

Novel ingredients and underexploited feed resources to improve sustainability of farmed fish species: growth, quality, health and food safety issues - SUSHIN



Valore nutritivo e sicurezza alimentare di ingredienti innovativi o sotto-utilizzati di interesse per l'acquacoltura



Novel ingredients and underexploited feed resources to improve sustainability of farmed fish species: growth, quality, health and food safety issues - SUSHIN

Valore nutritivo e sicurezza alimentare di ingredienti innovativi o sotto-utilizzati di interesse per l'acquacoltura

Curatori

Domitilla Pulcini, Federica di Giacinto, Emilio Tibaldi

Roma 2021



**FONDAZIONI IN RETE
PER LA RICERCA
AGROALIMENTARE**

Autori

Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi
dell'Economia Agraria

Centro di Ricerca Zootecnia e Acquacoltura
Via Salaria, 31 – 00016 Monterotondo (RM)

Dott. Fabrizio Capoccioni

Dott.ssa Sebastiana Failla

Dott.ssa Michela Contò

Dott. Marco Martinoli

Dipartimento di Scienze Agroalimentari,
Ambientali e Animali

Università degli Studi di Udine

Via delle Scienze, 206 - 33100 Udine (UD)

Dott.ssa Gloriana Cardinaletti

Dott. Roberto Cerri

Prof.ssa Francesca Tulli

Istituto Zooprofilattico Sperimentale
dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale"

Via Campo Boario, snc – 64100 Teramo (TE)

Igiene e Tecnologie degli Alimenti

Dott. Francesco Pomilio

Dott.ssa Violeta Di Marzio

Dott.ssa Cristina Marfoggia

Ecosistemi dulciacquicoli

Dott. Riccardo Caprioli

Dott.ssa Federica Di Giacinto

Laboratorio Nazionale di Riferimento per gli
inquinanti organici persistenti
alogenati nei mangimi e negli alimenti

Dott. Gianfranco Diletti

Dott.ssa Roberta Ceci

Bromatologia e residui

Dott.ssa Valeria Melai

Dott.ssa Mirella Bellocci

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agrarie,
Alimentari, Ambientali e Forestali

Università degli Studi di Firenze

Via delle Cascine, 5 - 50144 Firenze (FI)

Prof.ssa Giuliana Parisi

Prof. Mario Tredici

Dott.ssa Natascia Biondi

Siringrazia la Fondazione AGER (Fondazioni in rete per la Ricerca Agroalimentare)
per il sostegno fornito al Progetto "Novel ingredients and underexploited feed
resources to improve sustainability of farmed fish species: growth, quality,
health and food safety issues - SUSHIN - Progetto AGER 2- Cod. 2016-0112",
coordinato dal Prof. Emilio Tibaldi dell'Università degli Studi di Udine.

Premessa

È ben noto che tra le varie forme di zootecnia, la produzione mondiale di animali acquatici che aggrega pesci, molluschi e crostacei allevati a fini alimentari sia quella con i tassi di crescita più elevati da un oltre decennio. Essa ha da tempo superato la carne bovina e la stessa produzione della pesca tradizionale (FAO, 2020). Entro il 2030 (FAO, 2020), si stima che l'acquacoltura fornirà i due terzi dei prodotti ittici destinati al consumo umano. Si tratta di un settore che vanta antiche tradizioni in Italia, grazie alla relativa abbondanza di acque interne, al notevole sviluppo costiero, alla varietà di ambienti idonei alle produzioni acquatiche, nonché al bagaglio di conoscenze ed esperienze tecnico-scientifiche sviluppate ed acquisite dagli operatori del settore. Tuttavia, la produzione dell'acquacoltura nazionale è ben lungi dal soddisfare la domanda interna di prodotti ittici che attualmente viene coperta per oltre il 70% dall'importazione anche da aree extra-UE (Dati ISMEA, <http://www.ismea.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/4849>). Si tratta pertanto di un settore con grandi potenzialità di mercato che **AGER - Agroalimentare e ricerca**, progetto promosso e sostenuto da una associazione di fondazioni di origine bancaria, ha deciso di supportare finanziando ricerche e studi capaci di incidere positivamente sullo sviluppo dell'acquacoltura nazionale e della piscicoltura in particolare.

L'**obiettivo principale** di AGER2-Acquacoltura è il miglioramento dell'alimentazione dei pesci allevati, quale elemento cruciale per la sostenibilità economica, ambientale e sociale del settore. Ciò passa attraverso l'individuazione e la valutazione di nuovi alimenti proteici sostenibili, conformi ai principi della bioeconomia circolare, alternativi o complementari alle fonti proteiche convenzionali, da impiegare in mangimi sempre meno dipendenti da alimenti che originano da risorse marine limitate, quali le farine di pesce, ma anche da ingredienti di origine agroindustriale sempre più contesi tra settori zootecnici e alimentazione umana.

Il presente manuale è uno dei prodotti del lavoro svolto nell'ambito del progetto di ricerca AGER2-**SUSHIN - Sustainable f_iSH feeds INnovative ingredients**, che tra i suoi obiettivi include la valutazione di possibili ingredienti per una nuova generazione di mangimi destinati alle principali specie ittiche allevate in Italia, quali la spigola, l'orata e la trota iridea, con l'obiettivo di migliorare la qualità e la sostenibilità delle produzioni nella loro più ampia declinazione. Le farine ottenute da scarti di macellazione della filiera avicola, da microalghe e cianobatteri, da insetti e dal gambero rosso della Louisiana sono gli ingredienti innovativi o sotto-utilizzati presi in considerazione dal progetto SUSHIN.

La caratterizzazione nutrizionale e igienico-sanitaria di nuovi alimenti zootecnici suscettibili di inclusione in mangimi completi per i pesci allevati rappresenta il primo fondamentale elemento conoscitivo da acquisire per stabilirne l'idoneità d'impiego.

In questa direzione, nell'ambito dell'azione progettuale denominata *"Assessment of the nutritive value and safety of feed ingredients"*, il Centro di Ricerca "Zootecnia e Acquacoltura" del CREA ha analizzato la composizione chimico-nutrizionale dei suddetti ingredienti; il Dipartimento di Scienze Agro-Alimentari, Ambientali e Animali dell'Università degli Studi di Udine ha misurato la digeribilità *in vivo* dei nutrienti su trota e spigola; l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" li ha caratterizzati per la sicurezza alimentare determinando presenza e livelli di contaminanti chimici e microbiologici.

Indice

| | | |
|---|--|----|
| ● | Capitolo 1 - Riferimenti metodologici e normativi | 07 |
| | 1.1 I riferimenti metodologici | 07 |
| | 1.1.1 Analisi centesimale | 07 |
| | 1.1.2 Chitina | 08 |
| | 1.1.3 Carotenoidi totali e astaxantina | 08 |
| | 1.1.4 Acidi grassi | 09 |
| | 1.1.5 Aminoacidi, taurina, carnitina e anserina | 09 |
| | 1.1.6 Macro- e microelementi..... | 10 |
| | 1.1.7 Vitamine..... | 10 |
| | 1.1.8 Energia lorda | 10 |
| | 1.1.9 Digeribilità..... | 11 |
| | 1.1.10 Caratterizzazione igienico-sanitaria | 11 |
| | 1.2 I riferimenti normativi | 13 |
| ● | Capitolo 2 - Le PAT avicole | 19 |
| | 2.1 Le farine di scarti del macello avicolo | 19 |
| | 2.2 Farine avicole (PBM) del progetto SUSHIN | 21 |

| | |
|---|----|
| ● Capitolo 3 - Gli insetti..... | 27 |
| 3.1 Farine da larve di insetto | 27 |
| 3.2 Farine da larve di insetto nel progetto SUSHIN..... | 29 |
| ● Capitolo 4 - Le microalghe e i cianobatteri..... | 37 |
| 4.1 Le microalghe e i cianobatteri..... | 37 |
| ● Capitolo 5 - Il gambero rosso della Louisiana | 45 |
| 5.1 <i>Procambarus clarkii</i> | 45 |
| Bibliografia..... | 53 |

Capitolo 1

Riferimenti metodologici e normativi

1.1 Riferimenti metodologici

Le analisi chimico-nutrizionali sugli ingredienti sono state condotte presso i laboratori della sede di Monterotondo del Centro di Zootecnia e Acquacoltura del CREA, sotto la supervisione della Dott.ssa Sebastiana Failla, ad eccezione delle analisi delle ammine biogene, condotte da un laboratorio privato certificato.

Gli ingredienti sono stati sottoposti alle seguenti determinazioni analitiche:

1. Analisi centesimale
2. Chitina
3. Carotenoidi totali e astaxantina
4. Composizione in acidi grassi
5. Composizione in aminoacidi proteici, taurina, carnitina e anserina
6. Composti azotati non proteici
7. Macro e microelementi
8. Vitamine B2, B5, B6, C, E

Per ciascuna analisi, si riporta la metodica utilizzata.

1.1.1 Analisi centesimale

Sostanza secca, ceneri, proteine totali ed estratto etereo sono stati determinati secondo le metodiche AOAC (1995). Il **contenuto di umidità** (AOAC, 1995, n. 926.08) è stato determinato essiccando il campione a 102°C per 24 ore in capsule di porcellana preventivamente tarate. Le **ceneri totali** (AOAC, 1995, n. 923.03) sono state determinate in muffola per incenerimento del campione a 525°C per 24

h. La **proteina grezza** è stata determinata con il metodo Kjeldahl (AOAC 1995 n. 955.04) attraverso la quantificazione dell'azoto proteico amminico e ammidico, escluso l'azoto presente sotto forma nitrosa o nitrica. Il metodo è basato sulla mineralizzazione dell'azoto mediante trattamento a caldo con acido solforico concentrato e successiva distillazione dell'azoto ammoniacale, raccolto su una quantità nota di acido solforico, il cui eccesso è titolato con una soluzione di soda 0,1M. La quantità di proteina grezza viene stimata moltiplicando l'N titolato per 6,25.

Il **grasso totale** è stato determinato secondo il metodo Soxhlet (AOAC 1995, n. 948.15), previa idrolisi acida con HCl 3N. La sostanza, dopo essere stata neutralizzata con successivi lavaggi con acqua, è essiccata ed i lipidi totali vengono estratti mediante etere di petrolio con l'ausilio di ditali di cellulosa. Gli **estrattivi inazotati** NFE comprendenti zuccheri, amidi e fibre (emicellulosa, cellulosa e lignina) sono determinati per differenza.

1.1.2 Chitina

La **chitina** è stata determinata secondo la metodica proposta da Black & Schwartz (1950) con successive modifiche. Il procedimento analitico è costituito da tre fasi fondamentali:

1. allontanamento del calcio attraverso un processo di demineralizzazione utilizzando acido cloridrico 1M;
2. allontanamento delle proteine dal campione demineralizzato attraverso una idrolisi basica con soda 1M a 90°C e successiva neutralizzazione con una serie di lavaggi con acqua distillata;
3. eliminazione dei grassi residui sottoponendo il campione un flusso di etere.

Il residuo del campione dopo i diversi trattamenti è essiccato e pesato.

1.1.3 Carotenoidi totali e astaxantina

I carotenoidi totali e l'astaxantina sono stati analizzati secondo la metodica di Parisenti *et al.* (2011). Il campione è stato sottoposto ad estrazione tripla con acetone e i carotenoidi sono stati separati con esano. Il contenuto di **carotenoidi totali** è stato ottenuto tramite lettura allo spettrofotometro a 470 nm. Tramite la curva di taratura, usando l'astaxantina come standard, è stato quantificato il valore di carotenoidi espressi in $\mu\text{g g}^{-1}$. Lo stesso estratto viene utilizzato per la quantificazione dell'**astaxantina** in HPLC utilizzando una colonna C18. L'identificazione è avvenuta tramite confronto con lo standard puro di astaxantina ed espresso in $\mu\text{g g}^{-1}$.

Per la quantificazione dei carotenoidi delle alghe sono state utilizzate le metodiche riportate in Dere *et al.* (1998) e Lichtentaler & Wellburn (1983). L'estrazione è stata effettuata con acetone e poi si è

provveduto effettuare una scansione allo spettrofotometro a 370 nm ed a 600 nm. I carotenoidi totali sono stati quantificati secondo la funzione di [Lichtentaler & Wellburn \(1983\)](#).

1.1.4 Acidi grassi

L'**estrazione dei lipidi** è stata effettuata su 1 g di campione con una miscela di cloroformio/metanolo (2:1, v/v) secondo il metodo di [Folch et al. \(1957\)](#). I campioni di alghe hanno subito un passaggio in colonnine Strata SCX (55 µm 70A) 10g/6ml (Phenomenex) per eliminare la clorofilla.

Il grasso estratto è stato metilato secondo il metodo [IUPAC \(1992\)](#) che prevede l'aggiunta a circa 100 mg di grasso di 1 ml di esano e di 0,05 ml di una soluzione metanolica di KOH 2N.

La **composizione in acidi grassi** è stata rilevata per gascromatografia, impiegando un GC con rivelatore a ionizzazione di fiamma, una colonna capillare in silice (cyanopropylpolysiloxane Supelco, 2560; 100 m, 0,25 mm (i.d.), 0,25 mm di spessore) ed utilizzando come gas di trasporto l'elio ad un flusso costante di 1 ml min⁻¹. La temperatura dell'iniettore è stata impostata a 250°C del FID a 300°C. L'iniezione avviene in modalità split-splitless, con temperatura programmata (4 minuti a 140°C aumentando successivamente fino a 220°C di 4°C al minuto). Sono stati tralasciati in tabella gli acidi grassi meno rappresentati.

1.1.5 Aminoacidi, taurina, carnitina e anserina

L'analisi dei 18 amminoacidi, essenziali e non essenziali, è stata effettuata su campioni digeriti per 14 ore a 110°C in HCl 6N. Per la determinazione di taurina, anserina e carnitina i campioni sono stati trattati con HCl 0,1 N, il triptofano è stato estratto tramite idrolisi basica con idrossido di sodio 2 N a 120°C per 4 ore. Successivamente tutti i campioni sono stati derivatizzati secondo le procedure dell'AccQ-Fluor reagent kit della Waters (Milford, MA, U.S.A.) e determinati in HPLC su colonna Water AccQ-Tag column (3,9 x 150 mm) flusso g 100 g⁻¹ e detector Fluorimetro Waters 2475 con eccitazione 250 nm ed emissione 395 nm. I picchi sono stati identificati e quantificati usando gli amminoacidi standard forniti dal kit ed espressi in g 100 g⁻¹ di sostanza secca per i 18 amminoacidi totali e in µg g⁻¹ per taurina, carnitina e anserina.

L'azoto non proteico (NPN) è stato analizzato secondo la metodica descritta da [Careri et al. \(1993\)](#) con alcune modifiche: 2 g di campione sono stati disciolti in acqua e sono stati incubati 30 min a temperatura ambiente con un pari volume di TCA 10%, per la precipitazione delle proteine. Successivamente il campione è stato centrifugato a 4000 rpm per 15 min, sul surnanate recuperato è stata eseguita la titolazione con metodica Kjeldahl ([AOAC, 1995, n. 955.04](#)), per valutare il contenuto di azoto non proteico espresso in mg NPN 100 g⁻¹.

La determinazione delle ammine biogene è avvenuta seguendo la metodica di [Ruiz-Capillas \(2015\)](#).

Brevemente, 1,4 g di campione sono stati incubati per 24h a temperatura ambiente con 10 ml di TCA 7,5%. Il campione è stato omogenizzato e centrifugato a 5000 rpm per 15 min a 4 °C. Il surnatante è stato filtrato e 10 µl sono stati iniettati in HPLC per la derivatizzazione post column, equipaggiato di una colonna a scambio cationico. Le ammine sono state lette in fluorescenza a 330 nm e a 465 nm.

1.1.6 Macro- e microelementi

Per l'analisi dei principali macro- e microelementi (Ca, Cu, Mn, Fe, K, Na, Zn, Mg, P), i campioni sono stati mineralizzati usando il microonde, con HNO₃ 64%, H₂O₂ e H₂O ultrapura. Il campione così ottenuto è stato portato a volume noto con H₂O ultra-pura bidistillata ed analizzato con metodo di Spettroscopia ad assorbimento atomico (AAS) con un fornello di grafite o un fornello a fiamma a seconda della concentrazione del minerale analizzato. Tutti i risultati si riferiscono alla concentrazione sulla sostanza secca. Il fosforo è stato quantificato secondo la metodica descritta in GU n. 214 (12/08/1975) tramite analisi spettrofotometrica.

1.1.7 Vitamine

La **vitamina E** (identificata esclusivamente in *Arthrospira platensis*) è stata quantificata secondo la metodica riportata in [Qian et al. \(1998\)](#). I campioni sono stati estratti con acetone:cloroformio (30:70), evaporati e sospesi in n-butanolo ed iniettati in HPLC utilizzando una colonna C18 con fase eluente metanolo 100% e lettura a 210 nm. La vitamina E è stata quantificata confrontando le aree con la curva standard ed espressa in µg g⁻¹.

Le vitamine idrosolubili sono state ottenute secondo la metodica descritta da [Hasan et al. \(2013\)](#): 1 g di farina è stato incubato per 40 min a 70°C in agitazione con una soluzione di acetonitrile:acido acetico (v:v). Successivamente, il campione è stato centrifugato a 5000 rpm per 5 min a temperatura ambiente e un'aliquota di surnatante è stata filtrata su filtri da siringa 0,20 µm; 25 µl di filtrato sono stati iniettati nel sistema HPLC su colonna C18 Reverse phase con una fase mobile isocratica di metanolo:buffer fosfato e letto in UV a 265 nm. I picchi del campione sono stati identificati confrontandoli con i tempi di uscita dei picchi standard e calcolati in base ai valori ottenuti dalle curve standard ed espressi come mg di vitamina 100 g⁻¹ di farina.

1.1.8 Energia lorda

L'energia lorda è stata misurata con bomba calorimetrica secondo le indicazioni di [Miller et al. \(1959\)](#). L'alimento pesato in una capsula adatta è stato posto nel calorimetro, a sua volta circondato da acqua.

Dall'esterno è stata fatta passare nel calorimetro una corrente elettrica che ha provocato l'esplosione e la completa combustione dell'alimento con liberazione di calore. La variazione di temperatura dell'acqua corrisponde all'energia del campione misurata in Kcal.

1.1.9 Digeribilità

La misura della digeribilità apparente della proteina e dell'energia degli ingredienti è stata effettuata *in vivo* su trota iridea (*Oncorhynchus mykiss* W.) e su spigola (*Dicentrarchus labrax* L.), utilizzando il metodo indiretto e per differenza rispetto alla digeribilità di una dieta di riferimento nella quale l'ingrediente test viene incluso in proporzione nota (Halver & Hardy, 2002; NRC, 2011).

Nel metodo indiretto si fa uso di un marcatore indigeribile, neutrale rispetto ai processi digestivo-assorbitivi, aggiunto in dosi note alla dieta di riferimento. Il marcatore pertanto tende a concentrarsi nelle feci in misura inversamente proporzionale alla digeribilità dell'alimento, che viene determinata rapportando le concentrazioni del marcatore nell'alimento e nelle feci. La dieta di riferimento è stata qui addizionata con due dei marcatori più utilizzati in questo tipo di studi nei pesci: le ceneri acido insolubili (CAI) sottoforma di Celite®545 (Carlo Erba) e l'Ittrio (Yt) sottoforma di ossido (Sigma- Aldrich).

1.1.10 Caratterizzazione igienico-sanitaria

La caratterizzazione igienico-sanitaria degli ingredienti è stata eseguita presso i laboratori dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale". I metodi utilizzati per le analisi microbiologiche e chimiche vengono di seguito elencati.

- Esame batteriologico standard in aerobiosi ed in anaerobiosi (metodo interno).
- Metodo orizzontale per la ricerca di *E. coli* produttori di tossina shiga-like (STEC) e determinazione dei sierogruppi O157, O111, O26, O103 e O145 –metodo real time PCR (ISO/TS 13136:2012).
- Metodo orizzontale per la ricerca di *Listeria monocytogenes* e *Listeria* spp. negli alimenti destinati all'alimentazione umana ed animale e nei campioni ambientali: parte1- isolamento (ISO 11290:2017).
- Metodo orizzontale per la ricerca di *Salmonella* spp. (ISO 6579:2002/Cor 1:2004).
- Numerazione della carica batterica mesofila (ISO 4833-1:2013).
- Numerazione di coliformi ed *Escherichia coli* mediante piastre petrifilm (AOAC Official method 991.14:2002).
- Metodo orizzontale per la determinazione di *Norovirus* GI e GII e del virus dell'epatite A in

alimenti mediante real time RT-PCR- metodo di rilevazione qualitativo (ISO-TS 15216-2:2013).

- Ricerca *Shigella* spp. da alimenti (ISO 21567:2004).
- Numerazione Stafilococchi coagulasi positivi (*S. aureus* ed altre specie) - da alimenti destinati all'uomo e da alimenti destinati agli animali - metodo con rabbit plasma fibrinogen agar medium (ISO6888 parte2:1999).
- Metodo per la numerazione di enterococchi in alimenti per l'uomo e per animali (NMKL 68-5th Ed).
- Numerazione di batteri solfito riduttori (ISO 15213:2003).
- Ricerca di sostanze inibenti e chinolonici mediante screening microbiologico negli alimenti di origine animale destinati all'uomo e all'alimentazione animale (D. M. 10.3.97 SERIE GENERALE n. 103 del 6/5/97).
- Ricerca e quantificazione di microcistine in campioni di acqua, crostacei e mangimi (metodo interno-kit ELISA) (solo per la farina di gambero).
- Ricerca di metalli pesanti (mercurio, cadmio , piombo e arsenico totale) applicando metodi normati quali UNI EN 13804:2013 e UNI EN 13805:2014 per la preparazione e la digestione del campione sotto pressione e UNI EN 15763:2010 per l'analisi strumentale con spettrometria di massa con plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS).
- Ricerca di diossine (PCDD/F), policlorobifenili diossina-simili (DL-PCB), policlorobifenili non diossina-simili (NDL-PCB), a seguito delle seguenti fasi: estrazione, purificazione, separazione su colonna cromatografica, determinazione analitica e calcolo della tossicità equivalente (TEQ) (GC-HRMS-Calcolo).
- Ricerca di pesticidi organo-clorurati, mediante gas cromatografia capillare ad alta risoluzione (HRGC) con rivelatore a cattura di elettroni (ECD).

1.2 I riferimenti normativi

In Europa, le materie prime ammesse nei mangimi sono elencate nel **Regolamento (UE) 2017/1017 della Commissione del 15 giugno 2017, che modifica il regolamento (UE) n. 68/2013 concernente il catalogo delle materie prime per mangimi.**

Le materie prime considerate nel progetto *SUSHIN* rientrano nelle categorie:

- A. Proteine animali trasformate (N. 9.4.1).** Prodotto ottenuto per trattamento termico, essiccazione e macinazione di animali terrestri a sangue caldo o loro parti, compresi gli invertebrati diversi dalle specie patogene per l'uomo e per gli animali in tutti gli stadi di vita, da cui il grasso può essere stato in parte estratto o separato per via fisica. Se estratto con solventi, può contenere fino allo 0,1% di esano. Dichiarazioni obbligatorie: Proteina grezza; Sostanze grasse grezze; Ceneri grezze; Tenore di umidità, se > 8%.
- B. Farina di crostacei (N. 10.3.1).** Prodotto ottenuto per riscaldamento, pressione ed essiccazione di crostacei interi, o loro parti, compresi i gamberi di allevamento e selvatici. Dichiarazioni obbligatorie: Calcio; Ceneri insolubili in HCl, se > 5%.
- C. Farina di alghe (N. 7.1.3).** Prodotto della fabbricazione di olio di alghe, ottenuto per estrazione delle alghe. Le alghe sono state inattivate. Può contenere fino allo 0,1% di agenti antischiumogeni. Dichiarazioni obbligatorie: Proteina grezza; Sostanze grasse grezze; Ceneri grezze.

Il **Regolamento (CE) N. 999/2001 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 maggio 2001** reca disposizioni per la prevenzione, il controllo e l'eradicazione delle encefalopatie spongiformi trasmissibili (TSE) nei bovini, negli ovini e nei caprini. Esso si applica alla produzione e all'immissione sul mercato di animali vivi e di prodotti di origine animale e, in taluni casi specifici, all'esportazione degli stessi. All'art. 7 (par. 1) si vieta la somministrazione ai ruminanti di proteine animali trasformate, mentre all'art. 7 (par. 2) si estende tale divieto agli animali non ruminanti, diversi dagli animali da pelliccia, come specificato nell'allegato IV di detto Regolamento.

Le modifiche da segnalare di interesse per l'acquacoltura apportate al suddetto Regolamento sono:

- A. Regolamento (UE) N. 56/2013 della Commissione del 16 gennaio 2013 che modifica gli allegati I e IV del Regolamento (CE) n. 999/2001 del Parlamento europeo e del Consiglio recante disposizioni per la prevenzione, il controllo e l'eradicazione di alcune encefalopatie spongiformi trasmissibili,** che autorizza l'utilizzo di farine animali provenienti dagli scarti di macellazione, denominate PAT (proteine animali trasformate), nei mangimi per l'allevamento suinicolo, avicolo e per l'acquacoltura.

- B. Regolamento (UE) N. 893/2017 della Commissione del 24 maggio 2017 che modifica gli allegati I e IV del Regolamento (CE) n. 999/2001 del Parlamento europeo e del Consiglio e gli allegati X, XIV e XV del Regolamento (UE) n. 142/2011 della Commissione per quanto riguarda le disposizioni in materia di proteine animali,** che autorizza l'utilizzo delle proteine animali trasformate derivate da insetti e i mangimi composti che le contengono per l'alimentazione degli animali d'acquacoltura. La Commissione Europea stabilisce condizioni specifiche per la produzione e l'uso degli insetti "al fine di evitare qualsiasi rischio di contaminazione incrociata con altre proteine che potrebbero comportare un rischio di TSE nei ruminanti". Le proteine animali trasformate derivate da insetti potranno essere prodotte in impianti adibiti esclusivamente alla produzione di prodotti derivati da insetti d'allevamento. Tenendo conto della valutazioni del rischio a livello nazionale, nonché del parere dell'*European Food Safety Authority*, vengono ammesse per l'impiego nei mangimi le seguenti specie di insetti allevate attualmente nell'Unione: mosca soldato nera (*Hermetia illucens*), mosca comune (*Musca domestica*), tenebrione mugnaio (*Tenebrio molitor*), alfitobio (*Alphitobius diaperinus*), grillo domestico (*Acheta domesticus*), grillo tropicale (*Gryllobates sigillatus*) e grillo silente (*Gryllus assimilis*). Come tali, questi animali sono soggetti alle medesime norme relative ai mangimi, pertanto per la loro alimentazione è possibile utilizzare materie prime di origine non animale e prodotti di origine animale solo se ottenuti da materiali di categoria 3 ed autorizzati a tal fine (farina di pesce, prodotti sanguigni, fosfato dicalcico e fosfato tricalcico di origine animale, proteine idrolizzate derivate da non ruminanti, proteine idrolizzate derivate da pelli di ruminanti, gelatina e collagene derivati da non ruminanti, uova e prodotti a base di uova, latte, prodotti a base di latte, prodotti derivati dal latte e colostro, miele e grassi fusi). Di contro, ma in linea con le disposizioni vigenti, è vietato l'utilizzo di proteine derivate da ruminanti, rifiuti di cucina e ristorazione, farina di carne e ossa, stallatico e di materiali vietati come da Allegato III del Reg. (CE) n. 767/2009.

Tabella 1. Metodi di trasformazione standard di materiali di categoria 3¹, ai sensi del Reg. (UE) N. 142/2011.

| Metodo di trasformazione | Riduzione | Durata, temperatura e pressione | Sistema |
|--------------------------|---|--|------------------------|
| 1 | Se le dimensioni delle particelle di origine animale sono > di 50 mm, i sottoprodotti sono ridotti con idonea attrezzatura | I sottoprodotti di origine animale di dimensioni ≤ a 50 mm sono scaldati portando la temperatura al centro della massa a più di 133°C per almeno 20' ininterrottamente sotto una pressione assoluta ≥ a 3 bar | Continuo o discontinuo |
| 2 | Se le dimensioni delle particelle di origine animale sono > di 150 mm, i sottoprodotti sono ridotti con idonea attrezzatura | I sottoprodotti di origine animale di dimensioni ≤ a 50 mm sono scaldati portando la temperatura al centro della massa a più di 100°C per almeno 125', a oltre 110°C per almeno 120' e infine a oltre 120°C per almeno 50' | Discontinuo |
| 3 | Se le dimensioni delle particelle di origine animale sono > di 30 mm, i sottoprodotti sono ridotti con idonea attrezzatura | I sottoprodotti di origine animale di dimensioni ≤ a 50 mm sono scaldati portando la temperatura al centro della massa a più di 100°C per almeno 95', a oltre 110°C per almeno 55' e infine a oltre 120°C per almeno 13' | Continuo o discontinuo |
| 4 | Se le dimensioni delle particelle di origine animale sono > di 30 mm, i sottoprodotti sono ridotti con idonea attrezzatura | I sottoprodotti sono posti in un recipiente in cui è stato aggiunto grasso, in modo da garantire che la temperatura al centro della massa sia portata oltre i 100°C per almeno 16', a oltre 110°C per almeno 13', a oltre 120°C per almeno 8' e infine a oltre 130°C per almeno 3' | Continuo o discontinuo |

¹ Definiti sulla base del Reg. (CE) N. 1069/2009

Tabella 1. Continua

| Metodo di trasformazione | Riduzione | Durata, temperatura e pressione | Sistema |
|--------------------------|--|--|------------------------|
| 5 | Se le dimensioni delle particelle di origine animale sono > di 20 mm, i sottoprodotti sono ridotti con idonea attrezzatura | I sottoprodotti devono essere scaldati fino a coagulazione degli stessi e quindi pressati per eliminare grasso e acqua dal materiale proteinico. Quest'ultimo deve poi essere scaldato portando la temperatura al centro della massa a più di 80°C per almeno 120' e a più di 100°C per almeno 60' | Continuo o discontinuo |
| 6 ² | I prodotti di origine animale sono ridotti in modo che la dimensione delle particelle non sia superiore a 50 mm. Sono poi mescolati con acido formico per ridurre e mantenere il pH a 4,0 o meno. La miscela deve essere immagazzinata per almeno 24 ore | La miscela viene scaldata in modo da portare la temperatura al centro della massa ad almeno 90°C per almeno 60' | Continuo o discontinuo |
| | I prodotti di origine animale sono ridotti in modo che la dimensione delle particelle non sia superiore a 30 mm. Sono poi mescolati con acido formico per ridurre e mantenere il pH a 4,0 o meno. La miscela deve essere immagazzinata per almeno 24 ore | La miscela viene scaldata in modo da portare la temperatura al centro della massa ad almeno 70°C per almeno 60' | |

² Solo per sottoprodotti di origine animale di categoria 3 provenienti da animali acquatici.

Con **metodo di trasformazione 7**, si intende ogni metodo di trasformazione autorizzato dall'autorità competente per il quale è stato dimostrato dall'operatore a tale autorità:

- 1) L'identificazione dei rischi pertinenti nella materia prima;
- 2) La capacità del metodo di trasformazione di ridurre tali rischi a un livello significativo per la salute pubblica e animale;
- 3) Il campionamento del prodotto finale su base giornaliera per 30 gg in conformità dei seguenti standard microbiologici:

| | | |
|---|--|--------------------|
| Dopo il trattamento termico | Assenza di <i>Clostridium perfringens</i> in 1 g di prodotto | |
| Nel corso o al termine dell'immagazzinaggio | <i>Salmonella</i> : assenza in 25 g (5 campioni) | Enterobacteriaceae |

Capitolo 2

● Le PAT avicole

2.1 Le farine di scarti del macello avicolo

| Categoria | N. | Dichiarazioni obbligatorie | Metodi di trasformazione |
|------------------------------|-------|---|--|
| Reg. (UE) 1017/2017 | | | Reg. (UE) 142/2011 |
| Proteine animali trasformate | 9.4.1 | Proteina grezza; Sostanze grasse grezze; Ceneri grezze; Tenore di umidità, se > 8 % | Capo II - Sezione 4 – Trasformazione di materiali di categoria 3 Trasformati conformemente ai metodi da 1 a 5 e 7 (Capo III) |



Ottime fonti proteiche a costo contenuto
Sostenibili e fuori dal contesto “*farm animal feed–human food*”
Conformi al concetto di economia circolare



Osteggiate nei capitolati di produzione da parte della GDO, in quanto proteine animali

Le farine ricavate da scarti o sottoprodotti del macello avicolo, di seguito indicate con l'acronimo anglosassone PBM (*poultry by-product meal*), sono state per lungo tempo interdette all'uso mangimistico nella UE a seguito delle misure di contenimento/prevenzione della BSE (Decreto 999/2001). Il loro impiego nella formulazione di mangimi per l'acquacoltura è stato riammesso con il Reg. UE n. 56/2013.

I sottoprodotti avicoli utilizzati per la riduzione in PBM nel nostro paese originano dalla trasformazione delle parti di scarto della macellazione e sezionatura di polli e tacchini. Comprendono soprattutto colli, zampe, organi viscerali, uova non sviluppate e intestino. Non includono invece le penne, ad eccezione di quelle non completamente rimosse durante la spennatura delle carcasse (Cruz-Suarez *et al.*, 2007). La produzione di scarti di macello avicolo è quantitativamente importante in Italia, dove le produzioni del pollo da carne e del tacchino sono particolarmente rilevanti e relativamente consolidate in circa 1,3 milioni di tonnellate annue, da cui originano oltre 300.000 tonnellate di residui destinati alla riduzione in farina con il processo di rendering. Da tali scarti si stima vengano ottenute circa 60.000 tonnellate di PBM, corrispondenti a 40.000 tonnellate di proteina greggia, per la maggior parte utilizzate nella filiera del petfood. Si tratta di un valore ragguardevole, che virtualmente fornirebbe un quantitativo proteico di elevato valore biologico in grado di coprire l'80% del fabbisogno annuo di mangimi dell'acquacoltura nazionale. Per l'Italia, quindi, la produzione e l'utilizzo zootecnico di PBM ha un enorme potenziale e può assumere un ruolo strategico per colmare il deficit proteico che la caratterizza, soprattutto nel campo dei mangimi destinati alle specie ittiche.

Le farine di scarti del macello avicolo presentano elevati standard di sicurezza chimico biologica una bassa impronta ambientale (Maiolo *et al.*, 2020) e numerosi pregi nutrizionali dati dall'elevato contenuto proteico associato ad un profilo aminoacidico simile a quello ideale delle farine di pesce. Sono un'ottima fonte di taurina e di elementi minerali e non apportano fattori anti-nutrizionali. I nutrienti dei PBM sono ritenuti altamente digeribili anche grazie al miglioramento delle tecnologie di rendering. Tuttavia i dati disponibili a questo riguardo sono limitati e variabili tra ed entro le specie ittiche finora studiate.

| Nome scientifico | Nome comune | Classificazione |
|--|------------------------------|---|
| <i>Gallus gallus domesticus</i> (Linnaeus, 1758) | Pollo, Gallina, Gallo | Classe: Aves Ordine: Galliformes Famiglia: Phasianidae |



| Nome scientifico | Nome comune | Classificazione |
|--|-----------------|---|
| <i>Meleagris spp.</i> (Linnaeus, 1758) | Tacchino | Classe: Aves Ordine: Galliformes Famiglia: Phasianidae |



2.2 Farine avicole (PBM) del progetto SUSHIN

Sono state analizzate cinque differenti farine avicole, rappresentative dell'industria del rendering avicolo nazionale:

- 1) **PBM 1** (*poultry by-product meal 1, low ash*): ottenuta da residui della macellazione di solo pollo; caratterizzata da un basso contenuto in ceneri. Durante la trasformazione, la frazione dei solubili è stata riaggiunta alla massa degrassata in fase di essiccazione;
- 2) **PBM 2** (*Poultry by-product Meal 2*): ottenuta da scarti della macellazione di solo pollo;
- 3) **PBM 3** (*Poultry by-product Meal 3*): ottenuta da scarti di macellazione di pollo (90%) e tacchini (10%);
- 4) **PBM 4** (*Poultry by-product Meal 4*): ottenuta da scarti di macellazione di pollo (80%) e tacchini (20%);
- 5) **PBM 5** (*Poultry by-product Meal 5*): ottenuta da scarti di macellazione di pollo (65%) e tacchini (35%).

Tabella 2.1.1 Composizione centesimale, contenuto in proteina digeribile (g 100 g⁻¹), energia lorda e digeribile (kcal kg⁻¹).

| | PBM1 | PBM2 | PBM3 | PBM4 | PBM5 |
|-------------------------------|------|------|------|------|------|
| Sostanza secca | 96,2 | 96,0 | 95,4 | 94,2 | 97,1 |
| Proteina grezza | 73,1 | 65,3 | 67,0 | 65,6 | 66,3 |
| Proteina digeribile (trota) | 71,5 | 62,6 | 63,4 | 63,3 | 61,6 |
| Proteina digeribile (spigola) | nd | nd | nd | 63,0 | 63,2 |
| Ceneri | 8,9 | 14,7 | 13,5 | 12,4 | 16,8 |
| Lipidi grezzi | 12,9 | 14,5 | 13,0 | 14,8 | 12,2 |
| Energia lorda | 5346 | 5052 | 5011 | 5099 | 4892 |
| Energia digeribile (trota) | 5079 | 4900 | 4650 | 4834 | 4457 |
| Energia digeribile (spigola) | nd | nd | nd | 4910 | 4720 |

Tabella 2.1.2 Composizione in acidi grassi (g 100 g⁻¹).

| | PBM1 | PBM2 | PBM3 | PBM4 | PBM5 |
|----------------------|------|------|------|------|------|
| Saturi | 3,31 | 3,66 | 3,26 | 4,01 | 3,30 |
| C16:0 palmitico | 2,29 | 2,54 | 2,28 | 2,81 | 2,32 |
| Monoinsaturi | 3,99 | 5,12 | 4,55 | 6,35 | 4,87 |
| C16:1c9 | 0,49 | 0,55 | 0,49 | 0,77 | 0,52 |
| C18:1c9 oleico | 3,29 | 4,33 | 3,85 | 5,28 | 4,12 |
| Polinsaturi | 3,59 | 3,97 | 3,52 | 2,96 | 3,03 |
| PUFAn6 | 3,17 | 3,51 | 3,10 | 2,66 | 2,72 |
| C18:2n6 α-linoleico | 2,89 | 3,20 | 2,84 | 2,53 | 2,53 |
| C18:3n6 γ-linoleico | 0,02 | 0,03 | 0,02 | 0,02 | 0,02 |
| C20:4n6 arachidonico | 0,17 | 0,18 | 0,16 | 0,19 | 0,11 |
| PUFAn3 | 0,42 | 0,46 | 0,41 | 0,30 | 0,32 |
| C18:3n3 linolenico | 0,30 | 0,33 | 0,29 | 0,18 | 0,24 |
| C20:3n3 | 0,06 | 0,07 | 0,06 | 0,06 | 0,04 |
| C20:5n3 (EPA) | 0,03 | 0,02 | 0,02 | 0,03 | 0,01 |
| C22:5n3 (DPA) | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,02 |
| C22:6n3 (DHA) | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 |

Tabella 2.1.3 Composizione in aminoacidi (g 100 g⁻¹), taurina, carnitina e anserina (g kg⁻¹).

| | PBM1 | PBM2 | PBM3 | PBM4 | PBM5 |
|-----|------|------|------|------|------|
| Arg | 5,8 | 4,9 | 4,6 | 4,8 | 3,3 |
| His | 1,7 | 1,3 | 1,2 | 1,2 | 0,9 |
| Ile | 1,9 | 1,5 | 1,5 | 1,6 | 1,1 |
| Leu | 4,9 | 3,8 | 3,7 | 4,0 | 4,0 |
| Lys | 3,1 | 2,6 | 2,7 | 3,1 | 2,9 |
| Met | 1,6 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,0 |
| Cys | 0,7 | 0,7 | 0,7 | 0,7 | 0,6 |
| Phe | 3,2 | 2,3 | 2,1 | 2,1 | 1,5 |
| Tyr | 2,5 | 1,9 | 1,8 | 1,7 | 1,4 |

Tabella 2.1.3 Continua

| | PBM1 | PBM2 | PBM3 | PBM4 | PBM5 |
|-----------|------|------|------|------|------|
| Thr | 3,2 | 2,4 | 2,3 | 2,7 | 1,7 |
| Trp | 0,7 | 0,6 | 0,7 | 0,8 | 0,7 |
| Val | 3,4 | 2,7 | 2,8 | 2,9 | 2,9 |
| Ala | 5,3 | 4,5 | 4,5 | 5,0 | 5,1 |
| Asp | 6,1 | 5,5 | 5,7 | 6,8 | 5,5 |
| Glu | 10,9 | 9,5 | 9,6 | 11,3 | 9,1 |
| Gly | 7,5 | 6,6 | 6,1 | 6,4 | 6,7 |
| Pro | 5,8 | 5,0 | 4,7 | 5,1 | 5,4 |
| Ser | 3,4 | 2,8 | 2,6 | 2,9 | 3,3 |
| Taurina | 1,51 | 1,42 | 1,22 | 1,54 | 1,95 |
| Carnitina | 0,31 | 0,20 | 0,19 | 0,21 | 0,32 |
| Anserina | 0,21 | 0,25 | 0,25 | 0,23 | 0,36 |

Tabella 2.1.4 Contenuto in azoto non proteico (NPN), azoto basico volatile TVB-N (g 100 g⁻¹) e ammine biogene (mg kg⁻¹).

| | PBM1 | PBM2 | PBM3 | PBM4 | PBM5 |
|-----------------------------|------|------|------|------|------|
| Azoto non proteico | 3,3 | 3,2 | 3,5 | 3,0 | 3,4 |
| Azoto basico volatile TVB-N | 0,9 | 1,3 | 1,1 | 1,0 | 0,8 |
| Triptamina | 55 | 51 | 40 | 9 | 37 |
| 2-PHE | 19 | 16 | 14 | 4 | 7 |
| Putrescina | 109 | 83 | 54 | 36 | 40 |
| Cadaverina | 220 | 130 | 155 | 164 | 56 |
| Istamina | 22 | 22 | 14 | 18 | 9 |
| Tiramina | 112 | 89 | 54 | 48 | 31 |
| Spermidina | 51 | 39 | 52 | 75 | 28 |
| Spermina | 35 | 40 | 56 | 61 | 31 |

Tabella 2.1.5 Composizione in elementi minerali.

| | PBM1 | PBM2 | PBM3 | PBM4 | PBM5 |
|------------------------------|------|------|------|------|------|
| Ca % | 0,9 | 1,5 | 1,6 | 1,4 | 1,7 |
| P % | 1,9 | 2,8 | 2,6 | 2,3 | 3,4 |
| K % | 0,6 | 0,5 | 0,5 | 0,4 | 0,4 |
| Na % | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 |
| Mg (mg 100 g ⁻¹) | 44,6 | 80,7 | 76,5 | 70,6 | 83,6 |
| Cu (mg 100 g ⁻¹) | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 0,5 | 0,5 |
| Mn (mg 100 g ⁻¹) | 0,8 | 0,8 | 0,7 | 0,5 | 0,5 |
| Fe (mg 100 g ⁻¹) | 7,5 | 7,7 | 7,7 | 8,7 | 5,2 |
| Zn (mg 100 g ⁻¹) | 4,9 | 5,8 | 5,6 | 5,3 | 5,6 |

Tabella 2.1.6 Contenuto in vitamine e carotenoidi (mg 100 g⁻¹).

| | PBM1 | PBM2 | PBM3 | PBM4 | PBM5 |
|-------------|------|-------|-------|-------|-------|
| B2 | 86,9 | 75,0 | 81,6 | 44,9 | 96,7 |
| B5 | 22,9 | 21,6 | 21,6 | 11,1 | 30,8 |
| B6 | 76,1 | 145,2 | 150,9 | 187,3 | 210,4 |
| C | 28,5 | 25,3 | 27,0 | 25,2 | 14,5 |
| Carotenoidi | 2,4 | 2,0 | 1,3 | 1,3 | 2,2 |

Tabella 2.1.7 Livelli di diossine, PCB e pesticidi organo-clorurati.

| | PBM1 | PBM2 | PBM3 | PBM4 | PBM5 |
|---|---------|---------|---------|---------|---------|
| PCDD/F (pg WHO05-TEQ g ⁻¹) | 0,047 | 0,033 | 0,063 | 0,082 | 0,06 |
| DL-PCB (pg WHO05-TEQ g ⁻¹) | 0,001 | 0,005 | 0,0009 | 0,009 | 0,0013 |
| PCDD/F + DL-PCB (pg WHO05-TEQ g ⁻¹) | 0,048 | 0,038 | 0,064 | 0,091 | 0,061 |
| SOMMA NDL-PCB (ng g ⁻¹) | 0,018 | 0,012 | 0,012 | 0,092 | 0,063 |
| Pesticidi organo-clorurati* | < LOD** | < LOD** | < LOD** | < LOD** | < LOD** |

* α-HCH, Lindane, β-HCH, HCB, Heptachlor, Heptachlor epoxide, o,p-DDE, p,p'-DDE, α-Endosulfan, beta -Endosulfan, o,p'-DDD, p,p'-DDD, o,p'-DDT, p,p'-DDT, Aldrin, Dieldrin, Methoxychlor e Mirex

** intervallo dei limiti di rivelazione (LOD) compreso tra 0,001 e 0,012 mg kg⁻¹

Tabella 2.1.8 Livelli di metalli pesanti.

| | PBM1 | PBM2 | PBM3 | PBM4 | PBM5 |
|--|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Mercurio (mg kg ⁻¹) | Non rivel. <0,010 | Non rivel. <0,010 | Non rivel. <0,010 | Non rivel. <0,010 | Non rivel. <0,010 |
| Arsenico totale (mg kg ⁻¹) | 0,011 | 0,13 | 0,014 | 0,011 | 0,015 |
| Piombo (mg kg ⁻¹) | 0,040 | 0,32 | 0,059 | 0,042 | 0,063 |
| Cadmio (mg kg ⁻¹) | 0,099 | 0,084 | 0,075 | 0,10 | 0,094 |

Tutti i risultati riportati nelle tabelle 2.1.7 e 2.1.8 sono ampiamente inferiori ai valori limite previsti dalla legislazione vigente (Allegato I della Direttiva 2002/32/CE).

Tabella 2.1.9 Caratteristiche microbiologiche.

| | PBM1 | PBM2 | PBM3 | PBM4 | PBM5 |
|---|---------|--------|---------------------------------|--------|-------|
| Carica batterica mesofila (ufc g ⁻¹) | 1.800 | 15.000 | 53.000 | 26.000 | 4.600 |
| Clostridi solfito riduttori (ufc g ⁻¹) | <10 | <10 | 60 | <10 | <10 |
| Enterococchi intestinali (ufc g ⁻¹) | 350 | 50 | 130 | 150 | 130 |
| Staphylococchi coagulasi pos (ufc g ⁻¹) | <10 | <10 | <10 | <10 | <10 |
| Coliformi totali (ufc g ⁻¹) | <10 | <10 | <10 | <10 | <10 |
| <i>Escherichia coli</i> (ufc g ⁻¹) | <10 | <10 | <10 | <10 | <10 |
| Esame batteriologico: isolamento e identificazione | | | <i>Staphylococcus xylosus</i> * | | |
| <i>E. coli</i> VTEC-STEC | assente | | | | |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | assente | | | | |
| <i>Norovirus</i> | assente | | | | |
| <i>Salmonella</i> spp. | assente | | | | |
| <i>Shigella</i> spp. | assente | | | | |
| <i>Vibrio cholerae</i> | assente | | | | |
| Virus epatite A | assente | | | | |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | assente | | | | |
| <i>Vibrio</i> spp. | assente | | | | |
| Sostanze inibenti e chinolonici | assente | | | | |

* Le specie batteriche isolate sono riferibili a comuni contaminanti ambientali

Capitolo 3

Gli insetti

3.1 Farine da larve di insetto

| Categoria | N. | Dichiarazioni obbligatorie | Metodi di trasformazione |
|------------------------------|-------|---|---|
| Reg. (UE) 1017/2017 | | | Reg. (UE) 142/2011 |
| Proteine animali trasformate | 9.4.1 | Proteina grezza; Sostanze grasse grezze; Ceneri grezze; Tenore di umidità, se > 8 % | Capo II - Sezione 4 – Trasformazione di materiali di categoria 3 Trasformati conformemente ai metodi da 1 a 5 e 7 (Capo III) |



Fonti di nutrienti e molecole bioattive
Bassa impronta ambientale e conformi al concetto di economia circolare
Poco contese tra “farm animal feed-human food”



Disponibilità di mercato e prezzi ancora poco competitivi
Limitazioni di specie e substrati di allevamento
Pochi dati sul valore nutritivo (digeribilità) nei pesci

Le farine ottenute dagli insetti destano un'attenzione crescente come ingredienti sostenibili per l'alimentazione animale ed in particolare nella mangimistica delle specie ittiche allevate (Gasco *et al.*, 2020). Nonostante la modesta disponibilità di mercato e i prezzi ancora poco competitivi ne limitino attualmente l'utilizzo massivo in acquacoltura, le potenzialità di questi ingredienti sono notevoli. È infatti ampiamente accertato che le farine proteiche da insetti offrono numerosi vantaggi sul piano della ecosostenibilità grazie all'alta efficienza di conversione alimentare delle larve, alla bassa impronta

carbonica a ridottissimi consumi di suolo e acqua per la loro produzione (Maiolo *et al.*, 2020). Noto è il beneficio ambientale dato dalla possibilità di allevare insetti su bio-rifiuti. Sotto questo profilo, la bioconversione di sottoprodotti di basso valore in proteine di alta qualità rende gli insetti paradigmatici del concetto di bioeconomia circolare. Anche per i suddetti motivi, l'utilizzo di farine proteiche ricavate da insetti negli alimenti per l'acquacoltura è stato recentemente ammesso nell'Unione Europea con il Reg. UE n. 893/2017, pur limitandolo a sette specie allevabili facendo uso esclusivo di substrati alimentari vegetali.

Tra quelle ammesse dalla legislazione all'uso mangimistico, le farine proteiche ottenute da larve di *Tenebrio molitor* (tenebrione mugnaio) e di *Hermetia illucens* (mosca soldato nera) sono tra le più studiate nell'alimentazione dei pesci, soprattutto per via del loro elevato o medio-elevato tenore proteico e apporto di composti bioattivi quali la chitina, i peptidi antimicrobici e, nel caso di *H. illucens*, l'acido laurico (Barroso *et al.*, 2014; Sánchez-Muros *et al.*, 2014). Le farine ottenute dagli stadi larvali dei suddetti insetti si caratterizzano per profili in aminoacidi essenziali solo marginalmente deficitari rispetto a quello ideale delle farine di pesce, ma migliori di quelli dei derivati proteici vegetali (Gasco *et al.*, 2018). Esse sono anche una discreta fonte di vitamine, in particolare di vitamina B12, e minerali come ferro e zinco (Finke, 2015; Payne *et al.*, 2016).

Le farine di insetti presentano contenuti medi o elevati di lipidi ancorché variabili in relazione alla specie ed all'eventuale processo di sgrassatura cui vengono sottoposte (aspetto importante soprattutto nel caso delle pupae o pre-pupae di *H. illucens*) (Schiavone *et al.*, 2018; Gasco *et al.*, 2019). La qualità dei loro lipidi non rappresenta certamente il loro punto di forza, dato il trascurabile apporto di PUFA n3 che tuttavia potrebbe essere migliorato con l'allevamento su substrati arricchiti. In generale la loro composizione chimico-nutrizionale presenta una discreta variabilità e poco noti sono i fattori in grado di modificarla. Tra questi vi è certamente da approfondire il ruolo del tipo e composizione del substrato di allevamento delle larve e quello dei processi di lavorazione post-allevamento (Danieli *et al.*, 2019). Molto meno studiate sono la digeribilità di questi ingredienti, per la quale si dispone di stime poco più che puntuali su alcune specie ittiche (Dumas *et al.*, 2018; Basto *et al.*, 2020), e le loro caratteristiche di igiene e sicurezza alimentare.

3.2 Farine da larve di insetto nel progetto SUSHIN

Sono state analizzate quattro farine ottenute da larve disidratate di tre specie differenti di insetti, rispondenti alle seguenti caratteristiche:

- 1) **BSF1**: ottenuta da larve di mosca soldato nera. Farina commerciale. Tutti gli ingredienti che compongono il substrato di allevamento sono dichiaratamente di origine vegetale, certificati GMP+. Il processamento degli insetti segue il Regolamento (CE) N. 1069/2009,
- 2) **BSF2**: ottenuta da larve di mosca soldato nera. Farina commerciale. Gli ingredienti che compongono il substrato di allevamento sono di origine vegetale, tracciabili e controllati microbiologicamente,
- 3) **TM**: ottenuta da larve di tenebrione mugnaio. Farina sperimentale. Gli ingredienti che compongono il substrato di allevamento sono di origine vegetale (crusca di frumento, farina di mais),
- 4) **MD** (*Musca domestica*): Farina commerciale. Gli ingredienti che compongono il substrato di allevamento sono di origine vegetale. Non sono state fornite ulteriori informazioni dall'azienda fornitrice.

| Nome scientifico | Nome comune | Classificazione |
|--|--------------------|---|
| <i>Hermetia illucens</i> (Linnaeus, 1758) | Mosca soldato nera | Classe: Insecta Ordine: Diptera Famiglia: Stratiomyidae |



| Nome scientifico | Nome comune | Classificazione |
|--|---------------------------|---|
| <i>Tenebrio molitor</i> (Linnaeus, 1758) | Tenebrione mugnaio | Classe: Insecta Ordine: Coleoptera Famiglia: Tenebrionidae |



| Nome scientifico | Nome comune | Classificazione |
|---|---------------------|---|
| <i>Musca domestica</i> (Linnaeus, 1758) | Mosca comune | Classe: Insecta Ordine: Diptera Famiglia: Muscidae |



Tabella 3.1.1 Composizione centesimale, contenuto in proteina digeribile ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$), energia lorda e digeribile (kcal kg^{-1}).

| | BSF1 | BSF2 | TM | MD |
|-------------------------------|------|------|------|------|
| Sostanza secca | 95,6 | 94,2 | 94,1 | 96,7 |
| Proteina grezza (N x 6,25) | 50,7 | 45,4 | 44,3 | 52,5 |
| Proteina digeribile (trota) | 48,2 | 42,3 | nd | nd |
| Proteina digeribile (spigola) | 46,6 | 39,8 | nd | nd |
| Ceneri | 6,1 | 11,0 | 4,7 | 8,4 |

Tabella 3.1.1 Continua

| | BSF1 | BSF2 | TM | MD |
|------------------------------|------|------|------|------|
| Lipidi grezzi | 19,9 | 16,3 | 32,2 | 18,0 |
| Chitina | 4,7 | 6,0 | 6,5 | 5,3 |
| Energia lorda | 4963 | 4369 | 6083 | 4693 |
| Energia digeribile (trota) | 4318 | 3701 | nd | nd |
| Energia digeribile (spigola) | 4204 | 3360 | nd | nd |

Tabella 3.1.2 Composizione in acidi grassi (g 100 g⁻¹).

| | BSF1 | BSF2 | TM | MD |
|----------------------|--------------|--------------|-------------|-------------|
| Saturi | 11,82 | 10,82 | 6,68 | 5,08 |
| C16:0 palmitico | 3,36 | 2,69 | 4,08 | 4,32 |
| Monoinsaturi | 3,40 | 2,36 | 9,89 | 5,92 |
| C16:1c9 | 0,46 | 0,40 | 0,38 | 2,0 |
| C18:1c9 oleico | 2,65 | 1,62 | 9,30 | 3,77 |
| Polinsaturi | 4,19 | 1,83 | 5,04 | 5,36 |
| PUFAn6 | 3,75 | 1,60 | 4,93 | 4,90 |
| C18:2n6 α-linoleico | 3,70 | 1,51 | 4,89 | 4,86 |
| C18:3n6 γ-linoleico | 0,00 | 0,01 | 0,02 | 0,03 |
| C20:4n6 arachidonico | 0,03 | 0,02 | 0,007 | 0,008 |
| PUFAn3 | 0,44 | 0,23 | 0,11 | 0,45 |
| C18:3n3 linolenico | 0,42 | 0,18 | 0,05 | 0,34 |
| C20:3n3 | 0,01 | 0,01 | 0,03 | 0,10 |
| C20:5n3 (EPA) | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| C22:5n3 (DPA) | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| C22:6n3 (DHA) | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,01 |

* In *H. illucens* (BSF1 e BSF2) l'acido saturo a più elevata concentrazione è l'acido laurico (C12:0)

Tabella 3.1.3 Composizione in aminoacidi (g 100 g⁻¹), taurina, carnitina e anserina (mg kg⁻¹).

| | BSF1 | BSF2 | TM | MD |
|-----------|------|------|------|------|
| Arg | 2,6 | 2,1 | 2,6 | 2,8 |
| His | 1,4 | 1,3 | 1,4 | 1,2 |
| Ile | 1,6 | 1,5 | 2,4 | 2,3 |
| Leu | 3,6 | 3,3 | 3,7 | 3,5 |
| Lys | 2,8 | 2,4 | 3,0 | 4,5 |
| Met | 0,7 | 0,7 | 0,9 | 2,1 |
| Cys | 0,8 | 0,9 | 0,6 | 0,8 |
| Phe | 1,9 | 2,0 | 2,2 | 3,8 |
| Tyr | 3,3 | 3,0 | 2,3 | 2,0 |
| Thr | 2,1 | 2,1 | 1,6 | 1,9 |
| Trp | 0,4 | 0,4 | 0,8 | 0,7 |
| Val | 3,3 | 3,1 | 3,0 | 2,6 |
| Ala | 4,2 | 3,8 | 3,7 | 3,4 |
| Asp | 6,2 | 6,1 | 3,8 | 4,1 |
| Glu | 6,9 | 6,3 | 4,6 | 5,5 |
| Gly | 2,9 | 2,6 | 3,1 | 2,6 |
| Pro | 4,0 | 3,6 | 4,1 | 4,1 |
| Ser | 2,7 | 2,3 | 2,4 | 2,3 |
| Taurina | 39,0 | 27,2 | 22,6 | 29,2 |
| Carnitina | 43,0 | 49,9 | 40,0 | 58,7 |
| Anserina | 31,6 | 25,0 | 15,1 | 22,4 |

Tabella 3.1.4 Contenuto in azoto non proteico (NPN), azoto basico volatile TVB-N e ammine biogene (g kg⁻¹).

| | BSF1 | BSF2 |
|-----------------------------|------|------|
| Azoto non proteico NPN | 19 | 18 |
| Azoto basico volatile TVB-N | 1,6 | 0,4 |
| Triptamina | 7 | 17 |

Tabella 3.1.4 Continua

| | | |
|------------|-----|----|
| 2-PHE | 6 | 4 |
| Putrescina | 45 | 7 |
| Cadaverina | 18 | 3 |
| Istamina | 12 | 3 |
| Tiramina | 3 | 4 |
| Spermidina | 133 | 16 |
| Spermina | 18 | 3 |

Tabella 3.1.5 Composizione in elementi minerali.

| | BSF1 | BSF2 | TM | MD |
|------------------------------|------|------|-----|------|
| Ca % | 0,7 | 1,4 | 0,2 | 1,5 |
| P % | 1,1 | 1,3 | 0,7 | 1,2 |
| K % | 0,6 | 1,2 | 0,8 | 0,6 |
| Na % | 0,1 | 0,01 | 0,1 | 0,7 |
| Mg % | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 0,2 |
| Cu (mg 100 g ⁻¹) | 0,9 | 1,9 | 1,6 | 3,5 |
| Mn (mg 100 g ⁻¹) | 14,7 | 34,4 | 1,0 | 15,3 |
| Fe (mg 100 g ⁻¹) | 15,0 | 4,5 | 5,6 | 86,0 |
| Zn (mg 100 g ⁻¹) | 5,9 | 10,0 | 9,7 | 18,3 |

Tabella 3.1.6 Contenuto in vitamine e carotenoidi (mg 100 g⁻¹).

| | BSF1 | BSF2 | TM | MD |
|-------------|------|-------|------|-----|
| B2 | 18,4 | 61,7 | 1,1 | 7,2 |
| B5 | 8,1 | 23,4 | 15,3 | 4,2 |
| B6 | 61,9 | 190,1 | 0,8 | 0,2 |
| C | 48,7 | 36,7 | 2,5 | 0,8 |
| Carotenoidi | 1,89 | 1,60 | nd | nd |

Gli insetti

Tabella 3.1.7 Contenuto in diossine, PCB e pesticidi organo-clorurati.

| | BSF1 | BSF2 |
|---|---------|---------|
| PCDD/F (pg WHO05-TEQ g ⁻¹) | 0,004 | 0,005 |
| DL-PCB (pg WHO05-TEQ g ⁻¹) | 0,0009 | 0,0040 |
| PCDD/F + DL-PCB (pg WHO05-TEQ g ⁻¹) | 0,005 | 0,009 |
| SOMMA NDL-PCB (ng g ⁻¹) | 0,019 | 0,036 |
| Pesticidi organo-clorurati* | < LOD** | < LOD** |

* α-HCH, Lindane, β-HCH, HCB, Heptachlor, Heptachlor epoxide, o,p-DDE, p,p'-DDE, α-Endosulfan, beta -Endosulfan, o,p'-DDD, p,p'-DDD, o,p'-DDT, p,p'-DDT, Aldrin, Dieldrin, Methoxychlor e Mirex.

** intervallo dei limiti di rivelazione (LOD) compreso tra 0,001 e 0,012 mg kg⁻¹

Tabella 3.1.8 Contenuto in metalli pesanti.

| | BSF1 | BSF2 |
|--|----------------------|----------------------|
| Mercurio (mg kg ⁻¹) | Non rivel. <0,010 | Non rivel. <0,010 |
| Arsenico totale (mg kg ⁻¹) | 0,057 | 0,062 |
| Piombo (mg kg ⁻¹) | 0,077 | 0,11 |
| Cadmio (mg kg ⁻¹) | 0,32 | 0,23 |

Tutti i risultati riportati nelle tabelle 3.1.8 e 3.1.9 sono ampiamente inferiori ai valori limite previsti dalla legislazione vigente (Allegato I della Direttiva 2002/32/CE).

Tabella 3.1.9 Caratteristiche microbiologiche.

| | BSF1 | BSF2 |
|---|-----------|--------|
| Carica batterica mesofila (ufc g ⁻¹) | 3.500.000 | 17.000 |
| Clostridi solfito riduttori (ufc g ⁻¹) | 1.800 | <10 |
| Enterococchi intestinali (ufc g ⁻¹) | 49.000 | 7.000 |
| Staphylococchi coagulasi pos (ufc g ⁻¹) | <10 | <10 |

Tabella 3.1.9 Continua

| | BSF1 | BSF2 |
|--|--|---------|
| Coliformi totali (ufc g ⁻¹) | <10 | <10 |
| <i>Escherichia coli</i> (ufc g ⁻¹) | <10 | <10 |
| Esame batteriologico: isolamento e identificazione | <i>Bacillus cereus</i> * <i>Gemella bergeri</i> <i>Acinetobacter iwoffii</i> <i>Staphylococcus sciuri</i> | |
| <i>E. coli</i> VTEC-STEC | assente | assente |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | assente | assente |
| <i>Norovirus</i> | assente | assente |
| <i>Salmonella</i> spp. | assente | assente |
| <i>Shigella</i> spp. | assente | assente |
| <i>Vibrio cholerae</i> | assente | assente |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | assente | assente |
| <i>Vibrio</i> spp. | assente | assente |
| Virus epatite A | assente | assente |
| Sostanze inibenti e chinolonici | assente | assente |

* Le specie batteriche isolate sono riferibili a comuni contaminanti ambientali.

Capitolo 4

● Le microalghe e i cianobatteri

4.1 Le microalghe e i cianobatteri

| Categoria | N. | Dichiarazioni obbligatorie | Metodi di trasformazione |
|---------------------|-------|--|--------------------------|
| Reg. (UE) 1017/2017 | | | Reg. (UE) 142/2011 |
| Farina di alghe | 7.1.3 | Proteina grezza; Sostanze grasse grezze; Ceneri grezze | Nessuna specifica |



Buone fonti proteiche
Microalghe marine fonte di acidi grassi n-3
Potenziali proprietà nutraceutiche nei pesci
Poco in conflitto con altri usi "feed"



Scarsa disponibilità di mercato
Prezzi ancora insostenibili
Composizione nutrizionale variabile
Scarse conoscenze sulla biodisponibilità dei nutrienti

Tra i possibili ingredienti proteici che possono essere destinati alla formulazione di mangimi sostenibili per l'acquacoltura, quelli ottenuti da microrganismi unicellulari quali microalghe e cianobatteri hanno di recente suscitato un rinnovato interesse. Già ampiamente utilizzate per l'alimentazione delle forme larvali e giovanili di pesci, molluschi e crostacei, le biomasse essiccate dei predetti microrganismi, ad un valore nutritivo potenzialmente interessante, associano l'apporto di pigmenti, sostanze antiossidanti e molecole bioattive (Spolaore *et al.*, 2006). Rispetto ai convenzionali alimenti zootecnici, le biomasse microalgali sono ritenute virtualmente più sostenibili in termini di impronta ambientale complessiva, anche se ciò dipende dalla specie considerata, dal sistema e dal luogo di coltivazione (Maiolo *et al.*,

2020; Tredici *et al.*, 2016). Per contro, i costi di produzione elevati e l'incerta disponibilità di mercato attualmente ne limitano considerevolmente l'impiego su ampia scala.

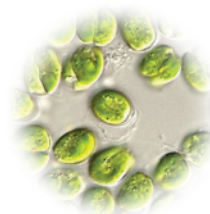
Le biomasse essiccate ottenute da cellule intere di molte microalghe e cianobatteri presentano contenuti proteici medio-elevati, compresi tra il 28 e il 71% della sostanza secca in relazione a specie, condizioni di coltura e tecniche di processamento post-raccolta. Il loro profilo aminoacidico è in molti casi migliore di quello dei comuni ingredienti vegetali e sono considerate buone fonti di macro- e micro elementi minerali (Cerri, 2021). Quelle ottenute da microalghe marine contengono acidi grassi preziosi quali LC-PUFA n3 (Niccolai *et al.*, 2020). La presenza di una parete cellulare spessa e complessa, limitando l'accessibilità agli enzimi digestivi dei nutrienti in esse contenuti, è il fattore che ne condiziona negativamente digeribilità e valore nutritivo per le specie ittiche (Tibbets, 2018). Si dispone di poche informazioni sugli standard di sicurezza chimico-microbiologica di questi potenziali nuovi ingredienti. Nel progetto SUSHIN le valutazioni hanno riguardato tre biomasse scelte sulla scorta di criteri nutrizionali e zoo-economici:

- 1) **TS:** biomassa essiccata di *Tetraselmis suecica* (ceppo F&M-M33) per il suo contenuto proteico medio-elevato e per la relativa economicità di produzione in fotobioreattori di nuova generazione (Tredici *et al.*, 2015);
- 2) **TL:** biomassa essiccata di *Tisochrysis lutea* (ceppo F&M-M36) per il suo buon apporto proteico e per la qualità dei lipidi;
- 3) **AP:** biomassa essiccata di *Arthrospira platensis* (Spirulina) per il suo elevato contenuto proteico e per il fatto di risultare tra le più disponibili ed economiche sul mercato.

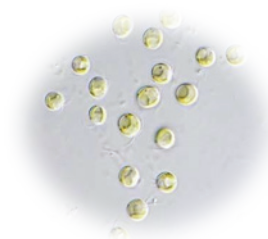
Le biomasse delle microalghe *Tisochrysis lutea* F&M-M36 e *Tetraselmis suecica* F&M-M33 sono state prodotte presso l'impianto Archimede Ricerche S.r.l. a Camporosso (IM) in reattori di tipo Green Wall Panel (GWP®), raccolte per centrifugazione ed essiccate mediante liofilizzazione. La biomassa di *Arthrospira platensis* F&M-C256 è stata prodotta con le stesse tecnologie presso l'impianto dell'Azienda Agricola La Serenissima di Conche di Codevigo (PD) ma è stata raccolta per filtrazione con vibrovaglio ed essiccata in corrente d'aria fredda.

Le caratteristiche delle farine analizzate sono di seguito riportate.

| Nome scientifico | Classificazione |
|----------------------------|---|
| <i>Tetraselmis suecica</i> | Phylum: Chlorophyta Ordine: Chlorodendrales Famiglia: Chlorodendraceae |



| Nome scientifico | Classificazione |
|--------------------------|--|
| <i>Tisochrysis lutea</i> | Phylum: Haptophyta Ordine: Isochrysidales Famiglia: Isochrysidaceae |



| Nome scientifico | Classificazione |
|------------------------------|--|
| <i>Arthrospira platensis</i> | Phylum: Cyanobacteria Ordine: Oscillatoriales Famiglia: Phormidiaceae |

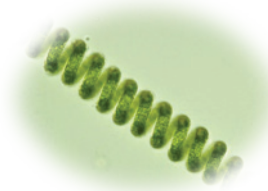


Tabella 4.1.1 Composizione centesimale, contenuto in proteina digeribile (g 100 g⁻¹), energia lorda e digeribile (kcal kg⁻¹).

| | TS | TL | AP |
|-------------------------------|------|------|------|
| Sostanza secca | 97,3 | 98,0 | 96,9 |
| Proteina grezza (N x 6,25) | 35,8 | 40,7 | 51,0 |
| Proteina digeribile (trota) | 30,8 | 37,4 | 42,4 |
| Proteina digeribile (spigola) | 26,2 | 34,4 | 42,3 |
| Ceneri | 17,9 | 13,1 | 8,1 |
| Lipidi totali | 16,2 | 32,7 | 15,1 |
| Estrattivi inazotati | 27,4 | 11,5 | 22,7 |
| Energia lorda | 3453 | 3826 | 3710 |
| Energia digeribile (trota) | 2316 | 2594 | 2886 |
| Energia digeribile (spigola) | 1890 | 2338 | 2782 |

Tabella 4.1.2 Composizione in acidi grassi (g 100 g⁻¹).

| | TS | TL | AP |
|----------------------|------|-------|--------|
| Saturi | 2,14 | 5,35 | 3,95 |
| C16:0 palmitico | 1,90 | 2,03 | 2,72 |
| Monoinsaturi | 2,28 | 4,05 | 0,58 |
| C16:1c9 | 0,33 | 0,89 | 0,37 |
| C18:1c9 oleico | 1,65 | 2,75 | 0,15 |
| Polinsaturi | 1,71 | 6,35 | 2,56 |
| PUFAn6 | 0,45 | 1,18 | 2,27 |
| C18:2n6 α-linoleico | 0,33 | 1,11 | 0,60 |
| C18:3n6 γ-linoleico | 0,02 | 0,01 | 1,65 |
| C20:4n6 arachidonico | 0,07 | 0,006 | tracce |
| PUFAn3 | 0,95 | 4,84 | 0,04 |
| C18:3n3 linolenico | 0,61 | 1,45 | 0,009 |
| C20:5n3 (EPA) | 0,20 | 0,03 | Tracce |
| C22:5n3 (DPA) | 0,00 | 0,02 | 0,00 |
| C22:6n3 (DHA) | 0,00 | 1,46 | 0,00 |

Tabella 4.1.3 Composizione in aminoacidi (g 100 g⁻¹), taurina, carnitina e anserina (g kg⁻¹).

| | TS | TL | AP |
|-----|-----|-----|-----|
| Arg | 2,3 | 2,2 | 3,1 |
| His | 0,8 | 0,9 | 1,2 |
| Ile | 1,2 | 2,4 | 2,0 |
| Leu | 2,2 | 3,1 | 3,4 |
| Lys | 1,3 | 1,6 | 1,4 |
| Met | 0,3 | 0,5 | 0,4 |
| Cys | 0,6 | 0,4 | 0,6 |
| Phe | 2,6 | 3,1 | 3,5 |
| Tyr | 1,2 | 1,6 | 2,9 |
| Thr | 1,6 | 2,0 | 2,5 |

Tabella 4.1.3 Continua

| | TS | TL | AP |
|-----|-----|-----|-----|
| Trp | 0,5 | 0,5 | 0,7 |
| Val | 2,0 | 2,3 | 2,8 |
| Ala | 2,5 | 2,7 | 2,9 |
| Asp | 2,7 | 3,4 | 3,7 |
| Glu | 5,3 | 4,7 | 6,8 |
| Gly | 2,3 | 2,6 | 3,1 |
| Pro | 2,0 | 3,4 | 2,7 |
| Ser | 1,3 | 1,7 | 2,5 |

Tabella 4.1.4 Contenuto in azoto non proteico (NPN), azoto basico volatile TVB-N e ammine biogene (g kg⁻¹).

| | TS | TL | AP |
|------------------------|-----|-----|-----|
| Azoto non proteico NPN | 19 | 27 | 21 |
| TVB-N | 1,9 | 1,6 | 2,0 |

Tabella 4.1.5 Composizione in elementi minerali.

| | TS | TL | AP |
|------------------------------|-----|------|------|
| Ca (%) | 1,2 | 0,4 | 0,2 |
| P (%) | 0,9 | 1,2 | 1,0 |
| K (%) | 1,4 | 1,0 | 0,9 |
| Na (%) | 1,5 | 1,6 | 0,7 |
| Mg (%) | 0,6 | 0,5 | 0,3 |
| Cu (mg 100 g ⁻¹) | 2,1 | 2,6 | 0,6 |
| Mn (mg 100 g ⁻¹) | 4,4 | 5,3 | 2,6 |
| Fe (mg 100 g ⁻¹) | 5,4 | 20,9 | 10,1 |
| Zn (mg 100 g ⁻¹) | 8,2 | 9,6 | 1,6 |

Tabella 4.1.6 Contenuto in vitamine e carotenoidi totali (mg 100 g⁻¹).

| | TS | TL | AP |
|--------------------|-------------|-----------|-----------|
| B2 | 14,8 | 101,1 | 136,9 |
| B5 | 75,8 | 10,1 | 16,4 |
| B6 | 34,8 | 55,1 | 77,5 |
| C | 173,1 | 218,5 | 67,4 |
| E | 0,0 | 0,0 | 172,2 |
| Carotenoidi totali | 1290.3±54.1 | 246.1±3.1 | 159.1±0.0 |

Tabella 4.1.7 Contenuto in diossine, PCB e pesticidi organo-clorurati in *A. platensis*.

| | AP |
|---|---------|
| PCDD/F (pg WHO05-TEQ g ⁻¹) | 0,008 |
| DL-PCB (pg WHO05-TEQ g ⁻¹) | 0,0013 |
| PCDD/F + DL-PCB (pg WHO05-TEQ g ⁻¹) | 0,009 |
| SOMMA NDL-PCB (ng g ⁻¹) | 0,134 |
| Pesticidi organo-clorurati* | < LOD** |

* α-HCH, Lindane, β-HCH, HCB, Heptachlor, Heptachlor epoxide, o,p-DDE, p,p'-DDE, α-Endosulfan, beta -Endosulfan, o,p'-DDD, p,p'-DDD, o,p'-DDT, p,p'-DDT, Aldrin, Dieldrin, Methoxychlor e Mirex.

** intervallo dei limiti di rivelazione (LOD) compreso tra 0,001 e 0,012 mg kg⁻¹

Tabella 4.1.8 Contenuto in metalli pesanti in *A. platensis*.

| | AP |
|--|--------------------|
| Mercurio (mg kg ⁻¹) | 0,077 |
| Arsenico totale (mg kg ⁻¹) | Non rivel. <0,0023 |
| Piombo (mg kg ⁻¹) | 1,5 |
| Cadmio (mg kg ⁻¹) | 0,041 |

Tutti i risultati nelle tabelle 4.1.8 e 4.1.9 sono ampiamente inferiori ai valori limite previsti dalla legislazione vigente (Allegato I della Direttiva 2002/32/CE).

Tabella 4.1.9 Caratteristiche microbiologiche in *A. platensis*.

| | AP |
|---|---|
| Carica batterica mesofila (ufc g ⁻¹) | 1500 |
| Clostridi solfito riduttori (ufc g ⁻¹) | <10 |
| Enterococchi intestinali (ufc g ⁻¹) | 260 |
| Staphylococchi coagulasi pos (ufc g ⁻¹) | <10 |
| Coliformi totali (ufc g ⁻¹) | <10 |
| <i>Escherichia coli</i> (ufc g ⁻¹) | <10 |
| Esame batteriologico: isolamento e identificazione | <i>Enterobacter cloacae</i> ssp, <i>dissolvens</i> * |
| <i>E. coli</i> VTEC-STEC | assente |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | assente |
| <i>Norovirus</i> | assente |
| <i>Salmonella</i> spp. | assente |
| <i>Shigella</i> spp. | assente |
| <i>Vibrio cholerae</i> | assente |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | assente |
| <i>Vibrio</i> spp. | assente |
| Virus epatite A | assente |
| Sostanze inibenti e chinolonici | assente |

* Le specie batteriche isolate sono riferibili a comuni contaminanti ambientali.

Capitolo 5

● Il gambero rosso della Louisiana

5.1 *Procambarus clarkii*

| Categoria | N. | Dichiarazioni obbligatorie | Metodi di trasformazione |
|---------------------|--------|--|--|
| Reg. (UE) 1017/2017 | | | Reg. (UE) 142/2011 |
| Farina di crostacei | 10.3.1 | Calcio; Ceneri insolubili in HCl, se > 5 % | Capo II - Sezione 4 – Trasformazione di materiali di categoria 3 Trasformati conformemente ai metodi da 1 a 7 (Capo III) |



Fonte naturale di proteine, minerali e carotenoidi
Trasforma un problema ecologico (la diffusione di una specie aliena invasiva) in alimento zootecnico



Biomassa disponibile non costante nel tempo
Rischi di contaminazione e sicurezza alimentare

Il gambero rosso della Louisiana (*Procambarus clarkii*, Girard 1852) è una specie esotica invasiva di rilevanza unionale (Black List, Reg. UE n. 2016/1141), ormai ampiamente diffusa nelle acque interne nazionali ed europee. Per le specie inserite in questa lista, lo stesso Regolamento consente tutte le misure di eradicazione, compresa la cattura e il successivo smaltimento.

Al fine di limitare l'espansione di questa specie, dal 1 gennaio 2015 è in vigore nei paesi dell'Unione Europea il Reg. UE 1143/2014, recante disposizioni volte a prevenire e gestire l'introduzione e la diffusione delle specie esotiche invasive. In Italia sono state istituite regole restrittive per il trasporto ed il rilascio

Il gambero rosso della Louisiana

degli individui in natura e sono stati avviati piani di eradicazione e politiche di contenimento, quali, ad esempio, la pesca ricreativa o piani di contenimento in parchi nazionali. Non sono disponibili molte informazioni in letteratura circa la composizione nutrizionale di questa specie. I dati più recenti, relativi al prodotto intero o ridotto in farina, registrano un contenuto proteico variabile tra il 40 ed il 75% del peso secco, un profilo aminoacidico bilanciato, un elevato contenuto in ceneri e un tenore lipidico contenuto in grassi piuttosto basso. La farina di gambero è caratterizzata da un elevato contenuto in chitina (8%) e di carotenoidi (120 mg kg^{-1}), di cui circa il 90% è costituito da astaxantina (Shahidi *et al.*, 1998), il che rende questo ingrediente molto interessante per le diete di specie ittiche di interesse commerciale in cui la colorazione assume un valore aggiunto, quali orata e trota iridea.

L'utilizzo di questa specie come ingrediente in diete formulate per specie ittiche allevate è stato scarsamente studiato. Due studi su orata ne hanno, tuttavia, messo in luce le potenzialità come fonte naturale di pigmenti carotenoidi negli Sparidi (Garcia-Romero *et al.*, 2010).

Non essendo disponibili dati a riguardo, non è possibile quantificare la biomassa disponibile in ambiente naturale da destinare all'industria mangimistica. Tuttavia, il riutilizzo delle biomasse rimosse dall'ambiente permetterebbe di innescare un processo virtuoso in grado di trasformare una problematica ambientale ed economica in una possibile risorsa.

Per le finalità del progetto SUSHIN, per ottenere la disponibilità di un quantitativo di *P. clarkii* sufficiente ad avviare la sperimentazione, nel marzo 2017 sono stati effettuati rilievi di campo per selezionare i siti ambientali più idonei alla cattura massiva. Sono state selezionate due zone di cattura: le aree umide protette del Parco Nazionale del Circeo e della Riserva Naturale Regionale Nazzano Tevere-Farfa (Lazio), entrambe incluse nella convenzione di RAMSAR del 1971.

Tali zone sono state selezionate anche sulla base dei risultati ottenuti dalle indagini sulle caratteristiche igienico-sanitarie dei gamberi prelevati (Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" - IZSAM).

| Nome scientifico | Nome comune | Classificazione |
|--|-------------------------------|---|
| <i>Procambarus clarkii</i> (Girard, 1852) | Gambero rosso della Louisiana | Phylum: Arthropoda Subphylum: Crustacea Classe: Malacostraca Ordine: Decapoda Famiglia: Cambaridae |



La farina di gambero è stata ottenuta dalla riduzione di circa 300 kg di gambero attraverso un processo sperimentale che ha previsto la riduzione in omogenato con metodo meccanico e la disidratazione rapida (flash-drying) ad alte temperature (3 cicli a ca. $>100^\circ\text{C}$). Tale processo ha permesso di preservare il più possibile le caratteristiche nutrizionali del gambero.

Tabella 5.1.1 Composizione centesimale, contenuto in proteina digeribile (g 100 g⁻¹), energia lorda e digeribile (kcal kg⁻¹).

| | |
|-------------------------------|------|
| Sostanza secca | 89,9 |
| Proteina grezza (N x 6,25) | 40,8 |
| Proteina digeribile (trota) | 39,9 |
| Proteina digeribile (spigola) | 39,1 |
| Ceneri | 34,9 |
| Lipidi totali | 5,5 |
| Estrattivi inazotati | 8,6 |
| Chitina | 8,0 |
| Energia lorda | 2845 |
| Energia digeribile (trota) | 2700 |
| Energia digeribile (spigola) | 2558 |

Tabella 5.1.2 Contenuto in astaxantina e carotenoidi totali (mg g⁻¹).

| | |
|--------------------|--------|
| Astaxantina | 86,39 |
| Carotenoidi totali | 119,45 |

Tabella 5.1.3 Composizione in acidi grassi (g 100 g⁻¹).

| | |
|----------------------|------|
| Saturi | 1,53 |
| C16:0 palmitico | 1,10 |
| Monoinsaturi | 1,57 |
| C16:1c9 | 0,77 |
| C18:1c9 oleico | 0,15 |
| Polinsaturi | 1,40 |
| PUFAn6 | 0,70 |
| C18:2n6 α-linoleico | 0,03 |
| C18:3n6 γ-linoleico | 0,02 |
| C20:4n6 arachidonico | 0,01 |

Il gambero rosso della Louisiana

Tabella 5.1.3 Continua

| | |
|--------------------|------|
| PUFAn3 | 0,66 |
| C18:3n3 linolenico | 0,30 |
| C20:5n3 (EPA) | 0,02 |
| C22:5n3 (DPA) | 0,04 |
| C22:6n3 (DHA) | 0,11 |

Tabella 5.1.4 Composizione in aminoacidi (g 100 g⁻¹), taurina, carnitina e anserina (g kg⁻¹).

| Aminoacidi | |
|------------|------|
| Arg | 1,6 |
| His | 1,2 |
| Ile | 1,6 |
| Leu | 3,0 |
| Lys | 1,8 |
| Met | 0,6 |
| Cys | 0,5 |
| Phe | 1,8 |
| Tyr | 1,1 |
| Thr | 1,6 |
| Trp | 0,4 |
| Val | 2,7 |
| Ala | 3,4 |
| Asp | 3,7 |
| Glu | 7,7 |
| Gly | 2,5 |
| Pro | 1,4 |
| Ser | 1,1 |
| Taurina | 25,4 |
| Carnitina | 43,0 |
| Anserina | 67,2 |

Tabella 5.1.5 Composizione in elementi minerali.

| | |
|------------------------------|------|
| Ca (%) | 5,7 |
| P (%) | 1,0 |
| K (%) | 1,1 |
| Na (%) | 0,7 |
| Mg (%) | 0,24 |
| Cu (mg 100 g ⁻¹) | 7,8 |
| Mn (mg 100 g ⁻¹) | 41,6 |
| Fe (mg 100 g ⁻¹) | 20,6 |
| Zn (mg 100 g ⁻¹) | 8,6 |

Tabella 5.1.6 Contenuto in vitamine (mg 100 g⁻¹).

| | |
|----|-------|
| B2 | 19,6 |
| B5 | 25,1 |
| B6 | 163,8 |
| C | 31,9 |

Tabella 5.1.7 Contenuto in diossine, PCB e pesticidi organo-clorurati.

| | |
|---|---------|
| PCDD/F (pg WHO05-TEQ g ⁻¹) | 0,165 |
| DL-PCB (pg WHO05-TEQ g ⁻¹) | 0,498 |
| PCDD/F + DL-PCB (pg WHO05-TEQ g ⁻¹) | 0,663 |
| SOMMA NDL-PCB (ng g ⁻¹) | 3,030 |
| Pesticidi organo-clorurati | < LOD** |

* α-HCH, Lindane, β-HCH, HCB, Heptachlor, Heptachlor epoxide, o,p-DDE, p,p'-DDE, α-Endosulfan, beta -Endosulfan, o,p'-DDD, p,p'-DDD, o,p'-DDT, p,p'-DDT, Aldrin, Dieldrin, Methoxychlor e Mirex.

** intervallo dei limiti di rivelazione (LOD) compreso tra 0,001 e 0,012 mg kg⁻¹

Tabella 5.1.8 Contenuto in metalli pesanti.

| | |
|--|--------------------|
| Mercurio (mg kg ⁻¹) | Non rilev. < 0,022 |
| Arsenico totale (mg kg ⁻¹) | 0,0076 |
| Piombo (mg kg ⁻¹) | 0,020 |
| Cadmio (mg kg ⁻¹) | 0,0059 |

Tutti i valori della Tabella 5.8 risultano inferiori al relativo tenore massimo di legge pari a 0,50 mg kg⁻¹, come riportato nel Regolamento 1881/2006/CE e successive modifiche. Per quanto riguarda l'arsenico totale non esistono attualmente limiti legislativi per i crostacei. Tuttavia, come ben descritto in letteratura (EFSA, 2009) in queste matrici, assimilabili ai prodotti ittici, il tenore di arsenico inorganico (ossia la parte notoriamente tossica dell'arsenico) è sicuramente inferiore al quantitativo di As_{totale}. Inoltre, i risultati delle tabelle 5.7 e 5.8 sono tutti ampiamente inferiori ai valori-limite previsti dalla legislazione vigente (Allegato I della Direttiva 2002/32/CE).

Tabella 5.1.9 Analisi microbiologiche e microcistine.

| | |
|---|--|
| Carica batterica mesofila (ufc g ⁻¹) | 74.000 |
| Clostridi solfito riduttori* (ufc g ⁻¹) | 510.000 |
| Enterococchi intestinali (ufc g ⁻¹) | 1.900 |
| Staphylococchi coagulasi pos (ufc g ⁻¹) | 380 |
| Coliformi totali (ufc g ⁻¹) | <10 |
| <i>Escherichia coli</i> (ufc g ⁻¹) | <10 |
| Esame batteriologico: isolamento e identificazione | <i>Enterobacter cloacae</i> ssp, <i>dissolvens</i> <i>Clostridium bifermentans</i> <i>Staphylococcus lentus</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp, <i>cremoris</i> <i>Panthoea</i> spp, <i>Lactococcus garviae</i> <i>Escherichia hermannii</i> |
| Microcistine (ng g ⁻¹) | 0,73 |
| <i>E. coli</i> VTEC-STEC | assente |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | assente |
| Norovirus | assente |

Tabella 5.1.9 Continua

| | |
|---------------------------------|---------|
| <i>Salmonella</i> spp. | assente |
| <i>Shigella</i> spp. | assente |
| <i>Vibrio cholerae</i> | assente |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | assente |
| <i>Vibrio</i> spp. | assente |
| Virus epatite A | assente |
| Sostanze inibenti e chinolonici | assente |

* *Clostridium bifermentans*

Le specie batteriche isolate sono riferibili a comuni contaminanti ambientali. I dati ottenuti per il contenuto di microcistine sono estremamente bassi rispetto ai valori raccomandati dall'OMS (*Tolerable Daily Intake* pari a $0,04 \mu\text{g kg}^{-1}$ peso corporeo per giorno), confermando quanto già emerso in precedenza ([Tricarico et al., 2008](#)).

Bibliografia

- AOAC (1995). Official methods of analyses of association of analytical chemist, 16th edition. AOAC, Washington DC.
- Barroso FG, De Haro C, Sánchez-Muros M-J, Venegas E, Martínez-Sánchez A, Pérez-Bañón C (2014). The potential of various insect species for use as food for fish. *Aquaculture* 422–423, 193-201.
- Basto A, Matos E, Valente LMP (2020). Nutritional value of different insect larvae meals as protein sources for European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture* 521, 735085.
- Black MM, Schwartz HM (1950). The estimation of chitin and chitin nitrogen in crawfish waste and derived products. *Analyst* 75(889), 185-189.
- Careri M, Mangia A, Barbieri G, Bolzoni L, Virgili R, Paroli G (1993). Sensory property relationships to chemical data of Italian type dry-crude ham. *Journal of Food Science* 58, 968-972.
- Cerri R (2021). Novel ingredients and underexploited feed resources to improve sustainability of farmed fish species: growth, quality, health and food safety issues – SUSHIN (Sustainable fISH feeds Innovative ingredients). Scuola di Dottorato in “Agriculture Science and Biotechnology”, Università di Udine.
- Cruz-Suarez LE, Nieto-Lopez M, Guajardo-Barbosa C, Tapia-Salazar M, Scholz U, Ricque-Marie D (2007). Replacement of fish meal with poultry by-product meal in practical diets for *Litopenaeus vannamei*, and digestibility of the tested ingredients and diets. *Aquaculture* 272, 466-476.
- Danieli PP, Lussiana C, Gasco L, Amici A, Ronchi B (2019). The effects of diet formulation on the yield, proximate composition, and fatty acid profile of the Black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) prepupae intended for animal feed. *Animals* 9(4), 178.
- Dere S, Günes T, Sivaci R (1998). Spectrophotometric determination of Chlorophyll- A, B, and total carotenoid contents of some algae species using different solvents. *Turkish Journal of Botany* 22, 13-17.
- Dumas A, Raggi T, Barkhouse J, Lewis E, Weltzien E (2018). The oil fraction and partially defatted meal of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) affect differently growth performance, feed efficiency, nutrient deposition, blood glucose and lipid digestibility of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 492, 24-34.
- European Food Safety Authority – EFSA (2009). Scientific Opinion on Arsenic in Food. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2009.1351>

- FAO (2020). The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA). Rome, Italy.
- Finke MD (2015). Complete nutrient content of four species of commercially available feeder insects fed enhanced diets during growth. *Zoo Biology* 34, 554–564.
- Folch J, Lees M, Stanley GHS (1957). A simple method for the isolation and purification of lipids from animal tissue. *Journal of Biological Chemistry* 226, 497–509.
- García-Romero J, Kalinowski CTH, Izquierdo MSL, Robaina LER (2010). Marine and freshwater crab meals in diets for red porgy (*Pagrus pagrus*): Effect on growth, fish composition and skin colour. *Aquaculture Research* 41, 1759–1769.
- Gasco L, Acuti G, Bani P, Dalle Zotte A, Danieli PP, De Angelis A, Fortina R, Marino R, Parisi G, Piccolo G, Pinotti L, Prandini A, Schiavone A, Terova G, Tulli F, Roncarati A (2020). Insect and fish by-products as sustainable alternatives to conventional animal proteins in animal nutrition. *Italian Journal of Animal Science* 19, 360–372.
- Gasco L, Dabbou S, Trocino A, Xiccato G, Capucchio MT, Biasato I, Dezzutto D, Birolo M, Meneguz M, Schiavone A, Gai F (2019). Effect of dietary supplementation with insect fats on growth performance, digestive efficiency and health of rabbits. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 10, 1-9.
- Gasco L, Gai F, Maricchiolo G, Genovese L, Ragonese S, Bottari T, Caruso G (2018). Fish meal alternative protein sources for aquaculture feeds. In: Gasco L, Gai F, Maricchiolo G, Genovese L, Ragonese S, Bottari T, Caruso G (Ed.), *Feeds for the aquaculture sector - Current situation and alternative sources*. SpringerBriefs in Molecular Science. Lightning Source UK Ltd; Cham, Switzerland, pp. 1-28.
- Halver JE, Hardy RW (2002). Fish nutrition, 3rd edition. Academic Press, San Diego, California.
- International Union of Pure and Applied Chemistry - IUPAC (1992). Standard methods for the analysis of oils, fats and Derivatives. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Hasan N, Akhtaruzzaman M, Sultan Z (2013). Estimation of vitamins B-complex (B2, B3, B5, and B6) of some leafy vegetables indigenous to Bangladesh by HPLC method. *Journal of Analytical Sciences Methods and Instrumentation* 3, 24-29.
- Lichtentaler HK, Wellburn AR (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions* 11, 591-592.
- Maiolo S, Parisi G, Biondi N, Lunelli F, Tibaldi E, Pastres R (2020). Fishmeal partial substitution within aquafeed formulations: life cycle assessment of four alternative protein sources. *The International Journal of Life Cycle Assessment* 25, 1455-1471.
- Miller DS, Payne PR (1959). A ballistic bomb calorimeter. *British Journal of Nutrition* 13, 501.
- Niccolai A, Bažec K, Rodolfi L, Biondi N, Zlatić E, Jamnik P, Tredici MR (2020). Lactic Acid Fermentation of *Arthrospira platensis* (Spirulina) in a Vegetal Soybean Drink for Developing New Functional Lactose-Free Beverages. *Frontiers in Microbiology* 11, 560684.
- NRC, 2011. Nutrient requirements of fish and shrimp. National Academies Press, Washington D.C., USA.

- Parisenti J, Beirao LH, Maraschin M, Mourino JL, Nascimento Vieira F, Bedin LH, Rodrigues E (2011). Pigmentation and carotenoid content of shrimp fed with *Haematococcus pluvialis* and soy lecithin. *Aquaculture Nutrition* 17, e530-e535.
- Payne CLR, Scarborough P, Rayner M, Nonaka K (2016). A systematic review of nutrient composition data available for twelve commercially available edible insects, and comparison with reference values. *Trends in Food Science and Technology* 47, 69-77.
- Pulcini D, Capoccioni F, Franceschini S, Martinoli M, Tibaldi E (2020). Skin pigmentation in gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed conventional and novel protein sources in diets deprived of fishmeal. *Animals* 2020, 10, 02138.
- Qian H, Sheng M (1998). Simultaneous determination of fat-soluble vitamins A, D and E and pro-vitamin D in animal feeds by one-step extraction and 2 high-performance liquid chromatography analyses. *Journal of Chromatography A*, 127-133.
- Ruiz-Capillas C, Triki M, de las Heras C, Tejada HP, Jiménez-Colmenero F, Herrero AM (2015). Essay of different extraction procedures in capelin fish meal for biogenic amine determination by HPLC. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 24, 443-453.
- Sánchez-Muros M-J, Barroso FG, 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 MT, Bergagna S, Dezzutto D, Meneguz M, Gai F, Dalle Zotte A, Gasco L (2018). Black soldier fly larva fat inclusion in finisher broiler chicken diet as an alternative fat source. *Animal* 12, 2032-2039.
- Shahidi F, Metusalach A, Brown JA (1998). Carotenoid pigments in seafood and aquaculture. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 38, 1-67.
- Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101, 87-96.
- Tibbetts SM (2018). The Potential for 'Next-Generation'. Microalgae-Based Feed Ingredients for Salmonid Aquaculture in Context of the Blue Revolution. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.73551>
- Tredici MR, Bassi N, Prussi M, Biondi N, Rodolfi L, Chini Zittelli G, Sampietro G (2015). Energy balance of algal biomass production in a 1-ha "Green Wall Panel" plant: How to produce algal biomass in a closed reactor achieving a high Net Energy Ratio. *Applied energy* 154, 1049-1051.
- Tredici MR, Rodolfi L, Biondi N, Bassi N, Sampietro G (2016). Techno-economic analysis of microalgal biomass production in a 1-ha Green Wall Panel (GWP®) plant. *Algal Research* 19, 253-263.
- Tricarico E, Bertocchi S, Brusconi S, Casalone E, Gherardi F, Giorgi G, Mastromei G, Parisi G (2008). Depuration of microcystin-LR from the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* with assessment of its food quality. *Aquaculture* 285, 90-95.

BetMultimedia

Editing, grafica e stampa
www.betmultimedia.it
info@betmultimedia.it

Finito di stampare nel mese di luglio 2021



SUSHIN