

**AVVISI PUBBLICI REGIONALI DI ATTUAZIONE PER L'ANNO 2016
DEL TIPO DI OPERAZIONE 16.1.01 "GRUPPI OPERATIVI DEL PEI
PER LA PRODUTTIVITÀ E LA SOSTENIBILITÀ
DELL'AGRICOLTURA"**

Focus area 4A, 5C, 5D e 5E DGR N. 2376 DEL 21 DICEMBRE 2016

RELAZIONE TECNICA FINALE

**DOMANDA DI SOSTEGNO 5015190
DOMANDA DI PAGAMENTO 5155394
FOCUS AREA: 5C**

Titolo Piano	Valorizzazione di sottoprodotti di filiere vegetali tramite insetti: nuove soluzioni per impieghi alimentari, agronomici ed energetici - Bioecoflies
Ragione sociale del proponente (soggetto mandatario)	CRPV sede Via dell'Arrigoni, 120 Cesena (FC), Piva 01949450405
Elenco partner del gruppo operativo	CRPV UNIMORE (Università degli Studi di Modena e Reggio) UNIPR (Università degli studi di Parma) ASTRA Consorzio Agribologna C.A.B. Cooperativa agricola Brisighellese Conservas Italia Az. Agricola Campalmonti Daniele Az. Agricola Bartolozzi Loris Az. Agricola Mengozzi Lucio

Durata originariamente prevista del progetto (in mesi)	24+4
Data inizio attività	01 settembre 2017
Data termine attività (incluse eventuali proroghe già concesse)	31 dicembre 2019

Relazione relativa al periodo di attività dal	01 settembre 2017	31 dicembre 2019
Data rilascio relazione	17 febbraio 2020	

Autore della relazione	Maria Grazia Tommasini
------------------------	------------------------

Telefono		email	mgtommasini@crpv.it
----------	--	-------	---------------------

1 DESCRIZIONE DELLO STATO DI AVANZAMENTO DEL PIANO

Lo sviluppo delle attività previste nel Piano è iniziato il 1 settembre 2019 ed in generale tutte le attività sono state attivate e svolte seguendo i protocolli presentati nel piano. Tutte le attività previste (pari al 100%) sono state realizzate.

In sintesi:

- L'azione 1 è stata realizzata come previsto seguendo i percorsi e utilizzando i diversi strumenti indicati nel piano.
- L'azione 2 non era prevista e non è quindi stata svolta alcuna attività.
- L'azione 3 è stata realizzata interamente conformemente a quanto previsto. In particolare per il completamento di alcune attività è stato necessario richiedere una proroga in data 28 febbraio 2019 (invio PEC), inerenti in particolare le verifiche di campo sulla funzionalità come ammendanti per le colture orticole delle matrici residue i processi di allevamento ed estrazione. Al fine di svolgere questa valutazione con quantitativi di substrato sufficienti, è risultato necessario replicare più cicli produttivi dell'insetto su substrati opportunamente definiti e pre-valutati che, essendo legati al ciclo biologico dello stesso, hanno richiesto più tempo per ottenerli. Non sono emerse altre criticità e tutte le altre attività sono state svolte come previsto dal Piano.
- L'azione 4 sulla divulgazione ha visto sviluppare dal GO diverse iniziative che hanno soddisfatto le aspettative del progetto e del GOI. In totale sono state svolte oltre 25 iniziative fra incontri, visite, articoli, poster, ecc. oltre alla pagina dedicata sul sito del CRPV.
- L'azione 5 sulla formazione è stata interamente svolta nell'ultimo periodo del progetto a seguito del necessario sviluppo dei dati e relativa elaborazione.

1.1 Stato di avanzamento delle azioni previste nel Piano

Azione	Unità aziendale responsabile	Tipologia attività	Mese inizio attività previsto	Mese inizio attività reale	Mese termine attività previsto	Mese termine attività reale
1 - Cooperazione		Esercizio della Cooperazione	1	1	24	28
3 - Realizzazione del piano.		Azioni dirette alla realizzazione del piano	1	1	24	28
4 - Divulgazione		Divulgazione	6	15	24	28
5 - Formazione		Coaching	12	27	24	28

2 DESCRIZIONE PER SINGOLA AZIONE

Azione

Azione 1 – ESERCIZIO DELLA COOPERAZIONE

Unità aziendale responsabile (Uar)

CRPV, UNIMORE, UNIPR, Astra

Descrizione attività

CRPV, nel suo ruolo di capomandatario ha svolto funzione di coordinatore dell'attività di funzionamento e gestione del Gruppo Operativo (GO) in accordo con gli altri Partner del GO.

Il **referente scientifico** del piano è stato individuato in (UNIMORE).

Il CRPV, tramite proprio personale (fra cui come **Responsabile Organizzativo del Piano, RP**), ha seguito regolarmente e gestito con le necessarie ed opportune documentazioni, tutte le fasi di sviluppo, dall'attivazione anche formale, all'attuale rendicontazione intermedia, del GO e del relativo Piano per assicurarne il corretto funzionamento e svolgimento.

In particolare sono di seguito descritte in sintesi le diverse attività svolte dal CRPV.

A seguito dell'approvazione del Piano (Delibera Reg. Emilia Romagna n° 13491 del 24/08/2017) è stata gestita la fase di costituzione dell'ATS con tutti i partner del Gruppo Operativo (GO) fino alla sua completa formalizzazione avvenuta nel settembre 2017 come da comunicazione inoltrata all'Ente regionale di \

Un primo incontro fra i partner effettivi del GO è stato organizzato in data **6 ottobre 2017**, in tale contesto sono stati rivisti i contenuti e gli obiettivi del Piano, al fine di avere la più ampia condivisione possibile delle informazioni, affinare le modalità di realizzazione delle azioni d'innovazione e rendere operativi rapidi feedback.

L'incontro del 6 ottobre 2017 ha rappresentato anche il momento di costituzione del Comitato di Piano (CP) per la gestione e il funzionamento del GO. Il CP è quindi composto:

- dal Responsabile Organizzativo del Piano (RP) anche detto Responsabile del Piano (CRPV);
- dai Responsabili Scientifici (RSs) dell'Univ. di Modena e Reggio Emilia (UniMORE);
- Univ. di Parma;
- Astra
- CAB Brisighellese;
- Conserve Italia;
- Agribologna;

oltre che dai rappresentanti delle Aziende agricole

Il **RP** si è quindi occupato di coordinare nel complesso tutte le attività, animando il GO, seguendone il percorso e verificandone la coerenza e buon sviluppo (attraverso innumerevoli contatti telefonici, via whatsapp, mail e mailing list, documentabili dagli strumenti CRPV e incontri specifici). Il RP ha inoltre favorito lo scambio di informazioni e ogni volta utile, il necessario supporto sia informativo che logistico per il buon sviluppo delle sinergie e attività previste dal piano.

Ha inoltre stimolato e collaborato per la realizzazione delle azioni di divulgazione e formazione, come descritte di seguito nell'azione 4 e 5.

L'attività di coordinamento e animazione ha visto il RP organizzare e partecipare un **totale di 8 incontri** del GO ed in particolare nelle seguenti date:

- **6 ottobre 2017** (a Reggio Emilia, RE),
- **12 ottobre 2017** (a Reggio Emilia, RE),
- **10 maggio 2018** (a Parma, PR)
- **3 settembre 2018** (via skype)
- **26 ottobre 2018** (a Reggio Emilia, RE),
- **15 maggio 2019** (via skype)
- **30 maggio 2019** (a Modena, MO)
- **19 dicembre 2019** (via skype).

I fogli firma di tutti gli incontri del GO sopra citati (esclusi quelli via skype), sono disponibili c/o il CRPV.

Oltre ai suddetti incontri il RP ne ha fatti alcuni ulteriori e specifici per la fase di monitoraggio sullo stato di avanzamento delle diverse attività incluse nel Piano o per affrontare eventuali specifiche fasi organizzative fra cui ad esempio le forniture delle materie di scarto dalle strutture produttive coinvolte. Inoltre sono stati innumerevoli i contatti fra il RP e i partners via mail, telefono o skype al fine di indirizzare, supportare e fornire informazioni utili allo sviluppo corretto del progetto e delle fasi tecnico-amministrative ad esso connesse.

Per la fase organizzativa e logistica di incontri e delle altre iniziative descritte di seguito, il CRPV si è avvalso della segreteria tecnica di CRPV.

Durante il costante monitoraggio dei lavori ed i risultati via via raggiunti in caso di scostamenti sono state valutate le necessarie azioni correttive. Questo è stato gestito anche in relazione ai momenti cruciali nello sviluppo delle diverse prove del Piano ("milestone"). In particolare nel primo periodo ottobre-febbraio (per la raccolta in particolare delle materie di scarto da impiegare per le indagini preliminari di laboratorio e successivamente nel corso del progetto per l'allevamento delle mosche soldato nell'ambito dell'azione 3. Sono state svolte inoltre verifiche su tutte le prove finalizzate al controllo del corretto stato di avanzamento lavori dove anche gli incontri sopra citati sono stati utili allo scopo, oltre ai contatti diretti avuti con i responsabili di ciascuna prova e con il RS.

I periodi autunno- primaverili hanno poi coinciso con l'organizzazione degli eventi di divulgazione organizzati sul territorio (vedi azione 4) e nella fase finale del progetto anche con l'organizzazione dei coaching di formazione (azione 5).

Dal secondo semestre 2019 in poi è iniziata anche la fase di analisi e rendicontazione tecnica. Il RP ha fornito tutti gli strumenti, informazioni e suggerimenti utili ai partner effettivi per il corretto sviluppo di questa fase dell'attività.

Nella fase terminale del progetto, il RP e i RSs, insieme a tutti i partner coinvolti, hanno completato l'analisi dei risultati ottenuti e predisposto la relazione tecnica finale oltre alle altre documentazioni necessarie per la rendicontazione amministrativo-economica prima intermedia e poi finale. Il CRPV si è occupato della gestione e predisposizione della documentazione e format e ha opportunamente informato e supportato i partner nella fase di rendicontazione tecnica ed economica.

Oltre alle attività descritte in precedenza, il CRPV ha svolto altre funzioni legate al proprio ruolo di capofila e referente responsabile in quanto mandatario dell'ATS, come le attività di interrelazione con la Regione Emilia-Romagna, l'assistenza tecnico-amministrativa agli altri partner, le richieste di chiarimento e la redazione di eventuali richieste di aggiustamento o comunicazioni di altra natura trasmesse all'ente preposto.

Il CRPV si è inoltre occupato dell'aggiornamento della Rete PEI-AGRI in riferimento al Piano, come richiesto dalla regione, al fine di stimolare l'innovazione, tramite l'apposita modulistica presente sul sito.

Autocontrollo e Qualità

Attraverso le Procedure e le Istruzioni operative approntate nell'ambito del proprio Sistema Gestione Qualità, il CRPV ha lavorato al fine di garantire efficienza ed efficacia al progetto, come segue:

- Requisiti, specificati nei protocolli tecnici, rispettati nei tempi e nelle modalità definite;
- Rispettati gli standard di riferimento individuati per il progetto;
- Garantita la soddisfazione del cliente tramite confronti diretti e comunicazioni scritte;
- Rispettate modalità e tempi di verifica in corso d'opera definiti per il progetto;
- Individuati i fornitori ritenuti più consoni per il perseguimento degli obiettivi.

La definizione delle procedure, attraverso le quali il Responsabile di Progetto ha effettuato il coordinamento e applicato le politiche di controllo di qualità, sono la logica conseguenza della struttura organizzativa del CRPV.

In particolare sono state espletate le attività di seguito riassunte.

Attività di coordinamento

Le procedure attraverso le quali si è concretizzato il coordinamento dell'intero progetto si sono sviluppate attraverso riunioni e colloqui periodici con il Responsabile Scientifico e con quelli delle Unità Operative coinvolte.

Attività di controllo

La verifica periodica dell'attuazione progettuale si è realizzata secondo cadenze temporali come erano state individuate nella scheda progetto. Più in particolare è stata esercitata sia sul funzionamento operativo che sulla qualità dei risultati raggiunti; in particolare è stata condotta nell'ambito dei momenti sotto descritti.

- Verifiche dell'applicazione dei protocolli operativi in relazione a quanto riportato nella scheda progetto;
- Visite ai campi sperimentali e ai laboratori coinvolti nella conduzione delle specifiche attività.

Riscontro di non conformità e/o gestione di modifiche e varianti

Non si sono verificate situazioni difformi a quanto previsto dalla scheda progetto.

Tutte le attività svolte come previsto nella procedura specifica di processo sono registrate e archiviate nel fascicolo di progetto e certificate attraverso visite ispettive svolte dal Responsabile Gestione Qualità del CRPV.

Il Sistema Qualità CRPV, ovvero l'insieme di procedure, di misurazione e registrazione, di analisi e miglioramento e di gestione delle risorse, è monitorato mediante visite ispettive interne e verificato ogni 12 mesi da Ente Certificatore accreditato (DNV-GL).

Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità evidenziate.

Gli obiettivi del piano sono stati raggiunti e non sono state rilevate criticità nella fase di cooperazione del GO.

Attività ancora da realizzare:

Nessuna.

1.2 Personale

Nome e Cognome	Unità Aziendale responsabile	Mansione/qualifica	Attività svolta nell'azione	Ore	Costo
	UNIMORE	Ricercatore	Responsabile scientifico	10	342,60
	UNIPR	Professore ordinario	Referente scientifico UNIPR	12	825,00
	CRPV	Impiegato di concetto	Responsabile progetto	243,5	7.607,49
	CRPV	Impiegato di concetto	Responsabile CRPV	8	437,76
	CRPV	Impiegato di concetto	Referente settore orticolo	237	7.609,99
	CRPV	Impiegato di concetto	Referente amministrazione	39	1.451,19
	CRPV	Impiegato di concetto	Amministrazione	131,5	3.081,04
	CRPV	Impiegato di concetto	Responsabile sistema qualità	18	505,80
Totale:					21.860,85

1.3 Trasferte

Cognome e Nome	Descrizione	Costo
	Trasferte fra la sede del CRPV, le sedi dei partners o altri luoghi di incontro ed i siti in cui si svolgono le azioni di realizzazione e divulgazione del piano.	634,84
Totale:		634,84

AZIONE 3 - SPECIFICHE AZIONI LEGATE ALLA REALIZZAZIONE DEL PIANO

3.1 Attività e risultati

Azione

AZIONE 3 - SPECIFICHE AZIONI LEGATE ALLA REALIZZAZIONE DEL PIANO

Unità aziendale responsabile (Uar)

Le unità verranno esplicitate per ogni singola attività.

Descrizione attività

SOTTO-AZIONE 3.1. Ottimizzazione dell'allevamento di MS, in relazione alla disponibilità stagionale e composizione dei SA, in funzione dell'efficienza di crescita delle larve

Attività 3.1.1. Disegno sperimentale funzionale

Uar: UNIMORE

OBIETTIVI

Screening delle variabili della composizione del SA in funzione dei sottoprodotti di diverse filiere vegetali disponibili durante tutto l'anno. Pianificazione ed analisi statistica di prove sperimentali di allevamento in laboratorio di MS, in considerazione della diversa disponibilità stagionale dei sottoprodotti provenienti dalle diverse filiere vegetali disponibili. Formulazione di almeno tre SA ottimali in funzione della disponibilità stagionale (annuale, estiva, autunnale) ed in considerazione dei parametri di allevamento della MS (peso e quantità delle larve e giorni di allevamento).

MATERIALI E METODI

L'approccio statistico utilizzato riguarda la progettazione razionale degli esperimenti, in particolare il Mixture Design. Questo è uno strumento molto specifico nella progettazione di esperimenti per ottimizzare le proporzioni tra gli ingredienti della miscela e quindi ampiamente utilizzato per le indagini chimiche e farmaceutiche. Questo approccio supera le forti semplificazioni intrinseche del metodo One-Factor-at-A-Time (OFAT), riducendo il numero di test sperimentali necessari per fornire il massimo numero di informazioni su problemi complessi, risparmiando tempo e risorse (Montgomery, 2012). Per l'impostazione dei piani sperimentali è stato utilizzato il software Design Expert 12 (Statease). Ogni esperimento pianificato, ovvero combinazione di SA, è stato replicato tre volte per la stima dell'affidabilità del modello. Gli esperimenti sono stati condotti secondo un ordine random per evitare il condizionamento ambientale. 21 esperimenti, compresi i punti centrali, sono stati pianificati e replicati tre volte per la miscela per tutto l'anno, 13 per la miscela estiva e 15 per la miscela autunnale.

L'analisi della varianza (ANOVA) è stata impiegata per valutare la significatività del modello e il suo potere predittivo per descrivere le relazioni tra composizioni del SA e performance dell'allevamento. Nel metodo ANOVA una differenza statistica tra i campioni può essere definita quando la variazione tra tutti i campioni, generalmente dovuta a cambiamenti di processo o di fattore, è maggiore della variazione all'interno dei

campioni ottenuti nelle stesse condizioni sperimentali. L'analisi dei residui è stata utilizzata per evidenziare potenziali esperimenti devianti, nonché i coefficienti di regressione, che sono stati analizzati con l'approccio del p-value: p-value superiori a 0,005 non sono stati considerati staticamente significativi e quindi trascurati per la formulazione del modello (Benjamin e Berger, 2019). La qualità del modello matematico così generato è stato valutato mediante i parametri R^2 e $Pred-R^2$ (Eriksson et al., 2008). Per ogni indicatore di performance di allevamento sono stati calcolati i rispettivi modelli matematici per ognuna delle stagioni considerate:

- Numero totali di prepupae (P Number)
- Peso medio di una singola prepua (P weight)
- Numero di giorni necessari per raggiungere il picco di prepupae (days)
- Quantità di acqua aggiunta durante l'allevamento normalizzata per i giorni necessari per l'allevamento (NWater)
- Quantità di SA aggiunto durante l'allevamento normalizzato per i giorni necessari per l'allevamento (NSubstrate)

Tutte le risposte state raccolte nella funzione di desiderabilità (D) al fine di ottenere una miscela complessiva ottimale di SA per ciascuna stagione in grado di soddisfarli tutte (Kros e Mastrangelo, 2004). In particolare, la massima importanza (5) è stata data a P weight e a P Number, insieme all'obiettivo di massimizzarli. D'altra parte, il parametro Days è stato tenuto in considerazione con un'importanza pari a 4 e con l'obiettivo di minimizzarlo. L'intervallo della funzione di desiderabilità è compreso tra 0 e 1, dove il valore più basso (0) rappresenta una combinazione completamente indesiderabile di fattori indipendenti e, al contrario, il valore più alto (1) indica una combinazione completamente desiderabile o ideale di essi.

RISULTATI

La selezione dei sottoprodotti è stata fatta in primis tenendo conto della disponibilità stagionale (anche in termini di quantità) e delle eventuali condizioni di raccolta e mantenimento per tempi medio-lunghi (qualche mese). Inoltre, sono stati considerati i diversi fornitori dei rispettivi sottoprodotti in modo da favorire lo snellimento della gestione logistica. Per cui in tabella 1 sono indicati i sottoprodotti selezionati.

Tab. 1 – Sottoprodotti selezionati

Annuale	Melone Frutta esotica Mela Ananas Kiwi
Estiva	Pomodori Pesche
Autunnale	Sansa Legumi Mais

La formulazione ottimale annuale è stata impiegata come parte della composizione dei SA Estivo e autunnale per incrementare lo smaltimento di sottoprodotti sempre disponibili. Mediante specifici test preliminari in laboratorio è stato confermato che mantenere costante la temperatura favorisce l'individuazione di SA ottimali da utilizzare successivamente nell'impianto massale.

Nella tabella 2 viene mostrata l'analisi ANOVA per i modelli calcolati da ciascuna risposta derivata dai dati di allevamento. Ciascuno dei modelli generati è significativo ma i parametri di bontà del modello risultano essere abbastanza buoni ($R^2 > 0,75$) solo per alcune risposte, in particolare 1 per la miscela annuale (P Number), 2 per la miscela estiva (P Number e N water) e 4 per la miscela autunnale (P weight, P number, days e N Substrate). Per tutte le risposte, il $Pred-R^2$ è inferiore a R^2 conformemente alla sua definizione e solo le risposte con R^2 abbastanza buono sono quelle che mostrano un alto valore di $Pred-R^2$, intorno a 0,70, indicando un buon potere predittivo del rispettivo modello.

Tabella 2 – Analisi ANOVA

Stagione	Risposte	p-value	R^2	$Pred-R^2$
Annuale	L Weight	< 0.0001	0.58	0.40

	P Weight	< 0.0001	0.47	0.33
	P Number	< 0.0001	0.79	0.73
	Days	< 0.0001	0.48	0.31
Estivo	L Weight	< 0.0001	0.78	0.75
	P Weight	< 0.0001	0.71	0.69
	P Number	0.0002	0.81	0.77
	Days	< 0.0001	0.48	0.31
	NWater	< 0.0001	0.78	0.71
Autunnale	L Weight	< 0.0001	0.80	0.71
	P Weight	< 0.0001	0.83	0.72
	P Number	< 0.0001	0.87	0.78
	Days	< 0.0001	0.93	0.90
	NWater	< 0.0001	0.60	0.50
	NSubstrate	< 0.0001	0.77	0.61

Alcuni risultati principali ottenuti dai modelli mostrano come almeno l'80% in peso di melone favorisca l'incremento di P Number, in particolare se combinato ai frutti esotici. Interazioni significative tra i componenti in miscela si evidenziano anche durante l'analisi dei substrati estivi tra i quali in particolare il pomodoro svolge un ruolo chiave promuovendo maggiori valori di P Number e NWater. Secondo gli stessi modelli, l'impiego di pesca riduce significativamente le prestazioni di allevamento rispetto alla migliore miscela per tutto l'anno. Considerando i substrati autunnali il P-weight aumenta impiegando principalmente mais (>50% in peso). Mentre l'esperimento composto principalmente da mais e legumi (> 70%) aumenta il numero di prepupae allevate e limita il numero di giorni necessari per l'allevamento, mentre risultati opposti sono stati ottenuti impiegando solo sanses. Vale la pena notare che molte combinazioni tra legumi e sanses promuovono l'efficienza complessiva dell'allevamento, massimizzando l'occupazione dei rifiuti e successivamente la loro valorizzazione. Le funzioni di desiderabilità sono state riportate nella Figura 1, rispettivamente per le miscele annuali (Figura 1a ed 1b), estive (Figura 1c ed 1d) ed autunnali (Figura 1e ed 1f).

Da cui si evincono i seguenti substrati come ottimali:

- Annuale: 70% melone + 30% frutta esotica;
- Estiva: 80% di pomodoro + 20% di pesca;
- Autunnale: 35% annuale + 25% legume + 20% sansa + 20% Mais.

CONCLUSIONI

Mediante un approccio razionale è stato possibile individuare quali sottoprodotti hanno un maggiore influenza sui parametri di allevamento. Tra i sottoprodotti disponibili tutto l'anno, una combinazione sinergica di avanzi di melone (70%) e frutta esotica (30%) ha fornito la migliore alimentazione per soddisfare le esigenze dietetiche di MS. L'inclusione degli avanzi estivi come il pomodoro e la pesca e gli avanzi autunnali come il mais e il legume, in combinazioni ben personalizzate, hanno portato a prestazioni di crescita molto simili a quelle della dieta di controllo. Questo studio razionale può supportare la scelta strategica dell'impiego residuo per la trasformazione da parte degli insetti per ricavare prodotti funzionali, attrarre il mercato e soddisfare i requisiti dell'economia circolare.

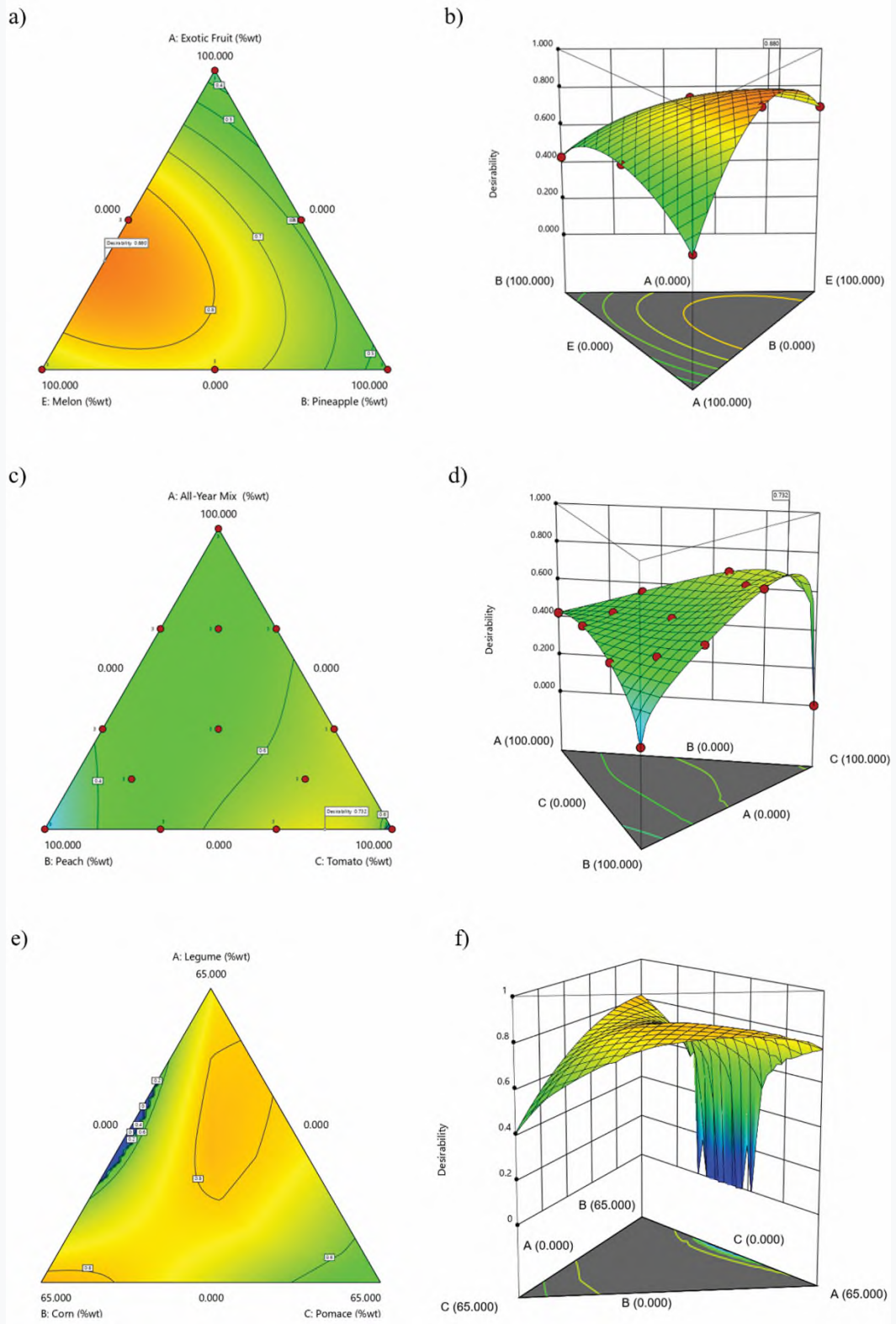


Figura 1 – Funzioni di desiderabilità

Attività 3.1.2. Sperimentazione ottimizzazione allevamento in laboratorio

Uar: UNIMORE

OBIETTIVI

Il lavoro si è concentrato sull'identificazione dei migliori substrati per ogni gruppo stagionale che supportano la crescita delle larve di MS, valutando i parametri biologici (variazione di peso delle larve e numero e tempi di sviluppo delle prepupe) e i parametri di produzione (mortalità delle larve, tasso di crescita, efficienza nella conversione del substrato e percentuale di prepupe ottenute).

Inoltre, su la base dei risultati ottenuti precedentemente in laboratorio e poi individuati nella attività 3.1.1, è stato eseguito un test preliminare per verificare le performance delle larve su le migliori miscele identificate per ogni gruppo stagionale, è anche sia verificato se è necessario aumentare l'umidità nei mix di substrati identificati. Si rimanda all'Allegato 1 per le foto.

MATERIALI E METODI

Dato che i sottoprodotti avevano dimensioni variabili è stato necessario utilizzare un tritratore che ha consentito di ottenere frammenti omogenei del diametro di circa 5 mm. Gli scarti triturati sono stati congelati all'interno di sacchetti di plastica per evitarne il deterioramento, e scongelati prima del loro utilizzo negli esperimenti.

Successivamente, attraverso l'approccio di Mixture Design (Attività 3.1.1) è stato possibile suddividere i sottoprodotti in 50 diverse miscele, raggruppate a loro volta in tre gruppi: annuale, autunnale ed estivo, sulla base della disponibilità stagionale e del contenuto nutrizionale. Sono state eseguite tre repliche per ogni miscela, aggiungendo anche ad ogni gruppo stagionale tre repliche con la dieta controllo (dieta di Gainesville, sopra descritta). Inoltre, ai mix estivi e autunnali sono stati aggiunti anche melone e mango dei substrati annuali perché tra tutti quelli testati sono risultati i migliori per la crescita delle larve e sono prodotti disponibili tutto l'anno.

Per ogni replica, 100 larve di secondo e terzo stadio assieme a una quantità di substrato variabile da 250 a 375 g, sono stati introdotti in contenitori di vetro (23x13x8 cm) uguali a quelli che vengono utilizzati per l'allevamento della colonia di laboratorio. I contenitori sono stati mantenuti in celle climatiche a 27°C con il 70% di umidità relativa e un ciclo giorno-notte 16:8 h.

Sono stati eseguiti due controlli a settimana durante i quali è stata aggiunta acqua e substrato alimentare all'occorrenza. I controlli hanno previsto la rimozione della box delle prepupe trovate in ogni replica, che sono state pulite, contate, pesate e messe all'interno di provette falcon. I campioni sono stati conservati in freezer (-20°C) per consentire l'analisi chimica delle componenti costituzionali delle prepupe.

Nei primi quattro controlli sono state raccolte in modo casuale 10 larve per replica, che sono state pulite con acqua, asciugate con carta assorbente e pesate. Dato che le larve non sono state danneggiate durante questa fase è stato possibile reintrodurle nel contenitore in modo che potessero continuare il loro sviluppo. I controlli sono proseguiti per un periodo di massimo 62 giorni, durante i quali le larve hanno raggiunto lo stadio di prepupa e sono state raccolte, oppure sono morte, tuttavia nel caso in cui, già in questa prima fase, si fossero sviluppate più del 10% di PP i controlli sulle larve sarebbero stati interrotti.

Al termine di ogni prova il substrato residuo rimasto dopo l'elaborazione è stato raccolto, pesato e conservato all'interno di sacchetti freezer in congelatore (-20°C) (Fig.2.9).

Sottoprodotti stagione annuale: da questo gruppo hanno fatto parte gli scarti di lavorazione di mango (frutta esotica), ananas, kiwi, mela e melone che sono stati combinati in 21 miscele contenenti diverse percentuali di substrati (Tab. 1). Il substrato è stato aggiunto in 4 momenti: inizialmente 100 g ai quali sono stati aggiunti altri 50 g durante i successivi 3 controlli.

Tab.1. Composizione substrati annuali

Codice	Mango (%)	Ananas (%)	Kiwi (%)	Mela (%)	Melone(%)
A	50.00	0.00	0.00	0.00	50.00
B	10.00	10.00	60.00	10.00	10.00
C	0.00	100.00	0.00	0.00	0.00
D	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00
E	0.00	0.00	0.00	100.00	0.00
F	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
G	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00
H	50.00	0.00	50.00	0.00	0.00
J	0.00	50.00	0.00	0.00	50.00
L	0.00	0.00	50.00	0.00	50.00
N	0.00	50.00	0.00	50.00	0.00
P	10.00	10.00	10.00	60.00	10.00
Q	0.00	0.00	0.00	50.00	50.00
R	10.00	10.00	10.00	10.00	60.00
S	0.00	50.00	50.00	0.00	0.00
T	50.00	50.00	0.00	0.00	0.00
U	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00
V	50.00	0.00	0.00	50.00	0.00
X	60.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Y	10.00	60.00	10.00	10.00	10.00
Z	0.00	0.00	50.00	50.00	0.00

Sottoprodotti stagione estiva: di questa categoria hanno fatto parte scarti di lavorazione di pomodoro (bucce e semi) e torsoli di pesca dai cui è stato eliminato il nocciolo, ai quali è stata aggiunta anche la miscela migliore del gruppo annuale, in diverse proporzioni ottenendo 13 miscele (Tab. 2).

Il substrato è stato aggiunto in 2 momenti, 250 g di substrato iniziale, successivamente dopo 8 giorni, sono stati aggiunti altri 125 g in tutte le repliche.

Tab.2. Composizione substrati estivi

Cod.	Melone %	Mango %	Pesca %	Pomodoro %
A	0.00	0.00	66.67	33.33
B	0.00	0.00	100.00	0.00
C	46.67	20.00	16.67	16.67
D	23.33	10.00	33.33	33.33
E	23.33	10.00	0.00	66.67
F	46.67	20.00	33.33	0.00
G	11.67	5.00	66.67	16.67
H	46.67	20.00	0.00	33.33

I	70.00	30.00	0.00	0.00
J	0.00	0.00	33.33	66.67
K	11.67	5.00	16.67	66.67
L	0.00	0.00	0.00	100.00
M	23.33	10.00	66.67	0.00

Sottoprodotti stagione autunnale: questo gruppo ha compreso scarti di legumi (ceci e cannellini), mais e scarti lavorazione delle olive (sia la parte di rifiuti solidi che le acque reflue) in combinazione con la miscela di mango e melone dei substrati annuali. Sono state create 15 miscele diverse (Tab.3.). Sono stati utilizzati 250g di substrato in ogni box, che sono stati aggiunti in una sola volta all'inizio dell'esperimento, ad eccezione che nelle miscele D, H, J e L, dove è stata osservata una maggiore crescita di larve.

Tab. 3. Composizione substrati autunnali.

Cod.	Ceci %	Cannellini%	Mais %	Sansa di olive%	Acqua di scarto %	Melone %	Mango %
A	6.25	6.25	62.50	6.25	6.25	8.75	3.75
B	0.00	0.00	50.00	0.00	0.00	35.00	15.00
C	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
D	6.25	6.25	12.50	31.25	31.25	8.75	3.75
E	31.25	31.25	12.50	6.25	6.25	8.75	3.75
F	50.00	50.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
G	25.00	25.00	0.00	25.00	25.00	0.00	0.00
H	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	70.00	30.00
I	25.00	25.00	50.00	0.00	0.00	0.00	0.00
J	0.00	0.00	0.00	25.00	25.00	35.00	15.00
K	6.25	6.25	12.50	6.25	6.25.00	43.75	18.75
L	0.00	0.00	0.00	50.00	50.00	0.00	0.00
M	0.00	0.00	50.00	25.00	25.00	0.00	0.00
N	25.00	25.00	0.00	0.00	0.00	35.00	15.00
O	12.50	12.50	25.00	12.50	12.50	17.50	7.50

Prova su effetto aggiunta di acqua

Sono state allestite due formulazioni per ogni miscela stagionale: con e senza aggiunta d'acqua (Tab. 4.). Una replica era costituita da 100 larve piccole e 400 g substrato, mantenuti nelle stesse condizioni specificate sopra. A partire dal settimo giorno dell'esperimento, sono stati effettuati controlli ogni 1-2 giorni e sono state pesate 10 larve per replica. L'esperimento è stato considerato concluso il giorno successivo alla comparsa della prima prepupa.

Tab. 4. Composizione dei substrati testati nella prova preliminare

Composizione dei substrati testati	Numero di repliche	
	Con acqua aggiunta	Senza aggiunta di acqua
Gruppo annuale: melone (70%) e frutta esotica (30%)	3	3
Gruppo estivo: pomodoro (80%) e pesca (20%)	3	3
Gruppo autunnale: legumi (25%), residui di lavorazione olive (20%), mais (20%), mix annuale (35%).	3	3

Calcoli sperimentali

In base ai dati raccolti sono stati calcolati i seguenti parametri:

- Mortalità delle larve % LM = $\frac{[\text{num.larve iniziale} - (\text{num.larve finale} + \text{num.prepupe})]}{\text{num.di larve iniziale}} * 100$
- Percentuale di prepupe % PP = $\frac{(\text{num.larve iniziale} - \text{num.prepupe})}{\text{num.di larve iniziale}} * 100$
- Riduzione del substrato RS = $\frac{\text{substrato totale (g)} - \text{substrato residuo (g)}}{\text{substrato totale (g)} * 100}$

RISULTATI

Sottoprodotti stagione annuale

I primi quattro controlli, eseguiti nei giorni 4, 9, 14 e 18 dell'esperimento, hanno riguardato principalmente lo sviluppo larvale. Le prime PP all'interno delle box sono state trovate il giorno 14. Nessuna delle miscele testate ha dato risultati superiori rispetto alla dieta di controllo. La miscela che era composta esclusivamente da melone (D), e quella composta da tutti i sottoprodotti del gruppo annuale in parti uguali (J), hanno portato a risultati migliori per quanto riguarda i tempi di sviluppo, in quanto già al giorno 14 più del 10% delle larve erano diventate PP. Mentre nelle miscele A, G, R ed Y, che avevano un contenuto più alto di melone o erano mix contenenti di tutti i sottoprodotti testati, le larve hanno raggiunto pesi superiori rispetto alle altre miscele (Fig. 1).

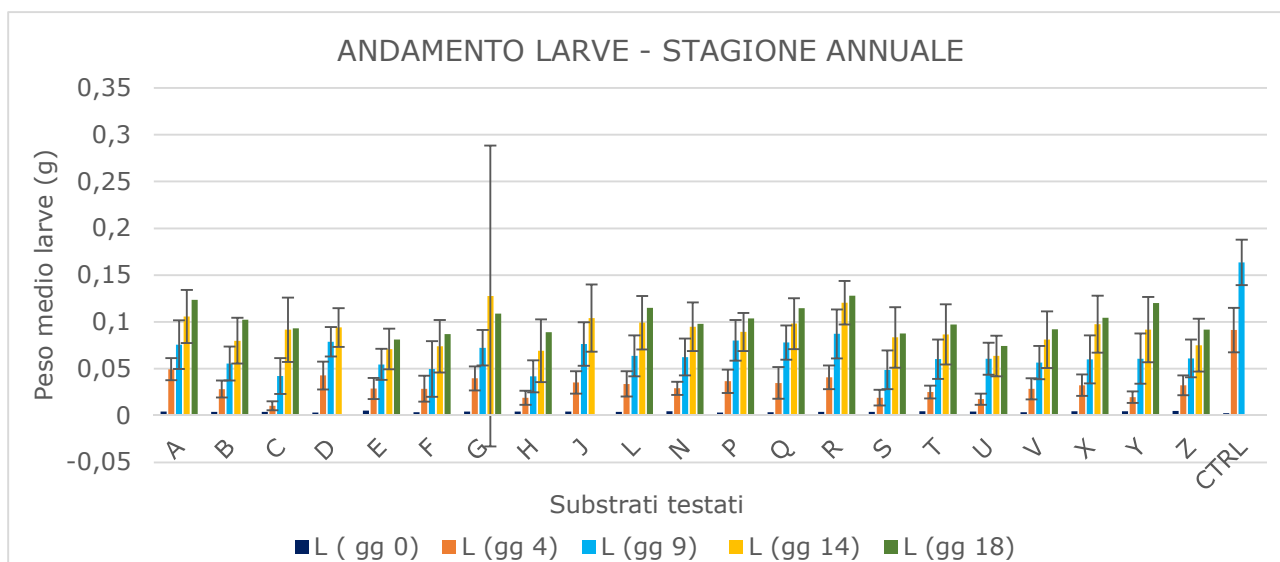


Fig. 1. Andamento del peso delle larve nel mix annuale (media ± deviazione standard)

Ogni mix testato ha portato a tempi di sviluppo differenti, tuttavia dal giorno 18 il numero di PP raccolte è aumentato raggiungendo il numero massimo di PP raccolte in un unico controllo (picco di prepupe) tra il giorno 24 e 28 in quasi tutti i mix, ad eccezione del substrato D nel qual già al giorno 14 si era raggiunto il picco (Fig. 2). In generale un'elevata percentuale di melone nella miscela promuove la velocità di sviluppo e l'incremento di peso delle PP. Nei substrati H, F, U e V, che avevano percentuali variabili di mango, kiwi e mela, i picchi sono stati raggiunti più tardi, tra i giorni 35 e 57 dell'esperimento (Fig. 3, 5). Il tempo richiesto affinché ~100% delle larve allevate su questi substrati raggiungesse lo stadio di PP è stato in totale di 62 giorni. I tempi per il raggiungimento dell'85% delle PP in alcune miscele sono stati relativamente brevi, ad esempio in D già al 28° giorno di esperimento e in R al 35° (Fig. 2, 4). Mentre altre miscele come C, F, H, S, U e Y hanno richiesto tempi molto lunghi: questi mix sono accomunati dalla presenza di elevate percentuali di mango, ananas e kiwi e in Y sono presenti tutti i substrati testati (Fig. 2, 3, 5, 6). I substrati A e D hanno portato ad un numero di PP superiore, ma la miscela A, composta da 50% mango e 50%

melone, si è rivelata la migliore da questo punto di vista. Tuttavia, in generale, il numero di PP sviluppatasi è stato notevolmente inferiore rispetto al controllo (Fig. 2).

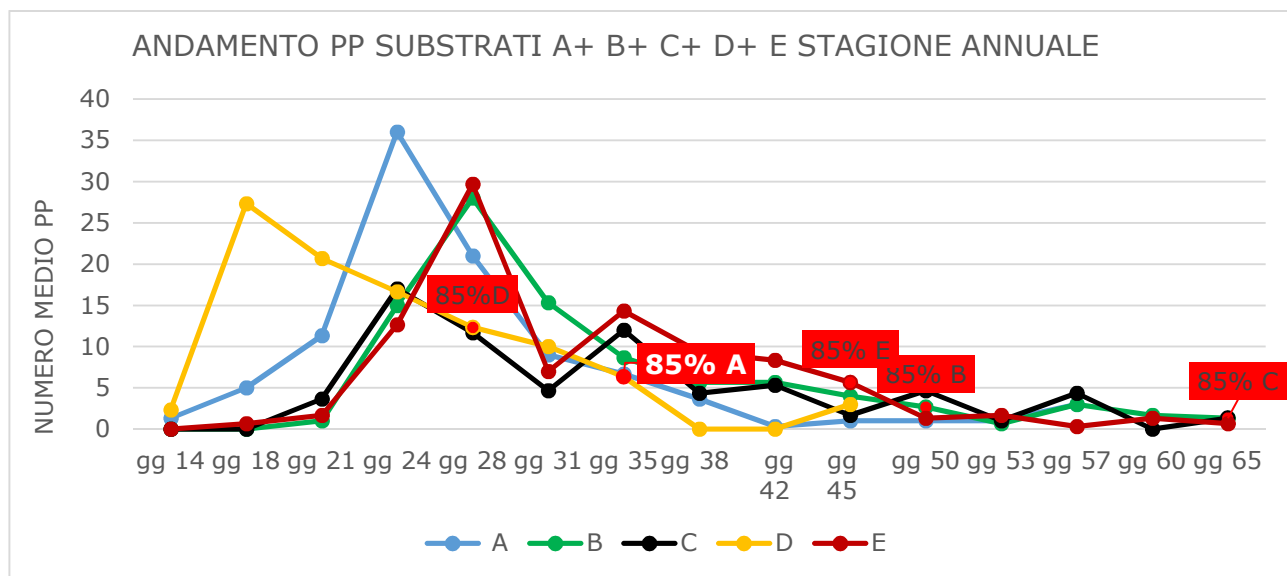


Fig. 2. Andamento PP substrati A+B+C+D+E stagione annuale.

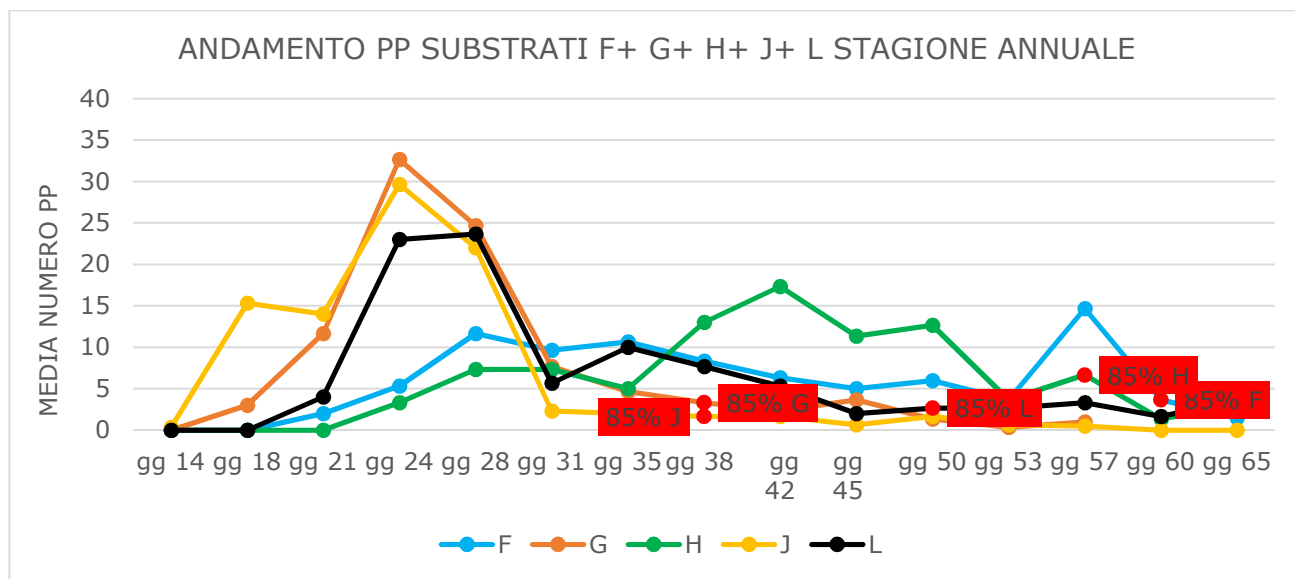


Fig. 3. Andamento PP substrati F+G+H+J+L stagione annuale.

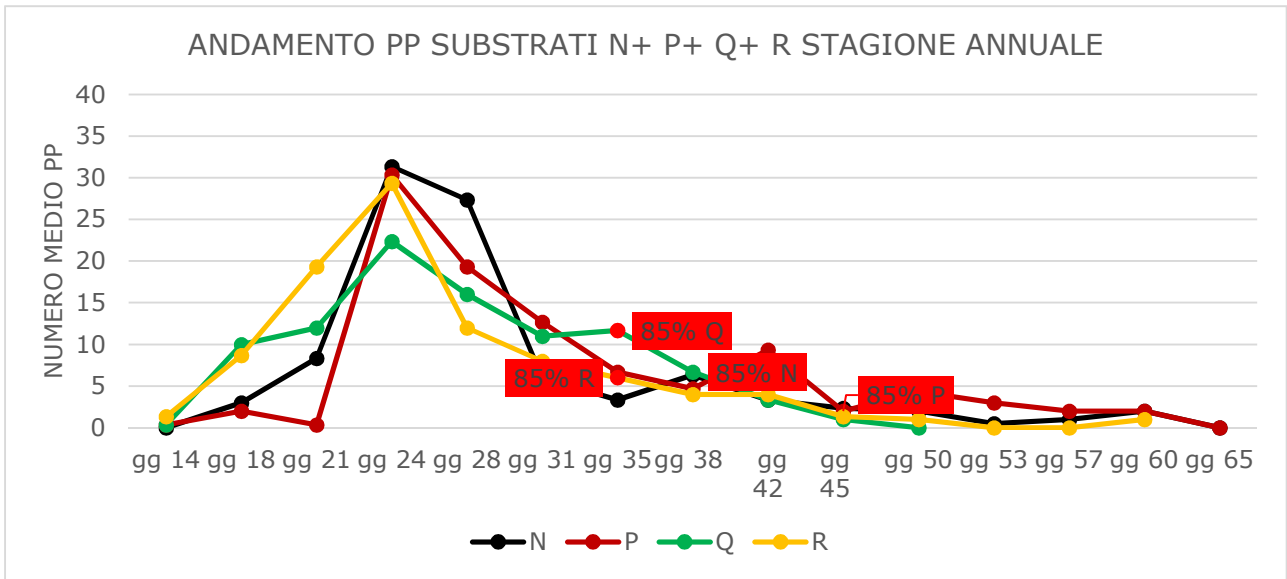


Fig. 4. Andamento PP substrati N+P+Q+R stagione annuale.

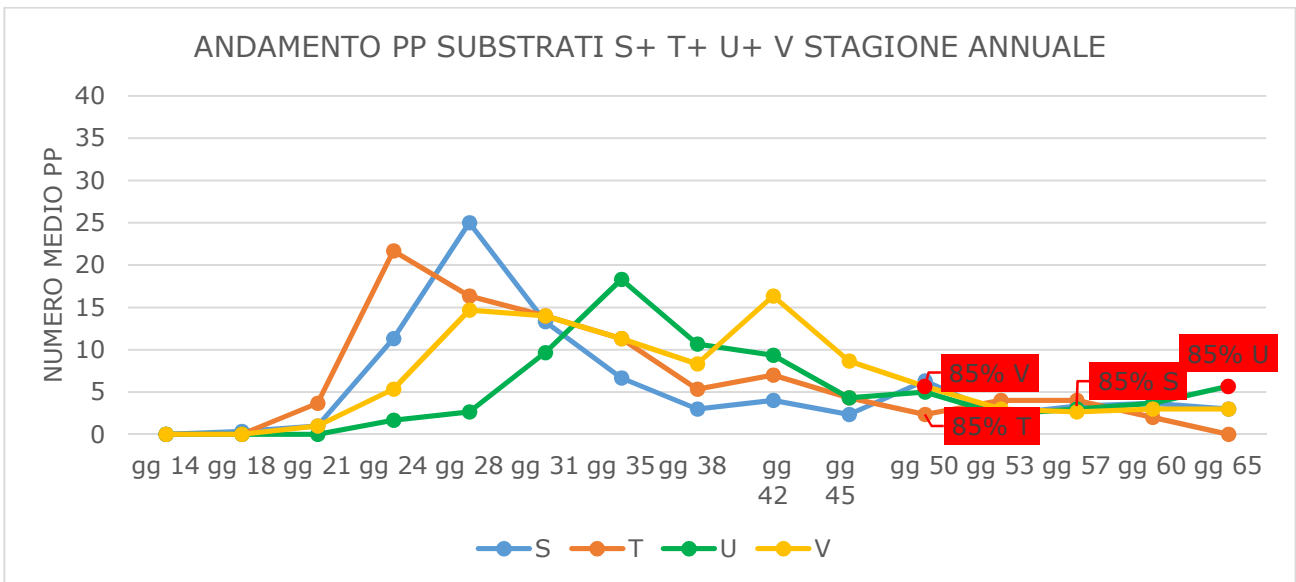


Fig. 5. Andamento PP substrati S+T+U+V stagione annuale.

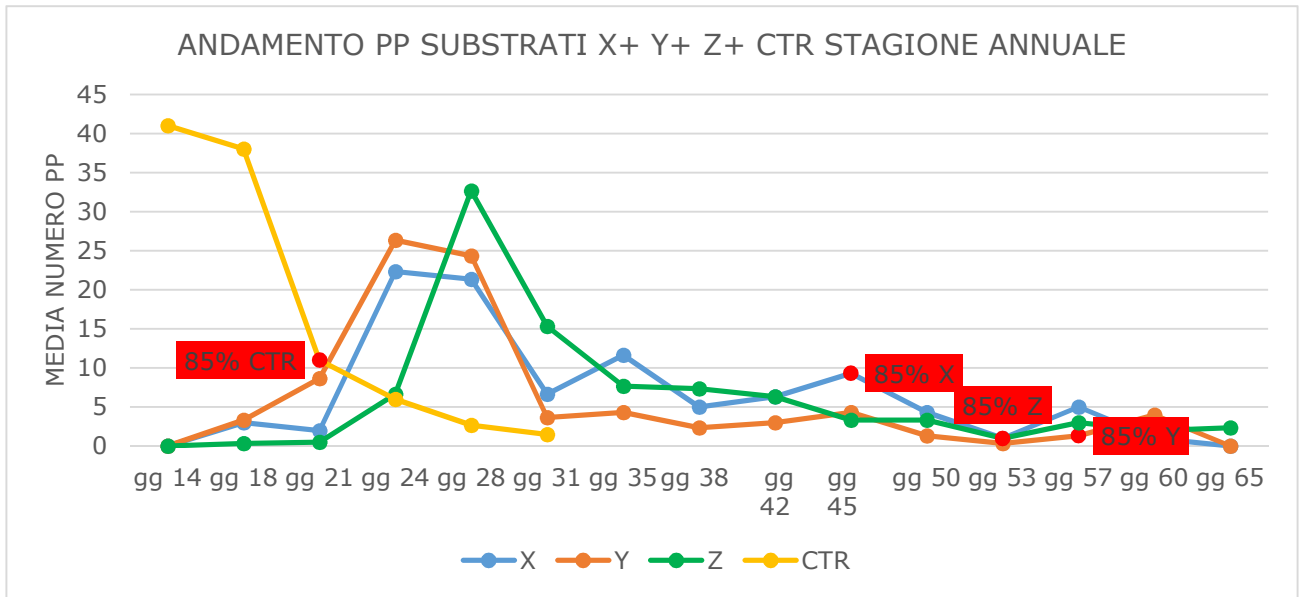


Fig. 6. Andamento PP substrati X+Y+Z+CTR stagione annuale

Rispetto al gruppo di controllo le PP allevate con i mix annuali hanno raggiunto un peso inferiore. Tuttavia, pesi leggermente superiori rispetto alla media sono stati registrati nelle PP allevate sui mix con un contenuto di melone superiore o uguale al 50%, o con una combinazione di melone ed ananas, kiwi o mela, nel concreto i substrati A, R, G, J e Q (Fig. 7).

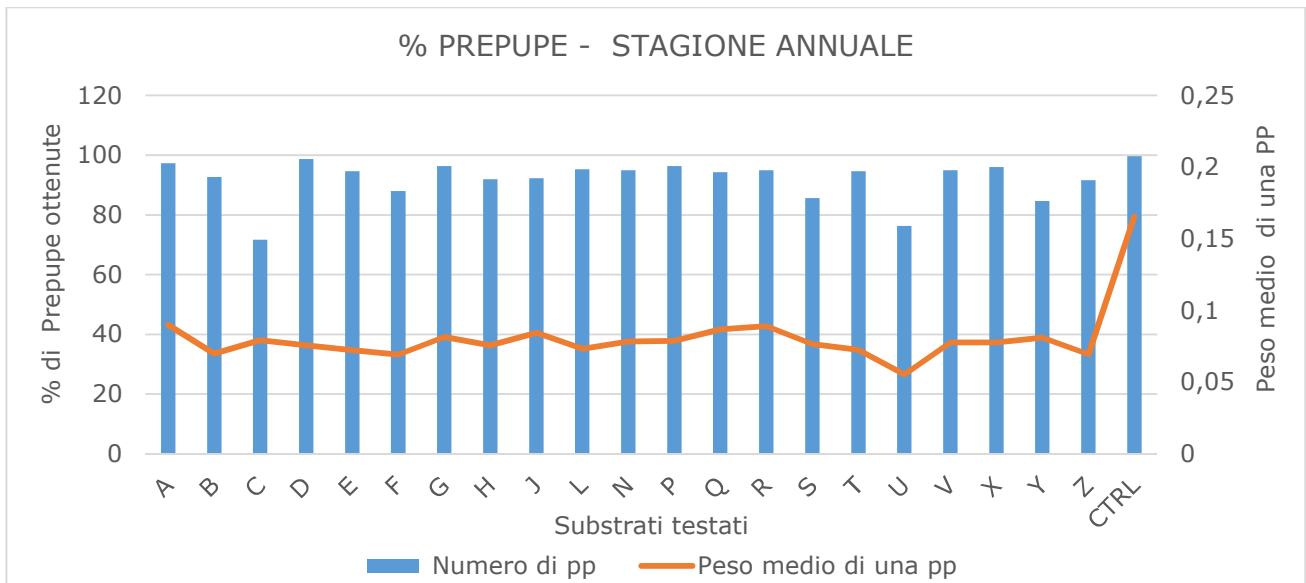


Fig. 7. Percentuale di PP e peso medio delle PP su substrati annuali.

La più alta percentuale di mortalità larvale è stata raggiunta nei substrati C, F e Y (Fig. 8), caratterizzati da un elevato contenuto di ananas o mango.

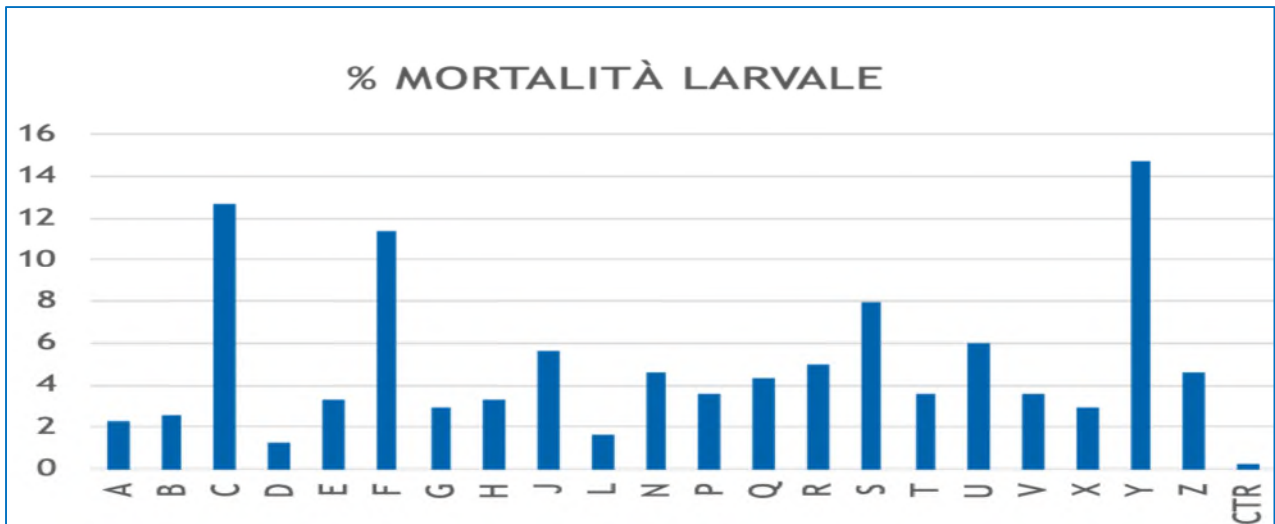


Fig. 8. Percentuale di mortalità larvale su substrati annuali

In generale, la riduzione del substrato è molto elevata (Fig. 9.), verosimilmente anche come conseguenza delle lunghe tempistiche richieste per lo sviluppo delle prepupe.

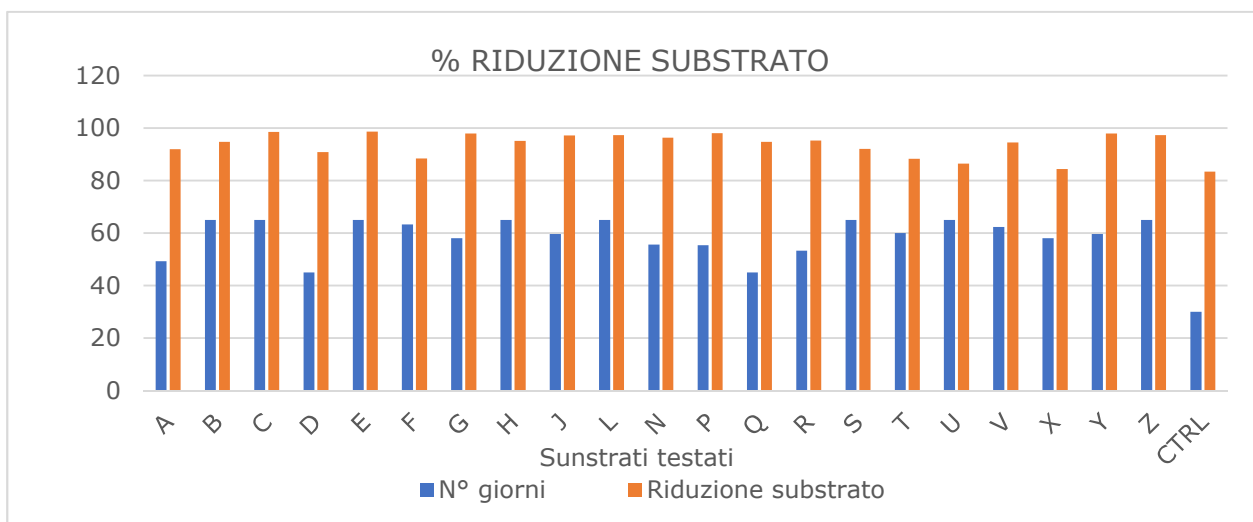


Fig. 9. Percentuale di riduzione del substrato per il gruppo annuale

Sottoprodotti stagione estiva

I controlli sullo sviluppo larvale sono stati eseguiti nei giorni 4, 7, 11 e 14 dell'esperimento, periodo che si sovrapponeva con la comparsa di PP nelle ultime due date, i giorni 11 e 14 di prova. Il peso delle larve che si sono sviluppate nelle miscele L ed E: la prima costituita da solo pomodoro (100% pomodoro) e la seconda da mango e melone (~33,3%) e pomodoro (~66,6%), è risultato simile a quello delle larve della dieta di controllo. Anche per quanto riguarda i tempi di sviluppo la combinazione di pomodoro e melone si è rivelata la migliore abbassando le tempistiche, infatti nei mix E, H, J, K ed L, che contengono elevate percentuali di entrambi, già il giorno 11 più del 10% delle larve erano diventate PP (Fig. 10).

Ogni miscela testata ha portato a tempi di sviluppo differenti. Per la maggior parte dei mix di substrati testati, il picco di raccolta delle PP è avvenuto il giorno 18 dell'esperimento, ad eccezione dei mix contenenti un'elevata percentuale pesca, rispettivamente i mix A, B, G ed M, dove il picco è stato raggiunto tra il 25° e il 32° giorno (Fig. 11, 12, 13).

Il tempo richiesto affinché ~100% delle larve allevate su tutti i substrati raggiungesse lo stadio di PP è stato di 39 giorni. Tuttavia, il mix M, dove era presente una grande quantità di pesca (66%) ma niente pomodoro, ha richiesto un tempo di sviluppo più lungo (42 giorni) (Fig. 13).

Il raggiungimento dell'85% di PP è avvenuto in tempi diversi a seconda dei mix utilizzati, i più performanti sono stati E, D, H ed L nei quali già al 21° giorno era stato raccolto l'85% di PP (Fig. 11, 12, 13). Queste miscele erano caratterizzate da alte concentrazioni di melone, come in H, o di pomodoro, come in E ed L, invece nel mix D erano presenti tutti i substrati di gruppo stagionale. I risultati peggiori per quanto riguarda il tempo necessario per raggiungere l'85% delle PP sono stati registrati nel substrato B composto da sola pesca (100%) che ha impiegato 39 giorni (Fig. 11).

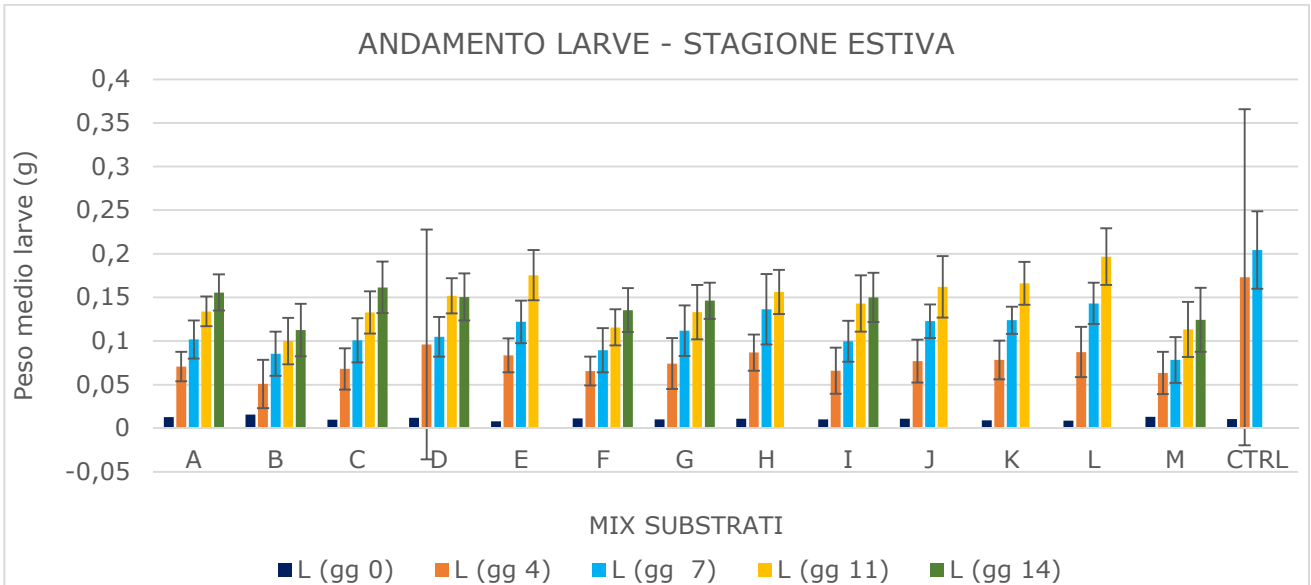


Fig. 10. Andamento del peso delle larve nel mix estivo (media± deviazione standard)

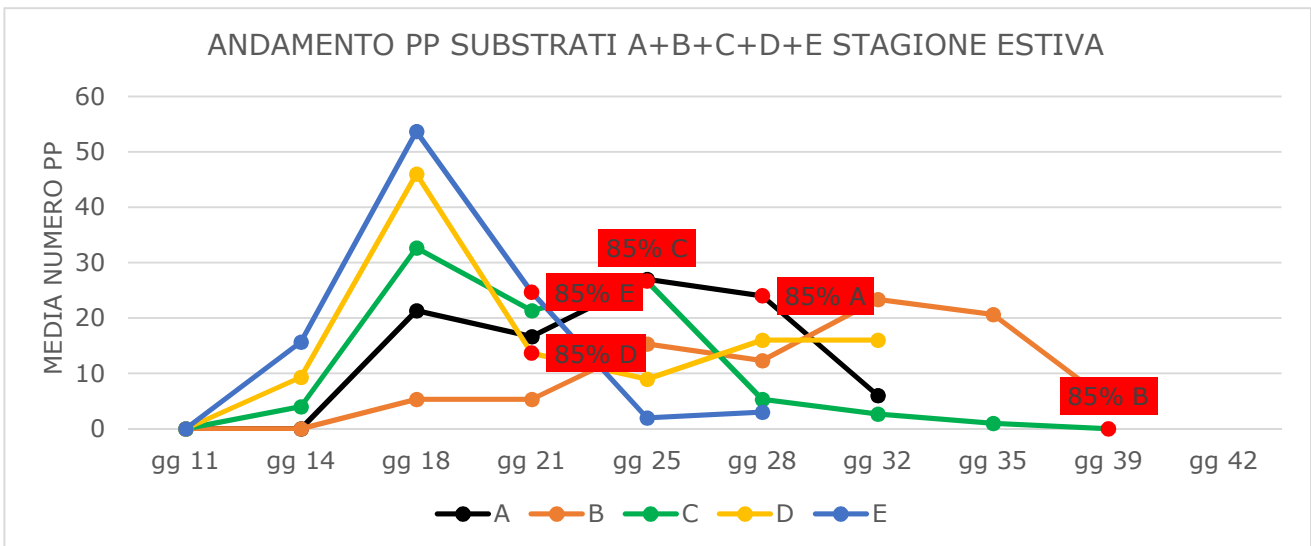


Fig. 11. Andamento PP substrati A+B+C+D+E stagione estiva

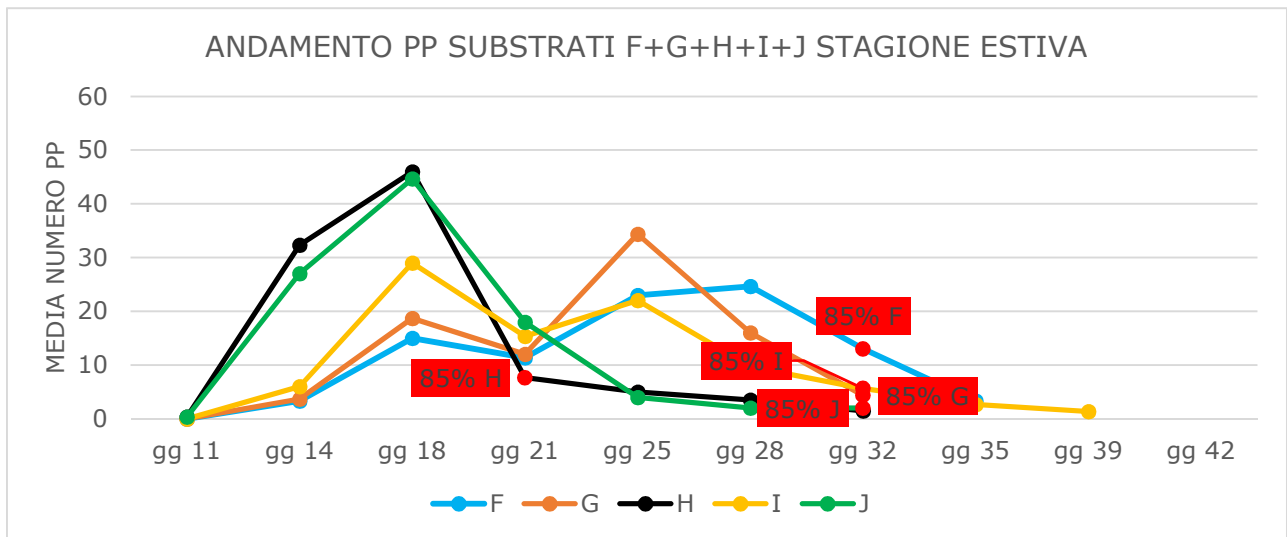


Fig. 12. Andamento PP substrati F+G+H+I+J stagione estiva

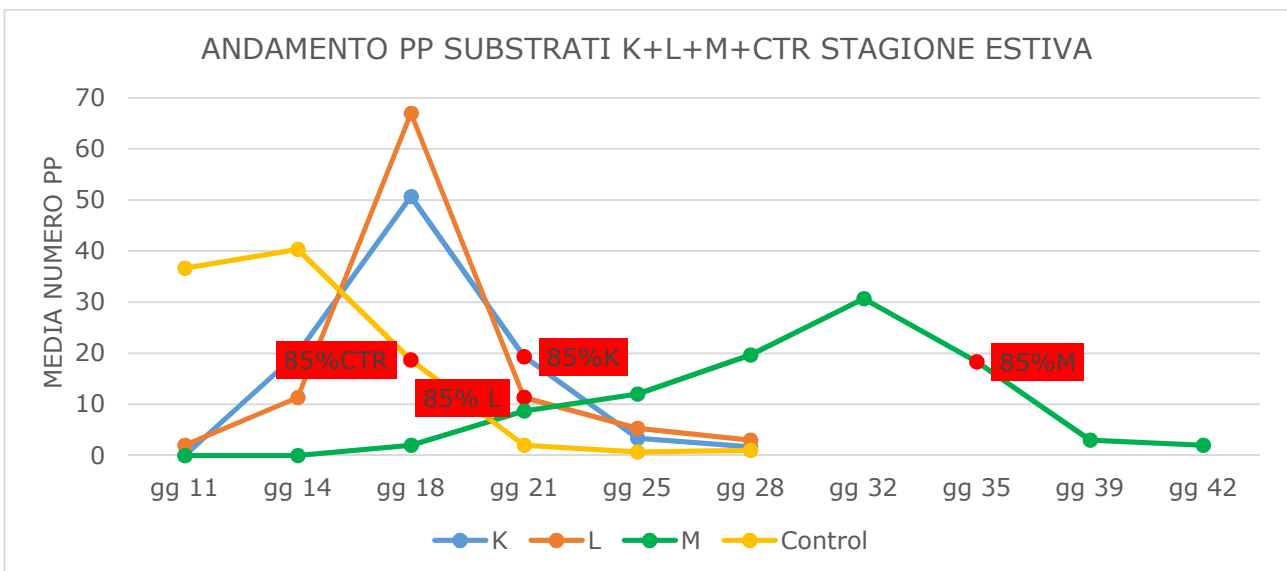


Fig. 13. Andamento PP substrati K+L+M+CTR stagione estiva

I substrati estivi hanno portato ad un numero e ad un peso delle PP simile a quelle del controllo, questo risulta evidente soprattutto se si fa un confronto con le PP ottenute nel gruppo annuale. Anche il numero di giorni necessario per lo sviluppo delle larve è simile a quello registrato nel controllo (Fig. 14).

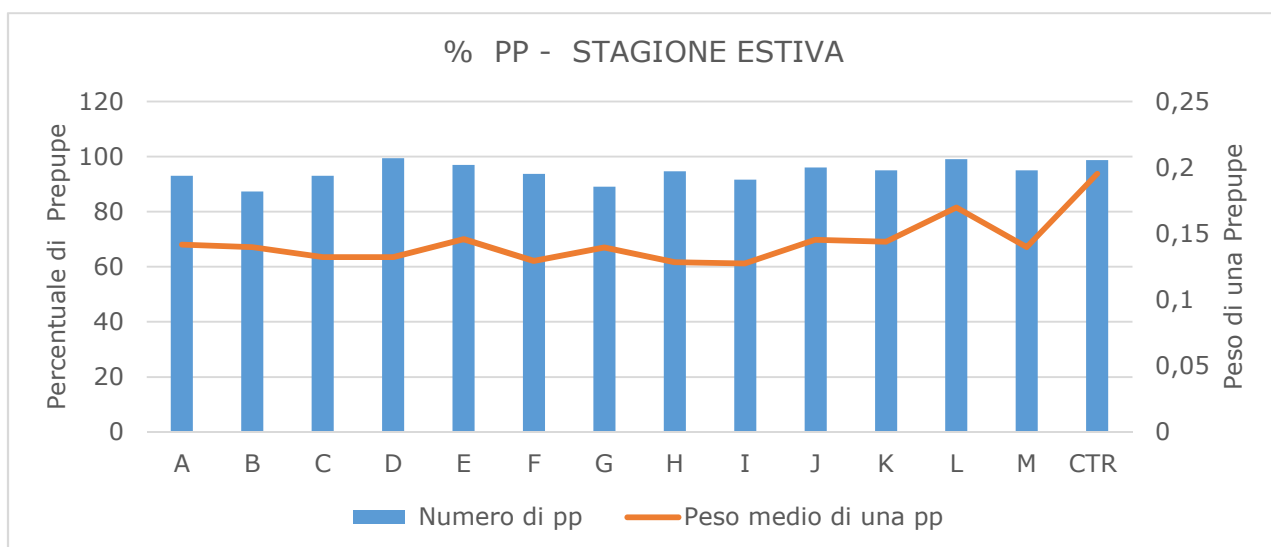


Fig. 14. Percentuale di prepupe e peso medio di PP su substrati estivi.

La più bassa percentuale di mortalità larvale è stata raggiunta nei substrati D e L (Fig. 15), caratterizzati da un elevato contenuto di pomodoro.

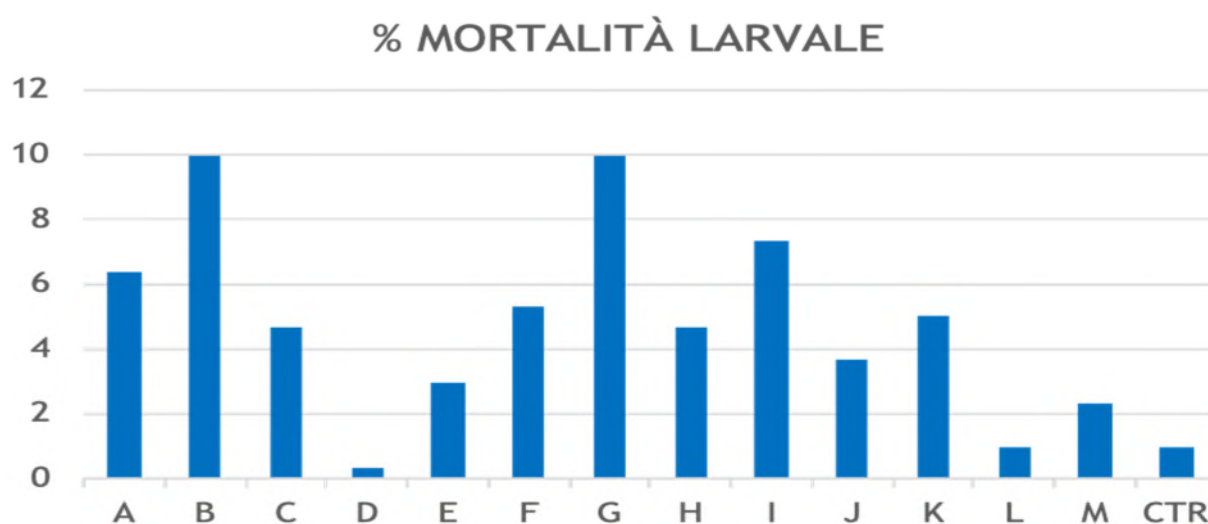


Fig. 15. Percentuale di mortalità larvale su substrati estivi

La riduzione del substrato più elevata è stata notata nei substrati B e M (Fig. 16.), caratterizzati da un elevato contenuto di pesca.

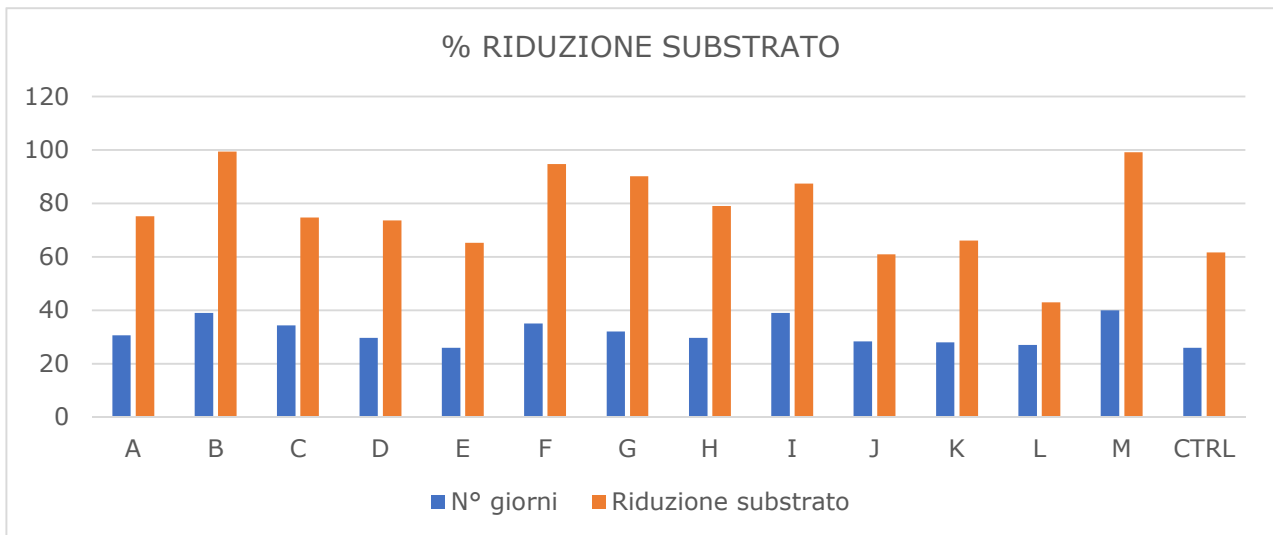


Fig. 16. Percentuale di riduzione del substrato su gruppo estivo

Sottoprodotti stagione autunnale

I controlli per lo sviluppo larvale sono stati eseguiti nei giorni 5, 8, 12 e 15 dell'esperimento, periodo che si sovrapponeva con la comparsa di PP nei giorni 12 e 15. In questo gruppo sono state registrate le migliori prestazioni di allevamento. Nelle miscele A, B, E, I, N e O il peso medio delle larve è stato più elevato e il tempo di sviluppo più rapido rispetto a quelli registrati nel controllo. In tali miscele il contenuto di legumi e mais era alto ed anche quello di mango e melone, ma in tutte la percentuale di scarti di lavorazione delle olive era bassa. A questo va aggiunto che la miscela L, costituita al 100% da sansa e acque di scarto delle olive, ha portato allo sviluppo di larve molto piccole e leggere e tra tutti i mix si è rivelata quella meno adatta allo sviluppo delle MS (Fig. 17.).

I tempi di sviluppo sono stati notevolmente inferiori rispetto a quelli registrati nelle fasi precedenti dell'esperimento (substrati annuali ed estivi), nella maggior parte dei substrati l'85% delle PP è stato raccolto tra il 15° e il 19° giorno (Fig. 18, 19, 20, 21). Tuttavia, le miscele J ed L, costituite da una percentuale elevata di scarti di olive o di mix annuale, ma prive di legumi, hanno portato a tempi di sviluppo decisamente lunghi, rispettivamente 36 e 64 giorni (Fig. 20). Tutti i picchi di raccolta sono avvenuti nei primi giorni dell'esperimento tra il 12° e il 19° giorno, ad eccezione che in J ed L (Fig. 18, 19, 20, 21).

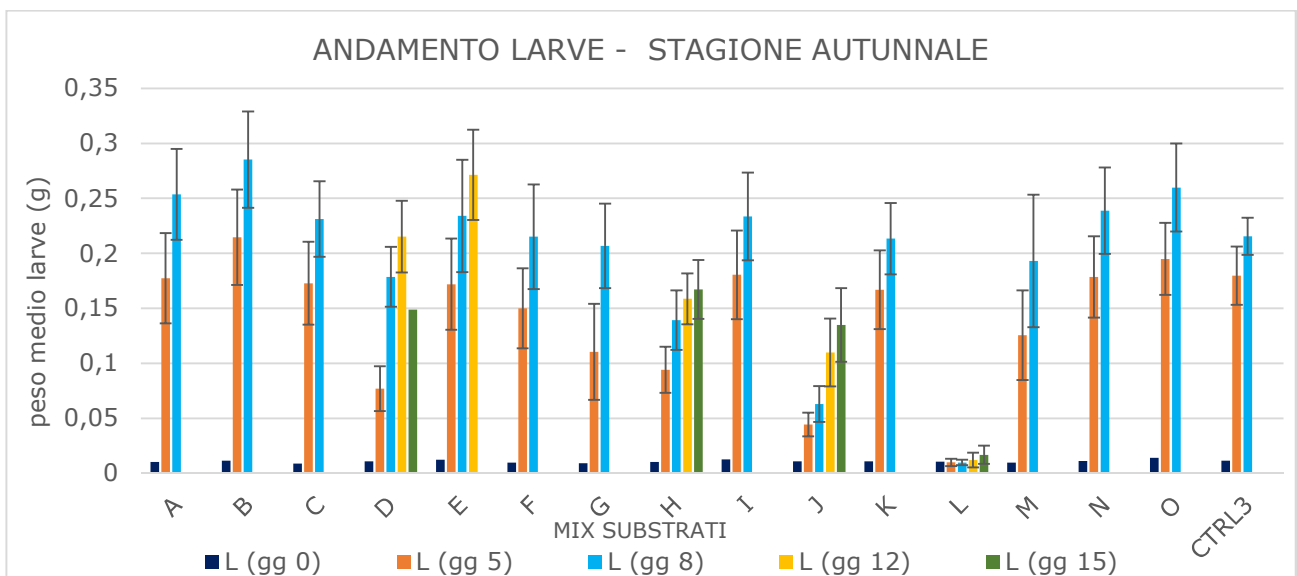


Fig. 17. Andamento del peso delle larve nel mix autunnale (media± deviazione standard)

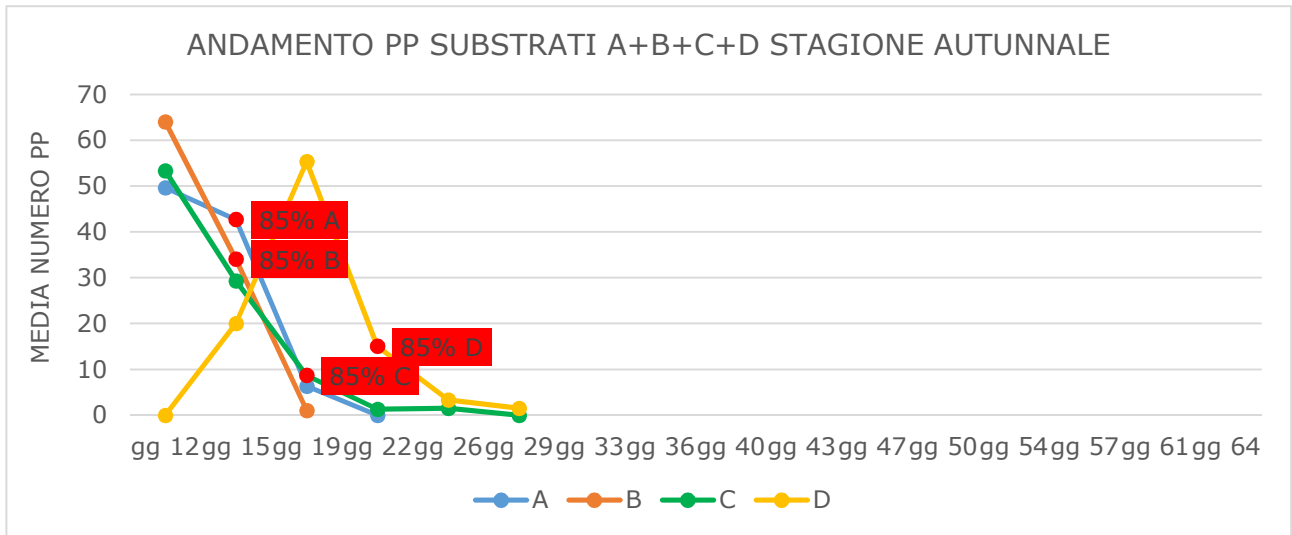


Fig. 18. Andamento PP substrati A+B+C+D stagione autunnale

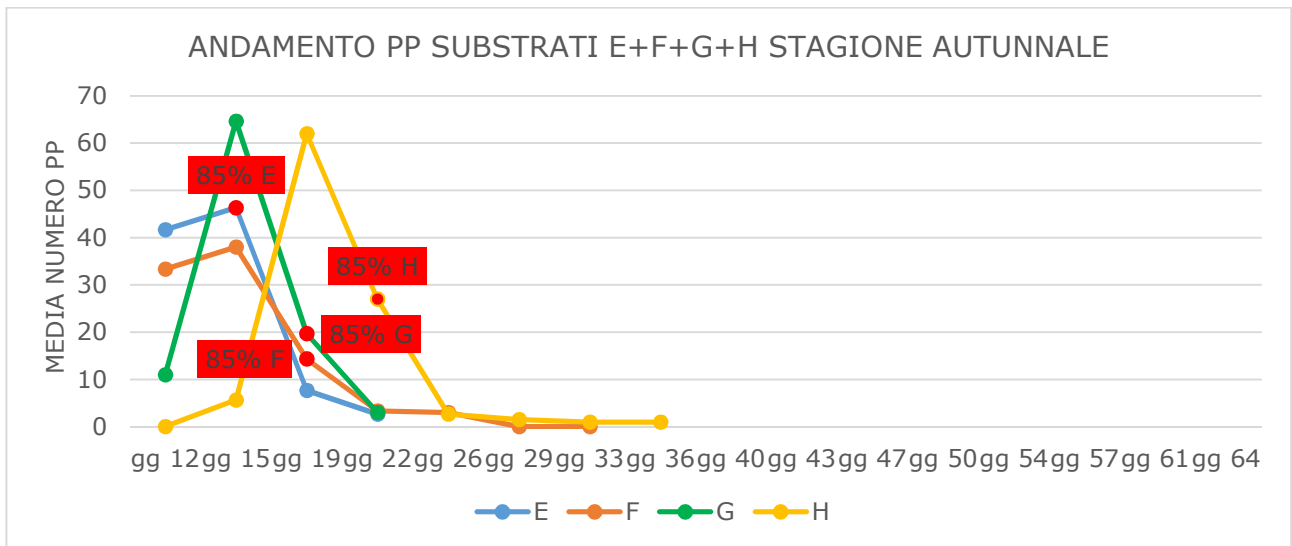


Fig. 19. Andamento PP substrati E+F+G+H stagione autunnale

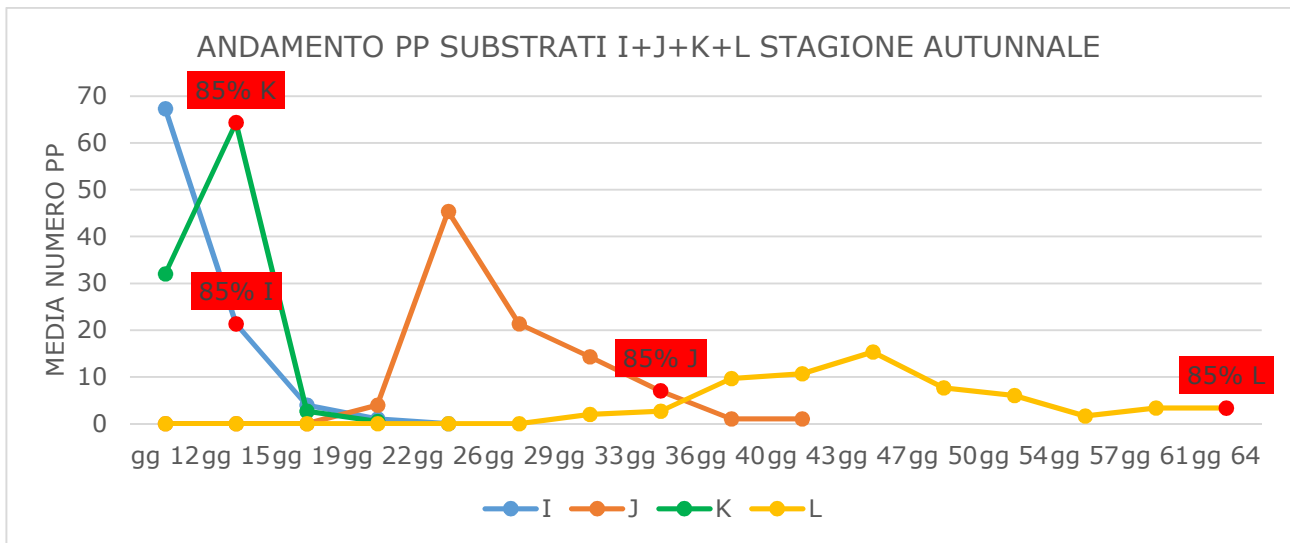


Fig.20. Andamento PP substrati I+J+K+L stagione autunnale

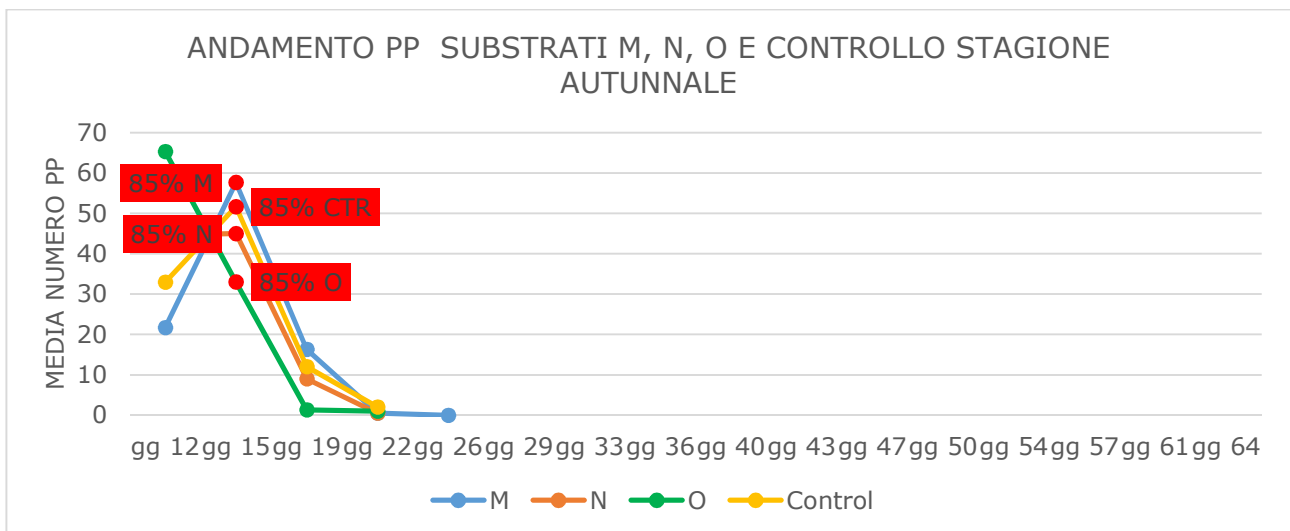


Fig. 21. Andamento PP substrati M+N+O+CTR stagione autunnale.

I mix autunnali hanno portato allo sviluppo di PP dal peso maggiore e in numero superiore rispetto al controllo. Nei mix H, J, L le PP avevano un peso inferiore: in nessuno di questi substrati erano presenti legumi o mais, mentre vi erano dosi elevate di mango e melone o residui di olive (Fig. 22.).

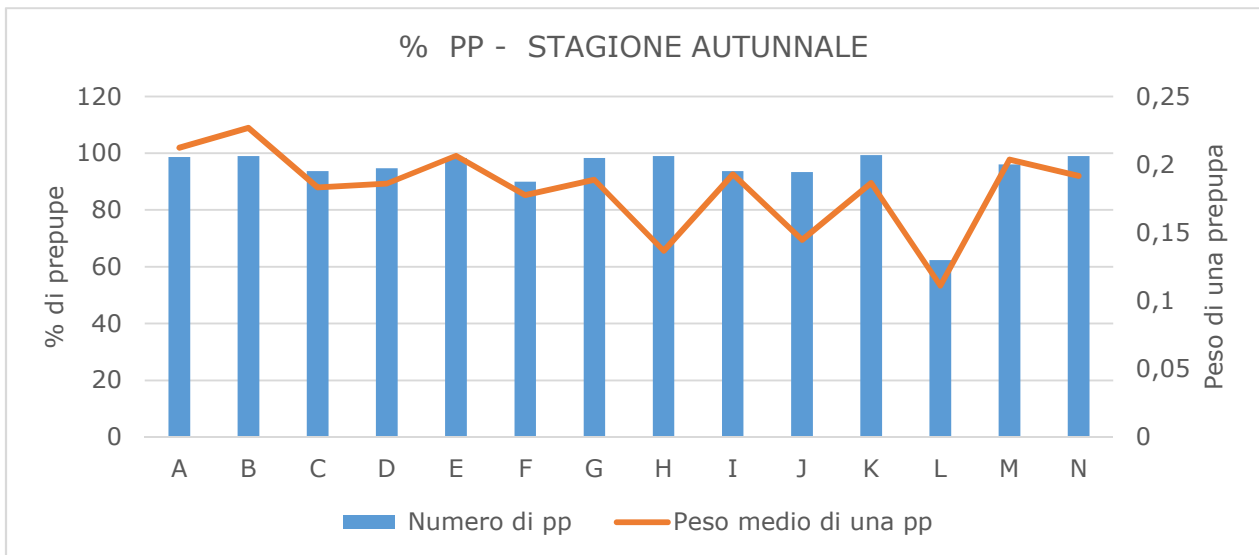


Fig. 22. Percentuale di prepupe e peso medio delle PP su substrati autunnali.

La percentuale di mortalità larvale più alta si è osservata nei substrato L (Fig. 23), caratterizzato da un elevato contenuto di residui di lavorazione delle olive.

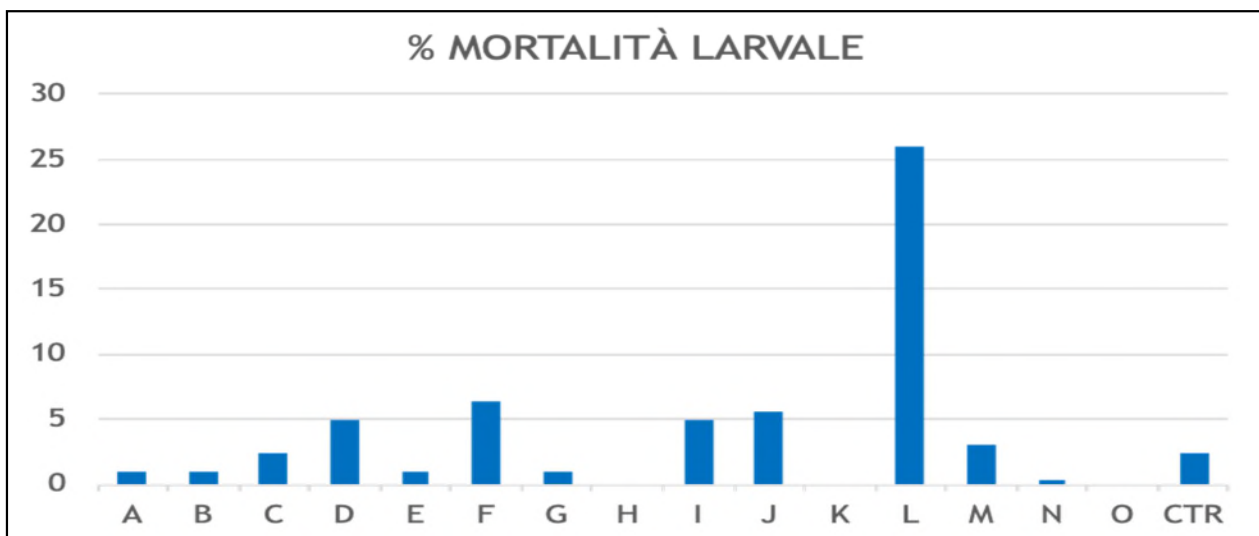


Fig. 23. Percentuale di mortalità larvale su substrati estivi

La riduzione del substrato più elevata si è registrata nei substrati H, J, K e N (Fig. 24), caratterizzati da un elevato contenuto di melone e mango.

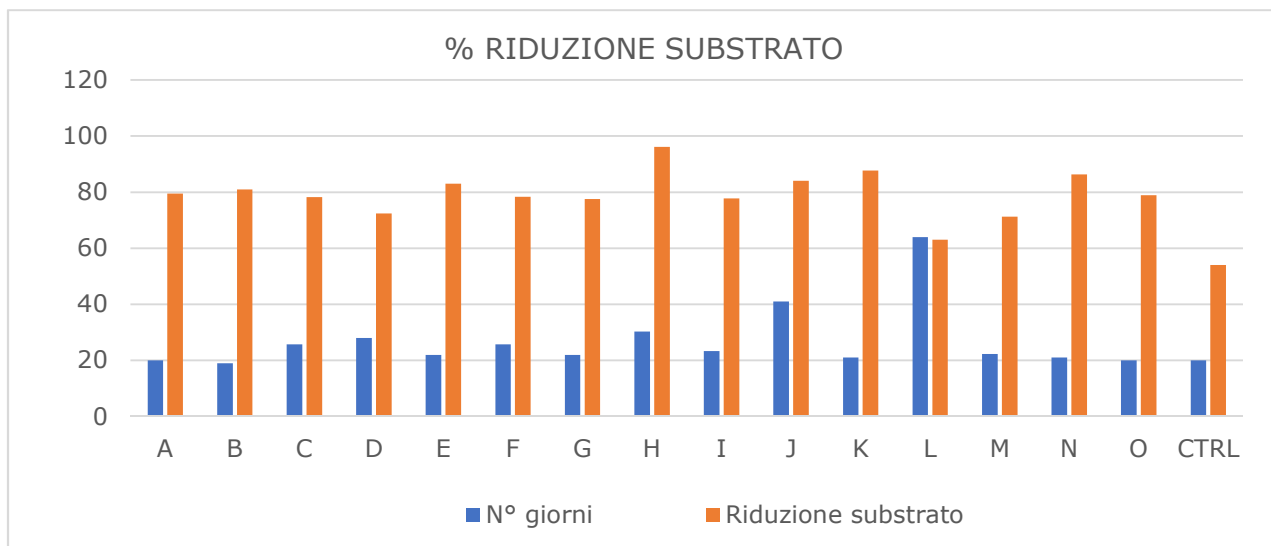


Fig. 24. Percentuale di riduzione del substrato su gruppo autunnale

Prova su effetto aggiunta di acqua

Nelle figure 25-28 è illustrato l'andamento della crescita larvale durante il periodo di osservazione. Come già osservato, in termini di peso larvale e tempistiche di sviluppo, i risultati del gruppo autunnale sono stati i migliori, con valori anche migliori al controllo. Il gruppo annuale ed estivo, invece, hanno presentato similarità nel peso delle larve ma differenza nelle tempistiche. Tuttavia i risultati ottenuti in questi gruppi sono stati inferiori al controllo. Come riportato dai grafici (Fig. 25, 26, 27), la differenza tra i trattamenti con e senza acqua aggiunta, non è rilevante.

Fig. 25. Andamento delle larve su substrati del gruppo annuale

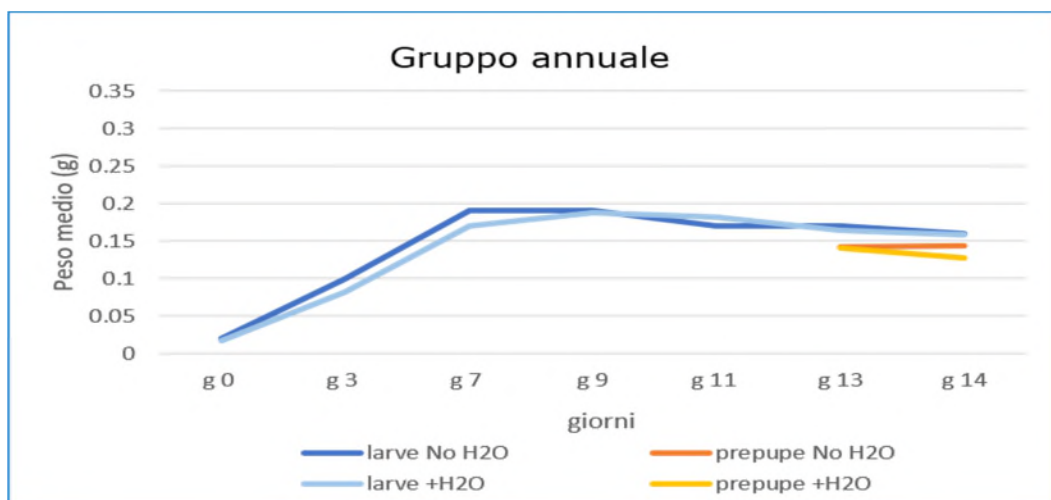


Fig. 26. Andamento delle larve e prime prepupe su substrati del gruppo estivo

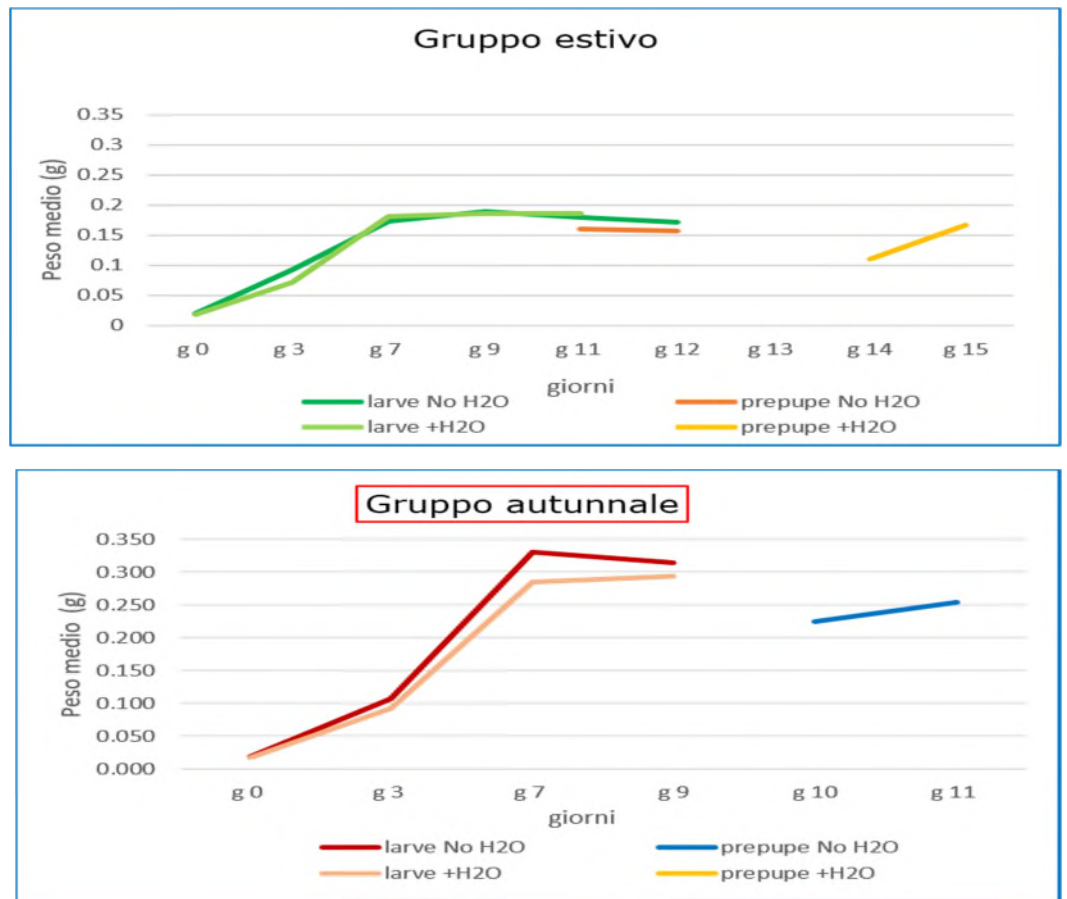


Fig. 27 Andamento delle larve e prime prepupe su substrati del gruppo autunnale

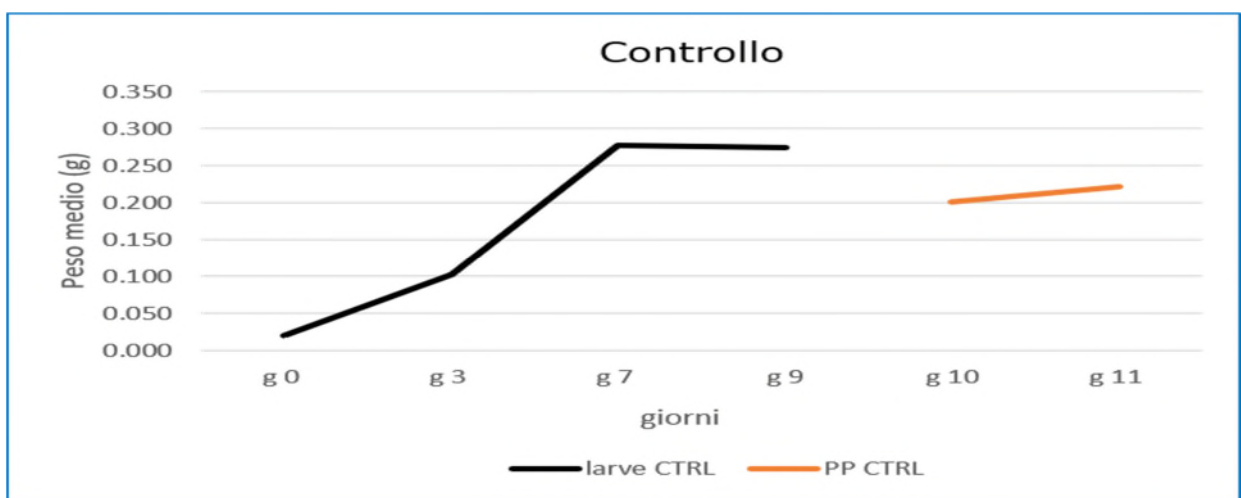


Fig. 28. Andamento delle larve e prime prepupe su substrati di controllo

La più alta percentuale di mortalità larvale si è registrata nel gruppo annuale in contrapposizione al gruppo autunnale (Fig. 29). Generalmente l'aggiunta di acqua ha aumentato il tasso di mortalità.

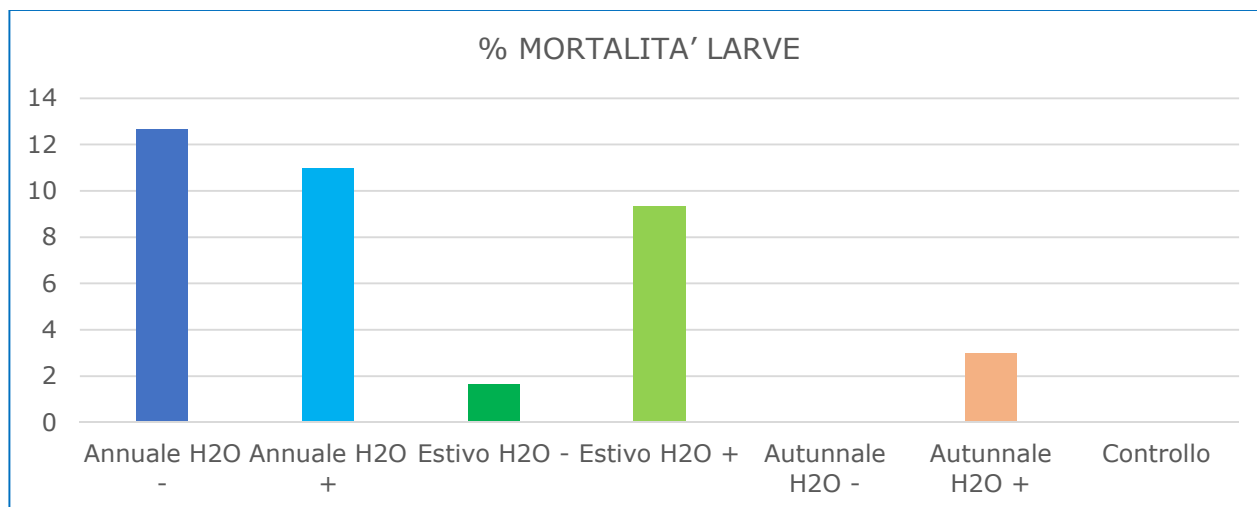


Fig. 29. Percentuale di mortalità larvale sui substrati testati

La percentuale di riduzione del substrato, alla fine dell'esperimento, è stata generalmente più alta che nel controllo, ad eccezione del substrato estivo con acqua aggiunta.

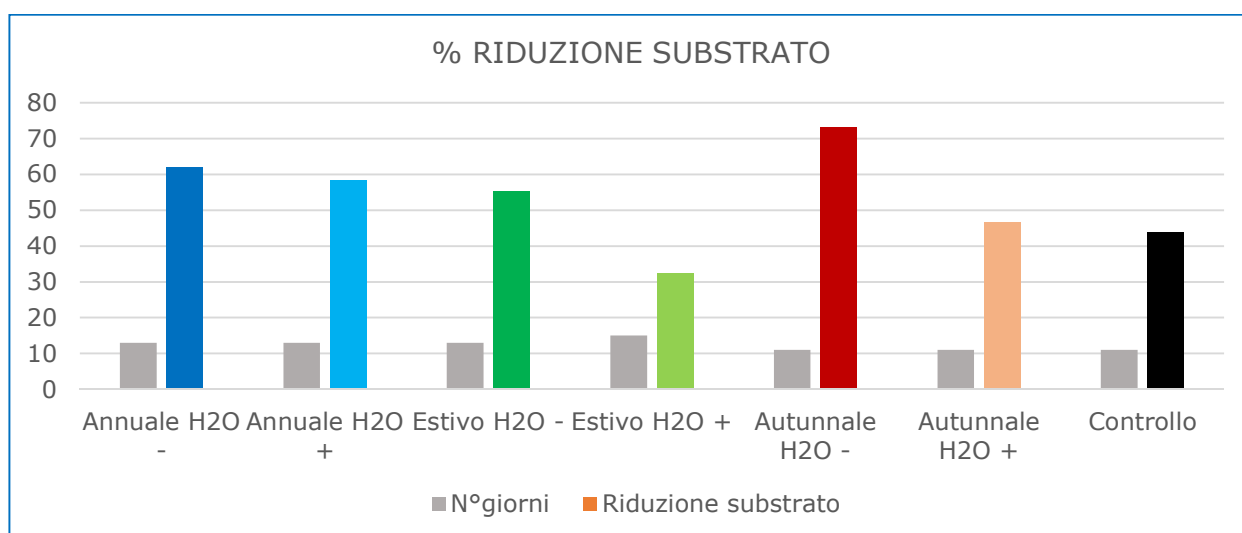


Fig. 30. Percentuale di riduzione dei substrati testati

CONCLUSIONI

Le prove sperimentali di laboratorio hanno dimostrato che è possibile allevare le mosche soldato sui substrati forniti dalle aziende del progetto in ogni momento dell'anno, sebbene con differenze anche importanti nei parametri di crescita di larve e prepupe. In generale il gruppo autunnale ha portato alle migliori performance di crescita delle larve, seguito dal gruppo estivo e infine dal gruppo annuale. Prendendo in considerazione i singoli substrati, quelli che hanno portato a performance di crescita migliori delle larve sono stati: melone (annuale); pomodoro (estivo); legumi e mais (autunnale) Da quanto ottenuto in laboratorio è stato possibile individuare miscele ottimali per ogni gruppo stagionale che sono state utilizzate su scala semi industriale nello step successivo del progetto.

È possibile confermare che su le miscele ottimali non è necessaria l'aggiunta di acqua ai fini di ottenere larve mature. Inoltre, si è notano buone performance delle larve sulle formulazioni ottimali di ogni gruppo stagionale.

SOTTO-AZIONE 3.2 Caratterizzazione dei diversi SA, frazionamento e caratterizzazione della composizione della biomassa larvale (BL) in funzione dei diversi SA, valutazione dei possibili usi alimentari (feed)

Attività 3.2.1 Caratterizzazione delle biomasse vegetali

Uar: UNIPR

OBIETTIVI

Le diverse biomasse vegetali utilizzate per la crescita degli insetti sono state caratterizzate in termini di umidità, proteine, carboidrati, lipidi e polifenoli, al fine di poter correlare la composizione delle diverse biomasse e delle loro miscele con la crescita degli insetti, determinando quindi le potenzialità dei diversi residui vegetali come substrato di allevamento.

MATERIALI E METODI

Sono stati analizzati tutti i substrati utilizzati nelle prove preliminari di allevamento (vedi attività 3.1.2) e nello specifico:

-substrati annuali: frutti esotici, ananas, kiwi, mela, melone

-substrati estivi: pesche, pomodori

-substrati autunnali; ceci, cannellini, mais, sansa, acqua lavorazione olive

Su ciascun campione sono stati determinati i seguenti parametri compositivi, utilizzando metodi ufficiali (AOAC).

Contenuto di umidità: mediante essiccazione in stufa a 104 °C per 24h o comunque fino a peso costante

Ceneri: incenerimento in muffola a 550 °C per 5h e fino a peso costante

Lipidi totali: estrazione in continuo con etere etilico mediante estrattore soxhlet automatico

Proteine totali: digestione completa del campione in acido solforico/fosfosolforico e distillazione e titolazione dell'ammoniaca prodotta (metodo Kjeldahal). Il fattore di conversione azoto proteine utilizzato è stato 6.25.

Sono state inoltre determinate le fibre totali con il metodo ufficiale AOAC 991,43 e il contenuto totale di polifenoli con il metodo Folin-Ciocalteu. I carboidrati digeribili sono stati determinati per differenza, seguendo l'equazione:

$$\text{Carbohydrates (\%wt)} = 100 - \frac{(w_{pr} + w_{fa} + w_w + w_a + w_{po} + w_{fi})}{100}$$

dove al numeratore sono stati considerati le somme dei pesi in grammi di proteine, grassi, acqua, ceneri, polifenoli e fibre

RISULTATI

I risultati dell'analisi centesimale sono riportati nelle seguenti tabelle per ciascun residuo vegetale utilizzato nelle miscele di allevamento di cui all'attività 3.1.2. I dati ottenuti mostrano come tutti i substrati abbiano un elevato contenuto d'acqua, in particolare i substrati estivi e annuali (costituiti prevalentemente da frutti). Il contenuto lipidico è molto basso eccetto per le sansa e i residui della lavorazione del mais dove si ritrovano percentuali superiori all'1%. Il contenuto proteico è molto basso in tutti i substrati annuali e nelle pesche mentre risulta più elevato nel pomodoro e nei residui della lavorazione di legumi e cereali (mais). Il contenuto di fibre totali (parametro determinato in aggiunta a quanto previsto dal piano perché ritenuto comunque importante per una completa comprensione delle proprietà nutrizionali dei substrati) è risultato quasi sempre piuttosto alto, specialmente se si vanno a considerare i dati rapportati alla sostanza secca. Il contenuto di carboidrati disponibili è piuttosto variabile ed in generale inversamente proporzionale al contenuto di fibra. Il contenuto totale di polifenoli è stato determinato per valutare un possibile effetto inibente di queste sostanze sullo sviluppo degli insetti. La loro concentrazione si è attestata intorno ai 100-200 ppm, eccetto il melone che presenta concentrazioni trascurabili (2 ppm) e altri frutti che presentano concentrazioni piuttosto basse (20-40 ppm).

Tabella 3.2.1.1: Composizione centesimale (g/100g di residuo tal quale, eccetto per i polifenoli espressi in ppm) dei substrati d'allevamento

stagionalità		%lipidi	%ceneri	%umidità	%fibre	Polifenoli (mg/kg)	%proteine	% carboidrati disponibili
annuale	frutti esotici	0,08	0,48	81,23	2,04	120	0,72	15,44
	ananas	0,21	0,62	86,51	0,75	18	0,52	11,39
	kiwi	0,05	1,73	87,54	2,39	42	0,94	7,36
	mela	0,04	0,32	90,83	1,54	26	0,35	6,92
	melone	0,08	0,71	93,78	5,61	2	0,48	tracce
autunnale	ceci	0,95	1,06	60,97	22,81	107	9,4	4,79
	cannellini	0,45	1,04	60,28	22,44	134	7,89	7,87
	mais	1,44	0,96	52,2	33,59	122	11,49	0,3
	sansa	3,66	1,07	51,71	33,32	172	1,97	8,23
	acque	0,03	2,89	90,94	tracce	164	0,93	5,19
estiva	pesche	0,82	0,52	89,89	3,58	115	0,87	4,31
	pomodori	0,37	0,81	79,67	17,23	248	3,02	tracce

Tabella 3.2.1.2: Composizione centesimale (g/100g di sostanza secca) dei substrati d'allevamento

stagionalità		%lipidi	%ceneri	%fibre	%polifenoli	%proteine	% carboidrati disponibili
annuale	frutti esotici	0.6	2.6	10.9	0.0639	3.8	82.3
	ananas	1.1	3.3	4.0	0.0096	2.8	60.7
	kiwi	0.4	13.9	19.2	0.0337	7.5	59.1
	mela	0.4	3.5	16.8	0.0284	3.8	75.5
	melone	1.3	11.4	90.2	0.0032	7.7	tracce
autunnale	ceci	2.4	2.7	58.4	0.0274	24.1	12.3
	cannellini	1.1	2.6	56.5	0.0337	19.9	19.8
	mais	3.0	2.0	70.3	0.0255	24.0	0.6
	sansa	7.6	2.2	69.0	0.0356	4.1	17.0
	acque	0.3	31.9	tracce	0.1810	10.3	57.3
estiva	pesche	8.1	5.1	35.4	0.1137	8.6	42.6
	pomodori	1.8	4.0	84.8	0.1220	14.9	tracce

CONCLUSIONI

Il lavoro di caratterizzazione effettuato ha permesso di ottenere informazioni importanti sulla composizione di molti sottoprodotti e scarti di aziende di trasformazione ortofrutticola presenti in regione. Questi dati sono tuttora piuttosto carenti ma sono fondamentali per individuarne la valorizzazione ottimale e sarebbe quindi auspicabile la creazione di un database compositivo ampio per tutti i by-products disponibili in regione. Inoltre, la conoscenza della composizione dei substrati, combinata con i dati relativi all'allevamento degli insetti e l'analisi statistica ha permesso di individuare alcuni nutrienti fondamentali per la crescita delle larve e l'effetto di eventuali sostanze inibenti. Questo tipo di correlazione è stata discussa in un articolo scientifico pubblicato su rivista con impact factor (Barbi, S., Macavei, L.I., Fuso, A., Luparelli, A.V., Caligiani, A., Ferrari, A.M., Maistrello, L., Montorsi, M. 2020, Valorization of seasonal agri-food leftovers through insects. Science of the Total Environment, 709,136209

Attività 3.2.2 Caratterizzazione delle biomasse da insetti – Frazione proteica e chitinosa

Uar: UNIPR

OBIETTIVI

Lo scopo di questa attività è stato principalmente valutare l'effetto dei diversi substrati di crescita sulla composizione chimica, sulle proprietà nutrizionali e sulla eventuale presenza di componenti bioattivi delle prepupae di mosca soldato e valutare quindi in via preliminare il miglior utilizzo delle biomasse di insetti ottenuti, con particolare riferimento alla frazione proteica e chitinica.

MATERIALI E METODI

Analisi centesimale - Le biomasse costituite dalle larve dell'insetto sono state inizialmente caratterizzate per la loro composizione centesimale mediante analisi di umidità, ceneri, lipidi totali e proteine totali mediante le metodiche già riportate al punto 3.2.1. Per il contenuto proteico totale è stato utilizzato come fattore di conversione il valore di 4.67, come riportato in letteratura per le prepupae di mosca soldato (Jansenn et al., 2017)

Determinazione della composizione amminoacidica – Il campione macinato è stato accuratamente pesato (circa 0,5 g) e idrolizzato in HCl 6N a 110°C per 23 h. Si è proceduto poi con l'aggiunta di 7.5 mL di standard interno (norleucina 5mM in HCl 0.1N), filtrazione con Buchner e diluizione in un matraccio da 250 mL con acqua distillata. La soluzione, poi, è stata ulteriormente filtrata attraverso membrana in nylon con pori da 0.45 µm. La cisteina, invece, è stata determinata (su un campione separato) come acido cisteico dopo ossidazione con 2 mL di acido performico (preparato appena prima dell'utilizzo miscelando 9 parti di acido formico con una parte di perossido di idrogeno) per 16 h in ghiaccio. Questa procedura è fondamentale perché la cisteina viene totalmente persa in seguito a idrolisi acida mentre l'acido cisteico permane nel campione e risulta essere di conseguenza quantificabile (Fountoulakis and Lahm, 1998). Successivamente sono stati aggiunti 300 µL di acido idrobromidrico per rimuovere l'eccesso di acido performico e, dopo aver portato a secco sotto flusso d'azoto, si è proceduto con l'idrolisi acida come per gli altri amminoacidi. Le rette di calibrazione sono state costruite con 5 soluzioni standard a diverse concentrazioni di mix di amminoacidi, acido cisteico e norleucina (standard interno).

Prima delle analisi dei campioni e delle rette è stato però necessario procedere con la derivatizzazione con AQC, una modificazione chimica che impartisce nuove caratteristiche agli analiti rendendoli in questo caso stabili e idonei all'UPLC-ESI.

A 10 µL di campione (oppure 10 µL di soluzione standard) sono stati aggiunti 70 µL di tampone borato (incluso nel kit, per stabilizzare il pH) e 20 µL di fluoroforo precedentemente ricostituito. Dopo un'incubazione a 55°C per 10 minuti sono stati aggiunti 100 µL di acqua e l'intera soluzione è stata poi trasferita nelle vials per l'analisi UPLC nelle seguenti condizioni: Strumento: ACQUITY UPLC con rivelatore ESI-MS; colonna: Acquity BEH C18 (1.7µm, 2.1 x 100mm); Eluenti: A:H2O + 0.2% CH3CN + 0.1% HCOOH; B:CH3CN + 0.1% HCOOH; 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; Durata corsa: 45 minuti; Temperatura colonna: 35°C; Temperatura campione: 18°C; Volume di iniezione: 2µL; Modalità di acquisizione: Full scan 240-500 m/z; Pressione: 0-14000 psi

La quantificazione di ciascun aminoacido è stata fatta mediante la costruzione di rette di calibrazione, ponendo in ordinata il rapporto $\text{Area(AA)}/(\text{Area(SI)} \cdot \text{Conc(SI)})$ e in ascissa la concentrazione dell'aminoacido

Determinazione del triptofano mediante idrolisi alcalina -Il triptofano è un aminoacido la cui determinazione richiede un protocollo differente, perché viene totalmente degradato in ambiente acido (Fountoulakis and Lahm, 1998). È stato utilizzato dunque un altro metodo (Delgado-Andrade et al., 2006) con qualche piccola modifica. 200mg di campione macinato sono stati aggiunti a 3mL di NaOH 4N e 150µL di 5-metil-triptofano 0.69 mM, utilizzato come standard interno. L'idrolisi è stata lasciata procedere per 18h a 110°C, dopodiché la soluzione è stata neutralizzata con HCl fino ad ottenere un pH di 6.5. Infine, è stata diluita fino a 25mL con il tampone borato e centrifugata per 5 minuti a 4000rpm (temperatura ambiente). Il surnatante è stato filtrato attraverso membrana in nylon con pori di 0.45µm. La quantificazione del triptofano è stata eseguita in questo modo: è stata preparata una soluzione, il cosiddetto fattore di risposta, contenente lo standard interno e l'analita (il triptofano) a concentrazioni note. Dopodiché è stato calcolato, in questo modo, un fattore di correzione R:

$$R = \left(\frac{[\text{Area}]_{\text{trp}} \cdot [\text{Concentrazione}]_{\text{SI}}}{[\text{Area}]_{\text{SI}} \cdot [\text{Concentrazione}]_{\text{trp}}} \right)$$

dove per SI s'intende lo standard interno e per trp il triptofano. Alla fine, sono stati analizzati i campioni e le aree del triptofano sono state "corrette" in questo modo:

Area triptofano corretta = (Area triptofano del campione)/R

Infine, è stato calcolato il peso del triptofano presente nel campione dividendo l'area corretta del triptofano per l'area dello standard interno e poi moltiplicandola per il peso di quest'ultimo.

I campioni sono stati analizzati con UPLC-ESI/MS applicando le stesse condizioni utilizzate per l'analisi degli aminoacidi totali, eccetto la modalità di acquisizione. È stato infatti utilizzato il metodo SIM, che permette di rivelare solo gli ioni con determinati rapporti massa/carica; sono stati selezionati gli ioni con massa 205 e 219, valori che rappresentano il peso molecolare del triptofano e dello standard interno.

Valutazione del profilo proteico mediante SDS-PAGE -Le frazioni proteiche sono state estratte dalle prepupe di *Hermetia illucens* cresciute sui diversi substrati vegetali e sono state analizzate mediante elettroforesi SDS-PAGE con l'obiettivo di confrontare i profili proteici in termini dimensionali (peso molecolare delle proteine). Per l'analisi vengono utilizzati circa 40 µg di proteine, ottenuti andando a seccare precisi volumi di estratti proteici. Il volume prelevato è stato calcolato a partire dai risultati sul calcolo delle concentrazioni eseguite tramite analisi rapida Qubit.

L'estrazione proteica è stata fatta su 0,5 g di campione macinato che poi vengono fatti reagire con 10 ml di tampone preparato in modo da ottenere le seguenti concentrazioni: KCl 1M, DTT 50mM, EDTA 0,5 mM, Tris-HCl 25 mM. L'estrazione viene condotta a 4°C per 7 h in agitazione, dopodiché la soluzione viene centrifugata per 30 minuti a 4°C a 3900 rpm in modo tale da separare il surnatante contenente la frazione proteica. La quantità di proteine in soluzione è stata determinata mediante metodo rapido Qubit. Il kit del Qubit è costituito da un fluoroforo apposito per i peptidi, da un buffer e dalle soluzioni standard a tre concentrazioni diverse di proteine. È stata preparata una "working solution", costituita per 1/200 dal fluoroforo e per 199/200 dal buffer. Di questa soluzione, se ne sono prelevati 198µL che sono stati miscelati con 2µL di campione, in modo tale da ottenere un volume finale di 200µL nell'apposita eppendorf. Dopo un'incubazione al buio (il fluoroforo è fotosensibile) e a temperatura ambiente per 15 minuti, è stato possibile procedere con la lettura dello strumento al fine di determinare la quantità di campione da prelevare per caricare nella cella 40 µg di proteina. Gli estratti proteici, prelevati nelle corrette quantità e portati a secco sotto flusso di azoto, sono stati ripresi ciascuno con 25µL di soluzione, composta da sample buffer XT4X, reducing agent XT20X e acqua bidistillata. 1,25µL di marker broad range, soluzione contenente i marker a diverso peso molecolare, sono stati aggiunti a 30µL della stessa soluzione usata per dissolvere le proteine secche. Dopo aver opportunamente miscelato i campioni e i marker con il vortex, è stato incubato il tutto nel termociclatore a 95°C per 5 minuti. Dopodiché il gel di poliacrilamide è stato inserito nella cella elettroforetica, riempita con una soluzione di Running Buffer diluito 1:20 con acqua distillata. Il supporto per il gel è costituito da una serie di pozzetti, in cui sono stati iniettati i campioni e i marker mediante una siringa. La vaschetta è stata successivamente chiusa con un coperchio dotato di elettrodi che direttamente collegati allo strumento applicano un campo elettrico. I campioni e i marker migrano dunque verso il polo positivo (dall'alto verso il basso). Terminata la corsa, poi, è stato spento il voltaggio e tolto il gel dal supporto. Il gel è stato colorato con Coomassie Brilliant Blue, decolorato e infine scansionato con il densitometro GS-800 controllato dal software "Quantity One" (BIO-RAD).

Determinazione della chitina - L'insetto macinato viene sottoposto a idrolisi acida per la determinazione del contenuto di N-acetilglucosammina, seguendo la stessa metodica riportata per la determinazione degli amminoacidi totali. A fine idrolisi e dopo raffreddamento, all'idrolizzato è stato aggiunto 1 ml della soluzione di standard interno Phenyl beta-D-glucopyranoside. Si filtra, con carta da filtro, e si secca con rotavapor. L'estratto secco viene derivatizzato con DMF (800 µl) e BSTFA (200 µl) e posto in stufa a 60°C per 1h, per l'analisi GC/MS. dotato di rivelatore a spettrometria di massa con analizzatore a singolo quadruplo, iniettore split/splitless e software di acquisizione dati. Lo strumento utilizzato è costituito da un gascromatografo Agilent Technologies 6890N e da uno spettrometro di massa Agilent Technologies 5973N. Colonna: capillare in silice fusa, lunghezza 30 metri, diametro interno 0.25 mm, fase stazionaria metilfenilsiliconica (5% fenile, spessore della fase stazionaria 025 µm).

RISULTATI

Analisi centesimale

Tabella 3.2.2.1: *Contenuto di umidità, composti azotati, grassi e ceneri delle prepupe di Hermetia illucens cresciute sui substrati annuali. CTR indica il campione controllo, cresciuto sui substrati convenzionali che vengono generalmente utilizzati per l'allevamento delle mosche soldato.*

Entomology code	Composizione dieta					Analisi centesimale				
	Frutti Esotici / Mango (g)	Ananas (g)	Kiwi (g)	Mela (g)	Melone (g)	umidità (g/100g)	grassi (g/100g)	ceneri (g/100g)	proteine (g/100g)	Chitina (g/100g)
A	375	0	0	0	375	71.15	6.52	2.60	11.49	5.24
B	75	75	450	75	75	70.95	7.70	4.80	11.03	3.51
C	0	750	0	0	0	72.27	5.01	4.86	10.95	4.39
D	0	0	0	0	750	70.78	5.05	3.50	12.32	5.31
E	0	0	0	750	0	70.61	7.01	3.69	11.39	4.65
F	750	0	0	0	0	69.66	9.60	3.75	11.29	3.62
G	150	150	150	150	150	69.79	8.84	3.78	10.56	4.47
H	375	0	375	0	0	69.94	8.42	4.74	10.53	4.05
J	0	375	0	0	375	71.51	5.99	3.80	11.39	4.64
L	0	0	375	0	375	70.01	6.00	4.48	11.00	5.42
N	0	375	0	375	0	73.77	7.70	3.82	11.34	2.13
P	75	75	75	450	75	69.25	7.27	4.00	11.60	5.01
Q	0	0	0	375	375	70.24	7.52	4.10	11.67	4.11
R	75	75	75	75	450	69.69	5.83	3.24	11.38	6.28
S	0	375	375	0	0	68.75	7.55	5.11	11.87	4.28
T	375	375	0	0	0	72.40	8.81	3.77	11.56	2.20
U	0	0	750	0	0	71.28	7.85	5.77	10.74	2.77
V	375	0	0	375	0	68.84	9.52	4.70	11.40	3.52
X	450	75	75	75	75	70.38	8.52	3.93	11.08	3.88
Y	75	450	75	75	75	71.40	7.48	3.90	11.58	3.59
Z	0	0	375	375	0	72.68	7.03	4.12	10.69	3.48
CTR						68.73	12.00	2.33	12.23	3.00
Media						70.73	7.39	4.12	11.28	4.12

Tabella 3.2.2.2: *Contenuto di umidità, composti azotati, grassi e ceneri delle prepupe di Hermetia illucens cresciute sui substrati estivi. CTR indica il campione controllo, cresciuto sui substrati convenzionali che vengono generalmente utilizzati per l'allevamento delle mosche soldato.*

Entomology code	Composizione dieta				Analisi centesimale				
	Melone (g)	Mango (g)	Pesche (g)	Pomodori (g)	umidità (g/100g)	grassi(g/100g)	ceneri(g/100g)	proteine (g/100g)	Chitina (g/100g)
A	0	0	750	375	72.83	12.67	2.07	11.69	0.74
B	0	0	1125	0	72.03	12.63	1.68	11.59	2.07
C	525	225	188	188	71.61	12.08	2.87	11.21	2.24
D	262	112	375	375	72.23	12.05	3.27	11.40	1.05
E	262	112	0	750	69.41	10.63	3.02	11.69	5.26
F	525	225	375	0	73.01	10.67	3.06	10.88	2.37

G	131	56	750	188	73.07	12.16	2.40	12.22	0.14
H	525	225	0	375	70.66	7.46	3.26	11.40	7.22
I	788	338	0	0	69.99	8.96	3.33	11.05	6.67
J	0	0	375	750	71.74	12.17	2.68	11.07	2.33
K	131	56	188	750	71.80	12.61	2.66	11.84	1.09
L	0	0	0	1125	71.34	11.36	2.94	11.70	2.66
M	262	112	750	0	73.47	11.51	1.99	11.93	1.11
CTR					70.77	11.67	3.21	12.20	2.15
media					71.71	11.33	2.75	11.56	2.65

Tabella 3.2.2.3: *Contenuto di umidità, composti azotati, grassi e ceneri delle prepupe di Hermetia illucens cresciute sui substrati autunnali. CTR indica il campione controllo, cresciuto sui substrati convenzionali che vengono generalmente utilizzati per l'allevamento delle mosche soldato.*

Entomology code	Composizione dieta			Analisi centesimale					
	Ceci	Cannellini	Maise	Sanse	umidità (g/100g)	grassi(g/100g)	ceneri(g/100g)	proteine (g/100g)	Chitina (g/100g)
A	46.875	46.875	468.75	46.875	71.33	11.97	1.08	12.63	2.98
B	0	0	375	0	72.83	11.57	1.18	12.65	1.76
C	0	0	750	0	70.56	10.18	0.93	13.78	4.55
D	70.3125	70.3125	140.625	351.5625	70.63	8.69	1.61	12.33	6.75
E	234.375	234.375	93.75	46.875	71.29	10.97	1.55	12.11	4.08
F	375	375	0	0	70.00	7.04	1.40	12.91	8.6
G	187.5	187.5	0	187.5	72.53	6.24	1.53	12.31	7.40
H	0	0	0	0	74.75	8.94	1.84	11.45	3.02
I	187.5	187.5	375	0	71.56	7.43	1.27	13.18	6.56
J	0	0	0	281.25	69.97	4.94	2.37	11.03	11.69
K	46.875	46.875	93.75	46.875	69.27	7.59	2.31	13.28	7.55
L	0	0	0	562.5	70.81	5.63	3.82	11.03	8.70
M	0	0	375	187.5	71.14	7.76	1.31	13.01	6.78
N	187.5	187.5	0	0	74.45	7.69	1.05	12.66	4.15
O	93.75	93.75	187.5	93.75	72.24	8.73	1.96	13.25	3.83
CTR					71.58	10.40	2.46	12.56	3.00
Media					71.56	8.49	1.73	12.51	5.72

Nell'attività 3.1.2 del progetto sono già state valutate le performance d'allevamento delle prepupe sui diversi substrati in termini di peso, numero e tempo di crescita. Le analisi hanno mostrato:

- Peggioramenti rispetto al gruppo di controllo (insetti più leggeri, meno numerosi, con tempi d'allevamento maggiori) per quanto riguarda i substrati con disponibilità annuale.
- Risultati in linea rispetto al gruppo di controllo per quanto concerne i substrati con disponibilità estiva i quali hanno mostrato, inoltre, una miscela ottimale di substrati composta per l'80% da pomodori e per il 20% da pesche.
- Miglioramenti generali rispetto al gruppo di controllo per quanto riguarda i substrati autunnali con una miscela ottimale di substrati così composta:
 - 35% di miscela ottimale di substrati disponibili tutto l'anno (70% melone e 30% frutti esotici)

- 25% legumi
- 20% sanse
- 20% mais

Questi risultati, però, non bastano per valutare l'impiego di sottoprodotti vegetali negli allevamenti di mosche soldato destinate al Feed&Food. È stata, perciò, analizzata la composizione centesimale delle prepupe di *Hermetia illucens* cresciute sui diversi substrati, elemento fondamentale e imprescindibile per determinare il loro valore nutrizionale e, quindi, valutare il loro potenziale utilizzo nelle diete umane o negli allevamenti come mangimi.

Per quanto riguarda il contenuto di grassi le analisi hanno evidenziato un quantitativo di grassi che varia dal 16,44% sul DW per il campione J cresciuto sui substrati autunnali fino al 49,48% su DW per il campione G cresciuto sui substrati estivi. Solo i campioni A e G cresciuti sui substrati estivi, però, presentano un quantitativo di grassi significativamente maggiore rispetto al campione controllo. Al contrario, i campioni D, C e R cresciuti su substrati con disponibilità annuale presentano un contenuto di grassi significativamente minore rispetto a quello dei campioni di controllo. In linea generale, nel gruppo di significatività a più alto contenuto lipidico è stata evidenziata una netta prevalenza di campioni cresciuti su substrati estivi (pari all'83%). I campioni cresciuti su substrati annuali e autunnali, al contrario, erano maggiormente presenti nel gruppo di significatività a più basso contenuto lipidico (rispettivamente pari a 63% e 30%).

Per quanto riguarda le ceneri si è evidenziato un contenuto che va dal 3,14% (DW) del campione C cresciuto sui substrati autunnali fino al 20,10% sul DW del campione U cresciuto sui substrati annuali. Diversi campioni di prepupe cresciute su substrati con disponibilità annuale evidenziano un quantitativo di ceneri significativamente maggiore rispetto a quello del campione di controllo, mentre solo il campione C cresciuto su substrati autunnali mostra un contenuto di ceneri significativamente minore a quello del campione di controllo. In generale, i campioni cresciuti su substrati annuali presentano un contenuto di ceneri di gran lunga superiore: nel gruppo di significatività a più alto contenuto, infatti, il 100% dei campioni apparteneva a questa categoria.

Per quanto riguarda il contenuto di chitina si sono osservati valori variabili, con quantità significativamente più alte rispetto al controllo in alcuni campioni estivi e autunnali

Per quanto riguarda il contenuto di proteine i risultati ottenuti non hanno evidenziato differenze significative tra il campione di controllo e quello delle altre prepupe cresciute su substrati differenti. E' stato però possibile individuare due gruppi di campioni con contenuti significativamente diversi di proteine: nel gruppo comprendente i campioni a maggiore contenuto di proteine si denota una maggiore prevalenza di campioni cresciuti sui substrati autunnali (40%). Viceversa, nel gruppo di significatività a più basso contenuto di proteine troviamo una netta prevalenza di campioni allevati su substrati vegetali annuali (46%).

Relazione tra la composizione del substrato d'allevamento e delle mosche soldato

Nell'ambito del presente progetto abbiamo cercato di trovare una relazione tra la composizione nutrizionale del substrato e quella delle prepupe. Per fare ciò, è stata calcolata la composizione centesimale dei vari mix a partire da quelle dei singoli prodotti vegetali.

In particolare ci si è focalizzati sul quantitativo di proteine, ed è stata trovata una correlazione positiva tra le proteine contenute nei substrati e quelle delle mosche soldato ($R=0,854$). Il grafico di seguito riportato, infatti, mostra come all'aumentare del contenuto di proteine del substrato cresca anche quello di proteine dell'insetto.

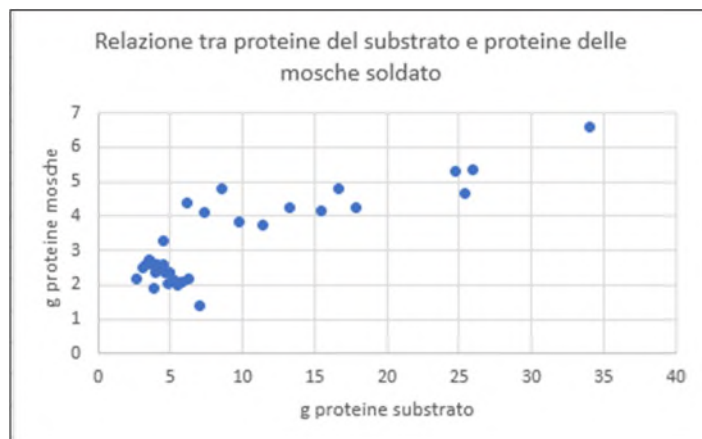


Figura 3.2.2.1: relazione tra proteine contenute nei substrati e proteine delle mosche soldato. Sono riportati soltanto i risultati relativi ai substrati annuali ed estivi.

Inoltre, ai fini di valutare la potenzialità di *Hermetia illucens* di convertire le proteine vegetali in proteine animali di elevata qualità nutrizionale, è stato calcolato un fattore di conversione dividendo i grammi di proteine delle prepupe per i grammi di proteine contenute nei substrati. I dati hanno mostrato ottimi risultati per i campioni E, Q e N cresciuti sui substrati annuali, capaci di convertire 1 grammo di proteina vegetale rispettivamente in 0,83, 0,80 e 0,79 grammi di proteine animali. Al contrario, si sono registrati esiti deludenti per quanto riguarda i campioni K e L cresciuti sui substrati estivi e il campione U cresciuto su substrati annuali, capaci di convertire 1 grammo di proteina vegetale rispettivamente in 0,18, 0,19 e 0,20 grammi di proteine animali.

Sebbene sia stata trovata una buona correlazione tra le proteine del substrato e quelle contenute nelle mosche, andando a confrontare il contenuto proteico percentuale tra i campioni sono state rilevate differenze significative soltanto tra alcuni di essi, al contrario invece di quanto accaduto per i grassi e le ceneri. Questo è in accordo con gli studi precedenti, i quali affermano che, indipendentemente dal tipo di substrato utilizzato, il contenuto di proteine e il profilo amminoacidico delle mosche soldato sembrano essere piuttosto costanti (Spranghers et al., 2017). Appare inutile, infatti, alimentare le mosche soldato con una dieta ad alto contenuto di proteine ai fini di ottenere un'elevata qualità proteica; in alcuni casi, quest'opzione appare addirittura svantaggiosa abbassando il tasso di sopravvivenza dell'insetto (Tschirner and Simon, 2015).

Valutazione qualità proteica

La determinazione della composizione in amminoacidi è fondamentale per poter valutare complessivamente la frazione proteica della mosca soldato da un punto di vista nutrizionale. In particolare, è stato determinato il contenuto di ogni singolo amminoacido sia in valore assoluto (g/100 g di peso secco) sia in termini relativi (mg di amminoacido/g di proteina) mediante UPLC-ESI/MS. Si riporta in basso uno dei cromatogrammi ottenuto dalle analisi: sull'asse X c'è il tempo di ritenzione di ogni amminoacido, mentre sull'asse Y l'abbondanza relativa.

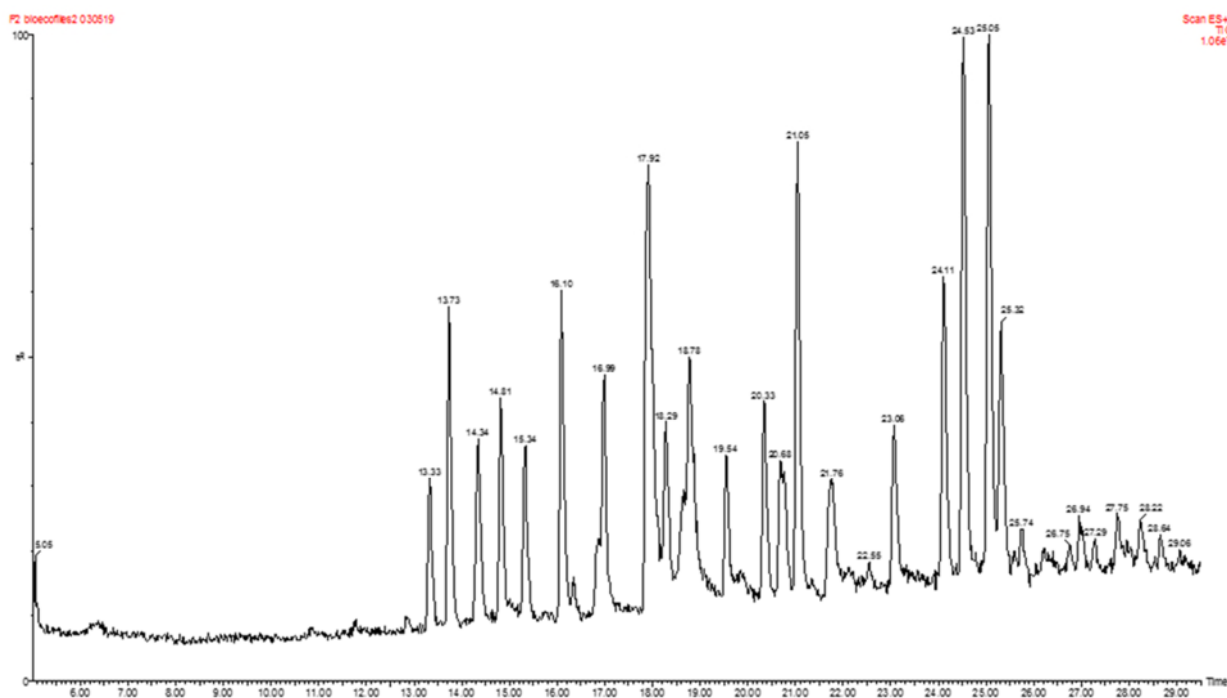


Figura 3.2.2.2: cromatogramma del profilo amminoacidico di un campione di mosca soldato ottenuto con UPLC-ESI/MS

I risultati della composizione amminoacidica sono riportati nelle seguenti tabelle.

Tabella 3.2.2.4: *Composizione in amminoacidi (mg/g proteina) delle prepupae di mosca soldato cresciute su substrati annuali*

Entomology code	ala	asx	arg	gly	his	ile	leu	met	phe	pro	ser	thr	val	lys	tyr	glx	trp	cys
A	64.3	99.6	70.1	68.2	19.8	45.8	76.3	21.0	49.0	70.7	50.5	39.5	61.2	42.1	69.0	117.0	18.6	17.3
B	61.8	100.1	71.6	57.0	27.9	46.3	79.6	20.8	44.0	71.8	45.5	38.6	60.3	41.8	62.7	124.1	23.5	22.5
C	60.9	80.4	80.7	64.6	31.5	46.7	78.5	21.5	56.0	66.8	47.1	39.3	60.8	41.1	81.5	101.8	19.8	21.0
D	61.8	93.0	72.4	63.6	24.9	46.0	79.5	24.1	57.6	66.6	46.7	39.7	61.5	39.9	77.5	102.2	21.5	21.4
E	64.1	104.0	71.7	58.3	30.5	44.8	78.4	19.2	44.5	68.5	45.4	37.9	59.7	43.2	66.8	120.1	19.2	23.7
F	64.4	97.6	71.0	58.4	30.1	49.0	82.6	20.3	46.0	71.3	46.6	37.1	60.9	45.1	65.7	114.3	18.5	21.1
G	71.2	94.5	63.9	61.1	23.1	51.0	85.4	18.9	46.6	70.0	44.5	34.9	66.8	49.2	58.1	122.1	18.5	20.1
H	60.4	91.9	79.1	59.8	27.8	46.6	80.8	20.1	50.1	67.4	47.9	36.7	60.7	44.1	69.0	114.9	19.0	23.8
J	63.1	90.8	75.8	61.0	31.4	47.4	82.4	19.5	49.8	70.8	53.1	36.7	61.0	41.7	74.4	111.2	9.4	20.4
L	65.6	102.4	75.6	62.4	29.2	43.2	81.8	18.2	42.3	71.6	45.2	34.7	60.1	45.7	64.3	122.9	10.0	24.7
N	66.4	97.3	73.9	54.1	26.0	50.0	84.1	17.7	45.8	70.0	44.9	37.3	64.1	50.8	59.7	123.1	15.2	19.8
P	65.9	97.3	72.5	57.1	28.2	48.7	82.0	21.9	50.3	67.5	47.9	40.5	64.5	42.9	71.0	110.6	11.9	19.1
Q	62.6	93.5	78.9	57.2	31.0	46.9	82.5	22.8	47.8	62.7	47.4	38.9	60.3	41.8	66.3	112.1	24.2	23.2
R	62.8	93.0	77.7	57.2	28.2	45.2	81.7	19.9	49.1	66.4	46.7	38.4	58.2	45.8	71.4	112.7	19.2	26.3
S	63.1	95.2	74.7	58.1	27.5	45.8	80.7	19.3	49.8	66.3	46.7	38.8	59.5	42.8	71.1	112.2	20.8	27.7
T	64.7	98.1	74.0	57.4	29.3	46.9	81.2	20.0	48.7	62.7	45.8	39.7	62.4	45.2	71.1	109.8	18.3	24.6
U	61.4	87.6	68.2	56.7	26.5	47.8	82.8	20.6	52.6	70.3	50.5	40.3	61.7	43.0	70.9	118.2	15.5	25.3
V	60.4	92.4	80.0	54.5	31.9	45.6	80.4	21.0	49.0	66.1	48.3	39.0	58.0	44.0	68.0	116.2	20.9	24.2

X	59.4	88.7	82.1	57.7	30.2	47.6	81.3	21.3	55.3	65.6	45.0	37.4	61.8	38.3	78.1	103.4	22.6	24.4
Y	60.5	92.6	80.9	55.8	32.1	48.6	81.8	20.4	49.7	66.9	47.1	38.6	61.9	43.9	74.4	108.0	15.8	21.1
Z	62.4	92.0	78.0	54.8	28.0	47.6	82.1	19.7	45.2	69.6	48.0	38.2	61.4	48.6	62.1	118.7	17.5	26.0
CTR	65.0	87.2	77.7	57.2	31.2	48.2	84.0	20.3	49.8	67.4	44.5	37.8	63.0	43.8	71.9	102.8	22.5	25.8

Tabella 3.2.2.5: *Composizione in amminoacidi (mg/g proteina) delle prepupae di mosca soldato cresciute su substrati estivi*

Entomology code	ala	asx	arg	gly	his	ile	leu	met	phe	pro	ser	thr	val	lys	tyr	glx	trp	cys
A	64.4	96.2	76.1	47.5	40.7	44.1	74.6	18.4	42.1	69.5	45.8	36.5	58.8	65.6	62.4	117.5	19.4	20.3
B	64.7	87.6	74.1	45.6	39.2	44.5	81.1	14.3	36.6	68.3	42.0	32.0	57.5	60.1	58.6	117.3	16.7	59.7
C	64.6	97.0	84.2	47.0	38.2	43.5	79.6	17.0	40.2	67.9	45.2	34.7	58.7	65.6	60.7	114.6	18.5	23.1
D	62.3	100.6	72.7	49.7	40.5	44.0	79.1	18.6	40.0	66.4	44.5	38.1	60.0	66.8	61.1	119.9	14.9	20.7
E	63.5	102.4	73.3	47.3	38.4	42.9	76.5	18.0	40.9	70.1	45.1	37.9	61.7	64.0	61.2	122.1	13.8	20.9
F	65.8	94.4	73.1	51.5	46.1	41.3	75.4	17.8	42.3	72.7	47.5	39.5	57.0	57.0	64.3	117.6	15.7	20.9
G	64.5	93.7	77.1	52.0	39.5	40.7	75.9	16.9	44.7	71.3	49.8	40.2	56.0	54.2	75.1	113.9	13.1	21.3
H	66.3	106.9	75.0	46.4	31.1	43.4	76.3	17.8	38.9	69.9	46.2	37.4	57.7	60.9	61.5	124.0	16.7	23.5
I	62.0	100.2	70.8	45.1	38.4	40.9	76.0	17.5	40.5	68.5	45.5	39.6	61.7	67.0	62.8	126.9	15.0	21.6
J	59.1	94.5	75.7	49.6	36.9	42.4	76.2	16.9	39.3	71.5	46.9	40.3	63.2	62.4	60.8	130.4	14.8	19.0
K	65.2	98.9	79.1	49.3	34.1	43.7	78.0	18.9	41.1	67.9	43.9	35.6	60.9	60.7	66.0	121.6	14.3	20.6
L	65.4	101.4	68.4	51.2	33.8	45.0	76.3	17.3	38.3	68.3	42.4	38.3	64.5	70.3	66.3	120.0	14.3	18.6
M	67.7	103.8	72.0	47.2	36.5	43.0	76.6	16.6	39.1	71.1	46.0	37.0	60.8	64.3	58.4	123.9	15.8	20.3
CTR	65.8	99.2	77.0	50.5	36.9	44.0	73.9	18.3	42.5	68.7	46.7	39.2	62.3	62.4	64.0	108.7	17.6	22.3

Tabella 3.2.2.6: *Composizione in amminoacidi (mg/g proteina) delle prepupae di mosca soldato cresciute su substrati autunnali*

Entomology code	ala	asx	arg	gly	his	ile	leu	met	phe	pro	ser	thr	val	lys	tyr	glx	trp	cys
A	54.7	91.0	85.7	58.8	53.2	40.6	66.6	31.0	61.5	62.5	30.8	33.2	53.9	41.5	93.2	95.7	20.2	26.0
B	58.5	100.8	80.7	61.0	54.1	40.1	62.2	29.5	60.4	63.6	34.7	35.2	54.1	33.2	90.5	99.1	17.9	24.3
C	55.4	105.1	81.4	57.9	48.3	41.0	66.0	29.4	58.5	59.8	35.9	35.7	55.8	56.1	84.2	94.7	15.7	19.2
D	58.6	86.6	89.2	61.5	50.6	40.5	62.6	30.0	58.9	69.2	29.2	30.6	52.6	32.8	95.1	105.7	18.7	27.4
E	56.6	98.0	81.8	58.2	52.9	44.2	64.9	28.3	58.0	65.3	34.0	33.4	55.0	44.0	87.8	98.8	14.6	24.2
F	59.6	105.8	72.1	56.0	46.5	44.5	72.2	28.4	50.6	60.1	34.5	36.5	57.2	60.7	77.2	106.5	13.9	17.6
G	53.1	98.3	79.0	57.8	52.2	45.8	63.6	26.8	53.2	65.7	31.0	34.1	55.1	50.5	84.8	110.7	16.8	21.5
H	54.6	104.7	86.3	55.4	53.6	38.6	58.6	30.2	55.0	61.8	34.4	31.5	50.3	45.5	86.1	111.7	17.5	24.3
I	59.1	103.5	76.7	56.8	50.9	43.0	68.3	28.9	55.4	60.7	34.3	36.3	55.1	54.2	82.6	97.3	16.3	20.7
J	56.5	93.7	83.7	54.6	47.7	39.0	59.3	26.7	51.4	67.4	29.6	29.7	48.1	55.4	88.1	123.9	19.3	26.1
K	65.7	109.8	73.4	53.7	47.4	41.6	64.2	27.6	51.9	58.4	32.7	37.0	54.5	57.2	74.5	112.3	16.7	21.4
L	55.0	83.9	92.1	55.5	52.1	38.7	58.5	28.0	57.2	68.8	28.1	32.2	52.0	46.8	86.0	116.7	19.4	29.2
M	56.3	92.4	76.7	62.5	53.1	45.6	69.7	26.8	56.0	65.4	33.8	37.3	59.9	43.5	88.2	96.9	15.8	20.0
N	55.9	94.4	80.9	57.8	53.5	39.3	64.1	28.5	56.3	62.8	33.9	35.2	55.0	54.9	85.8	101.3	17.0	23.3
O	58.5	99.0	76.6	58.3	53.5	42.0	64.9	27.5	57.0	63.4	33.4	35.8	56.8	52.6	83.9	96.9	18.9	21.0
CTR	56.6	109.4	80.5	50.7	48.3	40.2	59.3	27.2	51.1	58.8	28.6	33.0	51.1	65.0	78.5	119.2	19.0	23.6

Ci siamo naturalmente focalizzati sul contenuto di amminoacidi essenziali, ovvero quelli che gli organismi vertebrati non sono in grado di sintetizzare da sé a un ritmo commisurato al fabbisogno metabolico e che quindi devono essere assunti con l'alimentazione.

I test statistici effettuati sui dati provenienti dall'analisi UPLC-ESI/MS non hanno mostrato nessuna differenza significativa tra le prepupe per quanto riguarda il contenuto totale di amminoacidi essenziali. Quindi, non sembra esserci alcuna influenza da parte della composizione del substrato sul contenuto totale di amminoacidi essenziali nelle mosche soldato; d'altro canto, però, i valori relativi al contenuto di alcuni amminoacidi essenziali si discostano in maniera significativa tra loro. Quello che pare essere più influenzato dal substrato d'allevamento risulta essere, quindi, il contenuto dei singoli amminoacidi essenziali più che la quantità totale di questi ultimi.

L'unico amminoacido essenziale il cui contenuto in % sul peso secco non cambia in maniera significativa in nessun campione è la treonina.

Per quanto riguarda la valina e l'isoleucina, sono state riscontrate differenze significative solo tra alcuni campioni: i campioni E e L cresciuti su substrati autunnali hanno mostrato un contenuto di valina e isoleucina significativamente minore rispetto ai campioni P, cresciuto su substrati annuali, e L, cresciuto su substrati estivi. Per quanto riguarda l'isoleucina, anche il campione B cresciuto sui substrati autunnali ha evidenziato un contenuto significativamente minore rispetto ai campioni sopraccitati.

Il campione E cresciuto sui substrati autunnali presenta anche il più basso contenuto di triptofano, denotando differenze significative con i valori relativi ai campioni B, C, E e Q cresciuti sui substrati annuali.

Per quanto concerne i quantitativi di fenilalanina e tirosina, amminoacidi essenziali aromatici, solo i valori di pochissimi campioni si discostano in maniera significativa tra loro: è il campione N cresciuto sui substrati autunnali a contenerne un quantitativo maggiore rispetto agli altri e a presentare differenze significative con i campioni C e D cresciuti sui substrati estivi. Nessuno di loro, però, presenta differenze significative con i valori trovati per il controllo.

La leucina, invece, è risultata essere presente nel campione P cresciuto su substrati annuali in quantità significativamente maggiori rispetto a diversi campioni di prepupe cresciute su substrati con disponibilità autunnale.

Tuttavia, alcuni campioni cresciuti su substrati autunnali (C, G, N e O) hanno evidenziato un quantitativo significativamente maggiore di amminoacidi essenziali solforati (cisteina e metionina) rispetto ai campioni cresciuti sul substrato di controllo.

Per quanto riguarda il contenuto % di istidina sul DW, invece, il campione A cresciuto sui substrati annuali denota un quantitativo significativamente minore rispetto a quello osservato nel campione cresciuto sul substrato di controllo, mentre il campione O cresciuto sui substrati autunnali presenta una % di istidina sul DW significativamente maggiore dal punto di vista statistico a tutti i campioni cresciuti sui substrati annuali, eccetto C, P e Y.

Infine, la lisina è risultata essere presente nel campione D cresciuto sui substrati estivi in quantità più elevate rispetto agli altri campioni, anche se nessun campione ha evidenziato differenze significative con quello cresciuto sul substrato di controllo.

Il fatto che ci siano queste differenze potrebbe essere imputabile al differente profilo amminoacidico delle proteine contenute nei substrati; non possiamo, però, affermarlo con certezza in quanto non sono a nostra disposizione i dati riguardanti il contenuto di ogni singolo amminoacido nei substrati d'allevamento.

Nella seguente tabella sono riportati i valori dei singoli amminoacidi, divisi in essenziali e non essenziali, riguardanti il campione cresciuto su un substrato molto simile a quello che ha mostrato miglioramenti in termini di performance d'allevamento di cui si è discusso all'inizio del paragrafo 4.1 (20% sansé, 20% mais, 25% legumi, 35% miscela ottimale di substrati annuali). Lo scopo è quello di verificare che il substrato in questione, oltre a fornire notevoli miglioramenti nelle performance d'allevamento rispetto al gruppo di controllo, riesca anche a garantire un certo apporto di amminoacidi essenziali. È stato fatto un confronto con i valori di riferimento del fabbisogno proteico per la nutrizione umana (FAO/WHO, 1985), con i valori di composizione amminoacidica della soia e dell'albumine d'uomo, due proteine cardine dell'alimentazione umana (Young and Pellet, 1991) e con quelli del gruppo di controllo (Caligiani et al., 2018).

Tabella 3.2.2.6: *quantità di aminoacidi essenziali (espressi in mg/g proteina) nei campioni di prepupae di mosca soldato cresciute su substrati autunnali, estivi e autunnali, confrontate con altre fonti proteiche, con gli standard di riferimento FAO/WHO e con il campione del gruppo di controllo*

	Media campioni cresciuti su substrati annuali	Media campioni cresciuti su substrati estivi	Media campioni cresciuti su substrati autunnali	Campione di controllo	FAO/WHO 1985	Albume d'uovo	Soia
Istidina	29	38	51	33	15	22	25
Treonina	38	38	34	42	23	47	38
Valina	61	60	54	66	39	68	49
Lisina	44	63	49	65	45	70	63
Isoleucina	47	43	41	41	30	53	47
Leucina	81	77	64	75	59	88	85
Fenilalanina	49	41	56	36			
Triptofano	18	16	17	9	6	14	11
Metionina	20	17	28	17			
Cisteina + Metionina	43	41	51	47	22	66	68
Fenilalanina + Tirosina	118	103	140	110	38	91	97
SOMMA AA ESSENZIALI	528	520	557	384	277	519	483

I valori relativi alla % di ogni aminoacido essenziale sul peso secco, calcolati nel presente progetto, sono in accordo con i dati a disposizione in letteratura. In particolare, Spranghers et al. (2017) avevano trovato per le prepupae di *Hermetia illucens* cresciute su scarti vegetali valori di aminoacidi essenziali che si avvicinano molto a quelli provenienti dalle nostre analisi. Le uniche differenze si palesano in corrispondenza dell'istidina, della fenilalanina e della cisteina, risultate presenti in quantità maggiori nel nostro campione (Spranghers et al., 2017).

Rispetto al campione cresciuto sul substrato di controllo, abbiamo una % di aminoacidi essenziali sul DW leggermente più elevata, seppur tra i due valori non sia stata rilevata nessuna differenza significativa (Caligiani et al., 2018).

Inoltre, se confrontiamo i valori relativi al contenuto di ogni aminoacido essenziale presente nel nostro campione con quelli di riferimento per la nutrizione umana, notiamo che le proteine di *Hermetia illucens* contengono tutti gli aminoacidi essenziali in quantità sufficienti; elemento che si trova in accordo con gli studi eseguiti precedentemente sul profilo aminoacidico delle mosche soldato (Caligiani et al., 2018).

Infine, il profilo di aminoacidi essenziali del campione è stato confrontato con quello di proteine animali e vegetali ad alta qualità nutrizionale (albume d'uovo e soia): dal confronto sembra che le proteine di *Hermetia illucens* contengano quantità superiori di istidina, triptofano e aminoacidi aromatici e quantità più basse di leucina, lisina e aminoacidi solforati.

Valutazione profilo proteico mediante SDS-PAGE

Le frazioni proteiche estratte dalle prepupae di *Hermetia illucens* mediante il protocollo descritto nei paragrafi 3.3.1 e 3.3.2 sono state poi analizzate mediante elettroforesi SDS-PAGE permettendo di confrontare il profilo proteico in termini dimensionali. Nelle figure sottostanti vengono riportate le scansioni dei gel ottenuti per diversi campioni di cui, quindi, è possibile osservare la distribuzione delle proteine.

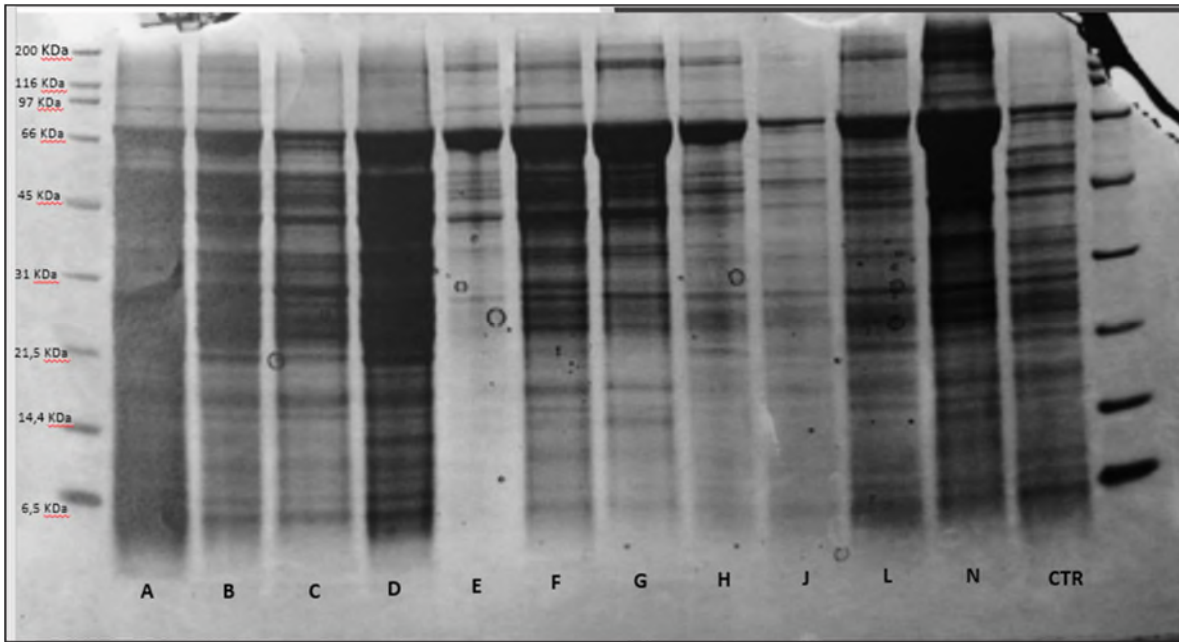


Figura 3.2.2.3: SDS-PAGE. Analisi degli estratti proteici di diversi campioni di *Hermetia illucens* cresciuti su substrati con disponibilità annuale.

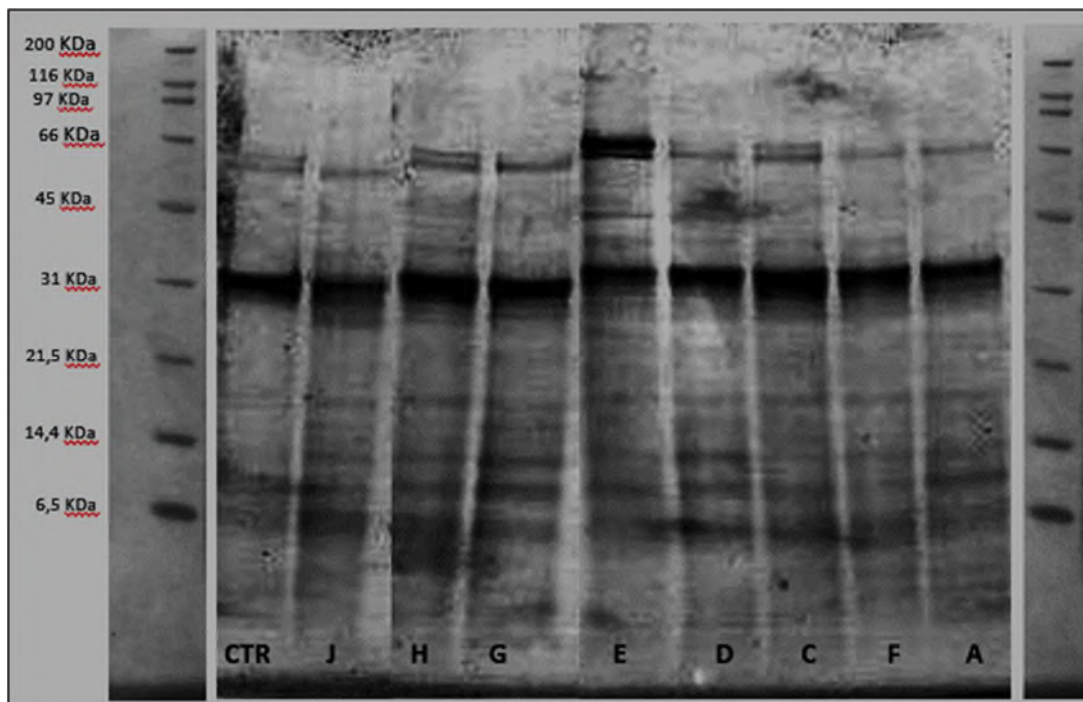


Figura 3.2.2.4: SDS-PAGE. Analisi degli estratti proteici di diversi campioni di *Hermetia illucens* cresciuti su substrati con disponibilità estiva.

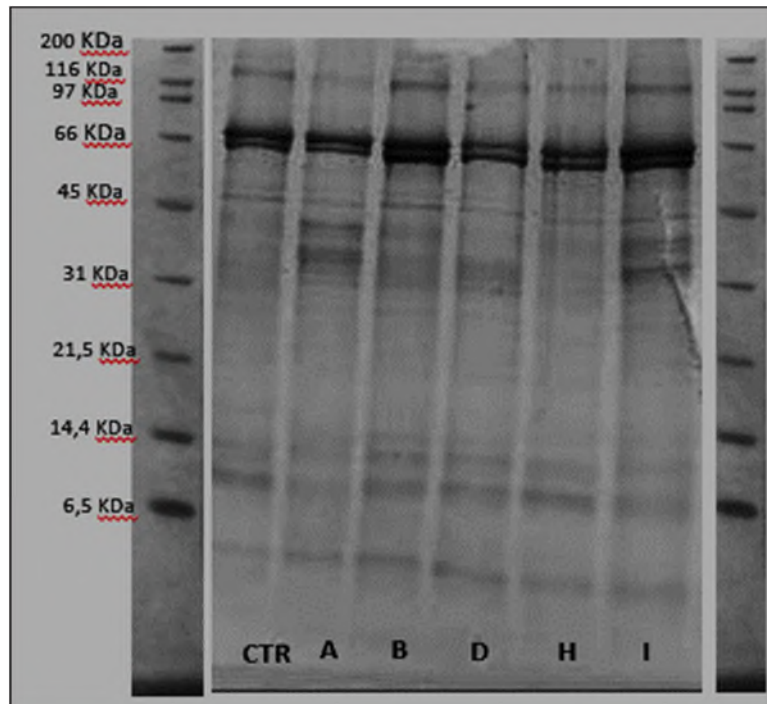


Figura 3.2.2.5: SDS-PAGE. Analisi degli estratti proteici di diversi campioni di *Hermetia illucens* cresciuti su substrati con disponibilità autunnale

È evidente la presenza di proteine con peso molecolare compreso tra i 31 e 70 kDa, con presenza di bande anche tra i 6 kDa e i 21 kDa.

Confrontando i campioni tra loro non si denotano rilevanti differenze significative nella distribuzione delle proteine. Desti particolare attenzione, però, il fatto che i campioni cresciuti sui substrati annuali, a differenza degli altri, presentino bande, anche ben marcate, tra i 45 kDa e i 65 kDa. Tutti i campioni presentano, tuttavia, bande particolarmente marcate in prossimità dei 31 kDa, 66 kDa e tra i 7 e i 20 kDa. Ciò suggerirebbe che la differente composizione dei substrati non abbia influenzato significativamente in termini qualitativi il profilo proteico.

CONCLUSIONI

La composizione centesimale delle prepupe di *Hermetia illucens* sembra solo parzialmente influenzata da quella del substrato.

Per quanto riguarda il contenuto proteico, infatti, sebbene i valori della % di proteine sul DW rientrino in un range abbastanza ampio sono state rilevate differenze significative soltanto tra alcuni campioni e nessuna dissonanza tra il controllo e gli altri campioni analizzati.

Il contenuto di grassi, espresso sempre in % sul DW, invece, è risultato essere distribuito, nei campioni analizzati, tra il 16,4% e 52,5%. In linea generale, i risultati statistici hanno mostrato la presenza di differenze significative tra più campioni a differenza di quanto accaduto con le proteine, a testimonianza del fatto che, come evidenziato dalla letteratura scientifica, la composizione dei substrati influenza più il contenuto di grassi che quello di proteine.

Per quanto riguarda le ceneri, è stato rilevato un contenuto significativamente maggiore rispetto agli altri nei campioni cresciuti su substrati annuali.

Prendendo in esame i profili amminoacidici si è visto che tutti gli amminoacidi essenziali erano presenti in quantità maggiore rispetto ai valori raccomandati dalla FAO/WHO (FAO, 1985).

Dall'elettroforesi SDS-PAGE si potrebbe dedurre che la differente composizione dei substrati non abbia influenzato significativamente in termini qualitativi il profilo proteico.

Attività 3.2.3 Caratterizzazione delle biomasse da insetti - Frazione lipidica

Uar: UNIMORE

OBIETTIVI

Le larve di mosca soldato possono essere allevate su una vasta gamma di substrati organici, la cui composizione influenza il profilo dei lipidi e degli acidi della larva stessa. Per questo motivo sono stati confrontati i vari profili lipidici di larve cresciute, nelle medesime condizioni, su differenti substrati costituiti da mescolanze di sottoprodotti ottenuti da diverse filiere vegetali.

MATERIALI E METODI

I campioni di grasso sono stati forniti dall'Unità Operativa UNIPR.

PREPARAZIONE DEGLI ACIDI GRASSI METILESTERI PER DERIVATIZZAZIONE ACIDO-CATALIZZATA

In un matraccio tarato da 100 mL 39 g di AcCl sono stati gradualmente aggiunti a circa 50 mL di metanolo anidro. Terminata la reazione, il matraccio è stato portato a volume.

Il reattivo è stato conservato in congelatore a -18 °C.

Una quantità nota di grasso delle PP (è stata trasferita in una provetta tarata ed il solvente è stato allontanato con un leggero flusso di azoto. Successivamente è stato aggiunto 1 mL di reattivo derivatizzante e le provette sono state chiuse ermeticamente e poste per 1 h a 100 °C in un thermoblock. Trascorso questo periodo, una volta fredde, le provette sono addizionate di 500 µL di acqua deionizzata e 500 µL di standard interno (1% metil undecanoato in esano). Infine il campione è stato estratto con 2 mL di esano agitando energicamente con un Vortex per 1 min e la fase organica è stata separata per centrifugazione (3500 rpm per 10 min). Un'aliquota del surnatante (1 µL) è stata iniettata in GC-MS.

CONDIZIONI ANALITICHE GC-MS

Un gascromatografo (Serie HP 6890, Hewlett-Packard, Waldbronn, Germania) dotato di iniettore split/splitless e accoppiato con rivelatore a spettrometro di massa (HP 5973 Mass Selective Detector, Hewlett-Packard, Waldbronn, Germania) è stato utilizzato per separare e quantificare gli esteri metilici degli acidi grassi.

Il sistema GC era dotato di una colonna capillare Mega-10 (100% cianopropilpolisilossano, 50 m 0,25 mm d.i., 0,20 µm di spessore della fase, (Mega snc, Legnano, MI). La temperatura del forno è stata regolata a 90 °C, mantenuta per 1 min, poi portata a 180 °C con un incremento di 10 °C/min, e infine tenuta a questa temperatura per 15 min (26 min totali di analisi). L'iniettore, operante in modalità split (rapporto di splittaggio 200: 1), e la transfer line erano entrambi impostati a 250 °C. Il gas di trasporto (He) era impostato ad un flusso costante di 1 mL/min.

La frammentazione è stata ottenuta mediante ionizzazione elettronica a 70 eV. La temperatura della sorgente è stata fissata a 230 °C e quella del quadrupolo a 150 °C. I cromatogrammi sono stati acquisiti ed elaborati tramite il software Enhanced Chem Station (G1701AA versione A.03.00, Hewlett Packard).

L'identificazione dei picchi è stata eseguita tramite (I) il confronto dei tempi di ritenzione dei picchi con quelli ottenuti con standard chimici, (II) il confronto degli spettri di massa del picco con quelli presenti nelle librerie dedicate agli acidi grassi metil esteri (Famedb23.l e Famedbwax.l; Agilent Technologies).

RISULTATI

La composizione delle PP allevate sui vari substrati mostra composizioni differenti, confermando così che la dieta influenza profondamente la composizione dei lipidi degli insetti.

In tabella sono riportate le combinazioni di scarti, per ognuno dei tre esperimenti, che hanno garantito le migliori prestazioni di crescita larvale. Gli scarti annuali (melone e mango) che hanno mostrato i migliori risultati nel primo esperimento sono stati inclusi anche nei test estivo e autunnale, perché la loro fornitura da aziende di produzione di succhi è continua e non soggetta alla stagionalità dei prodotti.

Tabella 3.2.3.1 – Composizione dei substrati che hanno garantito il migliore accrescimento larvale per ognuno dei tre esperimenti.

Annuale	Estivo	Autunnale
Melone 70,0%	Pomodori 80,0%	Melone 24,5%
Mango 30,0%	Pesca 20,0%	Mango 10,5%
		Cannellini 12,5%
		Ceci 12,5%
		Mais 20,0%
		Sansa di olive 10,0%
		Acqua di vegetazione 10,0%

I dati ottenuti da tre esperimenti (annuali, estivi e autunnali) hanno mostrato che gli acidi grassi maggiormente presenti sono i seguenti: C12:0, C16:0 e C14:0. C12:0 ha, nella maggior parte dei campioni, una concentrazione superiore al 50% del totale, con C16:0 e C14:0 che si attestano intorno al 10%. C25:0 risulta in tutti i set di dati inferiore al limite di rivelabilità (LOD).

I tre set di dati presentano differenze significative per tutti i parametri esaminati con $p < 0,001$, eccetto C17:1 ($p < 0,01$, solo per gli scarti estivi) e C23:0 ($p < 0,05$, solo per gli scarti autunnali). Sebbene l'ANOVA evidenzi differenze significative tra i campioni, C12:0 presenta valori contenuti entro un massimo di 66,26% e un minimo di 55,15% per i campioni V (50,0% mango; 50,0% mela) e M (50,0% ananas; 50,0% mela), rispettivamente. L'intervallo limitato riflette l'omogeneità degli scarti utilizzati per la realizzazione dei substrati, costituiti da soli residui di frutta.

Nei successivi due set di dati, estivi e autunnali, il divario tra massimo e minimo di C12:0 si amplia maggiormente. Si passa da un valore pari a 41,35 g/100 g del campione F (46,7% melone, 20,0% mango, 33,3% pesca) a 73,37 g/100 g del campione A (66,7% pesca, 33,3% pomodoro) (estivi); e da 38,23 g/100 g del campione L (50,0% sansa, 50,0% acqua di vegetazione della lavorazione delle olive) a 69,72 % del campione I (25,0% ceci, 25,0% cannellini, 50,0% mais) (autunnali). Gli intervalli più ampi, rispetto ai dati dell'esperimento annuale, sono imputabili all'introduzione di scarti organici derivanti da ortaggi, legumi, cereali e prodotti della lavorazione dell'oliva, i quali, avendo una natura diversa dalla frutta, apportano ai substrati di crescita sostanziali variazioni composizionali. Queste osservazioni valgono anche per C10:0 e C14:0. C16:0 diversamente presenta una correlazione negativa al C12:0, già evidenziata in studi recenti anche nel presente laboratorio.

Per quanto riguarda C18:0 e i rispettivi omologhi insaturi (C18:1, C18:2 e C18:3) si riscontra, così come per C12:0, una leggera differenza nei campioni cresciuti su scarti annuali, difficile da attribuire a diversità composizionali dei diversi frutti. La concentrazione di C18:0 nelle larve cresciute su scarti estivi presenta il valore massimo (7,21 g/100 g) nel campione B (100% pesca), mentre i valori massimi di C18:1 e C18:2 sono mostrati dai F (46,7% melone, 20,0% mango, 33,3% pesca), G (11,7% melone; 5,0% mango, 66,7% pesca, 16,7% pomodoro) e H (46,7% melone, 20,0% mango, 33,3% pomodoro).

Nella tabella riferita agli scarti autunnali, invece, il valore di C18:0 (10,51 g/100 g) del campione L (50,0% sansa, 50,0% acqua di vegetazione di olive), risalta nettamente rispetto alla media dei restanti campioni di questo esperimento che si aggira intorno a 2,4 g/100 g. Nello stesso campione anche C18:1 e C18:2 mostrano valori elevati. Ciò può essere messo in relazione alla particolare composizione del substrato, costituito esclusivamente da sansa di oliva, naturalmente ricche di acido oleico (C18:1), e in misura minore di linoleico (C18:2) e stearico (C18:0). Difatti anche nei campioni D (6,3% ceci, 6,3% cannellini, 12,5% mais, 31,3% sansa, 31,3% acqua di vegetazione di olive, 8,8% melone, 3,8% mango) e J (25,0% sansa, 25,0% acqua di vegetazione di olive, 35,0% melone, 15% mango), che presentano percentuali di sansa e acqua della lavorazione delle olive pari o superiori al 50%, si riscontra una discreta presenza di acido linoleico (e oleico solo in D), rispetto agli altri campioni.

Analizzando le sommatorie delle frazioni di acidi risulta evidente una preponderanza di acidi grassi saturi. Sono state rilevate differenze nel rapporto tra sommatoria di acidi grassi saturi (AGS) e insaturi (AGI), delineando così profili peculiari per ciascun substrato di allevamento (Fig. 3.2.3.1.a, 3.2.3.1.b, 3.2.3.1.c).

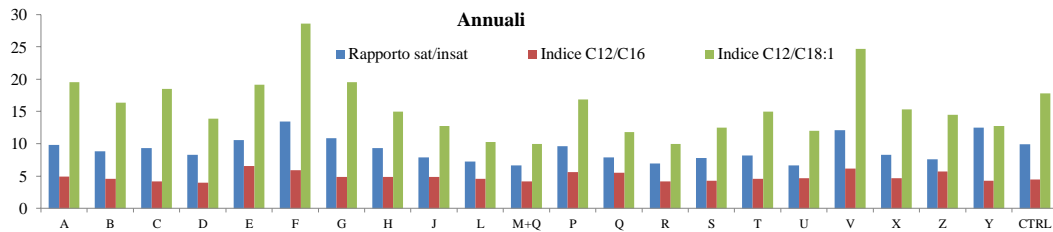


Figura 3.2.3.1a. Istogramma relativo ad alcuni indici inerenti gli acidi grassi ottenuti nell'esperimento annuale.

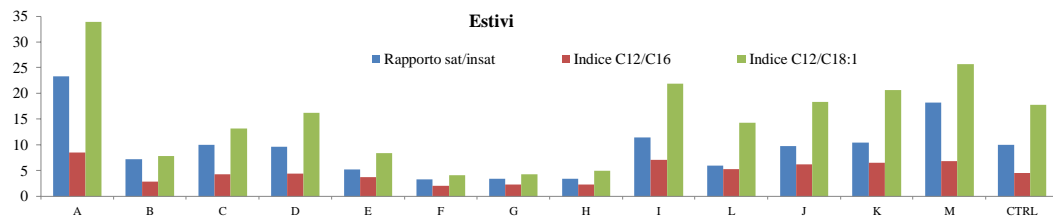


Figura 3.2.3.1b. Istogramma relativo ad alcuni indici inerenti gli acidi grassi ottenuti nell'esperimento estivo.

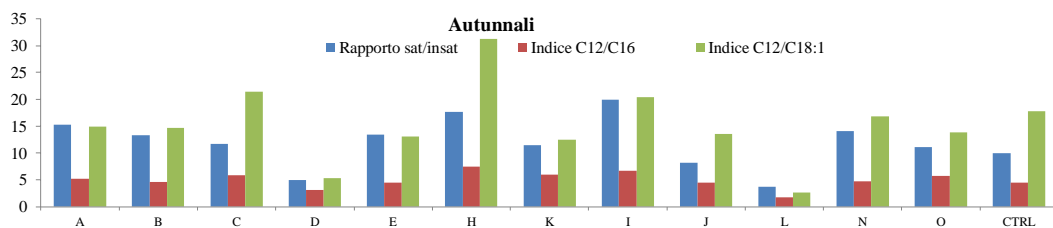


Figura 3.2.3.1c. Istogramma relativo ad alcuni indici inerenti gli acidi grassi ottenuti nell'esperimento annuale.

L'istogramma di figura 3.2.3.1a non evidenzia sostanziali differenze tra i diversi campioni, molto probabilmente a causa della trascurabile diversità di composizione dei diversi frutti. Si evidenziano valori più bassi per l'indice C12:0/C18:1 (fig. 3.2.3.1c) soprattutto nei campioni D ed L, già precedentemente menzionati, e caratterizzati da un alto contenuto di acido oleico.

Il confronto dei risultati ottenuti ha dimostrato una grande coerenza con alcuni studi recenti in termini di contenuto di grassi nelle larve insetti, così come di profilo degli acidi grassi. In generale, i valori relativi ai parametri lipidici sono fortemente influenzati dalla specie di insetto e da diversi altri fattori, quali la composizione della dieta fornita, l'habitat, le condizioni di temperatura e umidità e lo stadio metamorfico. La modulazione di tali fattori permette, pertanto, di indirizzare la quantità e la qualità dei lipidi.

Anche in questo studio si conferma che il contenuto di lipidi larvali rappresenta una buona fonte energetica. Inoltre, il basso contenuto di colesterolo rende questo grasso adatto per l'industria alimentare. Tuttavia, a causa degli ostacoli imposti dalla legislazione, l'utilizzo alternativo come (bio)combustibile resta attualmente l'unica strada percorribile. Questo impiego permette una parziale riduzione dell'erosione dei combustibili fossili e delle conseguenze ambientali connesse.

Il biodiesel si ottiene facendo reagire lipidi con alcoli a basso peso molecolare (metanolo, etanolo, propanolo), producendo così esteri degli acidi grassi. Ha buone proprietà lubrificanti e un numero di cetano più elevato rispetto anche ai più recenti combustibili diesel a basso tenore di zolfo. Oltre alle interessanti proprietà come carburante, il biodiesel mostra anche altre caratteristiche cruciali che lo rendono migliore del diesel. In particolare, consente di ridurre la produzione e l'emissione di contaminanti ambientali, come monossido di carbonio, metalli pesanti, ossidi di zolfo, idrocarburi alifatici e aromatici, nonché microparticolato.

Il bilancio energetico del ciclo di vita mostra, inoltre, un risultato estremamente positivo con un consumo energetico di circa un quarto rispetto all'energia prodotta. L'origine da colture vegetali e prodotti animali sostenibili implica l'azzeramento del ciclo di CO₂ quando il biodiesel viene bruciato. Non vengono emesse ulteriori emissioni di CO₂ perché l'anidride carbonica prodotta è già stata compensata da quella che le piante hanno fissato durante la loro crescita.

Il biodiesel, infine, ha una bassa tossicità rispetto al diesel. Perdite accidentali sono meno problematiche perché il biodiesel è biodegradabile nel giro di 21 giorni, sebbene già dopo 2 giorni a contatto con l'aria gli esteri degli acidi grassi non siano più rilevabili.

È stato infine calcolato il numero di cetano degli esteri metilici ottenuti dai lipidi estratti dagli insetti che è riportato nella tabella seguente.

ANNUALE	CN	ESTIVO	CN	AUTUNNALE	CN
A	64	A	65	A	65
B	64	B	65	B	65
C	64	C	65	C	65
D	64	D	64	D	62
E	65	E	63	E	65
F	64	F	61	H	65
G	64	G	61	I	66
H	64	H	61	J	64
J	64	I	64	K	65
L	64	J	64	L	63
M	64	K	64	N	65
P	64	L	62	O	64
Q	64	M	65	CTRL	64
R	64	CTRL	64		
S	64				
T	64				
U	63				
V	65				
X	64				
Z	64				
Y	66				
CTRL	64				

Non si evidenziano differenze significative né tra il controllo e le diverse tesi, né tra i diversi periodi dell'anno. Solo i campioni S, G, H nel periodo estivo presentano valori leggermente più bassi.

In generale i valori sono poco superiori al numero di cetano tipico degli esteri metilici che derivano dai grassi di origine animale che sono leggermente superiori al valore tipico del gasolio di origine fossile. Tuttavia non è stato possibile fare una effettiva prova di combustione che avrebbe richiesto alcuni litri di esteri, per cui i valori sono stati ottenuti per via indiretta applicando una formula che teneva conto della composizione, numero di saponificazione e del numero di iodio.

CONCLUSIONI

I risultati delle analisi del progetto BIOECOFLIES hanno confermato come la diversità della composizione del substrato di crescita possa influenzare la composizione lipidica larvale. In particolare, l'abbondante

presenza di scarti della filiera olivicolo-olearia modula l'accumulo di acidi grassi insaturi della serie C18. Meno accentuate sono le differenze che si ottengono impiegando in prevalenza scarti di frutta.

SOTTO-AZIONE 3.3. Produzione massale di MS in impianto dimostrativo

Attività 3.3.1. Pianificazione funzionale della produzione massale

Uar: UNIMORE

OBIETTIVI

Valutazione statistica delle variabili di processo e loro interazione dell'impianto dimostrativo per la produzione massale di MS a partire dalle formulazioni individuate nella sottoazione 3.1.1.

MATERIALI E METODI

I metodi utilizzati sono i medesimi già esposti per la Attività 3.1.1. Le formulazioni ottenute come output della Attività 3.1.1 sono stati impiegate nell'impianto massale e denominate SA (Substrato annuale), SA1 (Substrato estivo) e SA2 (Substrato Autunnale) con l'obiettivo di essere codificate per la pianificazione degli esperimenti. Inoltre la pianificazione degli esperimenti ha tenuto conto di variazioni controllate di temperatura ed umidità come mostrato in Tabella 3.3.1.1.

Tabella 3.3.1.1 – Pianificazione del piano sperimentale a riguardo dell'allevamento nell'impianto massale

Factor	Name	Units	Type	Minimum	Central	Maximum	Mean
A	Substrato		Categoric	SA	SA1	SA2	Levels:
B	Temperatura	°C	Numeric	25.00	27.00	30.00	27.50
C	Umidità	%	Numeric	50.00	65.00	80.00	65.00

Da queste condizioni è stato elaborato il piano sperimentale, il quale includendo 4 punti centrali e 2 replicati è formato da un totale di 24 prove di allevamento nell'impianto massale.

RISULTATI

I risultati ottenuti dalle prime prove svolte hanno mostrato che la variabilità dei risultati è del tutto simile alla variabilità sulle ripetizioni per cui non è stato possibile generare modelli matematici statisticamente significativi e con carattere predittivo. Inoltre, dato il numero di prove e i tempi di medi di allevamento (~20 giorni) il piano sperimentale avrebbe richiesto l'uso dell'impianto massale per un numero di mesi troppo elevato e quindi non compatibile con le tempistiche del progetto.

In alternativa l'analisi statistica si è concentrata sull'analisi dei macronutrienti delle MS in uscita dall'impianto massale mostrando che scarti della lavorazione di pesche, melone e frutti esotici incentivano il contenuto di frazione lipidica mentre sottoprodotti di kiwi promuovono il contenuto di ceneri.

CONCLUSIONI

Il piano sperimentale generato è difficilmente applicabile all'interno delle prove su impianto massale a causa del numero di prove necessarie affinché i dati abbiano rilevanza statistica, difficilmente ottenibile comunque considerando le prove preliminari svolte. Per cui invece sono state analizzate le relazioni tra substrato in miscela ed ottenimento di MS con un particolare contenuto di macronutrienti.

Attività 3.3.2. Sperimentazioni allevamento massale in impianto dimostrativo

Uar: UNIMORE

OBIETTIVI

In seguito ai risultati di precedenti esperimenti e della prova preliminare, le migliori combinazioni di substrati, identificate per ogni stagione sono state testate a livello semi-industriale, nell'ambito del prototipo di impianto per l'allevamento massale di mosche soldato, ottenuto nel precedente progetto VALORIBIO. Lo scopo di questo studio era di massimizzare il peso delle larve mature per ciascun tipo di substrato. Si rimanda all'Allegato 1 per le foto relative a questa parte

MATERIALI E METODI

Le larve di MS sono state allevate in contenitori di grandi dimensioni (vassoi di plastica rigida, superficie di 2400 cm²), mantenendo un rapporto di 3,5 mg substrato / larve. Il numero di repliche per ogni stagione variava in base alla quantità di substrato disponibile, e in base al volume occupato dai diversi mix (Tab. 3.3.2.1). I vassoi sono stati preparati inserendo il substrato e le larve, e quindi inseriti nella cella climatica del prototipo, a 27°C con il 70% di umidità relativa.

Tab. 3.3.2.1. Composizione dei substrati testati nell'impianto

Composizione dei substrati testati	Numero repliche	Quantità substrato /contenitore (g)	Numero larve /contenitore
Mix annuale: melone (70%) e frutta esotica (30%)	4	8840	2400
Mix estivo: pomodoro (80%) e pesca (20%)	9	5000	1428
Mix autunnale: legumi (25%), residui di lavorazione olive (20%), mais (20%), mix annuale (35%).	3	2770	791
Controllo: crusca (25%), alfa alfa (15%), farina mais (10%) acqua (50%).	6	5040	1466

I controlli di ogni singolo box sono stati eseguiti nei giorni 4, 7, 9, 10 e 11. Ad ogni controllo è stato analizzato l'avanzamento di crescita delle larve prelevando in maniera casuale 10% larve per box; ogni larva prelevata veniva pulita, pesata e rimessa nel contenitore. L'esperimento si è concluso quando si è raggiunto al picco più alto di crescita larvale. In base alla tipologia della texture dei substrati sperimentali le larve sono state setacciate attraverso un vibrovaglio o prelevate singolarmente a mano.

RISULTATI

I risultati ottenuti nel prototipo seguono indicativamente lo stesso trend degli esperimenti preliminari, nonostante la riduzione di 3,5 invece che 4g di substrato per larva. Tuttavia le larve sono risultate di peso leggermente inferiore nel gruppo autunnale. Rispetto alla prova in laboratorio, il peso delle larve sviluppate nel substrato di controllo è stato il più basso, probabilmente dovuto alla combinazione della texture farinosa e una più ampia superficie dei contenitori del prototipo (Fig. 3.3.2.1).

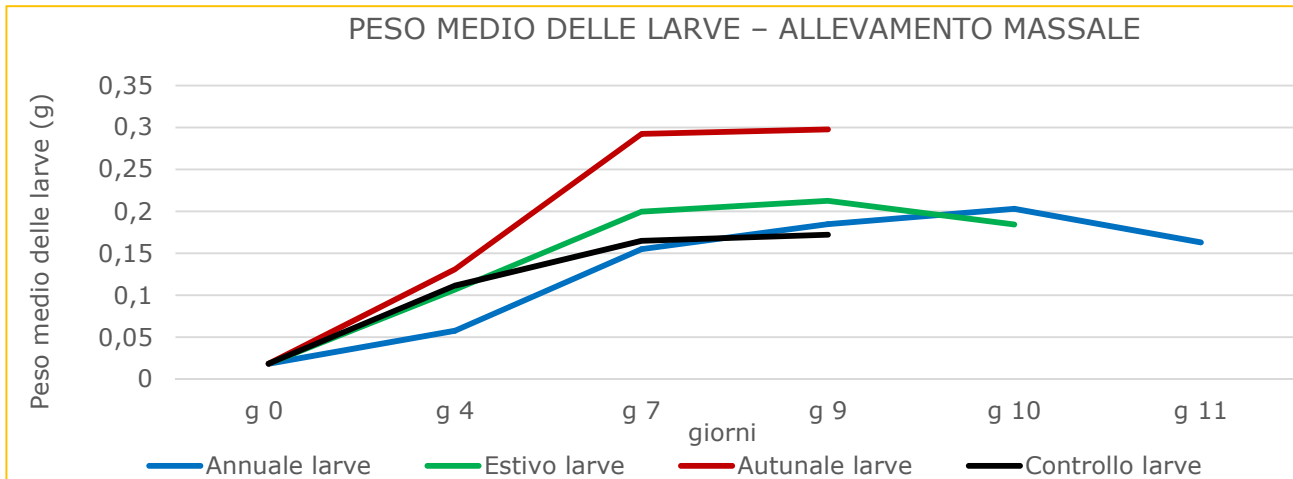


Fig. 3.3.2.1. Andamento delle larve sui substrati testati

Nel prototipo, la percentuale di mortalità ha seguito lo stesso trend della prova preliminare, con la più alta mortalità nel gruppo annuale, seguito dal gruppo estivo. La mortalità nel gruppo autunnale è confrontabile con quella del controllo (Fig.3.3.2.2.).

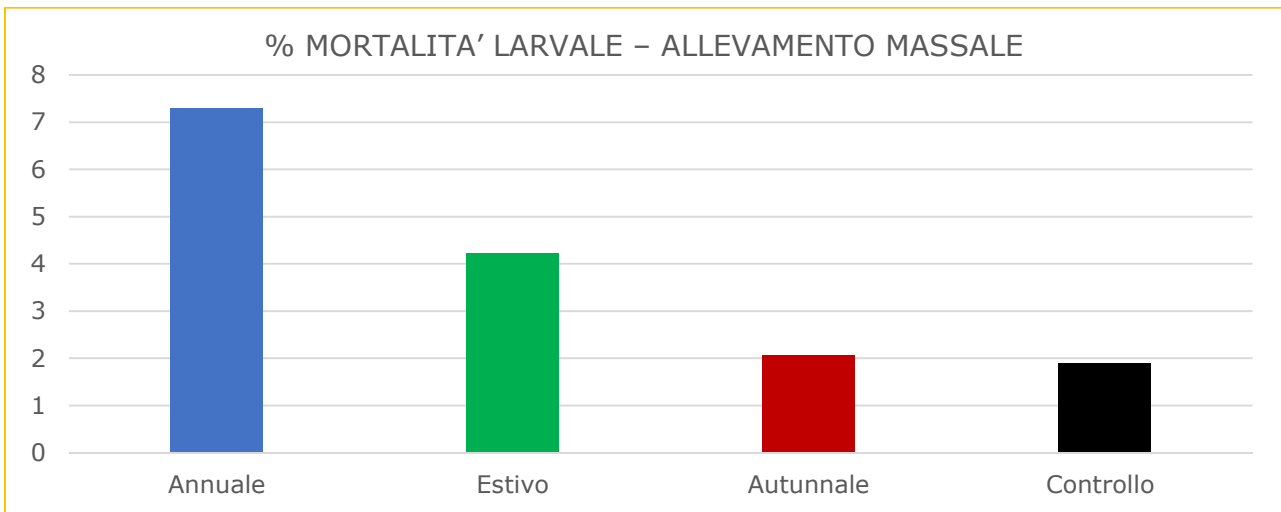


Fig. 3.3.2.2. Percentuale di mortalità nell'impianto

La riduzione del substrato estivo e autunnale è paragonabile a quella riscontrata nel controllo, in opposizione alla riduzione del substrato annuale (Fig. 3.3.2.3), probabilmente a causa della composizione acquosa della frutta (mango e melone).

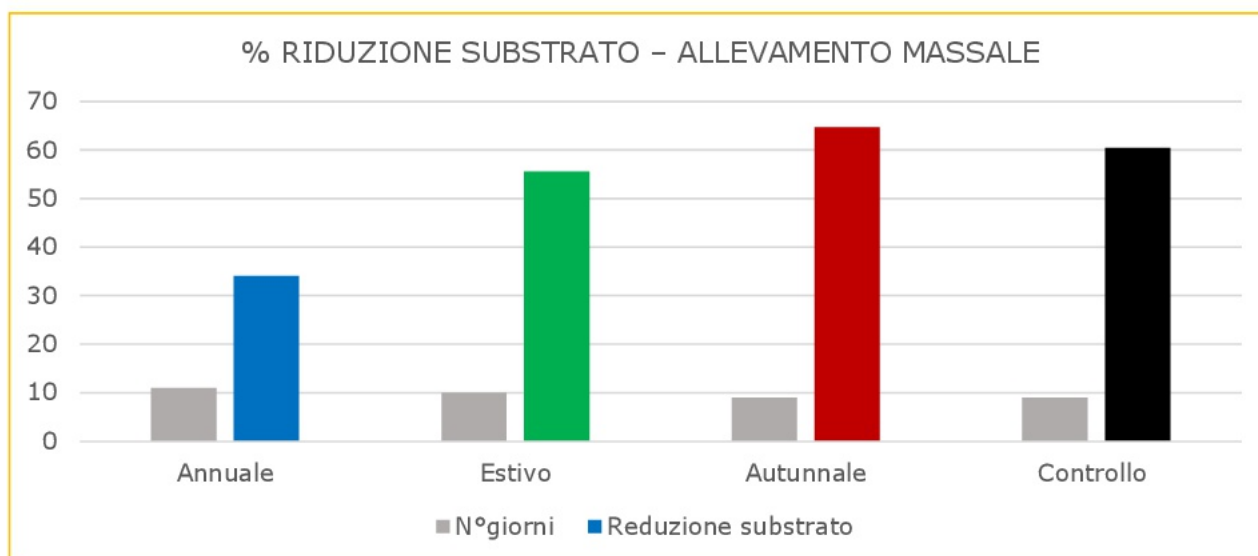


Fig. 3.3.2.3. Percentuale di riduzione del substrato nell'impianto

CONCLUSIONI

E' stata dimostrata l'efficienza dell'impianto sia per la crescita delle larve sia per la produzione. Sono stati ottenuti circa 6 kg di larve, quantità utile per le analisi dell'azione 3.4. Inoltre è stato possibile comparare le performance e i tempi di sviluppo larvale dei vari gruppi stagionali con il gruppo di controllo.

SOTTO-AZIONE 3.4 Valutazione funzionale delle macromolecole ottenute dalla BL e del compost, per verificarne impieghi industriali ed agronomici

Attività 3.4.1 Messa a punto di metodologie per la purificazione di frazioni

Uar: UNIPR

OBIETTIVI

Mettere a punto, su scala di laboratorio, procedure per l'isolamento e la purificazione delle frazioni proteica, lipidica e chitinoso da biomasse da insetto prodotte in allevamento massale.

Effettuare una caratterizzazione approfondita delle frazioni proteica e chitinoso per valutare i possibili impieghi come integratori ad alto contenuto proteico e integratori di chitosano e glucosammina (chitosano come fibra alimentare e glucosammina per il benessere delle articolazioni).

MATERIALI E METODI

Metodologie di frazionamento.

Separazione della frazione lipidica. Il campione di prepupae macinato è stato sottoposto ad un'estrazione con etere di petrolio in rapporto 1:2 (campione/solvente). L'estrazione è stata effettuata in agitazione a 55°C per 1h utilizzando un sistema di refrigerazione per impedire l'evaporazione del solvente. Il solvente contenente i grassi è stato quindi recuperato mediante filtrazione con mentre sul pellet è stata effettuata una seconda estrazione con le stesse modalità. Le fasi liquide recuperate dalle due estrazioni, infine, sono state portate a secco per ottenere l'estratto lipidico puro.

Estrazione "multi-step" della frazione proteica (metodo Osborne). L'estrazione proteica dal campione sgrassato è stata eseguita seguendo un noto modello (Osborne and Voorhees, 1894) con qualche modificazione, come riportato in uno studio sulla mosca soldato nera (Caligiani et al., 2018). Questo

protocollo consiste nel sottoporre il campione a quattro estrazioni successive in condizioni blande che in modo tale da suddividere la componente proteica in quattro diverse frazioni (albumine, globuline, prolamine, gluteline). Il campione sgrassato è stato estratto con una soluzione acquosa (rapporto 1:5 campione: soluzione estraente) contenente acido ascorbico 5mM, EDTA 2mM e Tris-HCl 10mM per 1h a 4°C con agitazione magnetica. Trascorso l'intervallo di tempo è stata effettuata una centrifugazione a 4°C per 20 minuti (4000rpm), in modo tale da separare il surnatante contenente le albumine e il pellet. Il pellet residuo è stato quindi sottoposto alla seconda estrazione, sempre in rapporto 1:5, con una soluzione composta da acido ascorbico 5mM, EDTA 2mM, Tris-HCl 20mM e NaCl 0.5M, per 1h a 4°C con agitazione. Una centrifugazione a 4°C per 20 minuti a 4000rpm poi ha separato nuovamente il pellet dal surnatante, contenente la frazione proteica delle globuline. La procedura è stata ripetuta una terza volta per ottenere la separazione delle prolamine. In questo caso, la soluzione estraente è composta da una miscela acqua-etanolo 30-70 con acido ascorbico 5mM. Dopo aver fatto reagire per 1h a 4°C con agitazione magnetica è stato possibile separare nuovamente il surnatante dal pellet (centrifugazione a 4°C e 4000rpm per 20 minuti). Infine, quest'ultimo è stato estratto per 1h a 4°C con una soluzione di NaOH 0.1M e acido ascorbico 5mM. Trascorso l'intervallo di tempo, una centrifugazione a 4°C e 4000rpm per 20 minuti ha permesso di separare l'ultima frazione proteica, costituita dalle gluteline.

Estrazione proteica mediante idrolisi enzimatica con PBL. È stato eseguito un secondo protocollo di estrazione che prevede l'utilizzo di enzimi proteolitici. L'estrazione enzimatica è stata eseguita con protease da *Bacillus Licheniformis* (PBL) in un ambiente controllato mediante l'utilizzo di un pH-Stat.

Il campione sgrassato macinato è stato nel reattore con sistema pH-stat insieme alla soluzione tampone in rapporto 1:5 con concentrazione di enzima pari allo 0,25% del peso del campione. L'idrolisi enzimatica è stata eseguita nelle condizioni ottimali per l'azione dell'enzima: pH 7.5 e temperatura di 60°C. L'idrolisi è stata arrestata dopo 4h, portando la temperatura a 90°C per 10 minuti per l'inattivazione dell'enzima. Il campione idrolizzato è stato centrifugato a 4000 rpm a 4°C per 30 minuti così da ottenere il surnatante, arricchito in frazione proteica e il pellet.

Estrazione e purificazione della chitina. I pellet derivanti dalle fasi precedenti di estrazione proteica vengono sottoposti a trattamento di demineralizzazione con HCl 2N (rapporto 1:10), per 24h a temperatura ambiente, poi si centrifuga per 15 min a 4000 rpm. Il precipitato viene lavato per due volte con acqua (centrifugando per 15 minuti a 4000 rpm e scartando ogni volta il surnatante).

Produzione di chitosano

La chitina estratta (paragrafo precedente), circa 30g, sono stati posti in una beuta da 1L con 450 mL di una soluzione di NaOH 12,5 N (1:15 m/v) a 90 °C per 4 ore in un bagnetto ad olio. In seguito alle 4 ore e dopo raffreddamento, la miscela è stata neutralizzata con circa 500 mL di HCl 12 N fino ad ottenere un pH neutro. Il tutto è stato centrifugato a 4 °C per 20 min a 4000 rpm ed il solido è stato separato dal surnatante (Ngo, 2017).

Il solido è stato sottoposto a lavaggi con acqua bidistillata e successivamente è stata posto in stufa a 40 °C ad essiccare ottenendo così la chitina deacetilata ovvero il chitosano.

Determinazione della purezza e del grado di acetilazione di campioni di chitosano mediante analisi diretta 1H NMR

10 mg di chitosano vengono sciolti in 1780 microlitri di D2O, 120 microlitri di HCl 37% e 100 microlitri TSP 2620 ppm in D2O. Si lascia in agitazione per 30 minuti a temperatura ambiente e poi si preleva 1 ml di soluzione e si trasferisce in un tubo NMR. L'acquisizione degli spettri 1H NMR viene fatta a 70 °C per evitare la sovrapposizione del segnale residuo dell'acqua con i segnali della glucosammina e della glucosammina acetilata. Il calcolo del grado di acetilazione viene fatto integrando i segnali del gruppo acetile e della glucosammina deacetilata.

Dall'integrazione del segnale del TSP e dei segnali H2-6 della somma delle due forme, acetilata e non acetilata, e correggendo per il grado di acetilazione reale calcolato, è possibile determinare la quantità assoluta di chitosano solubilizzato.

Produzione di glucosammina mediante idrolisi acida

Sono state testate diverse condizioni di idrolisi al fine di ottimizzare il metodo. Le variabili modificate sono state:

- Tipo di Acido (Trifluoroacetico 2 N o acido cloridrico 8 N)
- Tempo di idrolisi (2h, 3h, 4h, 5h, 6h)

Al termine delle idrolisi, ogni provetta è lasciata raffreddare a temperatura ambiente e successivamente tutto il contenuto è trasferito in un pallone da 50 ml. Il tutto è stato portato a secco e si è proceduto con l'analisi in GC-MS per determinare il contenuto di glucosammina.

RISULTATI

Estrazione della frazione proteica

Sono state sviluppate diverse tecniche di estrazione della frazione proteica, finalizzate a mantenerne l'integrità e il valore nutrizionale, per poter successivamente utilizzare l'estratto come ingrediente

aggiuntivo di alimenti o mangimi per migliorarli dal punto di vista nutrizionale. In particolare, sono stati utilizzati due protocolli di estrazione differenti, uno chimico e uno enzimatico, e ne è stata valutata l'efficienza in termini di resa di estrazione, parametro fondamentale per valutare e poi ottimizzare a livello industriale l'eventuale processo, andando a considerare anche i fattori economici. I metodi di frazionamento sono stati applicati al substrato più ricco di sostanze azotate, ovvero le prepupae derivate dall'allevamento massale cresciute sul substrato autunnale (come si può osservare dalla composizione centesimale riportata in tabella 3.4.1.1) e, come confronto, alle prepupae cresciute sul substrato controllo. I risultati relativi alle rese di estrazione sono riportati nella tabella 3.4.1.2.

Tabella 3.4.1.1: *composizione centesimale (g/100g) dei 4 campioni di prepupae di mosca soldato derivanti dall'allevamento massale*

Substrato	Umidità	grassi	ceneri	proteine	chitina
Annuale	69.8	7.18	2.07	9.51	3.51
Estivo	71.9	10.4	1.74	11.06	4.9
Autunnale	70.2	11.8	1.59	12.73	3.68
Controllo	70.6	10.9	2.87	12.08	3.55

Tabella 3.4.1.2: *Distribuzione relativa di N e resa di estrazione proteica delle frazioni ottenute mediante idrolisi enzimatica (proteasi da Bacillus licheniformis) e frazionamento di Osborne di larve di mosca soldato cresciute sul substrato "autunno" e "controllo". I risultati sono espressi come media ± deviazione standard e le differenze significative ($p < 0.05$) tra i due batch di larve sono contrassegnati da un **

	Distribuzione relative N %				% Resa di estrazione proteica			
	Autunno		Controllo		Autunno		Controllo	
Idrolisi Enzimatica								
Idrolizzato*	59	± 3	68	± 2	74	± 3	68	± 2
Pellet*	41	± 3	32	± 2				
Frazionamento Osborne								
Albumine	26	± 6	37	± 0	32	± 8	37	± 0
Globuline*	10	± 0	13	± 1	12	± 1	13	± 1
Prolamine	4	± 0	5	± 1	4	± 0	5	± 1
Gluteline	16	± 2	15	± 4	20	± 2	15	± 4
Totale					6		7	
					8		0	
Pellet	45	± 6	30	± 5				

Innanzitutto, è importante sottolineare come l'estrazione con enzima (PBL) sul campione autunnale abbia dato risultati significativamente migliori in termini di resa rispetto al metodo chimico multistep; oltretutto, si tratta anche di una tecnica "green". Non bisogna dimenticare, infatti, come l'utilizzo di solventi chimici abbia un impatto molto maggiore sull'ambiente e come pertanto sia da preferire, quando possibile, l'utilizzo di altre vie, soprattutto quando hanno rendimenti migliori.

Rispetto al frazionamento di Osborne, le proteine del campione autunno e del campione controllo hanno una resa simile in termini di quantità totale di proteine estratte, ma una distribuzione leggermente diversa in termini di frazioni, indicando una diversa solubilità di alcune componenti proteiche.

In ogni caso, tutti i metodi testati, hanno mostrato una resa proteica soddisfacente, intorno al 70%, in linea con i processi riportati in letteratura. Come step successivo, al fine di individuare il valore nutrizionale degli estratti proteici ottenuti, è stata determinata la composizione amminoacidica, come riportato nell'attività 3.2.2. I risultati ottenuti sono riportati nelle seguenti tabelle, da cui si può notare che esistono alcune differenze tra la composizione in amminoacidi essenziali delle diverse frazioni, ma tuttavia, salvo poche eccezioni (es leucina), tutte superano i valori di riferimento.

Tabella 3.4.1.3 Profilo in amminoacidi essenziali (espresso come mg AA/g proteina) delle larve di mosca soldato cresciute sul substrato "autunno" e delle frazioni proteiche ottenute mediante idrolisi enzimatica e frazionamento di Osborne, confrontato con quelli della proteina di riferimento per la nutrizione umana, l'albumine d'uovo e la soia.

	Insetto TQ	Idrolizzato enzimatico	Osborne Albumine	Osborne Globuline	Osborne Prolammine	Osborne Gluteline	Proteina riferimento	Albumine d'uovo	Soia
His	43	42	68	116	49	60	15	22	25
Thr	49	43	43	33	36	44	23	47	38
Val	73	77	60	40	70	68	39	68	43
Lys	59	70	90	40	110	85	45	70	63
Ile	52	50	44	40	51	54	30	53	47
Leu	78	70	60	44	51	75	59	88	85
Phe+Tyr	111	79	75	87	70	139	38	91	97
Met+Cys	42	35	36	50	35	30	22	66	68
Trp	20	19	15	14	19	14	6	14	11

Tabella 3.4.1.4: Profilo in amminoacidi essenziali (espresso come mg AA/g proteina) delle larve di mosca soldato cresciute sul substrato "controllo" e delle frazioni proteiche ottenute mediante idrolisi enzimatica e frazionamento di Osborne, confrontato con quelli della proteina di riferimento per la nutrizione umana, l'albumine d'uovo e la soia.

	Insetto TQ	Idrolizzato enzimatico	Osborne Albumine	Osborne Globuline	Osborne Prolammine	Osborne Gluteline	Proteina riferimento	Albumine d'uovo	Soia
His	44	56	63	133	207	71	15	22	25
Thr	49	46	48	42	20	41	23	47	38
Val	70	75	62	45	16	67	39	68	43
Lys	65	79	87	149	261	92	45	70	63
Ile	47	53	45	42	21	51	30	53	47
Leu	74	74	67	59	17	72	59	88	85
Phe+Tyr	101	80	76	117	135	128	38	91	97
Met+Cys	42	40	43	44	58	33	22	66	68
Trp	18	14	13	15	15	19	6	14	11

Produzione di chitina, chitosano e glucosammina

La chitina è un polisaccaride totalmente insolubile e quindi lo si ritrova nel pellet residuo dopo l'estrazione proteica, insieme ad una frazione minerale e al residuo di proteine insolubili che non vengono estratte. Per valutare la quantità di proteine residue nel pellet è stata fatta l'analisi degli amminoacidi totali. I risultati sono riportati in tabella 3.4.1.5

Tabella 3.4.1.5: Composizione amminoacidica del residuo proteico presente nel pellet ad alto contenuto di chitina (g/100 pellet tal quale)

	Controllo enzima	Autunno enzima	Controllo Osborne	Autunno Osborne
ala	0.349	0.48	0.282	0.368
asp	0.504	0.88	0.359	0.632
arg	0.429	0.52	0.334	0.382
gly	0.272	0.40	0.272	0.328
his	0.404	0.46	0.395	0.372

ile	0.235	0.46	0.207	0.285
leu	0.357	0.71	0.305	0.463
met	0.136	0.18	0.066	0.061
phe	0.277	0.47	0.198	0.268
pro	0.224	0.31	0.228	0.271
ser	0.191	0.30	0.163	0.243
thr	0.232	0.40	0.178	0.261
val	0.287	0.54	0.308	0.421
lys	0.519	0.71	0.385	0.480
tyr	0.251	0.44	0.257	0.407
glu	0.252	0.52	0.141	0.277
sum	4.918	7.79	4.077	5.519

Il residuo proteico nel pellet ad alto contenuto di chitina risulta maggiore in generale nei campioni di insetti cresciuti su substrati autunnali. Tuttavia, dopo trattamento di demineralizzazione in ambiente acido e di deacetilazione in soda concentrata, si è ottenuto in entrambi i casi un chitosano con un residuo proteico inferiore allo 0,1% e con un grado di acetilazione residuo di circa il 20%, determinato mediante 1H NMR (Figura 4.3.1.1). Queste caratteristiche sono confrontabili con quelle di chitosano commerciale ottenuto da lieviti o da gusci di crostacei, dimostrando la possibilità di utilizzare il chitosano da insetti cresciuti sui substrati del progetto come alternativa a questi ultimi.

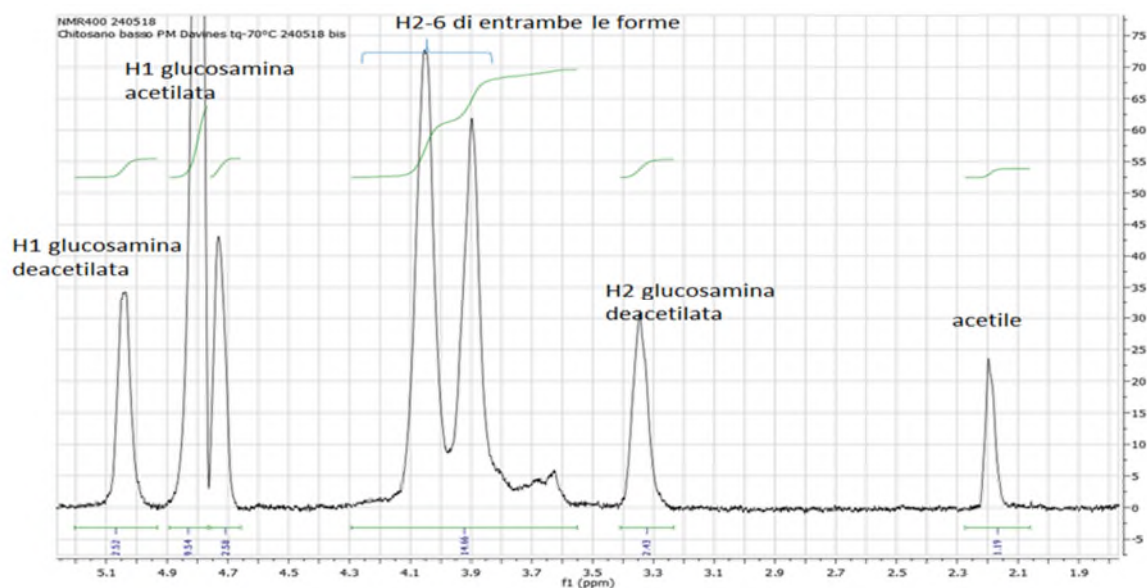


Figura 4.3.1.1: Spettro 1H NMR del chitosano ottenuto da insetti cresciuti sul substrato autunnale. Il calcolo del grado di acetilazione viene fatto integrando i segnali del gruppo acetile e della glucosammina deacetilata. La purezza è dimostrata dall'assenza di segnali importanti nello spettro diversi da quelli del chitosano.

Il chitosano è stato quindi utilizzato come materia di partenza per la produzione di glucosammina mediante idrolisi acida in acidi concentrati e ad alta temperatura. La resa in glucosammina nelle diverse condizioni di idrolisi acida testate è riportata in tabella 3.4.1.6

Tabella 3.4.1.6: Resa % in glucosammina ottenuta idrolizzando in diverse condizioni il chitosano ottenuto dal campione di insetti cresciuti sul substrato autunnale

Prova	Acido (N)	Tempo	Temperatura	Resa
1	HCl 8 N	2h	110 °C	42,60
2	HCl 8 N	3h	110 °C	59,46
3	HCl 8 N	4h	110 °C	22,3
4	HCl 8 N	6h	110 °C	20,96
5	TFA 2N	1h	110 °C	nd
6	TFA 2N	2h	110 °C	0,19
7	TFA 2N	3h	110 °C	0,04
8	TFA 2N	4h	110 °C	0,18
9	TFA 2N	5h	110 °C	0,41
10	TFA 2N	6h	110 °C	0,16
11	HCl 6N	23h	110 °C	32,5

Come notiamo le rese ottenute dall'idrolisi effettuata con TFA sono molto basse, questo può essere spiegato dal fatto che l'acido trifluoroacetico essendo un acido debole non sia in grado di rompere i legami glicosidici β 1-4 che unisce le molecole di glucosammina per formare il polisaccaride.

Invece le idrolisi effettuate con HCl hanno mostrato una resa nettamente superiore ma considerando le rese delle idrolisi ora per ora, notiamo che la quantità di chitina idrolizzata cresce dalle 2 ore alle 3 ore per poi ridursi drasticamente dalle 4h di idrolisi in poi. Questo comportamento è dovuto all'effetto di degradazione degli zuccheri in ambiente acido, che porta quindi ad un prodotto non puro contenente glucosammina e relativi prodotti di degrado. Per ovviare a questo problema si ritiene necessario procedere in futuro utilizzando sistemi di idrolisi diversi, ad esempio con enzimi ad azione chitinolitica, in modo da evitare o comunque

CONCLUSIONI

Sono state messe a punto diverse tecniche di estrazione della frazione proteica dalle prepupae di mosca soldato in condizioni mild, in modo da ottenere frazioni proteiche intatte da un punto di vista nutrizionale. Sia il metodo basato sulle attività enzimatiche che il metodo chimico multistep hanno dato ottime rese di estrazione proteica (circa il 70%). Le frazioni ottenute presentano tutte una composizione amminoacidica il linea con le raccomandazioni nutrizionali in termini di amminoacidi essenziali e sono confrontabili con le proteine della soia e dell'uovo.

Il pellet ricco di chitina, opportunamente trattato e purificato costituisce un ottimo substrato per la produzione di chitosano con composizione simile ai benchmark commerciali. Per quanto riguarda la produzione di glucosammina sarà invece necessario ottimizzare il processo produttivo al fine di evitarne il degrado durante il trattamento di idrolisi in ambiente acido

Attività 3.4.2 Messa a punto di metodologie per lo studio dei lipidi

Uar: UNIMORE

OBIETTIVI

Questa attività ha lo scopo di valutare la capacità di *H. illucens* di crescere su sottoprodotti dell'industria alimentare, valutando il suo profilo lipidico in funzione del substrato. Per fare questo è necessario avere un metodo analitico che non provochi artefatti e sia robusto.

L'estrazione dei lipidi è stata effettuata con il classico metodo Folch per i tessuti animali; la composizione di acidi grassi è stata effettuata sugli esteri metilici ottenuti con diversi metodi per valutare le frazioni libere e legate mediante GC-FID.

Inoltre, la tecnica di soppressione degli insetti è stata valutata in relazione alla stabilità dei trigliceridi.

MATERIALI E METODI

Campionatura

Nei laboratori di ricerca di Entomologia, presso l'Università di Modena e Reggio Emilia, sono stati testati 9 diversi substrati di rifiuti alimentari per l'allevamento di *H. illucens*. Per ciascun substrato è stato prelevato un campione omogeneo di larve e prepupae del peso di circa 10 grammi per l'analisi (cfr. Attività 3.2.3 Caratterizzazione delle biomasse da insetti - Frazione lipidica).

Metodo per l'estrazione di *H. illucens*

Ottimizzazione del metodo

Il metodo di estrazione dei lipidi è stato ottimizzato per la matrice a partire dal classico metodo descritto da Folch et.al (1957) per l'estrazione di lipidi da diversi tessuti animali.

Un omogeneizzatore Ultraturrax è utilizzato specificamente per l'omogeneizzazione del campione. È considerata una buona alternativa a più efficace del pestello di Folch, poiché riesce perfettamente a distruggere tutti i tessuti degli insetti, incluso l'esoscheletro degli insetti.

Folch J., Lees M., Stanley G.H.S (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem. 226:497-509.

Analisi degli acidi grassi

La transesterificazione è un passaggio fondamentale e critico per l'analisi dei grassi. Sono state valutate due tecniche che forniscono informazioni diverse. La prima consisteva nella transesterificazione catalizzata da basi e la seconda utilizzava invece una catalisi acida. Nel primo caso si derivatizzano e quindi si quantificano solo gli acidi grassi legati (principalmente trigliceridi); nel secondo la derivatizzazione è completa (liberi e legati). I metodi sono stati convalidati valutandone linearità, limite di rilevazione, limite di quantificazione, recuperi e ripetibilità.

Studio sul tipo di soppressione prepupae

La valutazione dell'effetto della soppressione di prepupae sulla quantità di frazione libera e legata di acidi grassi, sono stati studiati tre diversi tipi di soppressione. Una prima aliquota di prepupae è stata congelata (i), un'altra è stata gettata in acqua bollente (ii) e l'ultima è stata direttamente omogeneizzata all'atto dell'estrazione.

RISULTATI

Concentrazione di acidi grassi in relazione al tipo di soppressione prepupae

Al fine di valutare come il profilo lipidico viene modificato alla soppressione dell'insetto, sono stati eseguiti i test descritti nella sezione precedente. In particolare, è stato studiato come la relazione tra acidi grassi liberi e legati varia con la variazione della morte degli insetti. I campioni sono stati analizzati in duplicato, nelle stesse condizioni e con lo stesso strumento come descritto nell'Attività 3.2.3 Caratterizzazione delle biomasse da insetti - Frazione lipidica. I risultati dei test sono mostrati nella figura 3.4.2.1. Dove si vede chiaramente come la soppressione mediante congelamento provoca la distruzione dei tessuti a causa dell'aumento del volume d'acqua. Quando le prepupae vengono scongelate, gli enzimi lipolitici entrano in contatto coi trigliceridi provocandone l'idrolisi ed il conseguente aumento di acidi grassi liberi. Nel caso degli altri due tipi di soppressione, i risultati sono quasi simili. I valori sono molto più bassi perché le reazioni enzimatiche sono state inattivate dal calore mediante acqua bollente o, nel terzo caso, le reazioni enzimatiche sono inibite dalla rapidità dell'estrazione e dall'azione del metanolo che probabilmente favorisce l'inattivazione degli enzimi.

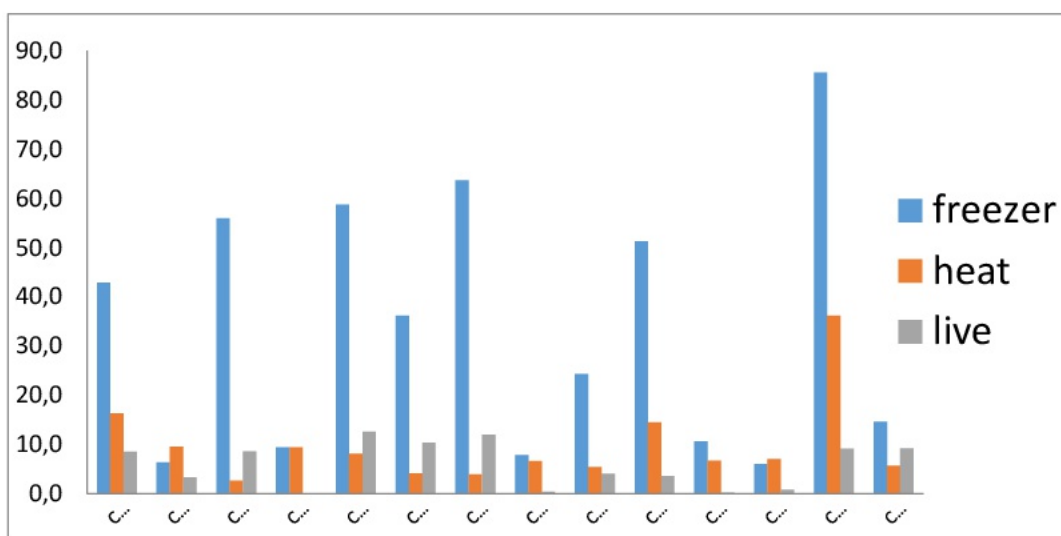


Fig 3.4.2.1. Acidi grassi liberi (%) ottenuti con i diversi tipi di soppressione.

Tuttavia, i campioni reali allevati sui diversi substrati sono stati soppressi con la tecnica del congelamento, poiché è l'approccio il più appropriato per il benessere degli animali. Inoltre, l'obiettivo principale di questa azione è lo studio delle modificazioni degli acidi grassi in conseguenza della diversa alimentazione.

CONCLUSIONI

È stato sviluppato e validato un nuovo metodo di estrazione lipidica su campioni di prepupae di *H. illucens*. I risultati di linearità, recuperi, limiti di quantificazione e ripetibilità sono stati tutti soddisfacenti e mostrano una buona metodologia adatta per lo studio di lipidi da insetti. Tuttavia questa tecnica non è applicabile a grandi quantità di insetti per il costo e l'impatto ambientale dei solventi. In futuro sono auspicabili altri studi per la messa a punto di un metodo di estrazione lipidica senza l'uso di solventi.

Attività 3.4.3 Valutazione agronomica del compost

Uar: Astra

OBIETTIVI

L'obiettivo generale dell'attività svolta, in un'ottica di economia circolare, era quello di valorizzare i sottoprodotti delle filiere agroalimentari, sfruttando le potenzialità delle "mosche soldato" (Black Soldier Fly, *Hermetia illucens* L.), per ricavare prodotti ad elevato valore energetico, impiegabili poi per scopi alimentari e/o mangimistici, come combustibili e come fertilizzanti e/o ammendanti per l'agricoltura.

In particolare le mosche soldato (MS) sono insetti non infestanti le cui larve hanno la capacità di accrescersi su vari tipi di substrati organici, nello specifico scarti del settore agroalimentare, convertendone grandi quantitativi in biomassa, costituita dalle larve stesse e ricca in grassi e proteine.

Gli obiettivi specifici dell'Azione 3.4.3 hanno riguardato proprio la verifica della possibilità di sfruttamento nel settore agricolo di sottoprodotti di alcune importanti filiere vegetali, come quella olivicola (sanse, ecc.), ortofrutticola (buccia di pomodoro, bucce di frutta, sottoprodotti della lavorazione della IV Gamma, ecc.), vitivinicola (vinacce, fecce, raspi, ecc.) e maidicola, sottoposti all'azione della Mosca Soldato.

Tali substrati costituiscono infatti un prodotto organico ben dotato in elementi della fertilità, Azoto in particolare, ma anche Fosforo e Potassio, con un buon rapporto C/N e privo di problematiche microbiologiche. Di questi prodotti si è provveduto quindi a valutare l'effettiva efficacia fertilizzante.

MATERIALI E METODI

I prodotti derivanti dagli scarti dell'industria agroalimentare utilizzati per l'allevamento massale delle Mosche Soldato di cui è stata verificata l'effettiva efficacia funzionalità come fertilizzanti e/o ammendanti nel settore agricolo sono stati:

- ✓ **Substrato composto da matrici organiche con disponibilità annuale:** costituito prevalentemente da scarti della lavorazione di frutta e ortaggi come mele, meloni, kiwi, mango ed ananas. Questo tipo di substrato presenta il vantaggio di garantire un approvvigionamento continuo alla filiera durante tutto l'arco dell'anno. Dai test di laboratorio è risultato che il "mix" ottimale per questo tipo di matrice organica è composto per il 70% da sottoprodotti della lavorazione del melone e per il restante 30% da quelli del mango. Il tempo necessario alle larve di *Helmetia* per completare la trasformazione di questo substrato è stato di circa 45 giorni;
- ✓ **Substrato composto da matrici organiche con disponibilità primaverile-estiva** (periodo maggio-agosto): è costituito da scarti provenienti dalla lavorazione di pesche, pomodoro (bucce, semi, ecc.) e da "substrato annuale", le cui caratteristiche sono state precedentemente riportate. Le prove di laboratorio hanno certificato che per questo tipo di substrato il "mix" ideale di matrici è composto per l'80% da sottoprodotti della lavorazione del pomodoro e per il 20% da quelli delle pesche. Il tempo necessario per la trasformazione di questo substrato è risultato inferiore ai 40 giorni;
- ✓ **Substrato composto da matrici organiche con disponibilità autunnale -invernale** (periodo settembre-dicembre): è costituito da sottoprodotti del grano, legumi, e da "substrato annuale", matrice precedentemente descritta, e da scarti di lavorazione del settore vinicolo (vinacce, ecc.). I test di laboratorio hanno attestato che per questa matrice il "mix" ideale è composto per il 35% dal substrato annuale, il 25% da legumi, il 20% da vinacce ed il 20% da grano. I tempi necessari per la trasformazione del substrato si sono rivelati piuttosto brevi, con un "range" approssimativamente oscillante tra i 19-20 giorni circa.

Risulta evidente come la disponibilità di questi substrati sottoposti all'azione della Mosca Soldato sia direttamente correlata all'andamento stagionale e quindi, secondariamente, alla disponibilità delle materie prime. In particolare, per quanto riguarda l'attività inerente all'azione 3.4.3, i quantitativi "finiti" di biomassa organica impiegabili come fertilizzante e/o ammendante sono stati i seguenti:

Tabella 3.4.3.1: quantitativi di matrici organiche ottenute dall'azione delle larve di MS disponibili per prove agronomiche

Tipologia substrato	Quantità substrato residuo (g)	Quantità larve mature (g)	Quantità prepupe (g)
Annuale Totale	19748.45	1451.093	4.323
Estivo Totale	19889.101	2179.898	91.868
Autunnale Totale	2716.04	687.96	18.03
Controllo Totale	11939.23	1471.28	12.86

Come tesi di "controllo" è stata impiegata la "dieta di Gainesville", substrato già testato in precedenti attività di sperimentazione, composto da Crusca (50%), farina di Mais (20%) e farina di alfalfa (30%).

Considerando i quantitativi diversificati delle tesi in valutazione (substrato annuale, estivo e autunnale), e per consentire una completa caratterizzazione agronomica dei materiali, si è pensato di miscelarli in un unico campione per ottenere quantitativi più consistenti e significativi. In Tabella 3.4.3.2 vengono riportate le principali caratteristiche chimiche del substrato finale ottenuto.

Tabella 3.4.3.2: principali caratteristiche del substrato ottenuto dalla miscelazione delle 3 matrici organiche in valutazione (substrato a disponibilità attuale, substrato a disponibilità primaverile estiva, substrato a disponibilità autunnale-invernale).

Parametri rilevati	Valori
N totale %	4,0
N organico %	3,3
P2O5 %	4,6
K2O	3,8
C/N	7,4

Le prove agronomiche sono state condotte su lattuga.

Presso il centro Aziendale del "Mario Neri" di Imola (Unità Operativa di ASTRA Innovazione e Sviluppo di Faenza) sono stati quindi realizzati 2 cicli di coltivazione in epoca autunnale.

I trapianti sono stati eseguiti rispettivamente il 1 ottobre 2019 ed il 18 ottobre 2019. Per limitare gli effetti "ambientali", come precipitazioni, vento, sbalzi termici ed eventuali problematiche causate da patogeni tellurici, si è pensato di impostare entrambi i cicli di coltivazione in coltura protetta, con trapianti effettuati in vaso (1 pianta per vaso). Per garantire la massima uniformità delle piante, su ogni vaso le somministrazioni idriche sono state effettuate tramite impianto di irrigazione a goccia.

L'attività è stata svolta in serra a parete verticale, dotata di bruciatori per il riscaldamento, finestre laterali ad apertura meccanizzata e ventole al colmo per l'arieggiamento della struttura.

Per le prove è stato adottato uno schema sperimentale a blocchi randomizzati, con 10 ripetizioni/tesi.

Per ciascuna prova sono state valutate 7 tesi. Ogni tesi era composta da 10 piante rappresentanti ciascuna una replica.

Per entrambi i cicli di coltivazione viene di seguito riportato l'elenco delle tesi in osservazione:

- ✓ **Tesi 1:** mix di substrato annuale, primaverile-estivo ed autunno-invernale (33% di ciascuna matrice) addizionate a torba in quantitativi del 5%;
- ✓ **Tesi 2:** mix di substrato annuale, primaverile-estivo ed autunno-invernale (33% di ciascuna matrice) addizionate a torba in quantitativi del 10%;
- ✓ **Tesi 3:** mix di substrato annuale, primaverile-estivo ed autunno-invernale (33% di ciascuna matrice) addizionate a torba in quantitativi del 15%;
- ✓ **Tesi 4:** substrato di controllo (Dieta di Gainesville) addizionato alla torba bruna in quantitativi del 5%;
- ✓ **Tesi 5:** substrato di controllo (Dieta di Gainesville) addizionato alla torba bruna in quantitativi del 10%;
- ✓ **Tesi 6:** substrato di controllo (Dieta di Gainesville) addizionato alla torba bruna in quantitativi del 15%;
- ✓ **Tesi 7:** substrato torba senza apporti di fertilizzanti;

Complessivamente per ogni ciclo di coltivazione sono stati impiegati 350 vasi. Le raccolte sono state eseguite il 10 dicembre 2019 ed il 27 dicembre 2019

RISULTATI

Di seguito vengono riportati i risultati produttivi ottenuti

Tabella 3.4.3.3 : Peso medio dei cespi di lattuga espresso in grammi e suddiviso per tesi e replicazioni (trapianto del 1 ottobre)

REPLICA	Dieta di Gainesville 5%	Dieta di Gainesville 10%	Dieta di Gainesville 15%	Mix 3 matrici organiche 5%	Mix 3 matrici organiche 10%	Mix 3 matrici organiche 15%	Test non concimato
1	210	240	280	160	180	200	110
2	230	280	280	160	150	200	120
3	230	260	280	160	210	170	120
4	230	220	260	180	220	170	140
5	240	250	270	200	200	200	150
MEDIA	228	250	274	172	192	188	128

Grafico 3.4.3.1: Peso medio dei cespi di lattuga espresso in grammi e suddiviso per tesi e replicazioni (trapianto 1 ottobre)

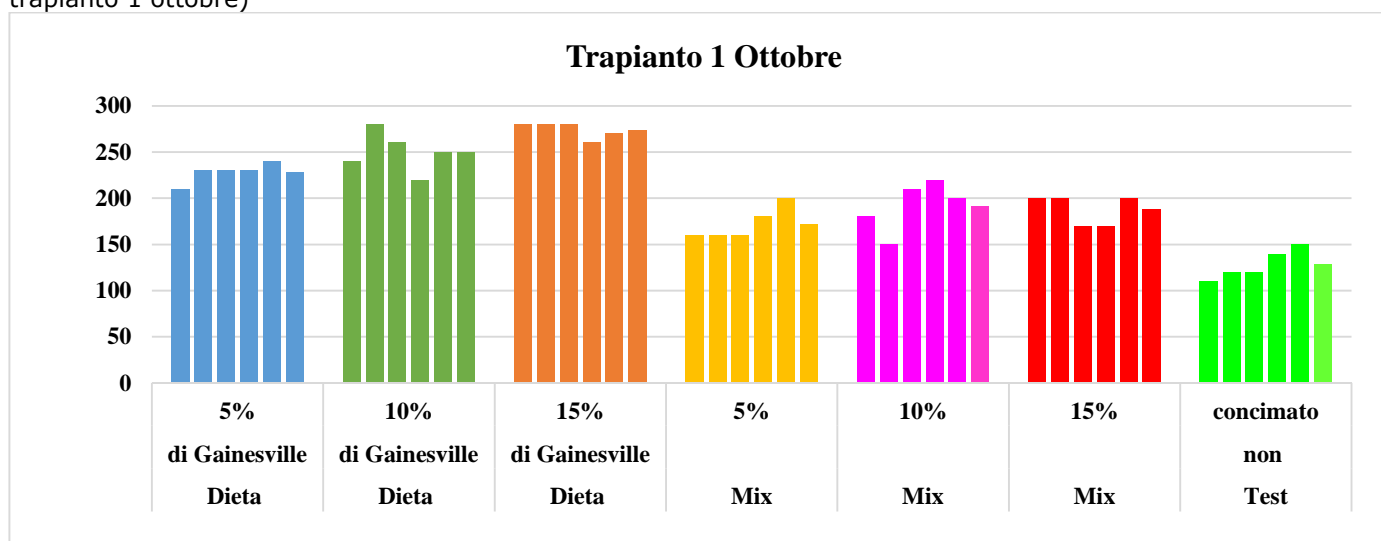


Tabella 3.4.3.4 : Peso medio dei cespi di lattuga espresso in grammi e suddiviso per tesi e replicazioni (Trapianto del 18 ottobre).

REPLICA	Dieta di Gainesville 5%	Dieta di Gainesville 10%	Dieta di Gainesville 15%	Mix 3 matrici organiche 5%	Mix 3 matrici organiche 10%	Mix 3 matrici organiche 15%	Test non concimato
1	140	200	220	160	170	180	120
2	140	160	200	160	180	180	130
3	160	240	220	200	180	180	120
4	180	160	200	160	180	200	150
5	160	180	180	160	180	180	140
MEDIA	156	188	204	168	178	184	132

Grafico 3.4.3.2: Peso medio dei cespi di lattuga espresso in grammi e suddiviso per tesi e replicazioni (Trapianto 18 ottobre)

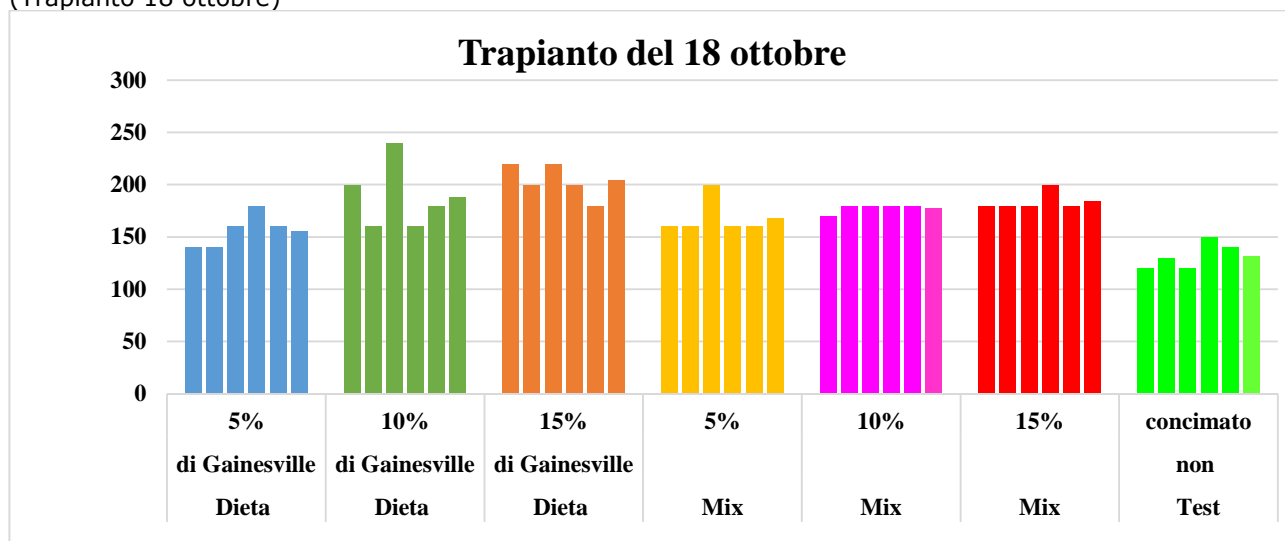


Tabella 3.4.3.5 : Rese medie espresse in t/ha in funzione del ciclo di produzione e delle diverse tesi in osservazione

TESI	Trapianto 1 ottobre (t/ha)	Trapianto 18 ottobre (t/ha)	MEDIA
Dieta di Gainesville 5%	19,38	13,26	16,3
Dieta di Gainesville 10%	21,25	15,98	18,6
Dieta di Gainesville 15%	23,29	17,34	20,3
Mix 5%	14,62	14,28	14,5
Mix 10%	16,32	15,13	15,7
Mix 15%	15,98	15,64	15,8
Test non concimato	10,88	11,22	11,1

Grafico 3.4.3.3 : Riepilogo produzioni espresse in t/ha nei 2 cicli di coltivazione suddivise per tesi

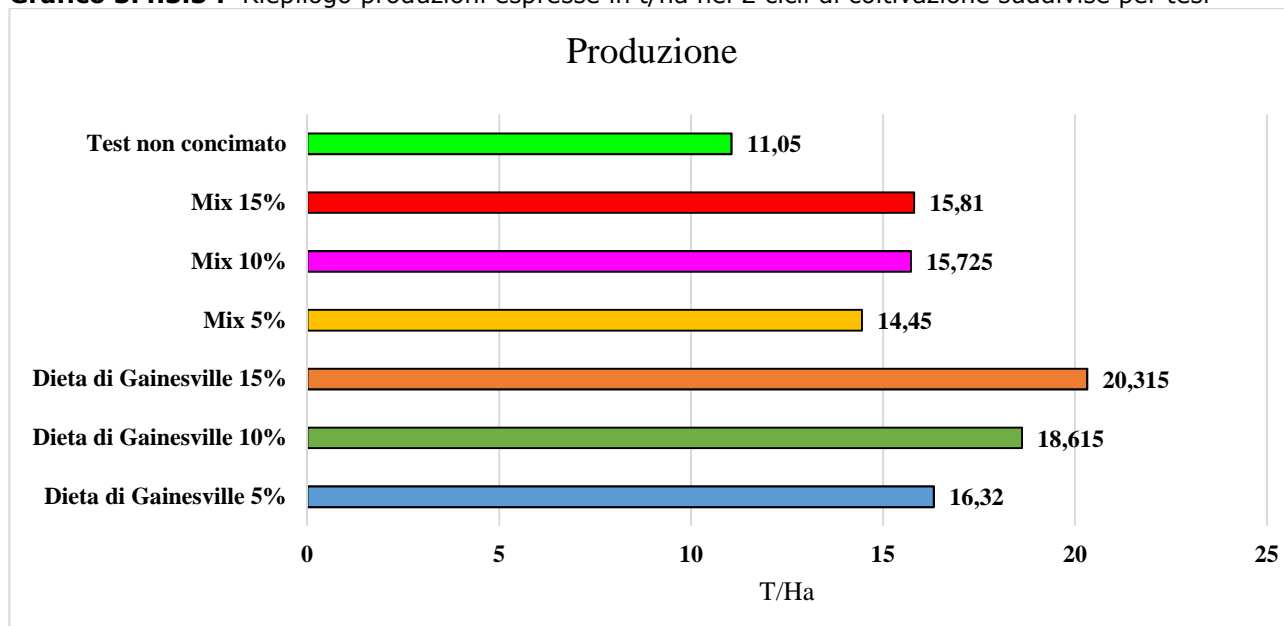
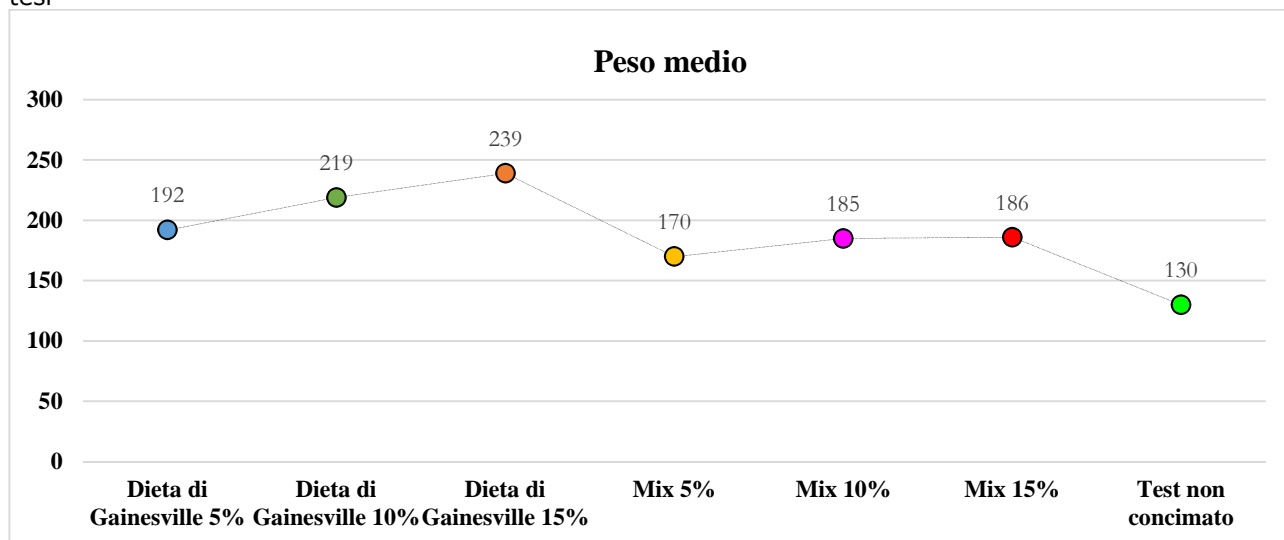


Grafico 3.4.3.4 : Riepilogo pezzatura cespi espressa in grammi nei 2 cicli di coltivazione suddivise per tesi



I risultati ottenuti sono da considerare complessivamente significativi ed attendibili.

A livello generale si può innanzitutto affermare che tutte le matrici utilizzate, indipendentemente dalle percentuali in cui sono state addizionate alla torba, non hanno causato "tossicità" alle piante; non sono state infatti rilevate sintomatologie particolari a carico degli apparati vegetativi e la mortalità dei cespi è risultata pressoché nulla.

Entrando nel dettaglio, il "rendimento" della tesi che prevedeva l'impiego della "Dieta di Gainesville" ha condotto, indipendentemente dalla percentuale di prodotto addizionato, ad un tendenziale aumento delle pezzature dei cespi e delle rese produttive; l'andamento apparso comunque più marcato nel primo ciclo di coltivazione, con messa a dimora delle piante il 1° ottobre (Tabella 3.4.3.3 e 3.4.3.4, Grafico 3.4.3.1 e 3.4.3.2, Tabella 3.4.3.5, Grafico 3.4.3.3 e 3.4.3.4).

Dai dati ottenuti si evidenzia inoltre come, per questa matrice organica, i migliori risultati si ottengano con apporti del 15% del prodotto, con cespi di pezzatura media di 274 grammi nel primo ciclo di coltivazione e di 204 nel secondo ciclo.

Simile, a grandi linee, anche il comportamento fornito dal substrato composto dal "mix" di matrici organiche ottenute come prodotto dell'attività larvale della Mosca Soldato.

Questa tesi pur fornendo un rendimento complessivo tendenzialmente inferiore al "controllo" ha confermato la massima efficacia con % addizionate comprese tra il 10 ed il 15%.

L'efficacia delle matrici organiche valutate è ulteriormente confermata, indipendentemente dai quantitativi apportati, dal rendimento costantemente superiore evidenziato da queste tesi nei confronti del "testimone" non concimato; in entrambi i cicli di coltivazione, infatti, le piante allevate su torba a zero apporti di matrici organiche si sono mantenute su livelli produttivi e di pezzatura costantemente inferiori.

CONCLUSIONI

A seguito delle prove condotte con due cicli di coltivazione, le indicazioni ottenute possono essere considerate piuttosto significative. Le prove effettuate su lattuga sono state eseguite in vaso ed in coltura protetta per limitare gli effetti "ambientali", uniformare quanto possibile le condizioni di coltivazione ed ottenere quindi dati più attendibili e comparabili nel tempo.

Le matrici organiche di cui è stata valutata l'efficacia fertilizzante erano tre (substrato a disponibilità autunnale, a disponibilità primaverile-estiva ed autunno-invernale) e per eseguirne una completa caratterizzazione su quantitativi di una certa entità, sono state riunite in un unico "mix organico", distribuito al substrato di coltivazione in diverse %.

La tesi in osservazione è stata posta a confronto con una matrice organica di riferimento, Dieta di Gainesville, prodotto già utilizzato per altre attività sperimentali e con un testimone a zero apporti fertilizzanti.

I risultati ottenuti, in entrambe le prove eseguite, hanno confermato la validità delle matrici organiche valutate. La Dieta di Gainesville ha portato ad un costante incremento di pezzatura e di rese produttive, rispetto alle altre tesi in osservazione; i migliori risultati sono stati ottenuti con forniture del 15%.

Il mix di matrici organiche, provenienti dall'attività delle Mosche Soldato, hanno portato ad un andamento produttivo sostanzialmente in linea con quanto emerso utilizzando la Dieta di Gainesville, pur con rese e pezzature tendenzialmente inferiori; anche per questi substrati i migliori risultati sono stati ottenuti con forniture comprese tra il 10 ed il 15%.

Il test "non concimato" ha raggiunto livelli produttivi considerevolmente inferiori rispetto a quelli forniti dalle matrici organiche in osservazione, indipendentemente dalle loro % di utilizzo.

Interessante notare come l'apporto delle matrici organiche, Mix di substrati e Dieta di Gainesville, non abbia portato a fenomeni di tossicità a carico delle piante; radici e cespi non hanno evidenziato sintomatologie particolari e in entrambi i cicli produttivi non sono stati rilevate fallanze significative.

Sotto-azione 3.5. Valutazioni di sostenibilità ambientale ed economica dei processi e prodotti (LCA-LCC)

Uar: UNIMORE

OBIETTIVI

Quantificare la sostenibilità ambientale ed economica di soluzioni per la bioconversione degli scarti delle filiere agroalimentari in composti ad alto valore nutrizionale, nell'ottica di individuare i principali percorsi verso possibili miglioramenti del sistema intervenendo, per esempio, sulla scelta del substrato e su possibili scenari di uso e fine vita.

MATERIALI E METODI

L'analisi LCA è stata condotta in conformità alla serie di norme UNI EN ISO 14040: 2006 e UNI EN ISO 14044:2006 utilizzando il codice di calcolo SimaPro 8.5 (PRè, 2014) e la valutazione degli impatti è stata effettuata con il metodo IMPACT 2002+ (Jolliet, 2003).

L'unità funzionale è rappresentata dal contenuto totale di lipidi, proteine e chitina ottenuti dall'estrazione delle larve mature allevate su tre differenti substrati ottenuti da alcune importanti filiere vegetali.

La composizione dei tre substrati vegetali analizzati è riportata nella tabella seguente:

Codice substrato	Nome Substrato	Composizione
S1	Annuale	70% melone + 30% mango
S2	Estivo	80% pomodoro + 20% pesca
S3	Autunnale	35% S1+ 25% legumi + 20% residui lavorazione olive + 10% mais

I confini del sistema comprendono la raccolta dei sottoprodotti vegetali e la trasformazione in substrato per l'allevamento delle larve; allevamento di larve su substrati organici; operazioni per l'isolamento di lipidi, proteine denaturate e chitina (energie, emissioni, risorse) dalle larve mature ottenute dalla fase precedente di allevamento; uso e fine vita dei prodotti. Inoltre, sono state considerate le energie necessarie, i materiali, il fabbisogno di acqua, le principali attrezzature con il loro fine vita, le energie necessarie, i trasporti, gli scarti con il loro fine vita, le emissioni in aria, i relativi impianti di aspirazione e depurazione, il recupero e riutilizzo di alcuni solventi.

La tabella seguente riporta i principali parametri della fase di allevamento:

Parametro	Substrato S1	Substrato S2	Substrato S3	Unità di misura
Peso di 1 larva	0,163	0,185	0,298	g
Quantità di substrato per vassoio	8400	4997	8310	g
Numero di vassoi utilizzati	4	9	1	-
Percentuale di riduzione del substrato	34,00	56,00	65,00	%
Substrato residuo per vassoio	5538,46	2210,13	2934,42	g
Numero di larve prodotte	2221,165	1316,943	2305,169	-
Durata allevamento	11	10	9	giorno
Percentuale di mortalità della larva	7,29	4,23	2,08	%

Prima di estrarre la parte organica delle larve mature queste vengono congelate a -20°C e macinate. L'impianto che permette l'estrazione è il bioconvertitore che è stato realizzato nell'ambito del progetto finanziato grazie al POR-FESR 2014-2020, (VALORIBIO). La resa di reazione dell'estrazione dei lipidi e proteine è risultata essere del 70% e dai dati sperimentali del presente progetto si sono ottenuti le seguenti informazioni:

- per la sgrassatura (ottenimento della parte lipidica) a 200 g di larve si aggiungono 400 mL di etere di petrolio (rapporto 1:2) e l'estrazione viene ripetuta due volte.
- per l'ottenimento delle proteine è stata considerata l'estrazione enzimatica, la quale rispetto a quella convenzionale analizzata nell'ambito di un precedente progetto finanziato dal POR-FESR 2014-2020, (VALORIBIO), è risultata essere più ambientalmente sostenibile. In particolare, a 6 g larve sgrassate si aggiungono 30 mL buffer (Na₂HPO₄ 10 mM, pH 7.5) (rapporto 1:5) e 0.25 % di enzima (protease from *Bacillus licheniformis*).
- per l'ottenimento della frazione chitinica è stata considerata l'aggiunta di 72,92 g di HCl a 375 g di larve macinate.

RISULTATI

L'analisi degli impatti ambientali LCA verrà condotta per determinare la sostenibilità ambientale (es. Carcinogens, Non-carcinogens, Respiratory inorganics, Ionizing radiation, Ozone layer depletion, respiratory organics, Aquatic ecotoxicity, Terrestrial ecotoxicity, Terrestrial acid/nutri, Land occupation, Aquatic acidification, Aquatic eutrophication, Global warming, Non-renewable energy, Mineral extraction, Renewable energy) ed economica dei substrati selezionati (S1, S2 e S3).

Substrato S1. L'analisi dei risultati per 63,83 g di lipidi+proteine+chitina estratti ha determinato che il danno totale vale 27,0439 mPt (Fig. 3.5.1) [0,4237 mPt/g]. Il processo che genera maggior danno è il processo relativo all'allevamento delle larve per il 74,2% determinato dagli alti consumi energetici del bioconvertitore che necessita di energia continua per fare andare il gruppo frigorifero. Il danno totale è dovuto per il 38% alla categoria Resources (dovuto all'uso di acqua da fiume impiegata per la produzione

di energia idroelettrica facente parte del mix energetico italiano), per il 32% alla categoria Human Health (dovuto all'emissione di particolato < 2.5 µm generato dalla produzione di energia elettrica derivante da carbone), per il 24,62% a Climate Change (per l'emissione di CO₂) e per il 5,24% a Ecosystem Quality (dovuto all'utilizzo di cippato per la produzione di energia elettrica da biomassa).

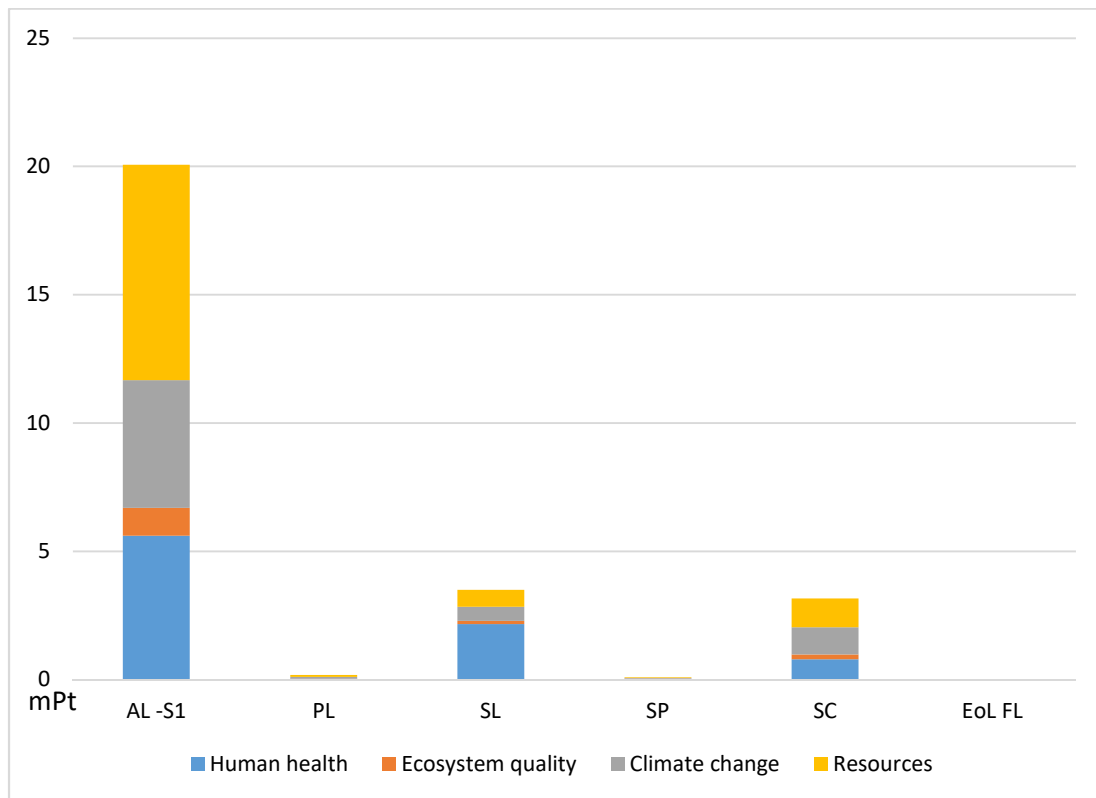


Figura 3.5.1 - Risultati LCA per impact category del sistema che permette l'estrazione di 63,83 g di lipidi+proteine+chitina con il substrato S1.

Damage category	Impact category	Unit	AL -S1	PL	SL	SP	SC	EoL FL
Human Health	Carcinogens	kg C2H3Cl eq	1,07015	0,009436	4,545326	0,015149	0,290604	0,001008
	Non-carcinogens	kg C2H3Cl eq	0,462064	0,00378	0,057341	0,007192	0,120048	0,001934
	Respiratory inorganics	kg PM2.5 eq	0,050437	0,00047	0,003484	0,000335	0,006423	2,41E-05
	Ionizing radiation	Bq C-14 eq	904,6755	8,062858	52,80378	2,152325	108,7719	0,065777
	Ozone layer depletion	kg CFC-11 eq	6,2E-06	5,35E-08	4,5E-07	2,29E-08	7,94E-07	2,34E-09
	Respiratory organics	kg C2H4 eq	0,009439	0,000104	0,003453	0,000104	0,002898	3,5E-06
Ecosystem Quality	Aquatic ecotoxicity	kg TEG water	3179,421	29,66479	291,3893	35,27931	681,822	2,52553
	Terrestrial ecotoxicity	kg TEG soil	1249,158	7,381653	57,02341	7,769398	109,3309	0,327534
	Terrestrial acid/nutri	kg SO2 eq	0,846015	0,007588	0,058749	0,003041	0,11091	0,000329
	Land occupation	m2org.arable	3,621145	0,0627	1,153848	0,031047	1,395757	0,000741
	Aquatic acidification	kg SO2 eq	0,244219	0,002185	0,016683	0,000862	0,03147	8,83E-05
	Aquatic eutrophication	kg PO4 P-lim	0,006592	5,98E-05	0,000658	0,003355	0,001126	5,29E-06
Climate change	Global warming	kg CO2 eq	49,28539	0,486742	5,378574	0,220886	10,45676	0,112958
Resources	Non-renewable energy	MJ primary	822,8361	7,305463	78,98375	3,182626	130,3477	0,159802
	Mineral extraction	MJ surplus	452,5387	3,785079	22,45593	0,567815	41,00004	0,0115

Tabella 3.5.1 Risultati LCA per impact category del sistema che permette l'estrazione di 63,83 g di lipidi+proteine+chitina con il substrato S1

Substrato S2. L'analisi dei risultati per 42,88 g di lipidi+proteine+chitina estratti ha determinato che il danno totale vale 18,95 mPt (Fig. 3.5.2) [0,4419 mPt/g]. Il processo che genera maggior danno rimane il processo relativo all'allevamento delle larve per il 75,27% determinato dagli alti consumi energetici del bioconvertitore che necessita di energia continua per fare andare il gruppo frigorifero. L'andamento dei carichi associati al danno totale rimane lo stesso infatti è dovuto per il 38,1% alla categoria Resources, per il 31,93% alla categoria Human Health, per il 24,64% a Climate e per il 5,3% a Ecosystem Quality. Inoltre, le emissioni associate sono le stesse in quanto anche in questo caso è l'energia elettrica la componente determinate sul danno complessivo.

Tabella 3.5.2 Risultati LCA per impact category del sistema che permette l'estrazione di 42,88 g di lipidi+proteine+chitina con il substrato S2

Damage category	Impact category	Unit	AL -S2	PL	SL	SP	SC	EoL FL
Human Health	Carcinogens	kg C2H3Cl eq	7,63E-01	6,34E-03	3,05E+00	1,02E-02	1,95E-01	6,77E-04
	Non-carcinogens	kg C2H3Cl eq	3,32E-01	2,54E-03	3,85E-02	4,83E-03	8,06E-02	1,30E-03
	Respiratory inorganics	kg PM2.5 eq	3,59E-02	3,16E-04	2,34E-03	2,25E-04	4,31E-03	1,62E-05
	Ionizing radiation	Bq C-14 eq	6,40E+02	5,42E+00	3,55E+01	1,45E+00	7,31E+01	4,42E-02
	Ozone layer depletion	kg CFC-11 eq	4,43E-06	3,59E-08	3,02E-07	1,54E-08	5,33E-07	1,57E-09
	Respiratory organics	kg C2H4 eq	6,80E-03	6,97E-05	2,32E-03	6,97E-05	1,95E-03	2,35E-06
Ecosystem Quality	Aquatic ecotoxicity	kg TEG water	2,27E+03	1,99E+01	1,96E+02	2,37E+01	4,58E+02	1,70E+00
	Terrestrial ecotoxicity	kg TEG soil	9,05E+02	4,96E+00	3,83E+01	5,22E+00	7,34E+01	2,20E-01
	Terrestrial acid/nutri	kg SO2 eq	5,99E-01	5,10E-03	3,95E-02	2,04E-03	7,45E-02	2,21E-04
	Land occupation	m2org.arable	2,57E+00	4,21E-02	7,75E-01	2,09E-02	9,38E-01	4,98E-04
	Aquatic acidification	kg SO2 eq	1,73E-01	1,47E-03	1,12E-02	5,79E-04	2,11E-02	5,93E-05
	Aquatic eutrophication	kg PO4 P-lim	4,68E-03	4,02E-05	4,42E-04	2,25E-03	7,56E-04	3,56E-06
Climate change	Global warming	kg CO2 eq	3,50E+01	3,27E-01	3,61E+00	1,48E-01	7,02E+00	7,59E-02
Resources	Non-renewable energy	MJ primary	5,85E+02	4,91E+00	5,31E+01	2,14E+00	8,76E+01	1,07E-01
	Mineral extraction	MJ surplus	3,19E+02	2,54E+00	1,51E+01	3,81E-01	2,75E+01	7,72E-03

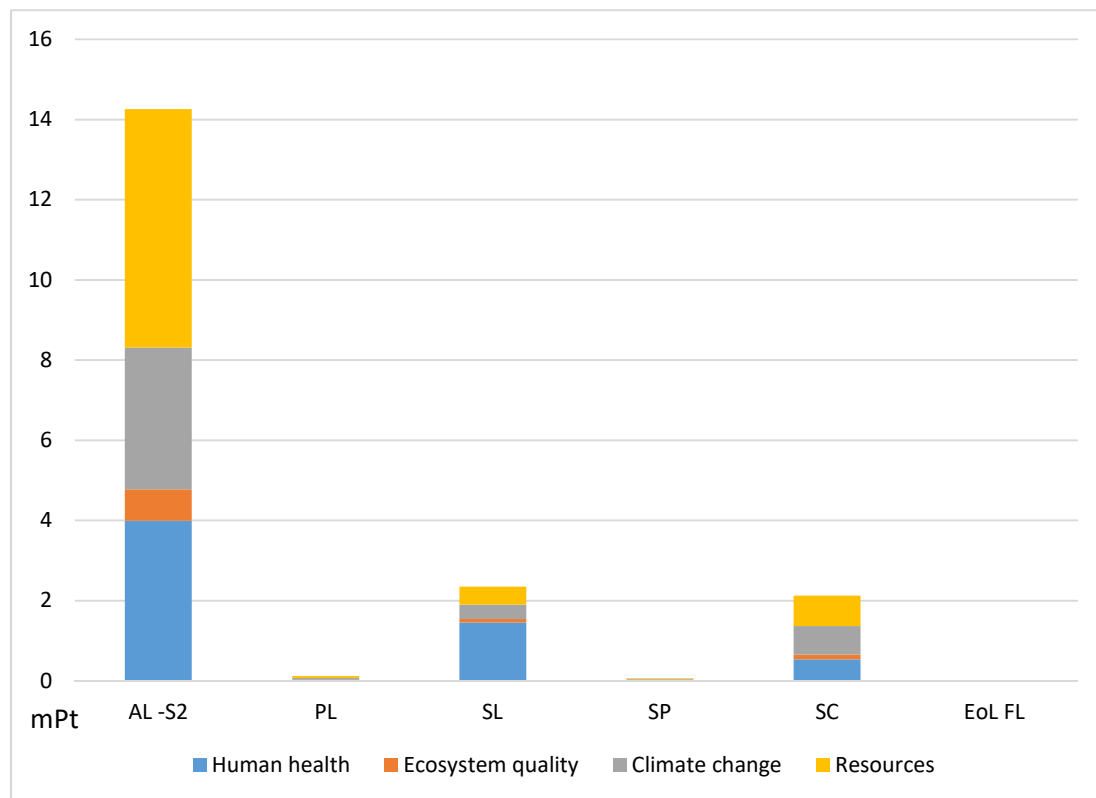


Figura 3.5.2 Risultati LCA per impact category del sistema che permette l'estrazione di 42,88 g di lipidi+proteine+chitina con il substrato S2

Substrato S3. L'analisi dei risultati per 121,04 g di lipidi+proteine+chitina estratti ha determinato che il danno totale vale 100,97 mPt (Fig. 3.5.3) [0,8314 mPt/g]. Il processo che genera maggior danno rimane il processo relativo all'allevamento delle larve per il 86,9% determinato dagli alti consumi energetici del bioconvertitore che necessita di energia continua per fare andare il gruppo frigorifero. Il danno totale è dovuto per il 39,74% alla categoria Resources, per il 30,1% alla categoria Human Health, per il 24,73% a Climate Change e per il 5,42% a Ecosystem Quality. Inoltre, le emissioni associate sono le stesse in quanto anche in questo caso è l'energia elettrica la componente determinate sul danno complessivo.

Tabella 3.5. 3 Risultati LCA per impact category del sistema che permette l'estrazione di 121,04 g di lipidi+proteine+chitina con il substrato S3

Damage category	Impact category	Unit	AL -S3	PL	SL	SP	SC	EoL FL
Human Health	Carcinogens	kg C2H3Cl eq	4,69E+00	1,79E-02	8,62E+00	2,87E-02	5,51E-01	1,91E-03
	Non-carcinogens	kg C2H3Cl eq	2,05E+00	7,17E-03	1,09E-01	1,36E-02	2,28E-01	3,67E-03
	Respiratory inorganics	kg PM2.5 eq	2,21E-01	8,91E-04	6,61E-03	6,35E-04	1,22E-02	4,58E-05
	Ionizing radiation	Bq C-14 eq	3,92E+03	1,53E+01	1,00E+02	4,08E+00	2,06E+02	1,25E-01
	Ozone layer depletion	kg CFC-11 eq	2,73E-05	1,01E-07	8,53E-07	4,35E-08	1,51E-06	4,44E-09
	Respiratory organics	kg C2H4 eq	4,22E-02	1,97E-04	6,55E-03	1,97E-04	5,49E-03	6,64E-06
Ecosystem Quality	Aquatic ecotoxicity	kg TEG water	1,40E+04	5,63E+01	5,53E+02	6,69E+01	1,29E+03	4,79E+00
	Terrestrial ecotoxicity	kg TEG soil	5,63E+03	1,40E+01	1,08E+02	1,47E+01	2,07E+02	6,21E-01
	Terrestrial acid/nutri	kg SO2 eq	3,68E+00	1,44E-02	1,11E-01	5,77E-03	2,10E-01	6,24E-04

	Land occupation	m2org.arab le	1,58E+0 1	1,19E- 01	2,19E+0 0	5,89E- 02	2,65E+0 0	1,41E- 03
	Aquatic acidification	kg SO2 eq	1,06E+0 0	4,14E- 03	3,16E- 02	1,63E- 03	5,97E- 02	1,67E- 04
	Aquatic eutrophication	kg PO4 P- lim	2,88E- 02	1,13E- 04	1,25E- 03	6,36E- 03	2,13E- 03	1,00E- 05
Climate change	Global warming	kg CO2 eq	2,16E+0 2	9,23E- 01	1,02E+0 1	4,19E- 01	1,98E+0 1	2,14E- 01
Resources	Non-renewable energy	MJ primary	3,60E+0 3	1,39E+0 1	1,50E+0 2	6,04E+0 0	2,47E+0 2	3,03E- 01
	Mineral extraction	MJ surplus	1,95E+0 3	7,18E+0 0	4,26E+0 1	1,08E+0 0	7,77E+0 1	2,18E- 02

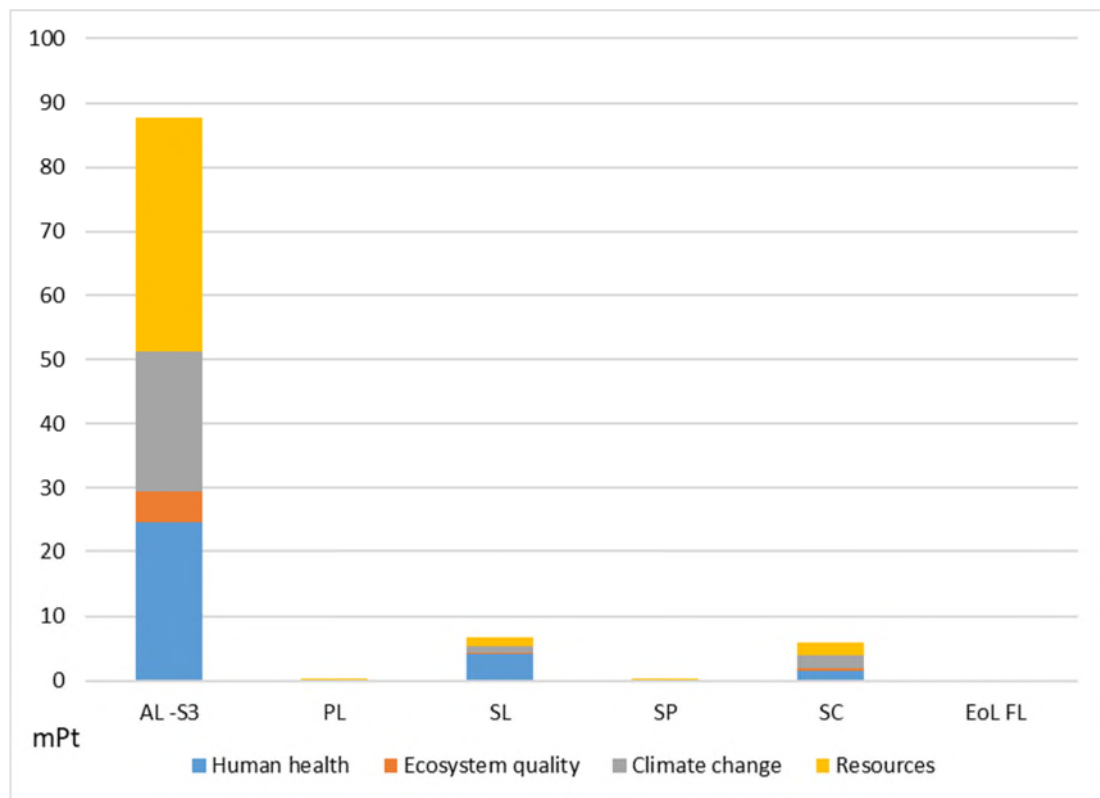


Figura 3.5.3 Risultati LCA per impact category del sistema che permette l'estrazione di 121,04 g di lipidi+proteine+chitina con il substrato S3

LEGENDA

AL - S1: Allevamento larve - S1; AL - S2: Allevamento larve - S2; AL - S3: Allevamento larve - S3; PL: Preparazione delle larve per la separazione di lipidi, proteine e chitina; SL: Separazione della frazione lipidica; SP: Separazione della frazione proteica; SC: Separazione della frazione chitinica; EoL FL: Fine vita della fase liquida.

COSTI ESTERNI

Infine, sono stati analizzati i costi esterni attraverso il metodo EPS 2015 (Steen, 2015) considerando gli stessi confini del sistema valutati nell'analisi LCA. I costi esterni, rappresentano il tentativo di tradurre in unità monetaria gli impatti ambientali. Ogni attività che produce un impatto negativo sull'ambiente comporta un danno per la società: i costi esterni sono la monetizzazione di tale danno. La volontà di pagare per ripristinare i cambiamenti ambientali è la misurazione monetaria e l'ELU (Environmental Load Unit), che corrisponde a un costo del danno ambientale di Euro, è l'unità di misura. Il costo esterno complessivo del processo di estrazione di lipidi, proteine e chitina ottenuti con i tre differenti substrati è riportato in tabella 3.5.4. Inoltre, i costi esterni affliggono le seguenti categorie di danno con stesso andamento per

tutti i tre substrati: Abiotic resources (S1: 62,85%, S2: 63,23%, S3: 63,64%), Human health (S1: 36,25%, S2: 35,89%, S3: 35,5%), Ecosystem services (S1: 0,83%, S2: 0,82%, S3: 0,8%), Access to water (S1: 0,051%, S2: 0,050%, S3: 0,0498%), Building technology (S1: 0,006992%, S2: 0,006911%, S3: 0,006688%) and Biodiversity (S1: 0,002873%, S2: 0,00284%, S3: 0,002782%).

Tabella 3.5. 4 *Externalità per damage category dei processi di ottenimento di lipidi+proteine+chitina con differenti tipi di substrato - EPS 2015dx method*

Damage category	Unit	Processo di ottenimento di lipidi+proteine+chitina con S1	Processo di ottenimento di lipidi+proteine+chitina con S2	Processo di ottenimento di lipidi+proteine+chitina con S3
Quantità di lipidi+proteine+chitina prodotta	g	63,83	42,88	121,04
Danno totale	ELU	32,446	23,006	125,678
Ecosystem services	ELU	0,271	0,190	1,011
Access to water	ELU	0,017	0,012	0,063
Biodiversity	ELU	0,001	0,001	0,003
Building technology	ELU	0,002	0,002	0,008
Human health	ELU	11,764	8,256	44,616
Abiotic resources	ELU	20,391	14,546	79,977

CONCLUSIONI

Dall'analisi dei risultati della produzione delle tre frazioni organiche ottenute da larve mature con i tre differenti substrati, si nota che il processo che produce il danno ambientale maggiore è nell'allevamento delle larve in particolare dovuto all'impiego di energia elettrica per il gruppo frigorifero che rimane in funzione in continuo per tutti i giorni necessari alla formazione delle larve mature. La categoria di danno maggiormente colpita è l'esaurimento delle risorse (Resources) a seguire dalla salute dell'uomo (Human Health) e cambiamento climatico (Climate Change) e infine dalla qualità dell'ecosistema.

L'analisi ha inoltre evidenziato che il punteggio totale su grammo di lipidi+proteine+chitina estratti (mPt/g) mostra che il sistema che considera il Substrato 3 è quello che produce l'impatto maggiore (0,8314 mPt/g). Mentre quelli associati al Substrato 1 e 2 risultano quasi la metà 0,4237 mPt/g e 0,4419 mPt/g rispettivamente.

L'analisi dei costi esterni evidenzia che le categorie di danno maggiormente coinvolte sono l'esaurimento delle risorse abiotiche e la salute dell'uomo.

Bibliografia

- Jolliet, O, Margni, M, Charles, R, Humbert, S, Payet, J, Rebitzer, G, Rosenbaum, R, 2003, IMPACT2002+: A new life cycle impact assessment methodology. Int. J. LCA, 8, 324-330.
- PRé. SimaPro 8 Multi user. PRé Consultants bv, Stationsplein 121, 3818 LE Amersfoort, The Netherlands 2014.
- Steen, B., 2015. The EPS 2015d Impact Assessment Method e an Overview.

Sotto-azione 3.6. Indagine conoscitiva sulla disponibilità di sottoprodotti del comparto agro-industriale sul territorio regionale per un possibile impiego nell'allevamento di insetti

Uar: CRPV

OBIETTIVI

L'obiettivo generale della presente azione è quello di effettuare le opportune valutazioni quali-quantitative connesse alla realizzazione di un processo di allevamento di mosche soldato, finalizzato all'estrazione di una componente proteica con differenti possibilità di impiego e l'utilizzo di un sottoprodotto a fini agricoli.

Sono state dunque valutate le disponibilità in termini di volumi sul territorio nazionale, con lo scopo di effettuare delle valutazioni generali in termini di fruibilità delle matrici.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato affrontato attraverso utilizzando gli strumenti di indagine elencati di seguito:

- Analisi qualitativa: in prima battuta è stata realizzata un'analisi conoscitiva finalizzata all'individuazione degli ipotetici sottoprodotti presenti sul territorio regionale e il loro iter di smaltimento, attraverso una serie di interviste svolte a circa 10 aziende del territorio. Questa prima analisi è stata completata con una successiva indagine di carattere qualitativo, basata sull'analisi del contenuto della discussione emersa durante la conduzione di una serie di Interviste in profondità rivolte ad osservatori privilegiati, con particolare riferimento alla componente produttiva del GOI, oltre che ai ricercatori impegnati nella realizzazione delle prove sperimentali.
- Analisi quantitativa: è stata realizzata basandosi su dati ISTAT con elaborazioni CRPV, al fine di raccogliere le informazioni necessarie ad effettuare le opportune valutazioni di disponibilità di sottoprodotti; le elaborazioni dei dati ISTAT sono state realizzate utilizzando criteri e informazioni definite nell'ambito dello studio conoscitivo descritto al primo punto.

RISULTATI

In relazione a quanto emerso dall'indagine qualitativa, è emersa una sostanziale complessità del sistema di selezione delle matrici vegetali durante il processo di lavorazione industriale. Infatti, durante il processo di lavorazione delle diverse matrici, esistono diversi punti in cui vengono generati degli scarti. Questi ultimi, appartengono prevalentemente alle categorie:

- Scarti all'ingresso del sistema: prodotti non idonei alla lavorazione;
- Scarti di produzione: prodotti lavorati ma non idonei alla vendita, sfridi di lavorazione (buccia, semi, etc.), acque residue, sanse etc.
- Scarti non recuperabili: parte dei prodotti che si perdono durante il processo di lavorazione, come ad esempio la parte dei succhi o salse che rimangono nelle tubature degli impianti a fine lavorazione.

Nella valutazione dell'incidenza degli scarti dell'industria alimentare, con lo scopo di effettuare le valutazioni di disponibilità, inizialmente sono stati raccolti i dati relativi alla percentuale di scarto delle diverse situazioni produttive, intese come differenza tra volumi di materie prime e volumi di prodotto lavorato.

Tuttavia, allo scopo di effettuare le opportune valutazioni di disponibilità di sottoprodotto disponibile per l'alimentazione del sistema di allevamento di mosche soldato, è stato necessario approfondire il tema della differenziazione della tipologia di scarto, al fine di stimare l'effettiva quantità di matrice vegetale recuperabile.

Dalle analisi conoscitive svolte, è emerso che la percentuale di scarto recuperabile è molto variabile in relazione alla tipologia di matrice, anche all'interno dei un medesimo settore. Nell'ambito della lavorazione degli ortaggi, ad esempio, gli scarti del sistema di produzione del pomodoro da industria possono arrivare anche al 5%, tra prodotti scartati all'ingresso delle linee, sfridi di lavorazione, perdite nelle tubature negli impianti etc., mentre questa percentuale può scendere al di sotto del 2% nel caso della lavorazione dei piselli per la produzione di conserve.

Data l'estrema variabilità della percentuale di scarti in relazione alla tipologia di prodotto e in virtù dei substrati utilizzati durante la sperimentazione svolta nell'ambito del presente lavoro, in un'ottica

conservativa finalizzata ad una valutazione concreta delle matrici disponibili, si è scelto di fissare le percentuali di scarto recuperabile tra l'1 e il 2% in relazione alla tipologia di prodotto finito, anche in considerazione del fatto che non tutto lo scarto può essere recuperato per ragioni logistiche ed organizzative.

In particolare, ai prodotti lavorati e consumati per intero e/o per i quali gli sfridi di lavorazione non costituiscono un buon substrato oppure costituiscono un substrato non ancora sottoposto a sperimentazione è stata considerata una percentuale di scarto recuperabile pari all'1%. Invece, per gli ortaggi e la frutta sottoposta a sistemi di lavorazione e trasformazione in passate, salse, succhi, macedonie, etc., è stata considerata una percentuale di scarto recuperabile pari al 2%.

Nell'ambito delle interviste e approfondimenti svolti con i ricercatori e sperimentatori coinvolti nel GOI, che assieme all'indagine svolta ha permesso di realizzare il data base allegato (vedi allegato: **Allegato_1_Bioecoflies-DB_valutazione_scarti.xls**), è stata stimata la resa di produzione del concime organico inteso come sottoprodotto dell'allevamento delle mosche soldato. Tale sottoprodotto viene realizzato con una resa variabile tra il 35 e il 60% del substrato iniziale.

Dall'analisi della figura 3.6.1, si evince come i volumi di cereali costituiscano una grande risorsa per il recupero di substrati utilizzabili, essendo valorizzabili intorno alle 200 mila tonnellate di scarto stimato sull'intero territorio nazionale, con un trend in crescita nell'ultimo triennio. In seconda posizione di collocano i prodotti appartenenti alla categoria Ortaggi e legumi, con un trend altalenante e indicativamente posizionato intorno alle 100 mila tonnellate di scarto recuperabile.

In crescita risulta invece il comparto legato alla produzione di olii e olive, con un trend che oscilla tra le 50 e le 100 mila tonnellate.

Infine, il settore della frutta risulta quello meno rilevante in termini di volumi, rimanendo compreso tra le 15 e le 20 mila tonnellate.

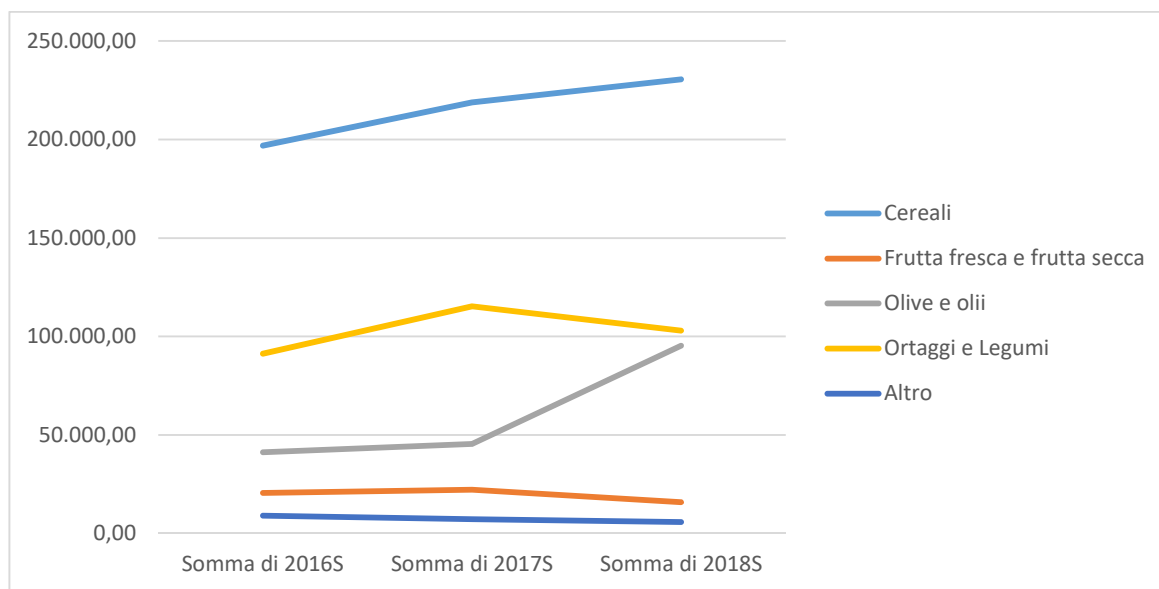


Figura 3.6.1: Andamento degli scarti in Italia dal 2016 al 2018.

Inoltre, sulla base dell'ultimo censimento ISTAT, di seguito viene riportata la distribuzione delle imprese agroalimentari nella Regione Emilia-Romagna (fig. 3.6.2), in cui si nota una forte concentrazione nell'area del centro Emilia, compresa tra Bologna e Parma.

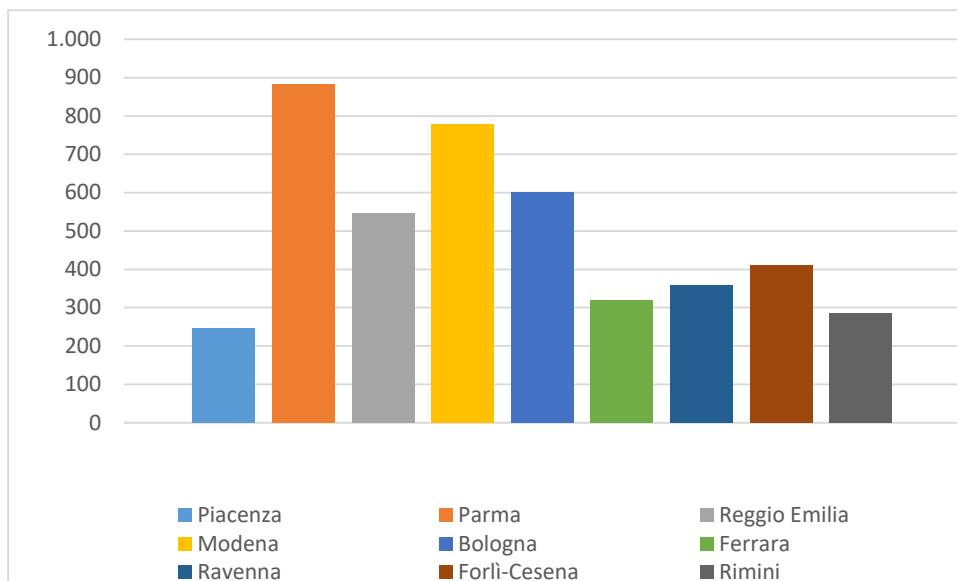


Figura 3.6.2: numero di imprese agro-alimentari in Emilia-Romagna.

Da una stima effettuata sui dati aggregati di ISTAT, si ritiene di poter raccogliere nella sola Emilia-Romagna circa 38 mila tonnellate di scarti provenienti dall'industria agro-alimentare.

Infine, sulla base dei volumi descritti ed utilizzando la percentuale di resa stimata in fase di valutazione dei substrati, in tabella 3.6.1 sono riportati i volumi di concime organico che si riuscirebbero ad ottenere dal recupero del sottoprodotto derivante dall'allevamento delle mosche soldato. Nello specifico, si ritiene possibile che, dal riutilizzo degli scarti dell'industria agro-alimentare, sia possibile ottenere fino a 180 mila tonnellate di concime organico. A livello regionale, si stima un volume di concime organico recuperabile di circa 15 mila tonnellate.

Tabella 3.6.1: Stima del volume di concime organico ottenibile dall'utilizzo degli scarti agro-alimentari in Italia

Matrici	Ton concime organico
Cereali	92.201,21
Frutta fresca e frutta secca	6.304,63
Olive e olii	38.113,95
Ortaggi e Legumi	41.169,43
Altro	2.311,01
Totale complessivo	180.100,23

CONCLUSIONI

In conclusione, si ritiene che l'importanza del comparto agro-alimentare e l'incidenza degli scarti possano rendere efficiente il sistema di recupero con le diverse finalità descritte nel progetto.

3.2 Personale

Azione	Nome e Cognome	Unità Aziendale responsabile	Mansione/qualifica	Attività svolta nell'azione	Ore	Costo
AZIONE 3.1.1		UNIMORE	Professore associato	Referente azione	304	11.570,24
AZIONE 3.1.2		UNIMORE	Ricercatore	Referente azione	54	1.722,06
AZIONE 3.1.2		UNIMORE	Assegnista	Tecnico di laboratorio	1218	16.844,94
AZIONE 3.2.1		UNIPR	Ricercatore	Referente azione	55	1.700,60
AZIONE 3.2.1		UNIPR	Borsista	Tecnico di laboratorio	717	9.371,19
AZIONE 3.2.1		UNIPR	Borsista	Tecnico di laboratorio	143	1.688,83
AZIONE 3.2.2		UNIPR	Professore associato	Referente azione	55	2.229,15
AZIONE 3.2.2		UNIPR	Borsista	Tecnico di laboratorio	430	5.624,40
AZIONE 3.2.3		UNIMORE	Professore ordinario	Referente azione	21	1.261,26
AZIONE 3.2.3		UNIMORE	Ricercatore	Tecnico di laboratorio	140	4.065,60
AZIONE 3.3.1		UNIMORE	Professore associato	Referente azione	113	4.399,09
AZIONE 3.3.2		ASTRA	OTD	Operaio avventizio	290	4.499,06
AZIONE 3.3.2		UNIMORE	Ricercatore / Professore Associato	Referente azione	24	822,24
AZIONE 3.3.2		UNIMORE	Assegnista	Tecnico di laboratorio	932	12.889,56
AZIONE 3.4.1		UNIMORE	Ricercatore	Tecnico di laboratorio	15	428,10
AZIONE 3.4.1		UNIPR	Professore Ordinario	Referente azione	40	2.310,40
AZIONE 3.4.1		UNIPR	Borsista	Tecnico di laboratorio	573	6.755,67
AZIONE 3.4.2		UNIMORE	Professore ordinario	Referente azione	41	2.462,46
AZIONE 3.4.2		UNIMORE	Ricercatore	Tecnico di laboratorio	77	2.286,90
AZIONE 3.4.3		ASTRA	Impiegato tecnico concetto di	Tecnico di campo	328	8.638,64
AZIONE 3.4.3		ASTRA	Impiegato tecnico concetto di	Tecnico di campo	240	5.523,80
AZIONE 3.5		UNIMORE	Professore associato	Referente azione	99	3.990,69
AZIONE		CRPV	Impiegato di	Referente analisi	313	7.080,18

3.6			concetto	economica		
AZIONE 3.6		CRPV	Impiegato di concetto	Referente settore colture estensive e bioenergetico	36	1.020,24
AZIONE 3.6		CRPV	Impiegato di concetto	Referente settore orticolo	32	667,84
AZIONE 3.6		CRPV	Impiegato di concetto	Referente settore vitivivolo	8	239,44
AZIONE 3.6		UNIMORE	Professore associato	Referente azione	119	4.924,22
					Totale:	125.016,8

3.3 Trasferte

Nome e Cognome	Descrizione	Costo
	Trasferte fra la sede del CRPV, le sedi dei partners o altri luoghi di incontro ed i siti in cui si svolgono le azioni di realizzazione del piano.	257,92
	Spese per missioni responsabile scientifico	68,46
Totale:		326,38

3.6 Materiali e lavorazioni direttamente imputabili alla realizzazione dei prototipi

Descrivere i prototipi realizzati e i materiali direttamente imputabili nella loro realizzazione

Fornitore	Descrizione	Costo
	3.2.1 Reagenti, solventi e materiali consumabili di laboratorio	8.477,35
	3.2.2 Reagenti, solventi e materiali consumabili di laboratorio	5.645,31
	3.4.1 Reagenti, solventi e materiali consumabili di laboratorio	13.222,23
Totale:		27.344,89

AZIONE 4 – PIANO DI DIVULGAZIONE DI TRASFERIMENTO DEI RISULTATI E IMPLEMENTAZIONE DELLA RETE PEI

4.1 Attività e risultati

Azione
Azione 4 - DIVULGAZIONE
Unità aziendale responsabile (Uar)
CRPV
Descrizione attività

L'azione di diffusione dell'innovazione alle imprese agricole e ai diversi stakeholders è stata avviata dopo il primo anno di svolgimento del progetto a seguito del raggiungimento dei primi risultati.

Le diverse azioni divulgative organizzate sono state indirizzate per contribuire a rendere concreto il collegamento funzionale *multi actor* tra innovazione, trasferimento e applicazione, che rappresenta un obiettivo intrinseco del PSR e della Misura 16.1.

La fase di divulgazione ha pertanto perseguito l'obiettivo di diffondere le informazioni-innovazioni valutate nel corso del piano, non solo ai membri del GO ma anche ad una più ampia gamma di *stakeholders* del settore agricolo. La divulgazione è stata indirizzata infatti anche a studenti e operatori diversi connessi all'ambito agricolo e industriale per allargare il range di utenza ed estendere la conoscenza di queste innovative tecniche e approcci. Il CRPV ha messo a disposizione del GO un indirizzario che conta migliaia di utenti, una mailing list di oltre 1.500 indirizzi, un portale che conta circa 10.000 visitatori all'anno, oltre a considerare che già la sua base sociale contribuisce nel suo complesso a produrre circa il 60% della PLV vegetale regionale, oltre al contributo offerto da tutti i partner del GOI.

Come preventivato nel Piano, il Piano di Comunicazione è stato sviluppato dall'intenso operato del personale CRPV, al fine di sviluppare una "Comunicazione sostenibile", ossia organizzare iniziative utili a mostrare i risultati raggiunti dalle attività del progetto e sistemi di divulgazione logisticamente tali da limitare quanto più possibile gli spostamenti degli utenti (ad esempio organizzando incontri tecnici disseminati sul territorio regionale piuttosto che accentrati in poche sedi) pur garantendo una visibilità massima delle innovazioni che meritavano evidenza sin dalle prime fasi di sviluppo del Piano.

Parte delle iniziative sono state realizzate presso le sedi delle Strutture socie di CRPV e/o partecipanti al GO, in modo da garantire una diffusione capillare su tutto il territorio regionale, anche replicando le iniziative laddove l'argomento era importante in funzione della vocazionalità del territorio, con l'obiettivo appunto di portare le competenze ed i risultati dell'innovazione, il più possibile vicino agli utilizzatori finali ossia le imprese agricole.

In accordo con i partner del GO, il personale CRPV ha quindi organizzato e gestito diverse iniziative e azioni di diffusione che sono descritte in Tabella 4.1. Per rendere più concreta la visione dell'attività svolta, in tabella 1 sono indicate tutte le azioni di divulgazione svolte nel corso dell'intera vita del progetto

In totale, dall'attivazione del progetto (1 settembre 2017) alla sua conclusione (31 dicembre 2019) sono state realizzate: **5 visite guidate in campo, 10 incontri tecnici, 5 articoli (di cui 2 in fase di pubblicazione), 4 Posters e 5 presentazioni a eventi fieristici, workshop nazionali ed internazionali** e 1 **audiovideo** ([Valorizzazione di sottoprodotti di filiere vegetali tramite insetti](#)).

Tutte le iniziative svolte hanno rappresentato anche momenti di discussione e confronto sul tema oggetto dell'evento, permettendo così un utile scambio di esperienze e risposte a vantaggio di tutti i partecipanti e del GO stesso.

Inoltre il CRPV ha messo a disposizione del GO il proprio **Portale Internet**, affinché le attività ed i risultati conseguiti nel presente Piano siano facilmente identificabili e fruibili dall'utenza. All'interno del portale CRPV è stata realizzata una pagina dedicata al Piano (<https://progetti.crpv.it/Home/ProjectDetail/28>), composta da una testata e da un dettaglio dove sono stati caricati tutti i dati essenziali del progetto e le attività condotte. Inoltre attraverso un contatto continuo con il Responsabile di Progetto, un referente CRPV ha proceduto all'aggiornamento della pagina con notizie, informazioni e materiale divulgativo ottenuti durante lo sviluppo del Piano. Questo lavoro, ha permesso, unitamente alla pubblicazione dei risultati, la consultazione dell'elenco dei Piani coordinati da CRPV, dal quale, selezionando un singolo Piano/progetto si accede ad una nuova pagina simile a quella del Portale CRPV, con cui si vedono i dettagli delle attività. Questo strumento comunicativo e divulgativo consente altresì di poter visionare collegamenti e sinergie che il presente piano può avere anche con altri progetti e/o iniziative.

Come indicato nell’Azione 1, il personale CRPV si è fatto carico di predisporre in lingua italiana e inglese, le modulistiche richieste per la presentazione del Piano al fine del collegamento alla **Rete PEI-Agri**.

Tabella 4.1 – Descrizione delle iniziative di divulgazione svolte dal 1 settembre 2017 al 31 dicembre 2019.

Visite guidate		Incontri tecnici		Pubblicazioni		Audiovideo
Data	Titolo (n. presenze)	Data	Titolo (n. presenze)	Data	Titolo	Titolo
20/12/18	BIOECOFLI ESIncVis20 1218RE (8)	20/12/18	BIOECOFL IESIncVis 201218RE (=)	30/05/19	Bioprodotti di qualità da scart ivergetali e insetti WASTE BioprodottiQualitàWASTEAprile Giugno2019	Valorizzazione di sottoprodotti di filiere vegetali tramite insetti
03/10/19	BIOECOFLI ESIncVis03 1019PR (15)	29/03/19	BIOECOFL IESIncontr o290319R E (25)	17/12/19	Valorization of seasonal agri-food leftovers through insects (Rivista Science of the Total Environment) Valorization of seasonal agri- food leftovers through insects (Rivista Science of the Total Environment)	
16/10/19	BIOECOFLI ESIncVis16 1019RE (22)	30/05/19	BIOECOFL IESIncontr o300519M O (19)	31/12/19	Optimization of Hermetia illucens (L.) egg laying under different nutrition and light conditions (Rivista PLOS ONE) in fase di pubblicazione	
25/10/19	BIOECOFLI ESIncVis25 1019RE (44)	03/10/19	BIOECOFL IESIncVis 031019PR (=)	31/12/19	Le mosche soldato, l'alternativa sostenibile per trasformare scarti di filiere vegetali in prodotti di alto valore per scopi mangimistici, agronomici ed energetici (Informatore (Agrario in fase di pubblicazione))	
12/11/19	BIOECOFLI ESIncVis12 1119BO (6)	16/10/19	BIOECOFL IESIncVis 161019RE (=)	Febbraio 2020	Insetti per la valorizzazione di scarti vegetali: l'economia circolare grazie alle mosche soldato (Agriculture-FIDAF febb. 2020 in fase di pubblicazione)	
		18/10/19	BIOECOFL IESIncontr o181019B O		PosterRRNMestreMaggio2018	

		25/10/19	BIOECOFL IESIncVis 251019RE (=)		Poster Summer School Course - Università di Verona 24/26- 06-19	
		06/11/19	BIOECOFL IESIncontr o061119R N (no)		Poster II edizione Giornata per il futuro della ricerca nella Chimica degli alimenti - UNIMI 23/24-09-19	
		12/11/19	BIOECOFL IESIncVis 121119BO (=)		Poster IPIFF International Workshop - Bruxelles 3-12-19	
		17/11/19	BIOECOFL IESSeminar ario17111 9RE (24)			
Tot = 5		Tot = 10		Tot = 5		Tot= 1

Tutta la documentazione relativa alle locandine prodotte e diffuse ed i fogli firma registrati in occasione delle diverse iniziative sopra riportate in tabella 1, nonché copia degli articoli sono disponibili presso il CRPV. Sono comunque allegati alla presente relazione i pdf delle presenze agli incontri tecnici, e visite guidate (**Allegato-2_GO5015190BIOECOFLIESPresenzeIncontriVisite.pdf**) Le locandine delle iniziative (visite guidate, incontri tecnici) sono invece disponibili al link incluso in **tabella 1**.

Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità evidenziate.

Gli obiettivi previsti sono stati raggiunti senza scostamenti dal piano di lavoro ed evidenze di criticità.

Attività ancora da realizzare:

Nessuna.

4.2 Personale

Nome Cognome	Unità Aziendale e Responsabile	Mansione/ qualifica	Attività svolta nell'azione	Ore	Costo
	CRPV	Impiegato di concetto	Responsabile progetto	196	6.148,83

	CRPV	Impiegato di concetto	Referente divulgazione	122	3.071,58
	CRPV	Impiegato di concetto	Referente divulgazione	24	1.078,20
Totale:					10.298,62

4.3 Trasferte

Cognome e Nome	Descrizione	Costo
	Trasferte fra la sede del CRPV, le sedi dei partners o altri luoghi di incontro ed i siti in cui si svolgono le azioni di realizzazione e divulgazione del piano.	489,00
Totale:		489,00

4.8 Collaborazioni, consulenze, altri servizi

CONSULENZE – SOCIETÀ

Ragione sociale della società di consulenza	Unità Aziendale Responsabile	Referente	Importo contratto	Attività realizzate / ruolo nel progetto	Costo
Pubblisole spa,	CRPV		500,00	Realizzazione Audiovisivo	500,00
Linxs	CRPV		2.500,00	Realizzazione pagina Web + App (Portale CRPV)	2.500,00
Totale:					3.000,00

AZIONE 5 – ATTIVITA' DI FORMAZIONE

5.1 Attività e risultati

Azione

Azione 5 – FORMAZIONE

Unità aziendale responsabile (Uar)

CRPV

Descrizione attività

Sono state svolte tutte le attività previste in questa azione ed in particolare 7 coaching come di seguito indicato.

Coaching n. 5015613 a Catalogo Verde

Titolo "Valorizzazione di sottoprodotti vegetali per la produzione di compost organico e macromolecole"

Data realizzazione: dal 11/12/2019 al 31/12/2019

Durata 6 ore

Le azioni di formazione svolte hanno suscitato un grande interesse e apprezzamento da parte dei partecipanti, sia per i temi trattati che per come sono stati organizzati e strutturati nelle presentazioni che

hanno visto una prima fase di approfondimento del tema stesso poi completato con i risultati emersi dal progetto per la loro applicazione operativa.

Gli obiettivi del progetto in merito alla formazione sono stati pienamente raggiunti e con alto grado di gradimento da parte degli utenti finali.

Inserito nel sistema SIAG anche il materiale didattico impiegato e distribuito a ciascun partecipante.

Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità evidenziate.

Tutte le attività di formazioni previste sono state svolte.

Attività ancora da realizzare:

Nessuna.

Attività di formazione

Specifica (N. domanda coaching)	Specifica (N. domanda Avvio)	Unità Aziendale Responsabile	Costo
5015613	5154771	CRPV	372,00
5015613	5154865	CRPV	372,00
5015613	5154892	CRPV	372,00
5015613	5154895	CRPV	372,00
5015613	5154898	CRPV	372,00
5015613	5154904	CRPV	372,00
5015613	5154906	CRPV	372,00
Totale			2604,00

3 CRITICITÀ INCONTRATE DURANTE LA REALIZZAZIONE DELL'ATTIVITÀ

Criticità tecnico- scientifiche	<ul style="list-style-type: none">• Non sono emerse sostanziali criticità tecnico-scientifiche salvo la necessità di avere una proroga di 4 mesi al fine di completare alcune attività inerenti le verifiche di campo sulla funzionalità come ammendanti per le colture orticole delle matrici residue i processi di allevamento ed estrazione. A seguito della proroga tutte le altre attività sono state svolte come previsto dal Piano.
Criticità gestionali (ad es. difficoltà con i fornitori, nel reperimento delle risorse umane, ecc.)	Non si rilevano criticità nella gestione del piano.
Criticità finanziarie	Non si rilevano criticità finanziarie.

1 ALTRE INFORMAZIONI

Nessuna altra informazione viene integrata.

5 CONSIDERAZIONI FINALI

Non si rileva nessun suggerimento particolare.

6 RELAZIONE TECNICA

ATTIVITÀ COMPLESSIVAMENTE EFFETTUATE, RISULTATI INNOVATIVI E PRODOTTI

Le attività nonché i risultati che il presente piano si era proposto al momento della formazione del Gruppo Operativo si considerano raggiunti in maniera soddisfacente. Le attività hanno fornito risultati coerenti con gli ambiti operativi specifici della Focus area 5C sull'economia circolare indirizzata al recupero degli scarti di lavorazione agricola per la realizzazione di nuove catene del valore e nuovi prodotti. In particolare l'applicazione di tecnologie innovative ha portato alla **valorizzazione di sottoprodotti a fini alimentari** provenienti dalle filiere olivicola e ortofrutticola per l'allevamento di insetti come le mosche soldato (MS), da cui sono ricavate biomasse ad alto contenuto di proteine, lipidi e chitina, oltre che materiale organico residuo con una buona dotazione di elementi nutritivi da poter impiegare come ammendanti in agricoltura, rispondendo quindi alla **valorizzazione di sottoprodotti a fini agronomici**. E' stato inoltre verificato come la frazione lipidica delle MS può avere una ricaduta a titolo di bilanciamento del poter calorifico nell'ottica di **valorizzazione di sottoprodotti a fini energetici**. I diversi componenti di prodotti emersi fra cui in particolare la frazione chitinosa ottenuta dalle MS fornisce un ulteriore spunto di impiego in diversi ambiti agricoli o industriali (e.g., fibre, spugne, schiume, bioplastiche) con una conseguente **diversificazione e ricollocazione produttiva sia agricola che extra agricola**.

Di seguito viene fatta sintesi dei principali risultati emersi dalle attività svolte nell'**Azione 3** del progetto.

SOTTO-AZIONE 3.1. Ottimizzazione dell'allevamento di MS, in relazione alla disponibilità stagionale e composizione dei SA, in funzione dell'efficienza di crescita delle larve

Attività 3.1.1. Disegno sperimentale funzionale

L'approccio innovativo basato sull'analisi multivariata DoE ha consentito di esplorare i mix stagionali più adeguati al reimpiego e valorizzazione mediante l'uso delle mosche soldato. La possibilità di suddividere l'impiego di sottoprodotti per stagione massimizzandone l'impiego e quindi la riduzione quantitativa come rifiuto fornisce uno strumento strategico in ottica di efficientamento di processo ed economia circolare. L'approccio razionale ha permesso di individuare i sottoprodotti che hanno un maggiore influenza sui parametri di allevamento. Tra i sottoprodotti disponibili tutto l'anno, una combinazione sinergica di avanzi di melone (70%) e frutta esotica (30%) ha mostrato le migliori performance in termini di soddisfacimento delle esigenze dietetiche di MS. L'introduzione di mix estivi (pomodoro e pesca) e mix autunnali (mais e legumi) opportunamente ottimizzate a livello compositivo, hanno fornito dati di crescita molto simili a quelle della dieta di controllo.

Attività 3.1.2. Sperimentazione ottimizzazione allevamento in laboratorio

Nelle attività sperimentali di laboratorio, la performance larvale di *Hermetia illucens* è stata testata su 50 miscele di sottoprodotti della filiera agroalimentare emiliano-romagnola ottenuti dalle aziende del progetto. Durante le prove, sono stati monitorati i diversi parametri di sviluppo delle larve al fine di identificare substrati idonei e disponibili per l'allevamento in un anno solare. Sulla base dei risultati sono quindi state individuate le miscele più idonee per lo sviluppo per ogni gruppo stagionale (disponibilità annuale, disponibilità solo estiva o solo autunnale). In particolare le miscele migliori sono risultate le seguenti (sempre riferite a sottoprodotti della lavorazione dei prodotti indicati):

- a) Annuale: melone (70%) e frutta esotica (30%),
- b) Estivo pomodoro (80%) e pesca (20%),
- c) Autunnale: legumi (25%), residui di lavorazione olive (20%), mais (20%), mix annuale (35%).

Le prove preliminari di laboratorio hanno dimostrato l'inutilità dell'aggiunta di liquidi nelle miscele vincenti stagionali nel caso di produzione larvale.

Complessivamente, è possibile affermare che le larve di mosca soldato sono in grado di sopravvivere e adattarsi a una grande variabilità di substrati, sebbene con differenze notevoli nei parametri di sviluppo. Considerando i singoli substrati, sono risultati migliori i seguenti: melone per il gruppo annuale, pomodoro per il gruppo estivo e legumi e mais per il gruppo autunnale.

Inoltre, le larve sviluppate sui sottoprodotti autunnali, hanno mostrato pesi superiori e tempistiche di sviluppo inferiori rispetto a quelle allevate sui restanti sottoprodotti.

SOTTO-AZIONE 3.2 Caratterizzazione dei diversi SA, frazionamento e caratterizzazione della composizione della biomassa larvale (BL) in funzione dei diversi SA, valutazione dei possibili usi alimentari (feed)

Attività 3.2.1 Caratterizzazione delle biomasse vegetali

Il lavoro di caratterizzazione effettuato ha permesso di ottenere informazioni importanti sulla composizione di molti sottoprodotti e scarti di aziende di trasformazione ortofrutticola presenti in regione. La disponibilità di questi dati è infatti carente ma essi sono fondamentali per individuarne la valorizzazione ottimale e sarebbe quindi auspicabile poter implementare il database realizzato nell'azione 3.6 in futuri progetti per ottenere un compositivo ampio per tutti i sottoprodotti disponibili in regione. Inoltre, la conoscenza della composizione dei substrati, combinata con i dati relativi all'allevamento degli insetti e l'analisi statistica ha permesso di individuare alcuni nutrienti fondamentali per la crescita delle larve e l'effetto di eventuali sostanze inibenti.

Attività 3.2.2 Caratterizzazione delle biomasse da insetti – Frazione proteica e chitinosa

Il grosso lavoro in termini di caratterizzazione delle biomasse larvali cresciute su diversi substrati ha permesso di comprendere meglio le potenzialità di questi insetti come materia prima per la produzione di ingredienti funzionali. In particolare per quanto riguarda il contenuto proteico si può affermare che esso è poco influenzato dal substrato di allevamento e quindi è possibile ottenere ingredienti proteici di elevata qualità, paragonabile a quello della soia e delle proteine dell'uovo, partendo da qualunque substrato di allevamento. La quantità di chitina risulta più variabile in funzione probabilmente dello stress subito dalle larve durante la crescita, indicando quindi che è possibile modulare il substrato di allevamento per ottimizzarne la produzione nel caso questo sia l'ingrediente maggiormente desiderato.

Attività 3.2.3 Caratterizzazione delle biomasse da insetti - Frazione lipidica

La ricerca ha messo in luce che la resa in lipidi e gli aspetti qualitativi sono fortemente influenzati dalla dieta durante gli stadi preimmaginali. Questo fatto è importante sia per quanto riguarda potenziali applicazioni in mangimistica o nell'alimentazione visto il ruolo determinante degli acidi grassi insaturi, sia per le applicazioni tecnologiche nella produzione di biodiesel. A quest'ultimo proposito si è visto che il numero di cetano è influenzato da queste variazioni. Solo gli specialisti nei due diversi campi potrebbero fare delle scelte adeguate alle varie necessità. D'altra parte, a causa della stagionalità e alla spiccata polifagia delle mosche soldato non è possibile fissare una dieta ideale.

SOTTO-AZIONE 3.3. Produzione massale di MS in impianto dimostrativo

Attività 3.3.1. Pianificazione funzionale della produzione massale

I risultati ottenuti dalle prove preliminari svolte hanno evidenziato che l'applicazione del metodo DoE per prove su impianto massale indicano l'impossibilità di generare modelli matematici statisticamente significativi e con carattere predittivo. L'elevato numero di prove e i tempi medi di allevamento avrebbero richiesto l'uso dell'impianto massale per un tempo molto più esteso delle tempistiche di progetto.

Si è invece concentrata l'attenzione sull'analisi delle correlazioni tra substrato in miscela ed ottenimento di MS con un particolare contenuto di macronutrienti. In particolare si è evidenziato come gli scarti della lavorazione di pesche, melone e frutti esotici promuovano il contenuto di frazione lipidica mentre sottoprodotti di kiwi promuovono il contenuto di ceneri. Questa informazione può fornire un utile supporto in fase di analisi dell'impiego delle larve per le varie applicazioni possibili.

Attività 3.3.2. Sperimentazioni allevamento massale in impianto dimostrativo

In seguito ai precedenti risultati di laboratorio, le migliori combinazioni di miscele identificate per ogni stagione sono state testate in contenitori di grandi dimensioni in un prototipo di impianto semi-industriale. Per massimizzare il peso delle larve mature, ad ogni controllo è stato analizzato l'avanzamento di crescita larvale prelevando un campione di larve equivalente al 10% del numero totale per ogni box. L'esperimento si è concluso con la comparsa delle prime prepupe.

I risultati ottenuti nel prototipo seguono indicativamente lo stesso trend degli esperimenti preliminari, nonostante fossero stati forniti meno grammi di cibo per larva. È stato possibile comparare le performance

e i tempi di sviluppo larvale dei vari gruppi stagionali con il gruppo di controllo. Le larve del gruppo autunnale sono risultate essere migliori in termini di peso rispetto agli altri gruppi stagionali ma, con numeri lievemente inferiori rispetto alle prove sperimentali di laboratorio. È stata dimostrata l'efficienza dell'impianto dimostrativo sia per quanto riguarda la crescita delle larve che in termini di produzione. Sono stati ottenuti circa 6 kg di larve e alcuni kg di residuo organico, quantità utili rispettivamente per le analisi chimiche e le prove agronomiche previste dalle sottoazioni successive.

SOTTO-AZIONE 3.4 Valutazione funzionale delle macromolecole ottenute dalla BL e del compost, per verificarne impieghi industriali ed agronomici

Attività 3.4.1 Messa a punto di metodologie per la purificazione di frazioni

Sono state messe a punto diverse tecniche di estrazione della frazione proteica dalle prepupae di mosca soldato in condizioni mild, in modo da ottenere frazioni proteiche intatte da un punto di vista nutrizionale. Sia il metodo basato sulle attività enzimatiche che il metodo chimico multistep hanno dato ottime rese di estrazione proteica (circa il 70%). Le frazioni ottenute presentano tutte una composizione amminoacidica in linea con le raccomandazioni nutrizionali in termini di amminoacidi essenziali e sono confrontabili con le proteine della soia e dell'uovo.

Il pellet ricco di chitina, opportunamente trattato e purificato costituisce un ottimo substrato per la produzione di chitosano con composizione simile ai benchmark commerciali. Per quanto riguarda la produzione di glucosammina sarà invece necessario ottimizzare il processo produttivo al fine di evitarne il degrado durante il trattamento di idrolisi in ambiente acido.

Attività 3.4.2 Messa a punto di metodologie per lo studio dei lipidi

Vista la variabilità della frazione lipidica, il suo studio è fondamentale per deciderne l'impiego. L'aspetto critico è legato alla fase di estrazione del grasso dagli insetti, fase nel corso della quale si possono generare degli artefatti che ne possono compromettere le future applicazioni industriali. Infatti l'idrolisi dei trigliceridi, imputabile ad una tecnica di soppressione delle larve non ideale, può comprometterne l'estrazione.

Bisogna però distinguere l'approccio analitico da laboratorio, meno sensibile a queste modifiche nel caso si voglia fare il dosaggio degli acidi grassi totali e l'approccio tecnologico che può essere effettivamente influenzato dalle modificazioni di polarità indotte dall'idrolisi.

Tra le diverse tecniche utilizzate, la sbollentatura delle larve risponde a criteri chimici ed umanitari nella soppressione delle larve, garantendo da un lato l'inattivazione degli enzimi ed una morte rapida che risparmi agli animali inutili sofferenze.

Attività 3.4.3 Valutazione agronomica del compost

Le prove sono state condotte su due cicli di coltivazione di lattuga in vaso ed in coltura protetta con un unico "mix organico" delle 3 matrici organiche (substrato a disponibilità autunnale, a disponibilità primaverile-estiva ed autunno-invernale) a percentuali diverse di dosaggio per valutare l'efficacia fertilizzante a confronto con una matrice organica di riferimento, Dieta di Gainesville, prodotto già utilizzato per altre attività sperimentali e con un testimone a zero apporti fertilizzanti.

I risultati ottenuti, in entrambe le prove eseguite, hanno confermato la validità delle matrici organiche valutate. La Dieta di Gainesville ha portato ad un costante incremento di pezzatura e di rese produttive, rispetto alle altre tesi in osservazione; i migliori risultati sono stati ottenuti con forniture del 15%.

Il mix di matrici organiche, provenienti dall'attività delle Mosche Soldato (MS), hanno portato ad un andamento produttivo sostanzialmente in linea con quanto emerso utilizzando la Dieta di Gainesville, pur con rese e pezzature tendenzialmente inferiori; anche per questi substrati i migliori risultati sono stati ottenuti con forniture comprese tra il 10 ed il 15%. Il test "non concimato" ha raggiunto livelli produttivi considerevolmente inferiori rispetto a quelli forniti dalle matrici organiche in osservazione, indipendentemente dalle loro percentuali di utilizzo.

Interessante notare come l'apporto delle matrici organiche, Mix di substrati e Dieta di Gainesville, non abbia portato a fenomeni di tossicità a carico delle piante; radici e cespi non hanno evidenziato sintomatologie particolari e in entrambi i cicli produttivi non sono state rilevate fallanze significative. Pertanto le matrici organiche provenienti dall'allevamento delle MS rappresentano un potenziale di interesse per l'apporto organico ai terreni nelle coltivazioni agricole.

Sotto-azione 3.5. Valutazioni di sostenibilità ambientale ed economica dei processi e prodotti (LCA-LCC)

Uno degli obiettivi di progetto è stata la quantificazione della sostenibilità ambientale ed economica di soluzioni per la bioconversione degli scarti delle filiere agroalimentari in composti ad alto valore nutrizionale, nell'ottica di individuare i principali percorsi verso possibili miglioramenti del sistema intervenendo sulla scelta del substrato.

È stata valutata la sostenibilità ambientale ed economica, attraverso la metodologia LCA (Life Cycle Assessment) (in conformità alla serie di norme UNI EN ISO 14040:2006 e UNI EN ISO 14044:2006 utilizzando il codice di calcolo SimaPro 8.5 (PRè, 2014) di soluzioni per la bioconversione degli scarti delle filiere agroalimentari in composti ad alto valore nutrizionale. L'unità funzionale scelta è rappresentata dal contenuto totale di lipidi, proteine e chitina ottenuti dall'estrazione delle larve mature allevate su tre differenti substrati ottenuti da alcune importanti filiere vegetali.

La composizione dei tre substrati vegetali analizzati è la seguente:

Codice substrato	Nome Substrato	Composizione
S1	Annuale	70% melone + 30% mango
S2	Estivo	80% pomodoro + 20% pesca
S3	Autunnale	35% S1+ 25% legumi + 20% residui lavorazione olive + 10% mais

I confini del sistema considerati comprendono la raccolta dei sottoprodotti vegetali e la trasformazione in substrato per l'allevamento delle larve; allevamento di larve su substrati organici; operazioni per l'isolamento di lipidi, proteine denaturate e chitina (energie, emissioni, risorse) dalle larve mature ottenute dalla fase precedente di allevamento; uso e fine vita dei prodotti. Inoltre, sono state considerate le energie necessarie, i materiali, il fabbisogno di acqua, le principali attrezzature con il loro fine vita, le energie necessarie, i trasporti, gli scarti con il loro fine vita, le emissioni in aria, i relativi impianti di aspirazione e depurazione, il recupero e riutilizzo di alcuni solventi.

La tabella seguente riporta i principali parametri della fase di allevamento:

Parametro	Substrato S1	Substrato S2	Substrato S3	Unità di misura
Peso di 1 larva	0,163	0,185	0,298	g
Substrato residuo per vassoio	5538,46	2210,13	2934,42	g
Numero di larve prodotte	2221,165	1316,943	2305,169	-
Durata allevamento	11	10	9	giorno
Percentuale di mortalità della larva	7,29	4,23	2,08	%

Dall'analisi dei risultati, impiegando il metodo di valutazione IMPACT 2002+ (Jolliet, 2003), si nota che, per tutti e tre i substrati, il processo che produce il danno ambientale maggiore è nell'allevamento delle larve in particolare dovuto all'impiego di energia elettrica per il gruppo frigorifero che rimane in funzione in continuo. La categoria di danno maggiormente colpita è l'esaurimento delle risorse (Resources) a seguire dalla salute dell'uomo (Human Health) e cambiamento climatico (Climate Change). L'analisi ha inoltre evidenziato che il punteggio totale su grammo di lipidi+proteine+chitina estratti (mPt/g) è maggiore per il Substrato 3 (0,8314 mPt/g).

Infine, sono stati analizzati i costi esterni attraverso il metodo EPS 2015 (Steen, 2015). I costi esterni, rappresentano il tentativo di tradurre in unità monetaria gli impatti ambientali. Ogni attività che produce un impatto negativo sull'ambiente comporta un danno per la società: i costi esterni sono la monetizzazione di tale danno. La volontà di pagare per ripristinare i cambiamenti ambientali è la misurazione monetaria e l'ELU (Environmental Load Unit), che corrisponde a un costo del danno ambientale in Euro, è l'unità di misura. Il costo esterno complessivo del processo di estrazione di lipidi, proteine e chitina ottenuti con i tre differenti substrati S1, S2, S3 pari rispettivamente a 32 ELU, 23 ELU e 126 ELU. Le categorie di danno maggiormente coinvolte sono: l'esaurimento delle risorse abiotiche e la salute dell'uomo.

Bibliografia

- Jolliet, O, Margni, M, Charles, R, Humbert, S, Payet, J, Rebitzer, G, Rosenbaum, R, 2003, IMPACT2002+: A new life cycle impact assessment methodology. Int. J. LCA, 8, 324-330.
- PRè. SimaPro 8 Multi user. PRè Consultants bv, Stationsplein 121, 3818 LE Amersfoort, The Netherlands 2014.
- Steen, B., 2015. The EPS 2015d Impact Assessment Method e an Overview.

Sotto-azione 3.6. Indagine conoscitiva sulla disponibilità di sottoprodotti del comparto agro-industriale sul territorio regionale per un possibile impiego nell'allevamento di insetti

L'obiettivo generale della presente azione è stato di effettuare le opportune valutazioni quali-quantitative connesse alla realizzazione di un processo di allevamento di mosche soldato, finalizzato all'estrazione di una componente proteica con differenti possibilità di impiego e l'utilizzo di un sottoprodotto a fini agricoli.

Attraverso un'indagine quali-quantitativa è emerso che il volume totale di scarti recuperabili sull'intero territorio nazionale è di circa 450 mila tonnellate di scarti proveniente dall'industria alimentare e utili all'alimentazione di allevamenti di mosche soldato. Tale numero si riduce a 38 mila tonnellate nella sola regione Emilia Romagna (Elaborazioni CRPV su dati ISTAT), con potenziali molto elevati quindi di reimpiego in nuove catene del valore.

RICADUTE IN AMBITO PRODUTTIVO, TERRITORIALE ED AMBIENTALE

Partendo da una biomassa di scarto che generalmente viene utilizzata a scopi energetici o smaltita, il progetto ha permesso di poter considerare una biomassa ricca di proteine, lipidi e chitina (fibra), riciclando prodotti di scarto agroalimentari per fornire quindi ingredienti in qualità di prodotti impiegabili in diversi settori industriali. Considerando il prezzo medio di mercato degli ingredienti ottenibili (600 Euro /ton per gli oli, 5.000 Euro/ton per le proteine e 10.000 Euro /ton per le fibre), è facile intuire la possibile ricaduta economica del progetto e conseguentemente l'aumento del reddito delle aziende produttive del territorio, considerando gli ingenti volumi di prodotti di scarto che le diverse filiere agroalimentari possono produrre ogni anno.

Grazie alle valutazioni svolte con la generazione di modelli matematici, inerenti formulazioni ottimali di substrati, che riguardano una maggiore efficacia ed efficienza nella selezione degli scarti e sottoprodotti utili per l'allevamento di mosca soldato, si può ricondurre a quale ambito produttivo (industriale) sono relative le principali ricadute. In tal modo questi scarti potranno essere rapidamente selezionati e le loro quantità definite, in base periodo dell'anno in cui si svolge l'allevamento, permettendo di evitare fenomeni di degradazione biochimica e ulteriori fasi di stoccaggio degli scarti. In particolare, i risultati del progetto hanno mostrato come possano essere largamente impiegati tutto l'anno ad esempio i residui della lavorazione di Melone, presente nella formulazione di substrato annuale al 70%. Discorso similare può essere fatto per i residui di Frutta Esotica, ma con entità minori, in quanto presenti sempre nella formulazione ottimale di substrato annuale in una percentuale del 30%. Queste indicazioni rappresentano quindi un indubbio valore che può essere messo a vantaggio per la **creazione di nuove value chain** virtuose nell'ottica di economia circolare.

Uno degli obiettivi di progetto è stata inoltre indirizzata a valutare la sostenibilità ambientale ed economica di soluzioni per la bioconversione degli scarti delle filiere agroalimentari in composti ad alto valore nutrizionale. Questa valutazione è stata indirizzata, assieme a quella di carattere più squisitamente economico, proprio nell'ottica di comprendere le potenzialità di ricaduta in ambito produttivo oltre che ambientale e per valutare i territori che maggiormente avrebbero potuto beneficiarne.

Le conoscenze e le tecnologie acquisite nel progetto saranno immediatamente spendibili nel sistema economico produttivo regionale grazie all'elevata quantità di sottoprodotti agrifood disponibile annualmente in ER (38 mila tonnellate nella sola Emilia Romagna), all'estrema versatilità dell'approccio proposto nella gestione degli scarti e alla propensione già esistente in molte aziende, siano esse produttrici o utilizzatrici di scarti, di volgersi agli insetti come nuova tecnologia migliorativa per il comparto. Attualmente in Italia esistono solo poche realtà in grado di produrre insetti, e si tratta di aziende di piccole dimensioni che allevano insetti artigianalmente solo su piccola scala, non a livello industriale. Non risultano quindi al momento disponibili sul mercato i prodotti derivanti dall'allevamento, né esistono impianti industriali dedicati alla trasformazione della biomassa di insetti in prodotti ad alto valore aggiunto. Il presente progetto fornirebbe nuove conoscenze scientifiche per applicare innovativi processi di bioconversione di rifiuti e sottoprodotti agroalimentari della regione mediante insetti. Lo sviluppo di una nuova value chain basata sugli insetti e sulla loro trasformazione e valorizzazione creerebbe come logica conseguenza nuovi sbocchi occupazionali, come pure il miglioramento della redditività delle aziende dovuto ad una diminuzione dei costi di smaltimento degli scarti, da una parte, e da nuovi profitti generati dalla valorizzazione degli scarti stessi.

Per le imprese agricole i risultati scaturiti potranno essere utilizzati per ottenere vantaggi economici derivanti direttamente dall'impiego di sottoprodotti dell'industria agroalimentare come substrati per

l'allevamento di insetti che potrebbero essere poi venduti per essere trasformati o trasformati direttamente, oltre alla possibilità di poter utilizzare il substrato organico ottenuto come compost di qualità per la coltivazione.

In relazione alle risultanze emerse nella realizzazione della sotto azione 3.5, emerge la potenzialità del sistema di recuperare circa 450 mila tonnellate di scarti alimentari provenienti dall'industria sull'intero territorio nazionale, di queste 38 mila tonnellate di substrato funzionale all'alimentazione di allevamenti di mosche soldato potrebbero essere raccolte in Emilia-Romagna.

Considerando le potenzialità del sistema di allevamento, il sottoprodotto da destinarsi alla concimazione agricola di 180 mila tonnellate a livello Italiano, utile al fabbisogno di circa 6.000 ettari di terreno agricolo. In Emilia Romagna si stima che la produzione del sottoprodotto potrebbe essere pari a 15 mila tonnellate, utili alla concimazione di circa 500 ettari di terreno, con un volume di concime organico recuperabile di circa 15 mila tonnellate.

La possibilità di impiegare come ammendante e/o fertilizzante il compost proveniente dalla attività di insetti come la Mosca Soldato, consentirà di chiudere in modo "circolare" l'economia della filiera agroalimentare, recando così consistenti benefici sia all'impresa coinvolte nella realizzazione dell'attività che a tutte le imprese associate del mondo agricolo.

L'impiego di un compost di questa tipologia consentirà di disporre di un prodotto a costi di produzione più contenuti e nello stesso tempo di migliorare struttura e, più in generale, la qualità dei suoli.

Tutto questo fornisce un indubbio risultato con ricaduta diretta sulla **resilienza** dei cicli produttivi incluse le fase di lavorazione dei prodotti agricoli con un diretto riscontro anche in termini di **adeguamento ai cambiamenti climatici**.

Dal punto di vista delle ricadute economiche collegate alla produzione di proteine, si rimanda invece alle sinergie tra il presente progetto ed il GOI Bioface (domanda n. 5015191).

In sintesi il progetto ha soddisfatto quindi gli **INDICATORI** previsti nel progetto. Di seguito viene fatta breve sintesi.

Indicatore 1: Definizione di indici biologici di performance degli insetti, ossia: la resa (massa di larve mature/prepupe di MS ottenute a partire da una certa massa di substrato), il tempo di sviluppo, la percentuale di sopravvivenza di larve mature/prepupe; la percentuale di sfarfallamento e il n°uova /femmina adulta. Poiché questi indici biologici sono strettamente correlati al substrato di crescita e alle condizioni ambientali, quelli ottenuti durante le prove sperimentali sui diversi mix di substrati di origine vegetale verranno comparati con quelli disponibili in letteratura, ricavati da insetti allevati su matrici di origine animale (in particolare deiezioni). Questo consentirà anche di comprendere la competitività di questo sistema produttivo con altri. (sotto-azioni 3.1. e 3.3) Sono stati ottenuti modelli matematici di correlazione tra gli indici biologici di performance degli insetti e formulazione del substrato di crescita degli insetti. Tali modelli hanno permesso di calcolare le formulazioni ottimali di scarti e sottoprodotti per ogni periodo stagionale considerato. Infine considerando i parametri di crescita standard è stato mostrato come l'impiego di un opportuno mix di scarti derivanti da legumi, melone, frutta esotica e sanse permetta di ottenere performance migliorative rispetto alla dieta standard per mosca soldato.

Nel concreto i parametri di crescita migliori, come il tempi di sviluppo e biomassa ottenuta, sono stati registrati nei substrati con una più elevata percentuale di melone e mango (del gruppo annuale), di pomodoro (gruppo estivo) e di legumi e mais (gruppo autunnale). La percentuale di sopravvivenza è stata negativamente influenzata dalla presenza di elevate percentuali di ananas, kiwi, pesca e scarti dalla lavorazione delle olive (sanse e acque di lavaggio).

Le performance di crescita delle larve di mosca soldato allevate sui migliori mix vegetali sono risultate superiori rispetto a quelle registrate su pollina (Rehman et al, 2017), su deiezioni suine (Nguyen et al, 2013), equine e ovine (Julita et al, 2018).

Ur Rehman, Kashif, et al. 2017. Cellulose decomposition and larval biomass production from the co-digestion of dairy manure and chicken manure by mini-livestock (*Hermetia illucens* L.). *Journal of environmental management*, 196: 458-465.

Nguyen, T.Tx, Tomberlin, J.K., Vanlaerhoven, S. 2013. Influence of resources on *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) larval development. *Journal of Medical Entomology*, 50.4: 898-906.

Julita, U., et al. 2018. Growth performance and nutritional composition of black soldier fly, *Hermetia illucens* (L), (Diptera: Stratiomyidae) reared on horse and sheep manure. In: *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. IOP Publishing, p. 012071.

Indicatore 2: Creazione di un database di composizione delle biomasse vegetali e delle biomasse larvali in funzione del substrato di crescita (sotto-azione 3.2): per ciascun substrato vegetale e per ciascuna biomassa larvale è stata valutata la composizione centesimale e, nel caso specifico della biomassa larvale anche la composizione aminoacidica (Tabelle 3.2.1.1 e da 3.2.2.1 a 3.2.2.6)

Indicatore 3: Ottenimento di frazioni proteiche da insetti per applicazioni in mangimistica con valore nutrizionale (composizione in amminoacidi essenziali) paragonabile o superiore a quello delle proteine della soia (Trp > 11mg/g proteina, aa solforati > 24 mg/g proteina, Lys > 60 mg/g proteina) (sotto-azione 3.4): Sono state ottenute 5 diverse frazioni proteiche, una da idrolisi enzimatica e quattro da estrazioni chimiche in condizioni mild. Tutte soddisfano i requisiti previsti, eccetto la frazione globulinica ottenuta col metodo osborne che ha un contenuto inferiore di lisina

Indicatore 4: Definizione di almeno 1 protocollo di estrazione e separazione di biomolecole dalle biomasse larvali utilizzabile per lo scalaggio industriale (sotto-azione 3.4): sono stati ottimizzati due diversi protocolli di estrazione che differiscono essenzialmente per il metodo di estrazione proteica (metodo enzimatico o metodo di osborne) che permettono di separare la frazione lipidica, proteica e di ottenere un pellet ricco di chitina che può essere ulteriormente purificato a chitosano

Indicatore 5: Definizione di 1 protocollo di purificazione di almeno una sostanza di natura chitinosa di interesse alimentare/nutraceutico con caratteristiche paragonabili ai prodotti attualmente in commercio (chitosano e glucosamina ottenuti da gusci di crostacei) (sotto-azione 3.4): è stato ottenuto un protocollo per la produzione di chitosano con un grado di acetilazione e di purezza paragonabile a benchmark commerciali (chitosano da lievito e da crostacei)

Indicatore 6: Ottenimento di una frazione lipidica per applicazioni in mangimistica con caratteristiche paragonabili o migliori rispetto a quelle normalmente utilizzate (rapporto acidi grassi saturi/insaturi < 1, acidi grassi essenziali > 10% indice di iodio > 40) (sotto-azione 3.4). La valutazione svolta ha mostrato che il rapporto acidi grassi saturi/insaturi è sempre superiore ad 1, in alcuni casi > 10 o 20 il che pone qualche limitazione all'uso della frazione lipidica ottenuta come mangime, ma risulta altresì che ne migliora, e di molto, la stabilità all'ossidazione, rappresentando quindi un ottimo prodotto da usare in miscele mangimistiche.

Indicatore 7: Ottenimento di una frazione lipidica per applicazioni energetiche (biocombustibili/rinnovabili) con caratteristiche paragonabili a quelle di altri biodiesel (percentuale di acidi grassi saturi, rapporto acidi grassi saturi/insaturi, indice di iodio < 120, numero di cetano compreso tra 45 e 51) (sotto-azione 3.4). Il rapporto è in genere alto con notevoli differenze in base al substrato. Il numero di cetano è risultato in generale > 60. Il numero di iodio è compreso tra 5,27 e 32,92 a conferma di un generale basso valore d'insaturazione. Si precisa, però, che la valutazione del numero di cetano è stata ottenuta con una formula e non con una prova mediante un motore a causa dei bassi volumi di materiale disponibile. Prove effettuate con adeguati volumi di grasso (almeno un paio di kg) potrebbero dare dati più incoraggianti. Ciò detto si precisa che tali lipidi possono trovare tuttavia valida applicazione in miscela con altri oli caratterizzati da un numero di cetano troppo basso, che da un lato non ha le caratteristiche di accensione adatte così come problemi di stabilità all'ossidazione.

Indicatore 8: I parametri tecnici caratterizzanti i compost impiegati in campo sia per fertilità del suolo (contenuto in SO) che per i livelli produttivi e qualitativi dei prodotti agricoli considerati, saranno confrontati rispettivamente con i valori standard di SO rilevabili nel suolo nella stessa azienda concimato normalmente così come con i livelli qualitativi e produttivi della stessa coltura a parità di condizioni di coltivazione. Ciò consentirà di valutare la concreta concorrenzialità di questi compost con altri in commercio (sotto-azione 3.4). Avendo svolto la prova in condizioni di vaso per poter svolgere valutazioni oggettive sull'effetto delle matrici organiche provenienti dallo scarto dell'allevamento di MS, i parametri tecnici della SO nel suolo non sono potute essere valutate, ma i risultati delle sperimentazioni hanno fornito dei risultati positivi circa le potenzialità di impiego di suddette sostanze in alternativa a concimi organici di altra natura, soddisfacendo in tal modo il completamento del ciclo virtuoso di una economia circolare. Incrociando i dati con quanto emerso dalla sottoazione 3.6, dal riutilizzo degli scarti dell'industria agro-alimentare, sarebbe possibile ottenere fino a

180 mila tonnellate di concime organico. A livello regionale, si stima che un volume di concime organico pari a circa 15 mila tonnellate si potrebbe recuperare impiegando gli scarti agroalimentari.

Indicatore 9: Realizzazione di un bilancio di massa e di energia di tutti i flussi di input e output rilevanti del sistema con particolare attenzione ai possibili scenari di fine vita (sotto-azione 3.5).

E' stato effettuato il bilancio di massa e di energia per valutare il processo estrattivo dei tre substrati analizzati. Gli input per la fase di produzione delle larve mature sono stati: quantità di substrato per vassoio: 8400 g (S1), 4997 g (S2), 8310 g (S3); numero di vassoi: 4 (S1), 9 (S2), 1 (S3). Il numero di giorni di allevamento necessari sono: 11 (S1), 10 (S2); 9 (S3). Mentre gli output: substrato residuo per vassoio: 5538.46 g (S1), 2210.13 g (S2), 2934.42 g (S3); numero di larve prodotte: 2221.165 g (S1), 1316.943 g (S2), 2305.169 g (S3). Le rese di estrazione considerate sono state: 70% resa di estrazione lipidica con etere di petrolio, 70% resa di estrazione proteica mediante metodo enzimatico, 56% resa di estrazione chitinica (si è utilizzato il grado di purezza della chitina). La quantità totale di Lipidi+Proteine+Chitina estratta è pari a 63.83 g [30.98g di proteine+26.8 g di lipidi +6.05 g di chitina] (con S1); 42.88 g [20.81g di proteine+18 g di lipidi +4.06 g di chitina] (con S2), 121.04 g [58.76 g di proteine+50.82 g di lipidi +11.46 g di chitina] (con S3). Mentre l'energia elettrica totale impiegata per l'estrazione delle suddette quantità sono: 727.29 kWh (S1); 509.10 kWh (S2); 2879.17 kWh (S3).

Indicatore 10: L'analisi di LCA permetterà di quantificare la riduzione di Kg di CO2 equivalente dei sistemi innovativi (substrati di allevamento, allevamento stesso, processi di estrazione e prodotti finali ottenuti) considerando quindi il carico di CO2 risparmiata nel processo (sotto-azione 3.5).

I risultati dell'analisi LCA hanno determinato che il carico di CO2 risultante dai processi estrattivi che utilizzano differenti substrati (S1, S2, S3), a parità di quantità di proteine+lipidi+chitina ottenuta, è pari a:

- usando il substrato S1: 772.11 kg CO2 eq/kg di substrato
- usando il substrato S2: 1078.36 kg CO2 eq/ kg di substrato
- usando il substrato S3: 2042.96 kg CO2 eq/ kg di substrato

A parità di proteine+lipidi+chitina ottenute il substrato S1 risulta essere quello che determina una produzione di CO2 minore rispetto agli altri due substrati analizzati.

I carichi di CO2 risultanti dai tre processi di produzione del substrato (1 kg) di allevamento sono i seguenti:

- S1: 0.01571 kg CO2 eq
- S2: 0.02663 kg CO2 eq
- S3: 0.01560 kg CO2 eq

L'analisi per kg di substrato evidenzia che la produzione del substrato S3 è quello che determina un carico di CO2 minore rispetto agli altri due substrati analizzati.

I carichi di CO2 risultanti dall'allevamento (1 kg) delle larve (bioconvertitore) su differenti substrati sono i seguenti:

- S1: 16.67 kg CO2 eq
- S2: 17.07 kg CO2 eq
- S3: 104.09 kg CO2 eq

L'analisi per kg di substrato evidenzia che la produzione del substrato S3 (dato dalla combinazione di scarti di prodotti autunnali) è quello che determina un carico di CO2 minore rispetto agli altri due substrati analizzati.

Indicatore 11: Creazione di un data base sulle disponibilità di scarti/sottoprodotti derivanti dalla trasformazione di prodotti agricoli in Emilia-Romagna (sotto-azione 3.6). Il Data base è disponibile in allegato.

RICADUTE SOCIALI:

Da punto di vista sociale il progetto BIOECOFILIES ha dimostrato che grazie all'utilizzo di insetti come bioconvertitori è possibile recuperare e valorizzare grandi quantità di scarti delle filiere agroalimentari producendo una biomassa ad alto valore aggiunto e un ammendante organico. Il progetto ha dimostrato che la tecnologia proposta si integra perfettamente ed efficacemente all'interno della filiera produttiva regionale, favorendo quindi imprese locali, in quanto sono stati utilizzati i diversi sottoprodotti forniti dalle diverse entità agro-industriali partecipanti al progetto e si è individuata la modalità più efficiente per poter utilizzare i substrati con diversa disponibilità stagionale. Questo offre quindi la possibilità di creare un nuovo

mercato per numerosi sottoprodotti agricoli, e di fatto potrà anche crea nuovi posti di lavoro con figure professionali specializzate nel favorire l'incontro tra domanda e offerta. L'implementazione di questa tecnologia, visto il territorio regionale assai ricco di imprese di trasformazione di prodotti agroalimentari consentirà di realizzare impianti di allevamento di insetti abbinati a gruppi di aziende regionali consentendo di attuare una simbiosi industriale a ciclo chiuso, trasformando punti di debolezza (produzione di scarti/sottoprodotti) in forze (prodotti da bioconversione ad alto valore aggiunto).

Attualmente l'Europa non è autosufficiente per la produzione di fonti proteiche (sia per uso diretto che per l'allevamento di bestiame), cosa che rende necessaria l'importazione di grandi quantità di proteine dall'estero, quasi sempre da colture GM, spesso a scapito della qualità. Pertanto, la produzione massale di larve di MS rappresenta una interessante alternativa di approvvigionamento di proteine di alta qualità, ottenute in Italia con tecnologie sviluppate a livello regionale e a basso impatto ambientale.

La valorizzazione agronomica e/o energetica del residuo post crescita larvale può contribuire alla sostenibilità economica dell'intera filiera allungando la catena del valore e minimizzando la quantità di rifiuti prodotti.

Il miglioramento dell'efficienza della lavorazione industriale e della gestione degli scarti alimentari, nonché il ritorno economico, si ripercuotono in modo rilevante sulle comunità locali, offrendo beni e dividendi tangibili, con un effetto diretto sull'aumento dei posti di lavoro. Inoltre, il sistema di bioconversione mediante insetti messo a punto avrà l'inevitabile effetto di rafforzare la posizione della Regione come leader nei sistemi di lavorazione agroindustriali sostenibili.

Data 14 febbraio 2020

IL LEGALE RAPPRESENTANTE (Firmato digitalmente)