

Titolo del Progetto

Novofeed (Novel feed ingredients from sustainable sources) Nuovi ingredienti per mangimi da fonti sostenibili

RELAZIONE FINALE

**Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie —Università di Bologna
Responsabile Scientifico del Progetto: Prof. Alessio Bonaldo**

Questa ricerca è stata intrapresa nell'ambito del progetto Novofeed (Novel mangimi ingredienti da fonti sostenibili), finanziato da Eranet - Marine Biotech, nell'ambito del Settimo programma quadro della Commissione europea. Grant Agreement numero 604814, 48 mesi 2017-2020. Il presente volume non è una pubblicazione e pertanto l'utilizzazione dei dati in esso contenuti è sottoposta all'autorizzazione scritta del responsabile dell'unità operativa o dell'Amministrazione

Indice

Partners e personale coinvolto	3
Abstract	4
Introduzione.....	5
Obiettivi del progetto di ricerca	6
Materiali e Metodi.....	6
Prove in vitro	6
Prove di citotossicità	6
Prove di immunostimolazione.....	7
Analisi immunologica	7
Prove in vivo	8
Qualità dell'acqua e parametri ambientali	11
Campionamenti	11
<i>Campionamento iniziale</i>	11
<i>Campionamenti finali</i>	12
Indici zootecnici di crescita e indici somatometrici	14
Analisi immunologiche	14
Analisi statistiche	15
Risultati	15
Prove in vitro	15
Prove in vivo	17
<i>Performance di crescita e indici somatometrici</i>	17
<i>Parametri ematici</i>	19
<i>Analisi immunologica</i>	22
Discussioni e conclusioni.....	23
Bibliografia.....	24

Partners e personale coinvolto

Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna (Unibo)

Prof. Alessio Bonaldo	Professore Associato
Prof.ssa Sara Ciulli	Professore Associato
Dott. Luca Parma	Ricercatore
Dott.ssa Serena Busti	Assegnista di ricerca
Dott. Enrico volpe	Assegnista di ricerca
Dott.ssa Francesca Errani	Dottoranda di Ricerca

Pesci derivanti da avannotterie italiane

ABSTRACT Inglese

One of the main key points for the development of sustainable aquaculture, is to define health-promoting circular feed ingredients which maximize performance and stimulate the defence mechanisms of fish. Aquaculture processing by-products are a rich source of bioactive peptides, molecules which can be used as functional feed ingredients to achieve better growth and fish health, thus promoting a sustainable aquaculture development (Siddik, M. A. B. et al., 2021). This study was undertaken in order to assess the potential effects of the bioactive peptides derived from Atlantic salmon (*Salmo salar*) processing by-products on growth, blood biochemistry, immune response and gut histology in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) reared under normal and after suboptimal condition.

ABSTRACT Italiano

Uno dei principali punti chiave per lo sviluppo dell'acquacoltura sostenibile è definire ingredienti circolari per mangimi che promuovono la salute, che massimizzano le prestazioni e stimolano i meccanismi di difesa dei pesci. I sottoprodotti della lavorazione dell'acquacoltura sono una ricca fonte di peptidi bioattivi, molecole che possono essere utilizzate come ingredienti funzionali dei mangimi per ottenere una migliore crescita e salute dei pesci, promuovendo così uno sviluppo dell'acquacoltura sostenibile (Siddik, M. A. B. et al., 2021). Questo studio è stato intrapreso per valutare i potenziali effetti dei peptidi bioattivi derivati dai sottoprodotti della lavorazione del salmone atlantico (*Salmo salar*) su crescita, biochimica del sangue, risposta immunitaria e istologia intestinale nella spigola (*Dicentrarchus labrax*) e nell'orata (*Sparus aurata*) allevati in condizioni normali e di stress.

Introduzione

Negli ultimi decenni il fenomeno della pesca eccessiva ha portato allo svuotamento di mari e oceani con relative ripercussioni sulle catene alimentari (Pauly, D. et al, 1998) e sugli ecosistemi marini (Halpern, BS et al., 2008). Inoltre, cresce la richiesta di pesce, che risulta essere un ottimo prodotto alimentare, ricco di acidi grassi omega-3. Considerando questi fattori e il continuo aumento della popolazione mondiale, il settore dell'acquacoltura si propone come fornitore di alimenti ricchi di nutrienti, cercando di separare la produzione ittica dalle fluttuazioni ambientali, controllando le condizioni di crescita, l'assunzione di mangime e le malattie (Asche, F. et al., 2008), queste ultime tra le principali ostacoli allo sviluppo di questo settore.

Seguendo i principi dell'economia circolare per il riutilizzo dei sottoprodotti della lavorazione degli alimenti, il progetto intende valutare l'efficacia dei peptidi bioattivi isolati dagli scarti di lavorazione del salmone (*Salmo salar*) includendoli nella formulazione di mangimi per specie ittiche come il branzino (*Dicentrarchus labrax*) e orata (*Sparus aurata*) e viceversa.

I sottoprodotti sono tutta la materia prima, commestibile o non commestibile che rimane dopo la produzione del prodotto principale (Mirabella, N., et al 2013) e che è una ricca fonte di peptidi bioattivi (Lafarga, T. et al 2014; Matak, K. et al 2015).

I peptidi bioattivi sono brevi sequenze amminoacidiche lunghe approssimativamente 2-20 aminoacidi (aa), ottenute dall'idrolisi proteolitica ad opera di enzimi, microrganismi con attività proteolitica o metodi di fermentazione. Dopo la digestione, questi piccoli peptidi a basso peso molecolare vengono assorbiti facilmente dal tessuto intestinale, entrando direttamente nel circolo ematico ed assicurandone la biodisponibilità (Di Bernardini et al., 2011).

Moderate quantità di questi peptidi aggiunti alla dieta, possono migliorare lo stato di salute dei pesci e la crescita. Alcuni studi hanno rilevato che i peptidi derivanti da scarti di lavorazione di specie ittiche hanno un elevatissimo potenziale antinfiammatorio, antimicrobico e antiossidante (Masso-Silva, J. et al., 2014, Siddik et al., 2020).

L'approccio adottato dal progetto riguarda non solo la riduzione degli sprechi, ma anche la potenziale riduzione dell'uso di mangimi medicati e il miglioramento della salute e del benessere dei pesci. In questo modo il progetto chiude il ciclo produttivo, promuovendo la sostenibilità del settore dell'acquacoltura.

Obiettivi del progetto di ricerca

Obiettivo del progetto di ricerca è individuare i potenziali effetti dei peptidi bioattivi derivati dai sottoprodotti della lavorazione del salmone atlantico (*Salmo salar*) sulle performance di crescita, sugli indici somatometrici, sui parametri biochimici del sangue, sulla risposta immunitaria e sull'istologia dei visceri, di spigola e orata (*Dicentrarchus labrax* e *Sparus aurata*) e viceversa, in normali condizioni di allevamento ed in condizioni subottimali. Il fine è determinare se gli scarti dai quali derivano le molecole testate, possano effettivamente rappresentare un buon punto di inizio per la produzione di ingredienti che diano valore aggiunto alle diete somministrate in acquacoltura, nell'ottica di un'economia circolare che riduca gli sprechi e le emissioni, contribuisca a tamponare i costi della produzione e riduca la pressione sugli stock ittici. Tema fondamentale della sperimentazione in acquacoltura è infatti lo sviluppo di sistemi di produzione sostenibili in riferimento all'ambiente, conducendo test su ingredienti innovativi e funzionali che siano in grado di massimizzare le performance di accrescimento e allo stesso tempo incrementare lo stato di salute dei pesci, influenzando positivamente sul sistema immunitario.

Materiali e Metodi

Prove in vitro

Le prove *in vitro* hanno avuto lo scopo di fornire dati sulla capacità immunomodulatoria di idrolizzati proteici ottenuti da sottoprodotti della lavorazione del salmone e di produrre i dati per la validazione del software predittivo su queste proprietà che i colleghi norvegesi stanno sviluppando. A tal fine sono state implementate varie prove *in vitro* ottimizzate per due linee cellulari denominate DLB-1 (*Dicentrarchus labrax* brain) e SAF-1 (*Sparus aurata* fin) derivate rispettivamente da cellule nervose di branzino Europeo (*Dicentrarchus labrax*) e fibroblasti di orata (*Sparus aurata*).

Nella fase di standardizzazione delle metodiche sono state testate molteplici variabili al fine di individuare quelle ottimali per l'analisi sulle linee cellulari selezionate come per esempio numero di cellule/cm², concentrazione dell'MTT, tipo, concentrazione e tempo di stimolazione, espressione genica basale del gene HK e dei geni marker da selezionare per la prova finale (IL-1b, IL-8, IFN, Ferritin, Hpcidin, C3, Mx).

Prove di citotossicità

Gli idrolizzati proteici ottenuti da sottoprodotti della lavorazione del pesce, estratti da materiale identificato come "testa" (SH) e da materiale identificato come "cute" (SS) sono stati preliminarmente sottoposti a test di citotossicità, misurata come concentrazione citotossica al 50% (CC50).

Le colture cellulari DLB-1 e SAF-1 sono state seminate in piastre a 96 pozzetti ed esposte agli idrolizzati a diverse concentrazioni (0,625-80 µg/ml) per 48 ore, quindi il prodotto è stato rimosso e la vitalità cellulare è stata misurata con il metodo MTT basato sulla riduzione del sale solubile di tetrazolio (giallo) in formazano (insolubile e blu). L'MTT (1 mg/ml) è stato aggiunto e dopo incubazione di 4 ore a 25°C è stato solubilizzato con etanolo 75%, quindi l'assorbanza è stata letta a 570 nm con spettrofotometro (Multiskan MS, LabSystems).

Tutte le prove di citotossicità sono state condotte in 3 repliche biologiche e due repliche tecniche.

Prove di immunostimolazione

Le colture cellulari DLB-1 e SAF-1 sono state seminate in piastre a 24 pozzetti ed esposte agli idrolizzati utilizzando la concentrazione selezionata sulla base dei risultati di citotossicità, quindi il prodotto è stato rimosso e una parte dei monostrati cellulari sono stati stimolati con lipopolisaccaridi di origine batterica (LPS, Merk) o con polyinosinic-polycytidylic acid sodium salt (POLY I:C, Merk) per 6-24 ore. Al termine della stimolazione l'RNA è stato estratto dalle cellule stimolate e non stimolate utilizzando un kit commerciale (NucleoSpin RNA, Macherey-Nagel).

Analisi immunologica

Le analisi immunologiche sono state condotte come precedentemente descritto (Busti et al., 2020). L'RNA è stato retrotrascritto utilizzando la GoScript Reverse Transcriptase (Promega) e la concentrazione del cDNA ottenuto è stata quantificata usando il fluorimetro Qubit (ThermoFisher). Le real time PCR sono state condotte con lo strumento ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems) utilizzando il sistema BRYT Green GoTaq qPCR (Promega). Tutti i campioni sono stati testati in triplicato. I primers usati per l'amplificazione del gene housekeeping (HK) e dei geni target sono riportati nelle tabelle 1 e 2. Per ciascun campione, l'espressione genica è stata normalizzata verso il gene 18S rRNA (HK) ed espressa come $2^{-\Delta\Delta Ct}$, dove il ΔCt è stato ottenuto sottraendo il valore di cycle threshold (Ct) del gene 18S rRNA dal valore del Ct del gene target. L'espressione genica nelle cellule esposte agli idrolizzati è stata espressa come fattore moltiplicativo relativo alle cellule non esposte.

Tabella 1. Primers usati per l'amplificazione dei geni di branzino

Gene	Abbreviation	GenBank ID	Primer sequence (5'-3')	References
18s rRNA	18S	AM490061	AGGGTGTGGCAGACGTTAC CTTCTGCCTGTTGAGGAACC	Sepulcre et al. 2007
Interleuchina 1β	IL-1β	AJ311925	ATCTGGAGGTGGTGGACAAA AGGGTGCTGATGTTCAAACC	Sepulcre et al., 2007
Interleuchina 8	IL-8	AM490063	GTCTGAGAAGCCTGGGAGTG GCAATGGGAGTTAGCAGGAA	Sepulcre et al., 2007

Interleuchina 10	IL-10	DQ821114	CGACCAGCTCAAGAGTGATG AGAGGCTGCATGGTTTCTGT	Sepulcre et al., 2007
Transforming growth factor β	TGF- β	AM421619	GACCTGGGATGGAAGTGGAT CAGCTGCTCCACCTTGTGTTG	Faliex et al., 2008
Ferritina	FER	NP_001117129, P49946, AAB34575	ATGCACAAGCTCTGCTCTGA TTTGCCCAGGGTGTGTTTAT	Sarropoulou et al. 2009
Epcidina	HEP	DQ131605	CCAGTCACTGAGGTGCAAGA TCAGAACCTGCAGCAGACAC	Sarropoulou et al. 2009; Rodrigues et al., 2006
Frazione C3 complement	C3	DN832026	TATGCCCTTCTTGCTCTGGT GCCTGAGTTGATCCATAGCC	Bado-Nilles et al., 2011
Proteina Mx	Mx	AM228977, HQ237501, AY424961	GAAGAAGGGCTACATGATCGTC CCGTCATTGTAGAGAGTGTGGA	Chaves-Pozo et al, 2012
Interferone I α	IFN-I	AM765847	GGCTCTACTGGATACGATGGCT CTCCCATGATGCAGAGCTGTG	Scapigliati et al., 2010

Tabella 2. Primers usati per l'amplificazione dei geni di orata

Gene	Abbreviation	GenBank ID	Primer sequence (5' - 3')	References
18s rRNA	18S	AY587263	CGAAAGCATTGCAAGAAT AGTTGGCACCGTTTATGGTC	Cuesta et al., 2008
Interleuchina 1 β	IL-1 β	AJ277166	GCGACCTACTGCCACCTACACC TCGTCCACCGCCTCCAGATGC	Pérez-Cordón et al. 2014
Interleuchina 8	IL-8	AM765841	GCCACTCTGAAGAGGACAGG TTTGGTTGTCTTTGGTCGAA	Liarte et al., 2011
Interleuchina 10	IL-10	JX976621	GAGCGTGGAGGAATCTTTCAA GATCTGCTGGATGGACTGC	Khansari et al., 2017
Transforming growth factor β	TGF- β	AF424703	GCATGTGGCAGAGATGAAGA TTCAGCATGATACGGCAGAG	Mansour et al., 2018
Ferritina	FER	ACY75476	AAGCCTCCAAGGGCCACAT TGGAGTCCAAGTGCCTCAG	Fernández et al., 2013
Epcidina	HEP	CB184616	GCCATCGTGCTCACCTTTAT CCTGCTGCCATACCCCATCT	Cuesta et al., 2008
Frazione C3 complemento	C3	CX734936, HM543456	CTGCCTCATTGCCATGCAG CAGGCGCTTCTCCAGGTAG	Cordero et al., 2016
Proteina Mx	Mx	AF491302	GAGAGGGAGCGGCATTGTTAC TCGTCCAGCTCTTCTCCTCGTG	Grasso et al., 2015 modified
Interferone I α	IFN-I	AM937108	GTCCAAAGCATCAGCTGAGG GTGGCCATTCTCTTGAGG	Picchietti et al., 2013 modified

Prove in vivo

Disegno sperimentale e sistema di allevamento

La prova sperimentale è stata condotta presso il laboratorio del Dipartimento di Scienze mediche veterinarie, con sede a Cesenatico (FC) in Viale dei Mille n° 160 (Fig.1).

Per la prova sono state utilizzate 18 vasche in vetroresina a base conica della capacità di 800 litri ciascuna. L'impianto di sperimentazione presenta un sistema di ricircolo chiuso (RAS) che consente il passaggio e il trattamento dell'acqua reflua proveniente dalle vasche attraverso una continua filtrazione e disinfezione. Il sistema RAS utilizzato ha un volume di acqua complessivo di 22 m³ ed

è costituito da un filtro meccanico a sabbia (PTK 1200, Astralpool, Barcellona, Spagna), luci ultraviolette (PE 25 mJ / cm²: 32m³ h⁻¹, Blaufish, Barcellona, Spagna) e un filtro biologico (PTK 1200, Astralpool, Barcellona, Spagna). La portata dell'acqua all'interno di ciascuna vasca è al 100% di cambio ogni ora, mentre il rinnovo complessivo dell'acqua è del 5% al giorno.

La prova è stata condotta con esemplari di orata e branzino con peso medio iniziale rispettivamente di circa 72.7 g e 73.2 g forniti da Panittica Italia srl. Gli animali sono stati pesati individualmente e distribuiti in nove vasche per specie nello stesso impianto RAS. Ogni vasca conteneva 60 esemplari. Agli animali sono state somministrate tre diete sperimentali prodotte in forma di pellet estruso con granulometria 4mm e denominate: BP0 (dieta di controllo), BP5 (dieta contenente il 5% di peptidi bioattivi) e BP10 (dieta contenente il 10% di peptidi bioattivi). La composizione delle diete e la percentuale di proteine, lipidi, ceneri e umidità in esse contenute sono illustrate in Tabella 3.

Durante i 58 giorni di prova, gli animali sono stati alimentati con mangiatoie automatiche (Fig.2) per sei giorni a settimana, la domenica sono stati mantenuti a digiuno. Ogni dieta era distribuita in triplicato (3 vasche per ogni specie). Il 50% della razione giornaliera è stato somministrato al mattino alle ore 8.30, il restante 50% nel pomeriggio alle ore 16.00, entrambi i pasti della durata di un'ora. Tutti i raccoglitori di mangime avanzato sono stati svuotati dopo ogni pasto e a fine giornata l'avanzo del mangime è stato raccolto, messo in stufa overnight a 105° e il giorno dopo pesato ai fini dei calcoli dei parametri di crescita. Per tutta la durata della prova è stato registrato quotidianamente il ritrovamento di esemplari morti in vasca, per calcolare il tasso di mortalità, aggiustare il dato di biomassa e correggere il calcolo dell'indice di conversione. Alla fine della sperimentazione gli esemplari sono stati posti in condizioni di allevamento subottimali (basso livello di ossigeno disciolto, pari al 70% della saturazione, ed alta temperatura, pari a 30°C) per i successivi 8 giorni.



Figura 1 Laboratorio in cui è stata condotta la prova. Operatori impegnati nel caricamento delle mangiatoie.

Tab. 3 Ingredienti e composizione prossimale delle diete sperimentali.

	<i>Diete Sperimentali</i>		
	BP0	BP5	BP10
<i>Ingredienti, % nella dieta</i>			
Salmon hydrolysate	0.00	5.00	10.00
Fish meal	15.00	10.00	5.00
Soybean meal	15.00	15.00	15.00
Wheat	15.28	16.02	16.87
Wheat gluten	12.20	11.30	10.30
Corn gluten	8.00	8.00	8.00
Soy protein concentrate	5.40	5.40	5.40
Fish oil	10.00	9.90	9.80
Rapeseed oil	5.00	5.00	5.00
Horse beans	10.00	10.00	10.00
Lecithin from rapeseed	1.00	1.00	1.00
Vitamin premix	0.50	0.50	0.50
Mineral premiks	0.50	0.50	0.50
Monosodiumphosphate	3.00	3.00	3.00
L-Lysine	0.40	0.40	0.40
DL-Methionin	0.05	0.05	0.05

Composizione prossimale, % sulla base del peso umido

Umidità	6.41	6.46	6.57
Proteine	39.90	39.50	39.22
Lipidi	19.20	18.75	18.04
Ceneri	6.79	6.29	5.73

Qualità dell'acqua e parametri ambientali

Durante l'intera durata della sperimentazione, la temperatura media dell'acqua è stata mantenuta a $24 \pm 1,0$ ° C; il fotoperiodo è stato mantenuto costante a 12 h giorno attraverso luce artificiale. Il livello di ossigeno è stato mantenuto costante a $8,0 \pm 1,0$ mg L⁻¹ attraverso un sistema di ossigeno liquido collegato ad un software controller (B&G Sinergia snc, Chioggia, Italia). Ammoniaca (azoto ammoniacale totale $\leq 0,1$ mg L⁻¹) e nitriti ($\leq 0,2$ mg L⁻¹) sono stati monitorati spettro fotometricamente una volta al giorno (Spectroquant Nova 60, Merck, Lab business, Darmstadt, Germania). Il controllo di questi parametri è stato effettuato quotidianamente al mattino, prima della somministrazione del pasto per evitare interferenze dovute all'aumento dei rifiuti azotati dovuti alle deiezioni e a frammenti di mangime non ingerito. La salinità (30 g L⁻¹) è stata misurata con un rifrattometro al sale (106 ATC), mentre i valori di pH sono stati mantenuti tra 7.5 e 8, provvedendo quando necessario all'aggiunta di bicarbonato di sodio (NaHCO₃), con azione di tampone, per mantenere il pH su valori ottimali sia per le specie oggetto di studio, sia per l'attività batterica nitrificante del filtro biologico.

Campionamenti

Per consentire l'acquisizione di informazioni necessarie alla valutazione delle performance di accrescimento, e degli altri parametri presi in esame, durante la prova sono stati condotti più campionamenti, uno iniziale, uno finale e uno dopo le condizioni di allevamento subottimali, articolati in diverse date. Tali operazioni sono state svolte utilizzando metodi standard rispettando le norme per il benessere animale. Tutti i soggetti sono stati pesati all'inizio ed alla fine della prova (previa anestesia).

Campionamento iniziale (T0)

Analisi immunologica. Il giorno 0 (inizio prova) sono stati soppressi, mediante l'utilizzo anestetico MS 222 in dose letale, tre esemplari per ogni vasca, allo scopo di ottenere campioni di fegato, rene ed intestino (circa 20-30 mg) (Fig. 2). I campioni sono stati conservati in RNAlater overnight alla temperatura di +4°C e successivamente refrigerati a -20°C. Questi campioni saranno processati

insieme a quelli prelevati alla fine della prova per l'estrazione di RNA ed analisi dell'espressione genica di alcuni marcatori della risposta immunitaria [ferritina (FER), epcidina (HEP), componente del complemento C3 (C3), interleuchina 1 β (IL-1 β), interleuchina 8 (IL-8), interleuchina 10 (IL-10), interferone 1 α (IFN-1), proteina Mx (Mx), fattore di crescita trasformante β (TGF- β)].



Figura 2 prelievo organi per analisi immunologica.

Campionamenti finali

Giorno 51 (T1)

Biochimica del sangue. Sono stati prelevati campioni di sangue (Fig.3) dalla vena caudale di cinque esemplari anestetizzati per ogni vasca (15 pesci di ogni specie, per ogni dieta), per la valutazione dei parametri ematici. I campioni sono stati poi centrifugati (3000 xg, 10 min, 4 °C) e le aliquote di sangue, conservate a -80 °C fino al momento delle analisi.



Figura 3 Prelievo ematico

Microbiota intestinale. Successivamente, sono stati sacrificati cinque pesci per ogni vasca con overdose di anestetico (8 e 12 ore post-prandiale per orate e branzini rispettivamente) e dissezionati

in condizioni di sterilità per prelevare il contenuto dell'intestino distale (Fig.4), riporlo in tubi Eppendorf (1 per pesce, circa 100 mg per ogni campione) e conservarlo a -80°C fino al momento dell'estrazione del DNA per l'analisi del microbiota.



Figura 4 Prelievo del contenuto intestinale

Analisi immunologica. Tre animali per vasca sono stati utilizzati per prelevare campioni di fegato, rene ed intestino (circa 20-30 mg), seguendo la procedura adottata al giorno 0 per l'estrazione di RNA ed analisi dell'espressione genica.

Giorno 52

Durante questo giorno di campionamento, tutti i soggetti sono stati anestetizzati e sono stati pesati singolarmente per fornire i dati utilizzati per l'elaborazione degli indici di accrescimento

Istologia. Tre pesci per vasca sono stati sacrificati per prelevare 2 campioni di circa 5 mm di lunghezza da due regioni diverse dell'intestino (prossimale e distale) da ogni animale (Fig.5). I campioni posti in fissativo (10% formalina tamponata) saranno poi processati allo scopo di ottenere sezioni di spessore 3 μm , da sottoporre a colorazione con ematossilina eosina (EE) da osservare con microscopio ottico.



Figura 5 Operazioni di campionamento istologico

Giorno 58 (T2- dopo mantenimento degli animali in condizioni di allevamento subottimali)

Dopo la fine della prova di crescita, gli esemplari sono stati mantenuti in condizioni di allevamento subottimali (alta temperatura, ~30 °C e ridotto ossigeno, ~3.5 mg/l e ~66.5% livello di saturazione) per una settimana, rispettando lo stesso regime alimentare, per testare la possibile interazione fra peptidi bioattivi nella dieta e resistenza allo stress nelle specie ittiche allevate. In questa giornata di campionamento, il prelievo di campioni per l'analisi immunologica, i parametri ematici e per il microbiota intestinale è stato condotto come descritto in precedenza.

Indici zootecnici di performance e indici somatometrici

Gli indici zootecnici di performance sono stati calcolati sui dati del peso del mangime ingerito calcolato durante la prova e il peso degli animali rilevato a inizio e fine prova. Gli indici calcolati sono stati i seguenti: Tasso di accrescimento specifico (SGR) = $(100 * (\ln \text{ peso finale (g)} - \ln \text{ peso iniziale (g)}) / \text{giorni})$; Feed intake (FI) = $100 * (\text{mangime somministrato} / \text{peso medio}) / \text{giorni}$; Indice di conversione alimentare (FCR) = $\text{feed intake (g)} / \text{incremento ponderale (g)}$.

A fine prova tre soggetti per vasca sono sacrificati e ne è stato registrato peso totale, peso dell'intero pacchetto viscerale, del grasso periviscerale e del fegato, allo scopo di calcolare gli indici somatometrici come riportato di seguito.

Fattore di condizione K di Fulton (CF) = $(\text{PT} / \text{L}^3) * 100$, dove PT è il peso totale del pesce in g, L è la sua lunghezza in cm; Indice Viscerosomatico (VSI) = $100 * (\text{peso visceri (g)} / \text{peso corporeo (g)})$; Indice Epatosomatico (HSI) = $100 * (\text{peso fegato (g)} / \text{peso corporeo (g)})$

Analisi immunologiche

Le analisi immunologiche sono state condotte come precedentemente descritto (Busti et al., 2020). Brevemente l'RNA totale è stato estratto da 30 mg di tessuto utilizzando il kit NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel) secondo le istruzioni del produttore. L'RNA è stato quindi retrotrascritto utilizzando la GoScript Reverse Transcriptase (Promega) e la concentrazione del cDNA ottenuto è stata quantificata usando il fluorimetro Qubit (ThermoFisher). Le real time PCR sono state condotte con lo strumento ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems) utilizzando il sistema BRYT Green GoTaq qPCR (Promega). I primers usati per l'amplificazione del gene housekeeping (HK) e dei geni target sono riportati nella tabella 1. Tutti i campioni sono stati testati in triplicato. L'espressione dei geni FER, HEP e C3 è stata misurata nei campioni di fegato, mentre l'espressione dei geni IL-1 β , IL-8, IL-10, IFN-1, Mx e TGF- β sono stati misurati nei campioni di intestino. Per ciascun campione,

l'espressione genica è stata normalizzata verso il gene 18S rRNA (HK) ed espressa come $2^{-\Delta\Delta Ct}$, dove il ΔCt è stato ottenuto sottraendo il valore di cycle threshold (Ct) del gene 18S rRNA dal valore del Ct del gene target. L'espressione genica nei campioni dei soggetti trattati e non trattati raccolti ai tempi T1 e T2 è stata espressa come fattore moltiplicativo relativo ai campioni raccolti al tempo 0 (T0).

Analisi statistiche

Tutti i dati sono presentati come media \pm deviazione standard (SD). La vasca è stata utilizzata come unità sperimentale per analizzare la crescita e le prestazioni. I dati di performance di crescita e indici somatometrici sono stati analizzati con un'ANOVA a una via, mentre quelli dei parametri plasmatici con un'ANOVA a due vie. La normalità e / o l'omogeneità delle ipotesi di varianza sono state convalidate per tutti i dati precedenti l'ANOVA. Quando le differenze tra i trattamenti sono state considerate significative ($P \leq 0,05$) è stato eseguito il Tukey post hoc test.

I dati di espressione genica ottenuti nella prova *in vitro* sono stati analizzati con ANOVA a una via e quando le differenze tra i trattamenti sono state considerate significative ($P \leq 0,05$) è stato eseguito il Tukey post hoc test. I dati di espressione genica ottenuti dai campioni prelevati durante la prova *in vivo* sono stati analizzati con ANOVA a due vie per valutare l'effetto sia del tempo (T1 vs T2) che della dose. La comparazione fra singoli gruppi sperimentali è stata poi condotta con test Mann-Whitney.

Risultati

Prove in vitro

Le prove di citotossicità e di misurazione dell'attività immunomodulatoria sono state standardizzate sulle colture cellulari di branzino ed orata settando i seguenti parametri: numero di cellule/cm² concentrazione dell'MTT, tipo, concentrazione e tempo di stimolazione, espressione genica basale del gene HK e dei geni marker.

La citotossicità misurata come concentrazione citotossica al 50% (CC50) per i dieci idrolizzati proteici, ottenuti da sottoprodotti della lavorazione del pesce, 5 estratti da materiale identificato come "testa" (SH1-5) e 5 da materiale identificato come "cute" (SS1-5) è riportata in tabella 4.

In particolare gli idrolizzati SH2, SH5, SS2 e SS5 non hanno mostrato nessun effetto tossico indipendentemente dalla concentrazione testata (0,625-80 $\mu\text{g/ml}$), mentre gli altri idrolizzati (SH1, SH3, SH4, SS1, SS3, SS4) hanno mostrato CC50 nel range 5,8-11,8 $\mu\text{g/ml}$ manifestando un effetto citotossico sostanzialmente diverso.

Tab. 4 Valori di citotossicità degli idrolizzati sulla coltura cellulare DLB-1

	CC ₅₀ (µg/ml)	
	mean	SD
SS1	7,028347515	4,819133
SS2	> 80	na
SS3	5,755138075	0,548005
SS4	11,82803406	2,043077
SS5	> 80	na
SH1	9,08862122	1,876935
SH2	> 80	na
SH3	6,628056936	1,29632
SH4	11,17506981	1,114253
SH5	> 80	na

na: non applicabile

Le prove preliminari di valutazione della capacità immunomodulatoria degli idrolizzati SS3 e SS5 non hanno mostrato attività immunomodulatoria di questi prodotti sulle due linee cellulari testate dopo 24 ore di incubazione in assenza di stimolazione (Fig. 6).

Le cellule trattate con l'idrolizzato SS3 (20 µg/ml) hanno mostrato una riduzione significativa dell'espressione genica di entrambi i marker immunologici (IL-1 β , IL-8) dopo stimolazione se comparate alle cellule non trattate. Questa riduzione è stata osservata sia dopo stimolazione con LPS che con POLY I:C (Fig. 6).

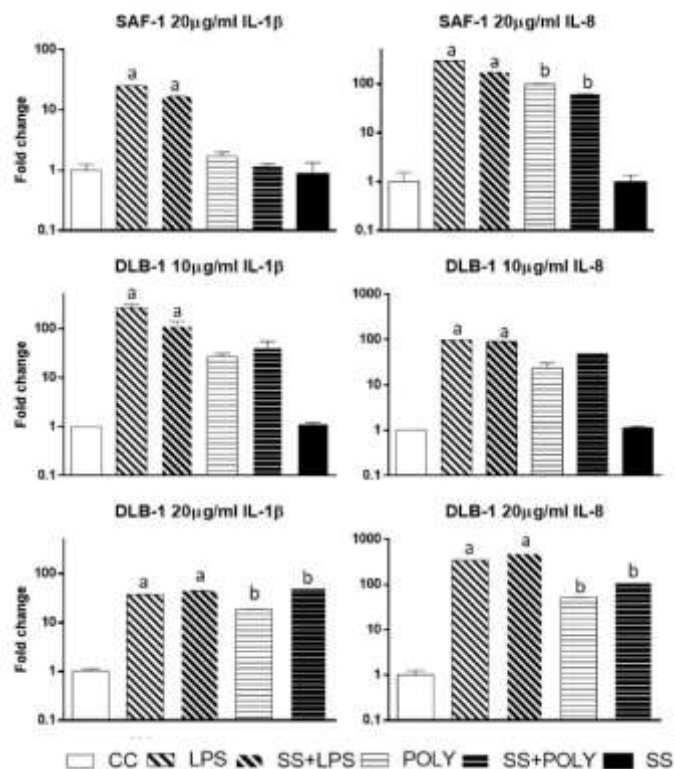


Figura 6. Espressione genica osservata nelle colture cellulari di branzino (DLB-1) e orata (SAF-1) esposte all'azione degli idrolizzati (SS) e dopo stimolazione (LPS o POLY I:C) Le lettere indicano differenze statisticamente significative ($p \leq 0.05$).

L'idrolizzato SS5 ha invece mostrato un effetto immunomodulatorio diverso alle due concentrazioni a cui è stato testato (10 e 20 $\mu\text{g/ml}$). A 10 $\mu\text{g/ml}$ è stata osservata una capacità di riduzione dell'espressione genica analoga a quella osservata per l'idrolizzato SS3, invece alla concentrazione di 20 $\mu\text{g/ml}$ è stata osservata un'attività di potenziamento dell'espressione (Fig. 6).

Prove in vivo

Performance di crescita e indici somatometrici

I dati riportati in Tabella 5 indicano i risultati degli indici di performance studiati durante l'intero periodo della prova. Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative in nessuno degli indici di performance. Ciò nonostante, si può osservare nella specie *Dicentrarchus labrax* un incremento di peso lievemente crescente all'aumentare della percentuale di peptidi bioattivi contenuti nella dieta somministrata, tendenza non rispettata dagli esemplari di *Sparus aurata* allevati con la dieta BP5. In generale gli esemplari di orata hanno mostrato un incremento di peso maggiore rispetto ai branzini. Per quanto riguarda il valore di SGR si può osservare un'elevata omogeneità dei valori

ottenuti fra esemplari della stessa specie nelle diverse diete e valori maggiori nelle orate, confermando i dati ottenuti in base alla crescita. I valori di FI ed FCR presentano una spiccata uniformità in entrambe le specie, anche se, in linea generale, i valori relativi alla specie *Dicentrarchus labrax* sono risultati inferiori rispetto a quelli della specie *Sparus aurata*. Per quanto riguarda la sopravvivenza percentuale, si è potuta constatare una maggiore variabilità di dati, ma con una tendenza maggiore per i branzini.

Tab. 5 Indici di performance di crescita di entrambe le specie *Dicentrarchus labrax* e *Sparus aurata*. I valori sono indicati come medie (n=3) ± SD.

	<i>Diete Sperimentali</i>					
	<i>Dicentrarchus labrax</i>			<i>Sparus aurata</i>		
	BP0	BP5	BP10	BP0	BP5	BP10
Peso iniziale(g)	73.2 ± 0.6	73.3 ± 1.6	73.3 ± 0.3	72.7 ± 0.8	72.7 ± 0.8	72.7 ± 0.4
Peso finale(g)	145.1 ± 1.8	147.1 ± 3.8	149.2 ± 2.6	169.6 ± 2.9	166.7 ± 2.8	170.0 ± 2.2
Incremento ponderale(g)	71.8 ± 2.3	73.8 ± 2.3	75.9 ± 2.3	96.9 ± 2.2	94.0 ± 2.1	97.3 ± 2.4
SGR	1.2 ± 0.0	1.2 ± 0.0	1.2 ± 0.0	1.5 ± 0.0	1.4 ± 0.0	1.5 ± 0.0
FI	1.5 ± 0.0	1.5 ± 0.0	1.5 ± 0.0	1.9 ± 0.0	1.8 ± 0.0	1.9 ± 0.0
FCR	1.3 ± 0.0	1.3 ± 0.0	1.3 ± 0.0	1.4 ± 0.0	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.0
Sopravvivenza (%)	2.2 ± 2.5	4.4 ± 3.5	0.0 ± 0.0	0.6 ± 1.0	3.9 ± 4.2	1.1 ± 1.0

Gli indici somatometrici (HSI, VSI, CF) riportati in Tabella 6, sono risultati simili nelle diverse diete in entrambe le specie. Per quanto riguarda gli indici HSI, VSI non sono state evidenziate differenze statisticamente significative. Tuttavia, una differenza significativa si nota nella specie *Sparus aurata* per gli esemplari nutriti con il mangime di controllo BP0, i quali mostrano un fattore di condizione (CF) circa 3 volte maggiore di quelli alimentati con i mangimi sperimentali.

Tab. 6 Indici somatometrici degli esemplari di *Dicentrarchus labrax* e *Sparus aurata* alimentati con le diete BP0, BP5 e BP10 per 58 giorni. I valori sono indicati come medie (n = 3) ± SD. Le lettere in apice indicano differenze statisticamente significative (One-way Anova p ≤ .05) tra i trattamenti.

Indici somatometrici	<i>Diete sperimentali</i>							
	<i>Dicentrarchus labrax</i>				<i>Sparus aurata</i>			
	BP0	BP5	BP10	<i>P- value</i>	BP0	BP5	BP10	<i>P- value</i>
HSI	2.6 ± 0.3	2.8 ± 0.4	2.5 ± 0.3	0.3656	2.4 ± 0.5	2.1 ± 0.3	2.6 ± 0.3	0.0899
VSI	12.2 ± 1.0	12.6 ± 1.5	12.3 ± 1.7	0.8399	7.7 ± 0.8	7.6 ± 0.6	7.4 ± 0.7	0.6568
CF	1.2 ± 0.06	1.2 ± 0.05	1.2 ± 0.08	0.8326	5.2 ± 4.9 ^b	1.6 ± 0.1 ^a	1.7 ± 0.06 ^a	0.0173

Parametri ematici

I parametri ematici degli esemplari di *Dicentrarchus labrax* e *Sparus aurata* sono illustrati nelle Tabelle 7 e 8 rispettivamente. La maggioranza dei parametri presi in considerazione, non ha mostrato variazioni statisticamente significative relative alla dieta ed al tempo di campionamento (prima e dopo l'effetto stressante indotto dalle condizioni di allevamento subottimali) per entrambe le specie. Ad ogni modo, si possono osservare nei valori relativi alle orate (Tab. 8), che il glucosio è stato influenzato significativamente dalla dieta e dal tempo di campionamento, mostrando valori maggiori con la dieta BP10, specialmente a T2. La creatinina è aumentata leggermente con BP10 a T2, mentre AST è risultato maggiore con la dieta BP10 in entrambi i campionamenti. Inoltre, è possibile osservare che trigliceridi e cortisolo risultano essere significativamente più bassi dopo l'effetto del periodo di allevamento in condizioni subottimali, in tutte le diete. Nessuna differenza significativa è stata osservata nei valori di TP e ALP. Nei parametri ematici relativi ai branzini (Tab. 7), si può osservare un incremento significativo dei valori di glucosio a T2 per le diete BP5 e BP10, mentre le condizioni stressanti hanno indotto un significativo calo dei valori dei trigliceridi, per gli animali assegnati alle diete BP0 e BP5.

Nessuna differenza statisticamente significativa per i restanti parametri osservati.

Tab. 7 Valori ematici degli esemplari della specie *Dicentrarchus labrax* in condizioni di allevamento normali (T1) e dopo essere stati sottoposti a condizioni di allevamento subottimali (T2). Parametri analizzati: TP = proteine totali, TRIG = trigliceridi, GLU = glucosio, ALP = fosfatasi alcalina, ASP = aspartato aminotransferasi, creatinina e cortisolo. I valori sono indicati come medie (n = 3) ± SD. Le lettere in apice indicano differenze statisticamente significative (Two-way Anova p ≤ .05) tra i trattamenti.

Parametri ematici	<i>Diete sperimentali</i>								
	T1			T2			<i>P- value</i>		
	BP0	BP5	BP10	BP0	BP5	BP10	<i>T</i>	<i>Diet</i>	<i>Interaction</i>
TP (g dL ⁻¹)	4.3 ± 0.4	4.8 ± 0.4	4.6 ± 0.7	4.7 ± 0.4	4.3 ± 0.4	4.7 ± 0.4	0.9749	0.6559	0.0091
TRIG (mg dL ⁻¹)	1442.2 ± 250 ^{ab}	1620.1 ± 225 ^b	1364.8 ± 473 ^{ab}	1142.0 ± 325.9 ^a	1105.0 ± 311.8 ^a	1340.2 ± 220.3 ^{ab}	0.0008	0.7434	0.0457
GLU (mg dL ⁻¹)	155.4 ± 50.9 ^{ab}	139.4 ± 31 ^{ab}	114.5 ± 18.3 ^a	151.8 ± 25.2 ^{ab}	165.2 ± 42.8 ^b	154.8 ± 35.1 ^b	0.0101	0.0884	0.0771
ALP (U L ⁻¹)	77.8 ± 11.5	90.5 ± 21.2	82.9 ± 16.3	91.9 ± 15.1	97.3 ± 15.9	93.0 ± 14.6	0.0085	0.1595	0.7434
AST (U L ⁻¹)	68.1 ± 56.7	176.8 ± 178	144.8 ± 96.7	149.6 ± 70.5	188.4 ± 119.2	104.4 ± 42.6	0.4937	0.0559	0.1505
Creatinina (mg dL ⁻¹)	0.2 ± 0.06	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.07	0.3 ± 0.03	0.3 ± 0.03	0.3 ± 0.06	0.0031	0.4134	0.6009
Cortisolo (µg dL ⁻¹)	14.4 ± 7.64	8.3 ± 2.6	16.9 ± 9.3	10.6 ± 6.8	11.0 ± 6.2	13.0 ± 7.2	0.431	0.12	0.3663

Tab. 8 Valori ematici degli esemplari della specie *Sparus aurata* in condizioni di allevamento normali (T1) e dopo essere stati sottoposti a condizioni di allevamento subottimali (T2). Parametri analizzati: TP = proteine totali, TRIG = trigliceridi, GLU = glucosio, ALP = fosfatasi alcalina, ASP = aspartato aminotransferasi, creatinina e cortisolo. I valori sono indicati come medie (n = 3) ± SD. Le lettere in apice indicano differenze statisticamente significative (Two-way Anova p ≤ .05) tra i trattamenti.

Parametri ematici	Diete sperimentali								
	T1			T2			P- value		
	BP0	BP5	BP10	BP0	BP5	BP10	T	Diet	Interaction
TP (g dL ⁻¹)	3.8 ± 0.3	3.8 ± 0.2	4.2 ± 0.3	4.1 ± 0.4	3.8 ± 0.2	3.7 ± 1.2	0.8474	0.3721	0.0787
TRIG (mg dL ⁻¹)	952 ± 457 ^b	761 ± 259 ^{ab}	885.6 ± 342 ^{ab}	633.5 ± 324.7 ^{ab}	576.1 ± 184.9 ^a	610.5 ± 232.8 ^{ab}	0.0007	0.3537	0.7817
Glucose (mg dL ⁻¹)	131.6 ± 23.1 ^a	128.5 ± 22.5 ^a	136 ± 20.6 ^a	142.1 ± 34.7 ^a	129.4 ± 26.3 ^a	171.6 ± 32 ^b	0.0111	0.0036	0.0551
ALP (U L ⁻¹)	257.7 ± 132	176.8 ± 76.7	200.6 ± 74.3	186.3 ± 60.0	168.2 ± 56.8	187.5 ± 59.6	0.0974	0.1007	0.318
AST (U L ⁻¹)	49.6 ± 23.5	57.2 ± 44.2	118.6 ± 154	64.3 ± 38.1	98.5 ± 84.7	114.3 ± 59.9	0.3752	0.0487	0.6269
Creatinina (mg dL ⁻¹)	0.2 ± 0.04 ^a	0.3 ± 0.06 ^{ab}	0.2 ± 0.07 ^a	0.3 ± 0.04 ^{ab}	0.3 ± 0.03 ^{ab}	0.3 ± 0.08 ^b	0.0013	0.4881	0.0244
Cortisolo (µg dL ⁻¹)	6.7 ± 3.3 ^{bc}	8.1 ± 3.7 ^c	9.6 ± 4.5 ^c	1.7 ± 0.7 ^a	1.7 ± 0.8 ^a	1.8 ± 0.8 ^{ab}	< 0.0001	0.3396	0.3964

Analisi immunologica

L'analisi di espressione genica ha mostrato una generale riduzione della risposta immunitaria a seguito dell'esposizione dei pesci a condizioni di allevamento subottimale. In particolare l'ANOVA a due vie ha mostrato una significatività del fattore tempo (T1 vs T2) per i seguenti geni: IL-8 ($p=0,0021$), proteina Mx ($p=0,0036$), ferritina ($p<0,0001$) e C3 ($p=0,021$). L'effetto della dose è stato invece significativo solo per il gene dell'interleuchina 1 β ($p=0,0364$) mostrando in questo caso anche un'interazione fra tempo e dose.

La comparazione dei livelli di espressione nei singoli gruppi al tempo T1 ha invece mostrato alcune differenze significative fra la dieta di controllo (BP0) e quelle con integrazione di idrolizzati proteici (BP5, BP10) ed anche fra le due diete sperimentali. In particolare a livello intestinale nella dieta BP5 si osserva una riduzione di alcuni marcatori proinfiammatori (IL-1 β , IL-8) ed un significativo aumento dell'espressione della citochina antinfiammatoria IL-10 ($p=0,0012$). Al contrario nella dieta BP10 si osserva un aumento dell'espressione dei marcatori proinfiammatori (IL-1 β , IL-8; Fig. 7).

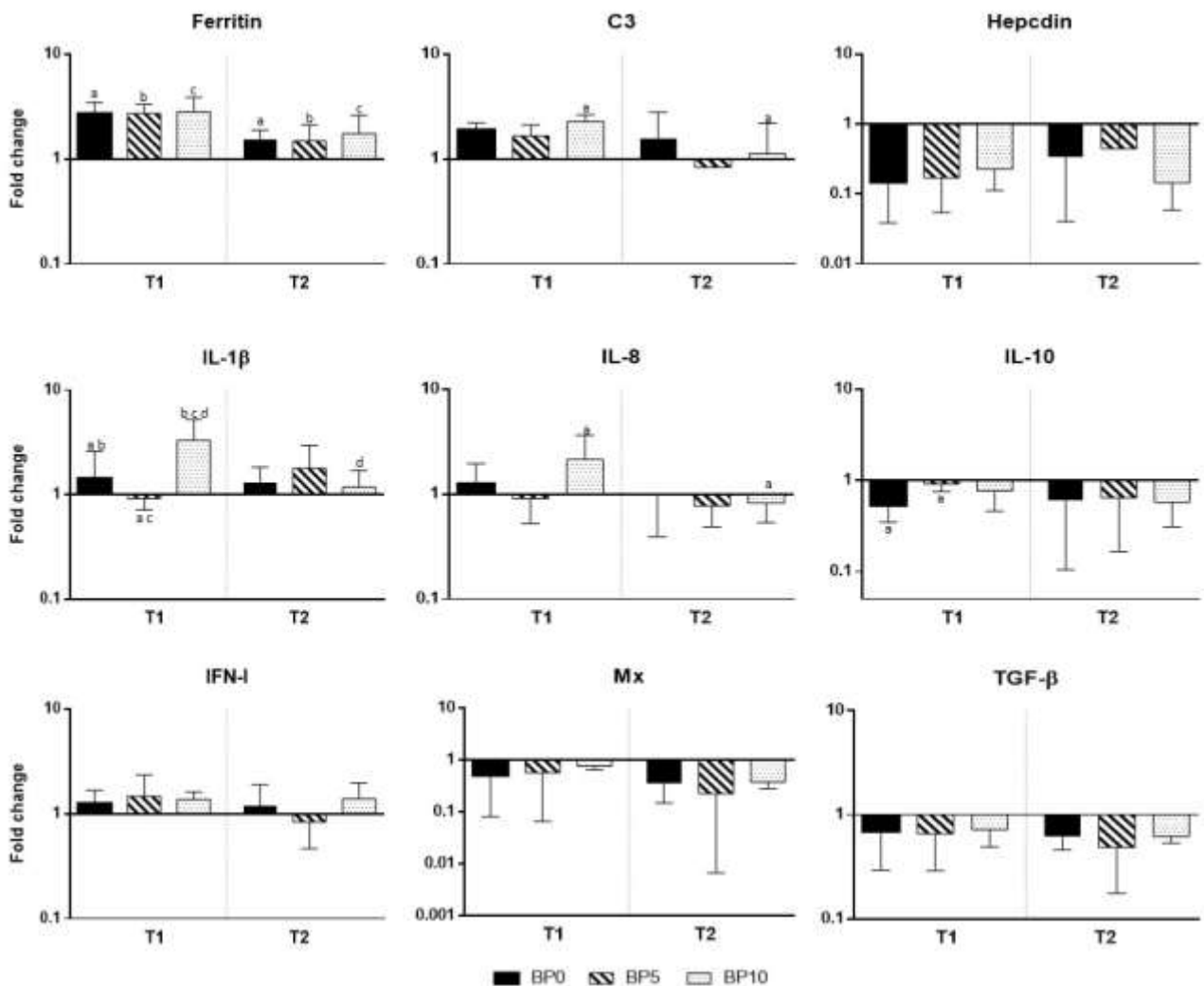


Fig.7 Espressione genica osservata negli esemplari della specie *Dicentrarchus labrax* in condizioni di allevamento normali (T1) e dopo essere stati sottoposti a condizioni di allevamento subottimali (T2). Le lettere indicano differenze statisticamente significative ($p \leq 0.05$).

Discussioni e Conclusioni

Le attività svolte *in vitro* sugli idrolizzati forniti hanno permesso di evidenziare un potenziale effetto immunomodulatorio in alcuni di essi, l'effetto si è mostrato diverso sulla base dell'idrolizzato e della concentrazione, i dati ottenuti potranno pertanto essere utilizzati dai colleghi norvegesi ai fini di validare il software predittivo sulle proprietà immunomodulatorie di idrolizzati proteici ottenuti da sottoprodotti della lavorazione del settore ittico. Gli idrolizzati potranno inoltre essere utilizzati per l'integrazione dell'alimentazione di specie ittiche quali branzino (*Dicentrarchus labrax*) ed orata (*Sparus aurata*) dove andranno verificate le proprietà immunomodulatorie.

Analizzando i risultati ottenuti nelle prove in vivo per ciò che concerne le performance zootecniche di crescita e conversione alimentare, si può notare come gli indici si discostino poco sia dai valori attesi sia gli uni dagli altri, delineando una crescita entro le aspettative. Osservando i dati sull'incremento del peso durante il periodo della prova, si demarca una più spiccata velocità di accrescimento nelle orate. Inoltre, gli indici somatometrici sono risultati equivalenti a prescindere dalla dieta somministrata, ad eccezione del fattore di condizione delle orate alimentate con dieta BPO che ha mostrato valori superiori alle aspettative, giustificabili in parte dall'aumento di peso elevato riscontrato nei parametri di crescita, in parte da una probabile casuale concentrazione di soggetti con potenziale di accrescimento (in termini di peso corporeo) maggiore rispetto agli altri, oltre che dalla possibilità d'errore intrinseca del campionamento. Ad ogni modo, i dati pervenuti hanno permesso di stabilire che i peptidi bioattivi derivanti dai sottoprodotti della produzione del salmone atlantico possono efficientemente rimpiazzare fino al 10 % della totalità dell'alimento senza compromettere la crescita e l'utilizzazione del mangime; in accordo con quanto asserito da altri studi nei quali sono state testate sostituzioni di alimentazione con moderate percentuali di peptidi bioattivi nella dieta (Kim, H. S. et al., 2014; Wei, Y. et al., 2016).

L'analisi immunologica effettuata sui campioni raccolti nella prova in vivo ha mostrato una generale riduzione dell'espressione genica dopo il periodo di esposizione a condizioni di allevamento subottimali mostrando come questo tipo di condizioni causi una riduzione della capacità di esprimere importanti fattori della risposta immunitaria. Per quanto riguarda le diete analizzate, è stato osservato un effetto diverso in relazione al dosaggio, in particolare a livello intestinale, con un effetto antinfiammatorio della dieta arricchita con il 5% di peptidi bioattivi e un effetto infiammatorio della dieta a maggiore concentrazione di peptidi bioattivi.

Alla fine della prova, la maggioranza dei parametri ematici presi in considerazione sono risultati assimilabili a quelli già visti in studi precedenti (Bonvini E. et al., 2018; Busti, S. et al., 2020), stando ad indicare una condizione generale di benessere nutrizionale.

In conclusione, i dati ottenuti fin ora, suggeriscono che i peptidi bioattivi derivanti dal riutilizzo degli scarti derivanti da salmoni dell'atlantico allevati (*S.salar*) possano avere una promettente implicazione come ingredienti sostenibili dell'alimentazione di branzini (*D.labrax*) ed orate (*S.aurata*) allevati.

Ulteriori dati non riportati, inclusi negli obbiettivi della sperimentazione, sono attualmente ancora in fase di elaborazione, poiché le correnti difficoltà relative alla pandemia globale hanno condizionato negativamente l'attività delle strutture universitarie sparse sul territorio incaricate della processazione dei campioni.

Il Responsabile Scientifico del Progetto

Prof. Alessio Bonaldo



Bibliografia

- Asche, F. Farming the Sea. *Marine Resource Economics*, 23, 527–547 (2008).
- Halpern, B.S., Walbridge, S., Selkoe, K. A., Kappel, C. V., Micheli, F., D'Agrosa, C., Bruno, J. F., Casey, K. S., Ebert, C., Fox, K. E., Fujita, R., Heinemann, D., Lenihan, H. S., Madin, E. M. P., Perry, M. T., Selig, E. R., Spalding, M., Steneck, R., Watson, R. A Global Map of Human Impact on Marine Ecosystems. *Science*, 319, 948-952 (2008).
- Lafarga, T., Hayes, M., Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation, functionality and application as functional ingredients. *Meat Sci*, 98(2), 227-239 (2014).
- Masso-Silvia, J. A., Diamond, G. Antimicrobial Peptides from Fish. *Pharmaceuticals*, 7(3), 265-310 (2014).
- Matak, K. E., Tahergorabi, R., Jaczynski, J. A review: Protein isolates recovered by isoelectric solubilization/precipitation processing from muscle food by-products as a component of nutraceutical foods. *Food Research International*, 77, 697–703 (2015).
- Mirabella, N., Castellani, V., Sala, S. Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. *Journal of Cleaner Production*, 65, 28–41 (2013).
- Pauly, D., Christensen, V., Dalsgaard, J., Froese, R., Torres, F. Jr., Fishing down marine foodwebs. *Science* 279, 860-863 (1998).
- Siddik, M. A. B., Howieson, J., Fotedar, R., Partridge, G. J. Enzymatic fish protein hydrolysates in finfish aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture*, 13, 406–430 (2021).