-Muros. MJ, 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.

- Schiavone. A, Dabbou. S, De Marco. M, Cullere. M, Biasato. I, Biasibetti. E, Capucchio. M.T, Bergagna. S, Dezzutto. D, Meneguz. M. (2018). Black soldier fly larva fat inclusion in finisher broiler chicken diet as an alternative fat source. *An international journal of animal bioscience* 12, 2032-2039.
- Sealey. W.M, Gaylord. T.G, Barrows. F.T, Tomberlin. J.K, McGuire. M.A, Ross. C, St-Hilaire. S. (2011). Sensory Analysis of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, Fed Enriched Black Soldier Fly Prepupae, *Hermetia illucens*. *Journal of the World Aquaculture Society* 42, 34-45.
- Selinheimo. E, NiEidhin. D, Steffensen. C, Nielsen. J, Lomascolo. A, Halaouli. S, Record. E, O'Beirne. D, Buchert. J, Kruus. K. (2007). Comparison of the characteristics of fungal and plant tyrosinases. *Journal of Biotechnology* 130, 471-480.
- Shahidi. F, Abuzaytoun. R (2005). Chitin, chitosan, and co-products: chemistry, production, applications, and health effects. *Advances in Food and Nutrition Research*.
- Sosa. D.A.T, Fogliano. V. (2017). Potential of Insect-Derived Ingredients for Food Applications. *Insect Physiology and Ecology* 215-231.
- St-Hilaire. S, Sheppard. C, Tomberlin. J.K, Irving. S, Newton. L, McGuire. M.A, Mosley. E.E, Hardy. R.W, Sealey. W. (2007). Fly Prepupae as a Feedstuff for Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of the World Aquaculture Society* 38, 59-67.
- Sugumaran. M, Barek. H. (2016). Critical Analysis of the Melanogenic Pathway in Insects and Higher Animals. *International Journal of Molecular Sciences* 17(10).
- Sugumaran. M. (1991). Molecular mechanisms for mammalian melanogenesis Comparison with insect cuticular sclerotization. *Federation of European Biochemical Societies* 293, 4-10.
- Sugumaran. M. (2002). Comparative Biochemistry of Eumelanogenesis and the Protective Roles of Phenoloxidase and Melanin in Insects. *Pigment Cell & Melanoma research* 15, 2-9.
- Sun. T, Long. R.J, Liu. Z.Y. (2013). The effect of a diet containing grasshoppers and access to free-range on carcass and meat physicochemical and sensory characteristics in broilers. *British Poultry Science* 54, 130-137.
- Sun-Waterhouse. D, Waterhouse. G.I.N, You. L, Zhang. J, Liu. Y, Ma. L, Gao. J, Dong. Y. (2016). Transforming insect biomass into consumer wellness foods: A review. *Food Research International* 89, 129-151.

- Tellam. R.L, Wijffels. G, Willadsen. P (1999). Peritrophic matrix proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29(2), 87-101.
- True. J.R (2003). Insect melanism: the molecules matter. *Trends Ecol. Evol.* 18, 640-647.
- Trullas. S.C, Van Wyk. J.H, Spotila. J.R (2007). Thermal melanism in ectotherms. *Journal of Thermal Biology* 32(5), 235-245.
- Turk. D, Bohn. T, Castenmiller. J, De Henauw. S, Hirsch-Ernst. K. I, Maciuk. A, Mangelsdorf. I, McArdle. H, Naska. A, Pelez. C, Pentieva. K, Siani. A, Thies. F, Zabouri. S, Vinciti. M, Cubadda. F, Frenzel. T, Heinonen. M, Marchelli. R, Neuhauser-Berthold. M, Poulsen. M, Prieto Maradona. M, Schlatter. J.R, Van Loveren. H, Goumperis. T, Knutsen. H.K (2021). Safety of frozen and dried formulations from whole house crickets (*Acheta domesticus*) as a Novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. *Efsa Journal* 19(8).
- Van Huis. A, Dicke. M, Van Loon. J.J.A. (2015). Insects to feed the world. *Journal of Insects as Food and Feed* 1(1), 3-5.
- Van Huis. A, Van Itterbeeck. J, Klunder. H, Mertens. E, Halloran. A, Muir. G, Vantomme. P. (2013). Edible insects: future prospects for food and feed security. *FAO Forestry Paper*.
- Veldkamp. T, Van Duinkerken. G, Van Huis. A, Lakemond. C.M.M, Ottevanger. E, Bosch. G, Van Boekel. T. (2012). Insects as a sustainable feed ingredient in pig and poultry diets: a feasibility study. *Animal Nutrition and Feeding*.
- Verbeke. W. (2015). Profiling consumers who are ready to adopt insects as a meat substitute in a Western society. *Food Quality and Preference* 39, 147-155.
- Watt. W.B (1968). Adaptive Significance of Pigment Polymorphisms in *Colias* Butterflies. I. Variation of Melanin Pigment in Relation to Thermoregulation. *Evolution* 22, 437-458.
- Womeni. H.C, Linder. M, Tiencheu. B, Mbiapo. F.T, Villeneuve. P, Fanni. J, Parmentier. M. (2009). Oil of insects and larvae consumed in Africa: potential source of polyunsaturated fatty acids. *Oilseeds & fats Crops and Lipids* 16, 4-6.
- Woodring. J, Lorenz. M.W (2007). Feeding, nutrient flow, and functional gut morphology in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Journal of morphology* 268(9), 815-825.

- Yang. X, Liu. Y, Payne. G.F. (2009). Crosslinking Lessons From Biology: Enlisting Enzymes for Macromolecular Assembly. *The Journal of Adhesion* 85, 576-589.
- Yi. L, Lakemond. C.M.M, Sagis. L.M.C, Schadler. V.E, Van Huis. A, Van Boekel. M.A.J.S. (2013). Extraction and characterization of protein fractions from five insect species. *Food Chemistry* 141, 3341-3348.
- Yi. L, Van Boekel. M.A.J.S, Lakemond. C.M.M. (2016). Extracting *Tenebrio molitor* protein while preventing browning: effect of pH and NaCl on protein yield. *Journal of Insects as Food and Feed* 3(1), 21-31.
- Zhao. X, Vázquez-Gutiérrez. J.L, Johansson. D.P, Landberg. R, Langton. M. (2016). Yellow Mealworm Protein for Food Purposes – Extraction and Functional Properties. *PloSE ONE* 11(2). Schiavone. A, De Marco. M, Martinez. S, Dabbou. S, Renna. M, Madrid. J, Hernandez. F, Rotolo. L, Costa. P, Gai. F, Gasco. L (2017). Nutritional value of a partially defatted and highly defatted black soldier fly larvae (*Hermetia illucens* L.) meal for broiler chickens: apparent nutrient digestibility, apparent metabolizable energy and apparent ileal amino acid digestibility. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 8(51).