

## LA DIETA A BASE DI *HERMETIA ILLUCENS* MODULA IL MICROBIOTA INTESTINALE, LA PRODUZIONE DI SCFA E LA SAZIETÀ VIA GLP-1 NELLE GALLINE OVAIOLE

Borrelli L.<sup>1,5</sup>, Dipineto L.<sup>1,5</sup>, Aceto S.<sup>2,5</sup>, Coretti L.<sup>3,4,5</sup>, Bovera F.<sup>1</sup>, Valoroso M. C.<sup>2</sup>, Pace A.<sup>1</sup>, Varriale L.<sup>1</sup>, Russo T. P.<sup>1</sup>, Santaniello A.<sup>1</sup>, Menna L. F.<sup>1</sup>, Fioretti A.<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup> *Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, Università di Napoli Federico II, Via Delpino 1 Napoli, Italia*

<sup>2</sup> *Dipartimento di Biologia, Università di Napoli Federico II, Napoli, Italia*

<sup>3</sup> *Department of Physiology and Biochemistry, Faculty of Medicine and Surgery, University of Malta, Msida, Malta*

<sup>4</sup> *Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli Federico II, Napoli, Italia*

<sup>5</sup> *Task Force on Microbiome Studies, Università di Napoli Federico II, Napoli, Italia*

### Summary

Insects represent a potential nutritional sources both for humans and animals. *Hermetia illucens*, with good amount of chitin and proteins, could be a suitable diet replacement for laying hens. In this study we investigated the effect of *H. illucens* larvae meal administration on cecal microbiota, short chain fatty acids (SCFAs) production, feed intake and GLP-1 gene expression in laying hens.

### INTRODUZIONE

Lo sviluppo di prodotti alimentari commerciabili a base di insetti potrebbe essere una fonte efficiente e sicura di sostanze nutritive, oggi soprattutto per motivi di sostenibilità ambientale considerando l'impatto della produzione alimentare sui cambiamenti climatici. Circa 1.900 specie commestibili sono consumate in alimentazione umana e animale (Van Huis et al. 2013; Borrelli et al., 2017) e in tutto il mondo, gli insetti vengono consumati a causa della loro ricchezza in proteine, grassi, vitamine, minerali e fibre. Tra questi *Hermetia Illucens*, un dittero della famiglia Stratiomyidae, conosciuta come black soldier fly ("mosca soldato nera") rappresenta una valida alternativa. Sostanze come la chitina, uno dei principali biopolimeri presenti in natura, altamente contenuta nella farina di insetti, possono essere un substrato perfetto per la fermentazione batterica e per la produzione di acidi grassi a catena corta (SCFA) che promuovono sia la salute dell'intestino che la salute in generale. Gli SCFAs e in particolare l'acido acetico, butirrico e propionico, una volta assorbiti sistematicamente per via ematica, giocano un ruolo essenziale come bioregolatori e promotori della crescita della mucosa intestinale influenzando a loro volta il metabolismo. Negli ultimi anni sta crescendo sempre di più l'interesse verso la modulazione degli SCFAs attraverso la dieta. Sempre più evidenze confermano che una dieta arricchita con specifici carboidrati non digeribili porta ad una maggiore produzione intestinale di SCFA e riduce l'aumento di peso corporeo, la massa grassa e induce variazioni nel comportamento alimentare, legate alla modulazione della produzione e secrezione di peptidi intestinali. Questo fattore è ampiamente discusso dalla comunità scientifica per intervenire sulla riduzione dell'obesità. IL GLP-1 è un ormone polipeptidico appartenente alla famiglia degli enteroglucagoni, che viene secreto dalle cellule L

dell'intestino distale. Esso è presente anche in numerose zone dell'encefalo come il Nucleo paraventricolare e dorso mediale dell'ipotalamo, il talamo e l'ipofisi, ove funziona da neurotrasmettitore. GLP-1 riduce l'assunzione di cibo e infatti in obesità risulta ridotto. Nei polli l'mRNA del recettore GLP-1 è largamente distribuito nel tratto gastrointestinale e nell'encefalo. Prove recenti suggeriscono che GLP-1 svolge un'azione anoressigenica nei pulcini e può avere un ruolo importante nella regolazione dell'assunzione di cibo. Come dimostrato da alcuni studi precedenti, la dieta a base di larve di *Hermetia Illucens* ha avuto diversi effetti positivi sulla morfometria e sull'attività enzimatica dell'intestino tenue, nonché buoni effetti sulla salute delle galline ovaiole, riducendo i livelli di colesterolo e trigliceridi nel siero e nelle uova. Considerando anche il crescente interesse verso il ruolo degli SCFAs quali principali metaboliti batterici, lo scopo di questa ricerca è stato quello di valutare attraverso analisi metagenomica, analisi gascromatografica e l'analisi dell'espressione di alcuni geni coinvolti nell'asse microbiota-intestino-cervello, gli effetti della supplementazione di tale dieta in galline ovaiole.

## **MATERIALI E METODI**

Due gruppi di galline ovaiole old Lohman Brown Classic di 24 settimane di età sono stati analizzati: un gruppo di 12 galline alimentate con una dieta a base di farine di insetto contenente larve di *Hermetia Illucens* (ID) e un gruppo controllo di 12 galline alimentate con dieta a base di farina di mais-soia (SD). Tutti gli animali sono stati trattati consapevolmente secondo la Direttiva 2010/63/UE, protezione degli animali utilizzati a fini scientifici. Dopo 21 settimane le galline sono state sottoposte ad eutanasia mediante dislocazione cervicale e sottoposte ad esame necroscopico durante il quale venivano rimossi, operando in sterilità, i ciechi da ciascuna gallina. Da uno dei due ciechi è stato estratto tutto il DNA batterico. Le regioni V3-V4 del 16SrDNA sono state amplificate a partire da 200ng di DNA. L'analisi metagenomica sui dati risultanti è stata condotta come riportato da Borrelli et al. (2017). Dall'altro cieco sono stati analizzati i livelli di SCFA, mediante gascromatografia. L'assunzione di mangime (feed intake) è stata misurata pesando la quantità di mangime distribuita, quella di mangime residuo e disperso ed è stata espressa come assunzione individuale di mangime per giorno (grammi / giorno / gallina). Infine, il cervello è stato rimosso per valutare l'espressione dell'mRNA di GLP-1 utilizzando RT-qPCR come descritto da Borrelli et al. (2016).

## **RISULTATI**

Il tipo e l'abbondanza relativa delle specie microbiche del cieco hanno mostrato forti differenze tra i gruppi SD e ID. *Alkaliphilus transvaalensis*, *Christensenella minuta* e *Flavonifractor plautii* rappresentano i principali contributori ( $p < 0,05$ ) di questo cambiamento e hanno mostrato avere il potenziale di degradare la chitina della farina di insetto e inoltre risultano essere correlati agli alti livelli osservati di SCFA intestinali, in particolare butirrato e propionato, nel gruppo ID ( $p < 0.001$ ). Questo gruppo ha anche mostrato una riduzione statisticamente significativa dell'assunzione di alimento e una maggiore espressione di GLP-1 a livello centrale ( $p < 0,05$ ).

## **DISCUSSIONE**

*Hermetia illucens* può essere considerato un potenziale prebiotico, in quanto "ali-

menta” bene il microbiota intestinale nelle galline ovaiole. In particolare, la produzione di SCFAs, derivati dalla fermentazione della chitina da parte di particolari batteri contenuta nella farina a base di larve di *H. illucens*, può influenzare direttamente la neurochimica del cervello aumentando l’espressione del gene GLP-1 del cervello e riducendo il comportamento di assunzione di mangime. Nel presente studio, l’aumento di SCFA, che agiscono attraverso i recettori GPR41 e GPR43 a livello delle cellule L, stimolerebbe la produzione e la secrezione dell’ormone della sazietà, GLP-1 e la conseguente riduzione di assunzione di cibo nel gruppo ID. Questo risultato in accordo con altri studi evidenzia la possibilità che gli aumenti del butirrato circolante possano influenzare direttamente la funzione del SNC. È necessario valutare la dieta e il cibo a base di insetti sia per l’alimentazione animale che umana considerando il crescente interesse mondiale e il potenziale contributo che può avere agendo non solo nella produzione energetica ma anche sull’asse microbiota-intestino-cervello, sia nell’eziologia che nel trattamento di numerosi disturbi metabolici.

### CONCLUSIONI

I cambiamenti nel microbiota intestinale, a seguito dell’alimentazione con farina di larve di insetti, sono nuovi e altamente significativi nel nostro studio. Qui il microbiota svolge un ruolo chiave nel coordinamento della degradazione dei polisaccaridi come la chitina, responsabile dell’aumento delle concentrazioni di SCFA, come mediatori microbici chiave nell’asse intestino-cervello, aumentando la sazietà e promuovendo sia l’intestino che la salute generale.

Gli insetti possono sostituire parzialmente gli ingredienti proteici nell’industria zootecnica e avicola. Per questo motivo l’obiettivo per il 2020 è introdurre gli insetti d’allevamento come ingredienti per mangimi e alimenti.

### BIBLIOGRAFIA

1. Borrelli L, Coretti L, Dipineto L, Bovera F, Menna F, Chiariotti L, Nizza A, Lembo F, Fioretti A, 2017. Insect-based diet, a promising nutritional source, modulates gut microbiota composition and SCFAs production in laying hens. *Sci Rep.* 24;7(1):16269. doi: 10.1038/s41598-017-16560-6
2. S. Marono, R. Loponte, P. Lombardi, G. Vassalotti, M. E. Pero, F. Russo, L. Gasco, G. Parisi, G. Piccolo, S. Nizza, C. Di Meo, Y. A. Attia, F. Bovera, Productive performance and blood profiles of laying hens fed *Hermetia illucens* larvae meal as total replacement of soybean meal from 24 to 45 weeks of age, *Poultry Science*, Volume 96, Issue 6, 1783–1790, doi: 10.3382/ps/pew461
3. Honda K. Glucagon-related peptides and the regulation of food intake in chickens. *Anim Sci J.* 2016;87:1090–8.
4. Borrelli L, Aceto S, Agnisola C, De Paolo S, Dipineto L, Stilling RM, Dinan, TG, Cryan JF, Menna LF, Fioretti A, 2016. Probiotic modulation of the microbiota-gut-brain axis and behaviour in zebrafish *Sci Rep.* 15;6:30046. doi: 10.1038/srep30046