

Risultati

La composizione chimica e i profili degli acidi grassi della farina delle crisalidi del baco da seta e delle diete sperimentali

La composizione chimica e il profilo degli acidi grassi della crisalide del baco da seta e delle diete sperimentali sono presentate nella tabella 1 e 2 e dimostrano che la dieta (SWM = dieta con crisalidi di baco da seta) è una ricca fonte di proteine (53,9% per la dieta SWM-FULL, con crisalide intera di baco da seta e 66,7% per la dieta con crisalide degrassata SWM-DEF di baco da seta, rispettivamente) e di lipidi (29,1% per la dieta con crisalide intera SWM-FULL di baco da seta e 9,49% per la dieta con crisalide degrassata SWM-DEF di baco da seta). Fra i lipidi è stata evidenziata una grande proporzione di acidi grassi polinsaturi, di cui il valore medio, nelle diete SWM-FULL e SWM-DEF è il 36,7% dei FAME (metil-esteri degli acidi grassi), attribuibile soprattutto all'acido α -linolenico (C18:3n-3), in media il 30,5% dei FAME. Come risultato, le diete SWM-FULL e SWM-DEF, mostrano un profilo di acidi grassi più sano in comparazione a quello di controllo, ovvero un rapporto $n-6/n-3$ ratio pari a 11,4, 0,91 e 3,38 rispettivamente per le diete di controllo, SWM-FULL and SWM-DEF. Le diete sperimentali con le crisalidi del baco da seta mostrano anche una certa quantità di contenuto di chitina (0.89 e 1.40 g/kg di alimento, rispettivamente per le diete SWM-FULL e SWM-DEF) e 1-DNJ (1,07 e 1,23 μ g/g di alimento, rispettivamente per le diete SWM-FULL e SWM-DEF), che non è stata trovata nella dieta di controllo.

Digeribilità apparente dei nutrienti, valore nutritivo e scelta del cibo

I risultati, mostrati in Tabella 3, sottolineano un effetto notevole delle diete sperimentali sulla digeribilità apparente dei nutrienti. L'ingestione della materia secca è stata più alta nel trattamento SWM-DEF, se comparato al Controllo, mentre quello SWM-FULL era intermedio (87,4 vs 93,4 vs 98,3 g per il Controllo, SWM-FULL e SWM-DEF, rispettivamente; $P < 0.001$). Le quaglie dei gruppi SWM-FULL e SWM-DEF hanno esibito una più alta produzione di escrementi, se comparati a quella del gruppo di Controllo (45,5 g e 51,7g vs 34,1 g per SWM-FULL, SWM-DEF e Controllo, rispettivamente; $P < 0.001$).

Tabella 1. Ingredienti delle diete sperimentali (g/kg di alimento) per le quaglie all'ingrasso.

	Diete sperimentali		
	Controllo	SWM-FULL	SWM-DEF
Farina di mais	471	431	469
Farina di frumento	63.7	183	152
Farina di soia	406	236	205
Farina di baco da seta	0.00	125	125
Olio di soia	30.7	0.00	22.5
Calcio carbonato	12.1	14.6	14.8
Fosfato di calcio	9.40	6.00	6.50
NaCl	2.70	2.70	2.70
L-Lysina	0.80	0.00	0.00
DL-Methionina	1.80	0.00	0.00
Premix di minerali e vitamine ¹	2.50	2.50	2.50

FULL and DEF corrispondono al 12.5% d'inclusione con farina di crisalide di baco da seta (SWM)(*Bombyx mori* L.) intera (FULL) e degrassate (DEF) rispettivamente.

1. Il premix di vitamine e minerali per kg di dieta è il seguente: vitamina A, 20 000IU; vitamina D3, 6 000 IU; vitamina E (acetato di α -tocopherol), 90 mg; vitamina K3, 7 mg; vitamina B1, 3.5 mg; vitamina B2, 16 mg; niacinamide, 100 mg; vitamina B6, 8 mg; Vitamina B12, 0.04 mg; biotina, 0.4 mg; acido folico, 2.5 mg; Ca-pantotenato, 27.78 mg; Fe, 80 mg; Mn, 200 mg; Cu, 50 mg; Zn, 200 mg; Ca-iodato, 2 mg/kg; Se, 0.4 mg; E 1604 Endo 14, 2200 U; Endo 1, 3 000 FTU; sepiolite, 175 mg.

Tabella 2 Composizione chimica (g/kg di alimento), 1-Deoxynojirimycin (1-DNJ; μ g/g) e contenuti di energia lorda (MJ/kg di alimento) della farina di crisalide di baco da seta (*Bombyx mori* L.) intera e degrassata (FULL e DEF, rispettivamente) e delle diete sperimentali (SWM-FULL and SWM-DEF, rispettivamente) per le quaglie da ingrasso.

	SWM		Diete sperimentali		
	FULL	DEF	Controllo	SWM-FULL	SWM-DEF
Sost. Secca	944	947	895	894	901
Proteina grezza	539	667	223	225	228
Estratto etereo	291	94.9	465	548	534
Fibra grezza	–	–	35.9	23.1	21.7
Amido	–	–	396	439	444
Ceneri	50.1	66.5	54.3	50.2	51.3
1-DNJ	28.7	34.0	0.00	0.89	1.40
Energia Lorda	–	–	ND	1.07	1.23
	25.2	21.9	17.4	17.3	17.0

In generale, i risultati hanno dimostrato che l'inclusione nella dieta della farina di crisalide di baco da seta (SWM) ha provocato la peggiore digeribilità per la SS (Sostanza Secca) ($P < 0.001$), materia organica ($P < 0.001$), e amido ($P < 0.001$), in comparazione alla dieta di Controllo, mentre la dieta SWM-DEF ha generato la più bassa digeribilità significativa di PG ($P = 0.0117$) e degli estratti eterei ($P < 0.001$), comparati alle diete SWM-FULL e di Controllo. Le ultime due diete hanno portato a risultati comparabili per la proteina grezza e gli estratti eterei. La digeribilità della chitina è stata significativamente più alta nelle quaglie SWM-DEF, comparata alle SWM-FULL (89,5 vs 48,1%, rispettivamente; $P < 0.0001$). La digeribilità dell'energia ha mostrato il seguente trend: Controllo > SWM-FULL > SWM-DEF (68,0 vs 59,8 vs 55,6%, rispettivamente; $P < 0.0001$). Conseguentemente il trattamento della dieta ha influenzato il valore nutritivo delle diete (Tabella 3): le quaglie di controllo hanno mostrato le più alta energia metabolizzabile (EM), seguite da quelle del gruppo SWM-FULL e SWM-DEF, con l'ultimo che ha esibito il valore più basso (13,3 vs 11,6 vs 10,5 MJ/kg SS per il Controllo, SWM-FULL e SWM-DEF, rispettivamente; $P < 0.0001$). Come conseguenza, è stato osservato un trend opposto per il rapporto fra la proteina metabolizzabile (MP) e l'energia metabolizzabile (ME) (11,7 vs 13,6 vs 14,4 per il Controllo, SWM-FULL e SWM-DEF, rispettivamente; $P < 0.0001$). Le quaglie in crescita non hanno gradito l'inclusione nella dieta sia di SWM-FULL o SWM-DEF, quindi determinando il seguente pattern di scelta del mangime: Controllo > SWM-FULL e SWM-DEF (61,3 vs 17,2 and 21,5%, rispettivamente; $P < 0.0001$).

Tabella 3 Effetto dell'inclusione nella dieta 0% (Controllo), 12.5% SWM-FULL (crisalide intera) e farina (degrassata) 12.5% SWM-DEF di crisalide di baco da seta (*Bombyx mori* L.) sulla digestibilità apparente delle quaglie da ingrasso.

	Diete sperimentali			RSD	P-value
	Controllo	SWM-FULL	SWM-DEF		
Numero di quaglie	11	11			
Peso vivo medio (LW) (g)	168	165		11.1	0.8179
Ingestione di sostanza secca (SS) (g)	93.4 ^{AB}	98.3 ^A		5.89	0.0006
Ingestione di sostanza secca (g/100 g LW)	55.7 ^{AB}	59.6 ^A		4.05	0.0025
Escreti (g SS)	45.5 ^A	51.7 ^A		6.39	<0.0001
Digestibilità apparenti (%):					
SS	51.5 ^B	47.7 ^B		4.64	<0.0001
Materia organica	53.8 ^B	49.9 ^B		4.73	<0.0001
Estratto etereo	70.2 ^a	65.9 ^b		3.41	0.0117
Amido	88.2 ^A	82.1 ^B		2.85	<0.0001
Chitina	68.6 ^B	62.1 ^B		6.86	<0.0001
	48.1	89.5		9.80	<0.0001
	59.8 ^{Ba}	55.6 ^{Bb}		3.90	<0.0001

SWM- FULL and DEF corrispondono a mangimi con il 12.5% d'inclusione di crisalidi con grasso (FULL) o senza (DEF)

a–b Le medie nella colonna che hanno scritte all'apice lettere diverse differiscono per una significatività di P < 0.05.

A–C Le medie nella colonna che hanno scritte all'apice lettere diverse differiscono per una significatività di P < 0.01.

Microbioma fecale

La comunità di ampliconi 16S batterici di sequenziamento hanno prodotto 1 489 527 sequenze annotate, assegnate a un rango di famiglia e un totale di 408 748 assegnate al livello di specie. Si sono incontrate 62 famiglie. La più abbondante è stata quella delle Leuconostocaceae, più abbondante nel controllo. La seconda è stata quella delle Streptococcaceae, con il massimo nella dieta con le crisalidi intere, che è risultata significativamente diversa dalle altre due. La terza per abbondanza è stata quella delle Sphingomonadaceae, presente largamente in tutti e tre i tipi di dieta. Differenze correlate al tipo di dieta riguardano le Rikenallaceae (phylum Bacteroidetes) e le Eubacteraceae (Phylum Firmicutes, Ordine Clostridiales), entrambe più numerose nella dieta SWM-FULL con una differenza significativa (P<0.01) rispetto alla dieta di controllo e da quella SWM-DEF (p<0.05).

Tabella 4: Effetto dell'inclusione nella dieta dello 0% (controllo), 12,5% farina intera e 12,5% di farina degrassata di crisalide sul valore nutritivo delle quaglie da ingrasso e sulla loro scelta alimentare.

	Diete sperimentali			RSD	P-value
	Control	SWM-FULL	SWM-DEF		
Numero di quaglie	11	11	11		
Valore nutritivo					
Proteina metabolizzabile (MP; g/kg cibo)	156	158	150	7.69	0.0778
Energia metabolizzabile (ME; MJ/kg DM)	13.3 ^A	11.6 ^B	10.5 ^C	0.74	<0.0001
Rapporto MP/ME	11.7 ^C	13.6 ^{Bb}	14.4 ^{Aa}	0.69	<0.0001
Scelta delle quaglie ² : scelta del cibo (%)	61.3 ^A	17.2 ^B	21.5 ^B	15.1	<0.0001

SWM- FULL and DEF corrispondono a mangimi con il 12.5% d'inclusione di crisalidi con grasso (FULL) o senza (DEF)

a–b Le medie nella colonna che hanno scritte all'apice lettere diverse differiscono per una significatività di $P < 0.05$.

A–C Le medie nella colonna che hanno scritte all'apice lettere diverse differiscono per una significatività di $P < 0.01$.

² Su 27 quaglie

A livello specie, ne sono state contate 109. I casi più numerosi sono nel genere *Lactobacillus*, con il genere *L. salivarius* compreso tra il 32 e il 64% delle registrazioni. Il secondo genere più rappresentato (9-21%) nei tre regimi di dieta era il Gram-negativo *Burkholderia fungorum*. I dati che mostrano le medie osservate per ogni batterio sono rappresentate in Tabella 5. Differenze marcate sono visibili nei gruppi che hanno ricevuto diete diverse, soprattutto per tre specie si registra un marcato incremento (Tabella 5), positivamente correlate al contenuto di crisalidi nel mangime e cioè *Aneurinibacillus thermoaerophilus*, più abbondante nella dieta SWM-FULL, rispetto alla SWM-DEF ($p < 0.05$) e, perfino più incisivamente, rispetto al controllo ($p < 0.01$). La seconda specie più abbondante è *Bacillus thermoamylovorans* con le stesse significatività summenzionate e il terzo è *Lactobacillus delbrueckii*, che ha mostrato un incremento significativo ($P < 0.05$) solo nel confronto fra la dieta SWM-

FULL e il gruppo di Controllo. Invece, si è trovata una maggiore presenza, nelle diete di controllo di *Escherichia coli*, che è calata dal 15% (nel gruppo di diete di Controllo) al 4,65% (quaglie SWM-DEF) e a un puro 0,56% nel gruppo nutrito con SWM-FULL. Per quanto riguarda i batteri che si sono accresciuti con le diete arricchite di SWM, le summenzionate prime due specie erano le maggiori specie presenti anche nel sequenziamento dei substrati alimentari. *A. thermoaerophilus* era il genere dominante al livello di specie (79%) anche nella dieta SWM-FULL e uno dei maggiori nella SWM-DEF (28%), mentre non si ritrovava nella dieta di Controllo. *Bacillus thermoamylovorans* era anche il secondo genere più abbondante (16,9%) nella dieta SWM-FULL, ma assente nella dieta SWM-DEF e di Controllo. Al livello di famiglie, invece, le Rikenellaceae rappresentavano il 79% dei generi nella dieta SWM-FULL e lo 0,09% nella SWM-DEF, mentre era pari a 0 nella dieta di Controllo.

Tabella 5

Effetto dell'inclusione nella dieta 0% (Control), 12.5% SWM-FULL (intera) e 12.5% SWM-DEF (degrassata) di farina di baco da seta (*Bombyx mori* L.) sulle più rilevanti famiglie e specie trovate nelle feci delle quaglie in ingrasso. L'abbondanza media di ogni genere è riportata come percentuale (%). I criteri per l'inclusione in questa tavola sono stati un'abbondanza > 1% in almeno un dei trattamenti o una differenza significativa (P < 0.05) tra trattamenti.

	CONTROLLO	SWM-FULL	SWM-DEF	
N. di quaglie	5	5	5	
N. di famiglie osservate	52	43	38	
Leuconostocaceae	65.52	24.65	46.25	0.17
Streptococcaceae	10.14	50.80	8.88	0.024
Sphingomonadaceae	6.87	7.11	13.61	0.46
Rikenellaceae	0.0084	2.59	0.0057	0.0059
Oxalobacteraceae	1.57	1.14	2.53	0.62
Rhodobacteraceae	2.59	1.79	0.33	0.97
Gloeobacteraceae	4.80	5.02	0.51	0.86
Pseudonocardiaceae	1.63	1.95	5.61	0.21
Bradyrhizobiaceae	1.19	0.29	2.57	0.37
Eubacteriaceae	0.0052	0.53	0.0147	0.0057
Planococcaceae	0.12	0.47	1.11	0.14
Cellulomonadaceae	2.23	0.14	1.13	0.71
Burkholderiaceae	0.90	0.67	6.82	0.48
Lactobacillaceae	0.11	0.02	2.42	0.83
Ruminococcaceae	0.02	1.20	0.65	0.96
Enterobacteriaceae	0.00	0.00	3.85	0.29
N. tot. di generi identificati a livello di specie	60	51	59	
<i>Lactobacillus salivarius</i>	38.75	64.57	32.50	0.31
<i>Burkholderia fungorum</i>	21.30	9.81	18.71	0.52
<i>Ruminococcus gnavus</i>	0.94	8.05	0.00	0.53
<i>Herbaspirillum huttiense</i>	4.90	3.06	7.96	0.24
<i>Enterococcus cecorum</i>	0.00	0.00	8.87	0.29
<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i>	0.00	5.51	0.00	0.0022
<i>Burkholderia caledonica</i>	3.81	1.77	3.11	0.59
<i>Novosphingobium sediminicola</i>	1.25	0.80	2.11	0.77
<i>Streptococcus pasteurianus</i>	0.07	0.00	2.46	0.36
<i>Bifidobacterium saeculare</i>	1.19	0.95	1.05	0.34
<i>Escherichia coli</i>	14.94	0.56	4.59	0.32
<i>Bifidobacterium thermacidophilum</i>	0.00	0.00	3.24	0.29
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	0.00	1.43	0.07	0.042
<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	0.00	1.10	0.00	0.0022
<i>Phenylobacterium</i> sp.	0.70	0.55	1.01	0.96
<i>Mucilaginibacter</i> sp.	0.70	0.05	2.68	0.25
<i>Enterococcus columbae</i>	0.00	0.00	1.07	0.29
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	1.06	0.11	0.09	0.88

FULL e DEF corrispondono al 12.5% d'inclusione con farina intera (FULL) e degrassata (DEF) di crisalide (SWM) degrassata di baco da seta (*Bombyx mori* L.). I P-values si riferiscono a differenze significative (P < 0.05) identificate attraverso lo Spearman's rank test dei dati. L'abbondanza relativa de generi è stata normalizzata, applicando una normalizzazione sulla scala totale delle somme seguita da una trasformazione in radice quadrata. La significatività statistica delle differenze è stata verificata con il test non parametrico di Kruskal-Wallis test.

Discussione

Il contenuto nutrizionale e il profilo degli acidi grassi della dieta SWM-FULL e SWM-DEF sono in linea con la letteratura scientifica, confermando ulteriormente il potenziale di questo ingrediente nella formulazione di mangimi e nel fornire cibo sano per l'uomo.

Anche per quanto riguarda il contenuto in chitina, il valore SWM del presente studio (3,0-3,6% della SS) conferma il range già individuato da Makkar e altri nel 2014 del 3-4%.

Nella ricerca illustrata, la più elevata ingestione di SS e la più elevata produzione di escrementi osservati nei gruppi nutriti con SWM, potrebbe essere in relazione alla presenza di chitina, che è stata riportata ridurre la digeribilità di nutrienti nei polli, e/o alla sostanza bioattiva 1-DNJ, che limita la digestione dei nutrienti essenziali. Infatti, mentre la digeribilità apparente della SS, sostanza organica, proteina grezza ed estratti eterei e amido nel Controllo è stata simile a quella usualmente riportata in letteratura per le quaglie, i valori dei gruppi SWM- e SWM-DEF erano più bassi di quelli usualmente riportati nelle ricerche. Il peggioramento della digeribilità apparente dei nutrienti nelle quaglie nutrite con SWM, ha portato a una riduzione del valore nutritivo della dieta, dal momento che l'energia metabolizzabile è stata al di sotto della soglia consigliata così da non essere sufficiente ad assicurare l'optimum di 2900 kcal ME/kg di cibo (National Research Council, Subcommittee on Poultry Nutrition (NRC), 1994). Questo potrebbe spiegare i risultati della prova di scelta del cibo illustrata in Tabella 4.

Le ricerche precedenti hanno dimostrato che l'attività chitinolitica è un'attività intrinseca del tratto gastrointestinale dei polli, poiché è o che digeriscono la chitina nel range del 67-92%. I risultati del presente studio sono coerenti con tale range, che era previsto, essendo le quaglie degli uccelli insettivori. Nonostante il fatto che la chitina possa essere parzialmente digerita dalle quaglie, la deacetilazione della chitina porta alla formazione del chitosano; è stato riportato che questa sostanza rallenta la degradazione dei nutrienti, formando complessi con i nutrienti del mangime, e, come evento finale, abbassando la digeribilità.

L'effetto negativo della chitina sulla digeribilità dei nutrienti è stata riportata in altri casi, quando le diete sono state supplementate con altre specie di insetti, per esempio la mosca soldato e la tarma della farina.

Ricerche recenti hanno scoperto che il livello dell'espressione dell'mRNA della chitinasi acidica e, perciò, l'attività chitinolitica dell'enzima, è fortemente correlata con il gruppo di alimentazione (carnivori, erbivori, onnivori) delle specie animali. Quindi, una possibile spiegazione della notevole differenza di digeribilità della chitina nei trattamenti SWM-FULL e SWM-DEF, può essere correlata al contenuto assoluto di chitina nella dieta.

Ipoteticamente, un più alto contenuto di chitina potrebbe avere accresciuto il livello dell'mRNA coinvolto nell'espressione della chitinasi acidica, così determinando una differente digeribilità della chitina. Comunque, la possibile associazione del livello di chitina incluso nella dieta con l'mRNA coinvolto nell'espressione della chitinasi acida, rimane da indagare.

Tra le attività biologiche dell'1-DNJ vengono riportate anche un'efficace azione anti-iperglicemica e antiobesità. In particolare, la molecola è un inibitore efficace dell'enzima α -glucosidasi, responsabile della conversione dell'amido in monosaccaridi, che vengono assorbiti dall'intestino.

La letteratura scientifica precedente ha indicato che il contenuto di 1-DNJ nelle crisalidi di baco da seta varia da 75 a 105 mg/100 g, ma l'esperimento attuato sembra indicare che il contenuto di 0.107 mg/100 g of 1-DNJ (SWM-DEF) è stato sufficiente a influenzare negativamente la digeribilità dell'amido nelle quaglie in accrescimento. Inoltre, l'1-DNJ gioca anche un ruolo regolatorio nella deposizione del grasso e nel metabolismo, che potrebbe inibire la sintesi di FA e incrementare l'ossidazione di FA, con il risultato della riduzione dei lipidi in accumulazione. Questo potrebbe parzialmente giustificare la digeribilità più bassa osservata nel gruppo SWM-DEF, che aveva un più alto contenuto in 1-DNJ.

Un possibile modo di risolvere i problemi sopramenzionati potrebbe essere la parziale rimozione della chitina, attraverso la processazione ad alta pressione, che potrebbe anche rimuovere i legami tra la chitina e alcune proteine legate, migliorando la qualità della farina e l'estrazione dell'1-DNJ.

Una volta estratto l'1-DNJ potrebbe essere utilizzato per altre finalità, come, ad esempio, lo sviluppo di cibi funzionali, per abbassare il glucosio postprandiale. Dal momento che l'1-DNJ sembra essere responsabile della caduta nella digeribilità dell'amido, una certa quantità di amido è rimasta disponibile per i microorganismi. Tale materiale non è stato necessariamente esaurito dal metabolismo batterico, come testimoniato dalla sua presenza nel materiale fecale, portando ad una ridotta digeribilità. Nondimeno, l'amido spiega come la comunità batterica si sia trasformata in flora amilolitica. Infatti, fra gli ordini che sono significativamente aumentati nella dieta SWM c'è la famiglia delle Rikenellaceae, la cui crescita è stata dimostrata essere stimolata nel ratto nutrito con l'amido grezzo di patata. Inoltre, l'assimilazione dell'amido viene inibita nell'animale, come si vede se si cambia un substrato metabolizzabile in uno equivalente della categoria amido-resistente, che è in linea con il significativo aumento di Eubacteriaceae. Quest'ultima è una famiglia presente nel microbioma umano e ha dimostrato il più forte incremento in risposta a una dieta arricchita in amido resistente. Inoltre, a livello di specie, l'attitudine amilolitica degli ordini di microrganismi che aumentano è talvolta implicito nel loro nome (*Bacillus thermoamylovorans*) o come per il gruppo dei Lattobacilli, conosciuti per una specifica attitudine biochimica.

Come menzionato precedentemente, entrambe le diete SWM hanno ugualmente influito negativamente sulla digeribilità dell'amido. Comunque, le differenze fra i due tipi di diete SWM per la risposta in termini di ordini di batteri, e il fatto che la SWM-FULL abbia indotto il cambiamento più estremo, potrebbe essere spiegato con la differente fonte di amido. Infatti, la dieta SWM-DEF conteneva quantità considerevolmente più basse di farina di grano e di soia, sostituita da farina di granoturco, in confronto alla dieta SWM-FULL.

Globalmente, i risultati del presente studio hanno indicato che la supplementazione di SWM nella dieta può influenzare negativamente la digeribilità dei nutrienti delle quaglie in crescita, soprattutto a causa della presenza della chitina e dell'1-DNJ. Inoltre, l'analisi del microbioma fecale può essere considerato come un efficace strumento per interpretare i dati della digeribilità nella produzione di animali d'allevamento. Ulteriore ricerca deve essere compiuta per testare la digeribilità dei nutrienti e la composizione del microbioma nelle specie degli animali, dopo la rimozione della chitina e dell'1-DNJ dalla farina di crisalide, con lo scopo di testare il contributo relativo di ogni biocomposto nell'influenzare la digestione del pollame.