

Università degli studi di Padova

Facoltà di agraria e medicina veterinaria



Tesi di laurea triennale in scienze e tecnologie animali

Effetto del medium e della proporzione di inoculo ruminale sulla fermentazione di sottoprodotti agroalimentari

Relatore: Dr. Franco Tagliapietra

Correlatore: Dr. Mirko Cattani

Laureando: Alessandro Moro

Anno accademico 2010/2011

A Giuliano

Sommario

Riassunto	7
Abstract	9
Introduzione.....	11
<i>Metodi in vivo per la valutazione degli alimenti:</i>	<i>11</i>
Bilancio ingesta excreta	12
<i>Metodi in vitro per la valutazione degli alimenti</i>	<i>12</i>
<i>Metodo a due stadi Tilley e Terry (1963).....</i>	<i>12</i>
<i>Metodo enzimatico.....</i>	<i>13</i>
<i>Tecnica della gas productione (GP).....</i>	<i>13</i>
Metodo delle siringhe.....	14
Metodo delle bottiglie	14
<i>Il medium di fermentazione.....</i>	<i>15</i>
<i>Descrizione di alcuni sottoprodotti agroalimentari.....</i>	<i>16</i>
Buccette di pomodoro	16
Pastazzo di agrumi	17
Cardo mariano	20
Obiettivi	23
Materiale e metodi	25
<i>Disegno sperimentale.....</i>	<i>25</i>
<i>Medium</i>	<i>26</i>
Preparazione del medium Menke	26
Preparazione del medium semplificato.....	28
<i>Prelievo del liquido ruminale.....</i>	<i>28</i>
<i>Preparazione dei campioni alimentari</i>	<i>29</i>

<i>Incubazione degli alimenti</i>	29
<i>Apparecchiatura Ankom RF</i>	29
<i>Analisi chimiche</i>	30
Determinazione del pH.....	30
Determinazione del N-ammoniacale.....	30
Analisi statistica dei dati.....	30
Risultati e discussione	33
<i>Effetto del medium, e della dose di inoculo microbico su alcuni parametri di fermentazione di sottoprodotti agroalimentari</i>	33
<i>Effetto delle condizioni di incubazione sulla fermentazione delle buccette di pomodoro</i>	36
<i>Effetto delle condizioni di incubazione sulla fermentazione delle buccette di pomodoro + cardo</i>	39
<i>Effetto delle condizioni di incubazione sulla fermentazione del pastazzo di agrumi</i>	42
<i>Effetto delle condizioni di incubazione sulla fermentazione del pastazzo di agrumi e cardo</i>	45
Conclusioni	49
Bibliografia	51
Ringraziamenti	53

Riassunto

Le metodiche di riferimento per la determinazione del valore energetico degli alimenti prevedono l'utilizzazione di metodiche *in vivo* (studio della digeribilità apparente) oppure *in situ* (studio della degradabilità ruminale). Questi metodi sono spesso criticati per problemi legati ai costi, al benessere degli animali ed alla scarsa ripetibilità delle misurazioni, che è dovuta principalmente alla difficoltà di standardizzare le procedure di analisi. Per queste ragioni sono state sviluppate metodiche *in vitro* che permettono di riprodurre in laboratorio i processi digestivi che si realizzano nel tubo digerente degli animali. Numerosi sono stati i tentativi di semplificare queste metodiche analitiche per ridurre l'impegno di lavoro e ridurre i costi di analisi. La presente tesi intende verificare la possibilità di semplificare le analisi per la valutazione della degradabilità *in vitro* degli alimenti per ruminanti. A tal fine è stato testato un medium di fermentazione semplificato in sostituzione a quello normalmente utilizzato ed è stata studiata l'opportunità di ridurre la dose di liquido ruminale necessaria come inoculo microbico. Un altro obiettivo del lavoro è stato esaminare la possibilità di utilizzare i residui di fermentazione come inoculo microbico per successive incubazioni.

La prova è stata realizzata utilizzando come substrato di fermentazione due sottoprodotti dell'industria agroalimentare (bucchette di pomodoro e pastazzo di agrumi) e una fonte fibrosa (cardo mariano), che sono stati incubati singolarmente o miscelati tra loro. Inoltre, sono stati utilizzati due medium diversi (medium convenzionale "Menke" e un medium "Semplificato") e due rapporti tra inoculo batterico e medium (inoculo/medium: 5/55 ml e 30/30 ml). La prova ha previsto 3 incubazioni successive, ciascuna della durata di 12 h, per una durata complessiva di 36 h. Nella seconda e nella terza incubazione è stato riutilizzato come inoculo il residuo di fermentazione dell'incubazione precedente.

I risultati della prova suggeriscono che, il medium "semplificato" può essere utilizzato in sostituzione al "Menke" solo nelle condizioni in cui il pH del liquido di fermentazione non scenda al di sotto di valori pari a 5.5 e venga utilizzato un elevato dosaggio di liquido ruminale come inoculo microbico. Inoltre, è stato verificato che la dose di liquido ruminale da impiegare come inoculo di fermentazione può essere ridotta senza effetti negativi sulle produzioni di gas. Analogamente, i residui di fermentazione possono essere utilizzati come inoculo microbico per la realizzazione di

incubazioni ripetute a condizione che venga impiegato un medium complesso (come il Menke) e la dose di inoculo microbico sia ridotta dai convenzionali 30 ml a circa 5 ml.

I risultati della prova hanno inoltre evidenziato che il pastazzo di agrumi e le buccette di pomodoro sono sottoprodotti caratterizzati da un'elevata fermentescibilità e la loro completa degradazione richiede l'impiego di una dose di medium superiore a quella utilizzata nella presente ricerca. A differenza dei sottoprodotti, il cardo si caratterizza per la capacità di tamponare il pH ruminale e stimolare l'attività fermentativa microbica soprattutto quando il pH del medium scende sotto valori pari a 6. Per questa ragione, l'incubazione combinata di sottoprodotti e cardo determina un incremento della produzione di gas rispetto alla utilizzazione dei sottoprodotti singolarmente.

Abstract

The energy content of feeds for ruminants is traditionally estimated using *in vivo* and *in situ* methods that evaluate the feed digestibility. These traditional methods use the rumen environment to measure feed degradation and are the standard against which the *in vitro* methods are often compared. At the same time, these techniques are criticized i) for problems related to animal welfare; ii) for the high costs iii) for the poor reproducibility and iv) because they measure the degree of disappearance and not the actual amount of fermented substrate. Therefore, *in vitro* methods, that reproduce in laboratory the conditions found in the rumen of the animals, are becoming more popular.

The objective of this test was to reduce the complexity of *in vitro* methods for feed assessment simplifying the composition of fermentation medium and reducing the dosage of rumen fluid as inoculum of fermentation. Another goal was to reuse residual fluids of fermentation as microbial inoculum for feeds incubation.

The test was carried out using as substrate of fermentation 2 by-products (tomato peels and citrus pulp) and a roughage (*Silybum marianum* - milk thistle) incubated with two different mediums (the conventional Menke medium and a "simplified" medium) and two different ratios between inoculums and medium (inoculum/medium = 5/55 ml or 30/30 ml). Three subsequent incubations were carried out: each lasted 12 h, for a total incubation time of 36 h. In the second and in the third incubation the residual fluid of fermentation of the previous incubation was reused as inoculum.

The results suggest that a simplified medium can be used as alternative to the conventional Menke medium, providing that the pH of the inoculum does not fall below 5.5, and a high dose of microbial rumen fluid is used as inoculum. Moreover, the dose of rumen fluid used as inoculum of fermentation can be reduced without adverse effects on gas production. The residual fluids of fermentation residues can be re-used as microbial inoculum at the condition that a complex medium (such as Menke) is used and the dose of microbial inoculum is reduced from conventional 30 ml to about 5 ml.

The results also showed that the citrus pulp and tomato peels are characterized by high fermentability and their complete degradation requires the use of a medium dose higher than that

used in this research. Differently, the roughage is characterized by the ability to buffer the pH and stimulate rumen microbial activity, especially, when the pH of the medium falls below values of 6. For this reason, the combined incubation of by-products and roughage increased the gas production compared to the single incubation of by-products.

Introduzione

La valutazione degli alimenti per animali è importante per poter formulare razioni adeguate, equilibrate nei vari principi nutritivi, e utilizzate con la massima efficienza dagli animali. E inoltre importante formulare delle diete con limitato impatto ambientale per gli allevamenti, e devono soprattutto garantire la salute degli animali e anche garantire la sicurezza per chi consuma alimenti di origine animale .

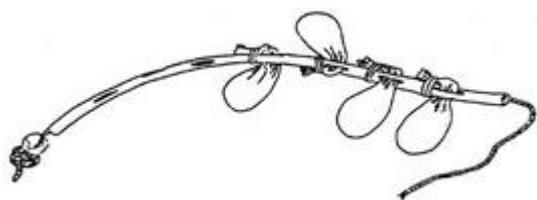
Il notevole miglioramento della produttività di tutti gli animali da reddito richiede sempre più informazioni sulla capacità degli alimenti di fornire all'animale idonei apporti di energia e principi nutritivi.

Metodi in vivo per la valutazione degli alimenti:

Gli studi in vivo sulla degradabilità nei prestomaci e sulla digeribilità nei successivi tratti del tubo digerente richiedono animali preparati chirurgicamente (fistole a livello di rumine, abomaso, duodeno, ileo), nonché opportuni indicatori che permettano di valutare le velocità di flusso dei nutrienti e di differenziarne l'origine microbica o alimentare.

Inoltre queste tecniche permettono la determinazione della "digeribilità apparente" degli alimenti mentre, la quantificazione della quota endogena, necessaria per la valutazione della "digeribilità reale", non è di facile realizzazione.

Tali studi sono inoltre, costosi, richiedono intenso lavoro di laboratorio, richiedono un elevato dispendio di tempo, ; per queste ragioni sono state messe a punto delle tecniche di laboratorio che permettono di semplificare le procedure di valutazione degli alimenti.



Nylon bags

Bilancio ingesta excreta

Il bilancio ingesta-excreta è utilizzato per la determinazione della digeribilità apparente (DA). Secondo tale metodica la digeribilità apparente di un principio alimentare (es. sostanza organica, proteina ecc..) è pari a:

$$d\% = ((P_i - P_e)/P_i) \cdot 100$$

dove: d% = coefficiente di digeribilità apparente della sostanza considerata; P_i = peso della sostanza ingerita dall'animale; P_e = peso della sostanza escreta con le feci (non digerita).

La procedura mira a misurare la digeribilità degli alimenti esponendoli all'attacco batterico ruminale e al processo digestivo gastrointestinale e valutando al termine di esso la quota di materiale e le componenti non digerite.

Le tecniche *in vitro* vanno assumendo sempre maggiore importanza perché più rapide e precise.

Metodi in vitro per la valutazione degli alimenti

Sono metodi che NON prevedono l'uso dell'animale come "incubatore" e si propongono di simulare in laboratorio ciò che avviene nell'ambiente ruminale. Le tecniche utilizzate possono essere diverse: fermentazioni *in vitro* con l'uso di liquido ruminale (Tilley e Terry, 1963), di enzimi cellulolitici (Jones e Hayward, 1975) e misurazione della produzione di gas prodotto durante la fermentazione (Menke et al., 1979).

Metodo a due stadi Tilley e Terry (1963)

La metodica proposta da Tilley and Terry (1963) è tra le più utilizzate per stimare la digeribilità apparente degli alimenti. Questa prevede di trattare gli alimenti in due fasi successive:

1. si sottopone l'alimento da testare ad una fermentazione con liquido ruminale per 48 ore a 39°C in condizioni di anaerobiosi (degradazione microbica);
2. si sottopone il residuo della prima fase ad un trattamento con acido cloridrico a pH 2 e poi a digestione enzimatica con pepsina per 48 ore.

Il residuo finale viene filtrato, essiccato in stufa a 103°C ed incenerito in muffola a 550°C per calcolare rispettivamente la sostanza secca (SSd) e la sostanza organica digerite (SOD).

Questa metodica gravimetrica è di tipo statico e non fornisce informazioni sulla cinetica di fermentazione degli alimenti.

Metodo enzimatico

La tecnica di incubazione con enzimi valuta la solubilità e la degradabilità degli alimenti per ruminanti. L'impiego di enzimi, di origine microbica e fungina, sostituisce e simula l'attacco operato dai microrganismi ruminali. Lo scopo è quello di operare indipendentemente dalla disponibilità di animali dotati di fistola ruminale e mantenuti ad alimentazione rigorosamente costante. La tecnica prevede di incubare una determinata quantità di alimento a 39°C in una soluzione tampone con una proteasi. A tempi prestabiliti si valuta la frazione di sostanza azotata degradata dall'enzima.

L'elaborazione dei dati con un opportuno modello matematico permette di valutare la cinetica di degradazione in esame. Molto importante per questa metodica risulta la scelta dell'enzima, da cui dipendono i risultati (Calabrò,2005)

Tecnica della gas production (GP)

La GP fu sviluppata per simulare le fermentazioni ruminali degli alimenti nel rumine ad opera della flora batterica ruminale. È noto che i ruminanti perdono circa il 10% delle sostanze alimentari digeribili in forma di gas. Il gas prodotto nel rumine viene eliminato mediante eruttazione, un evento riflesso indotto dagli stessi gas ruminali che distendono la regione cardiaca attivando i recettori (meccanocettori) in essa presenti che provocano il rilasciamento dello sfintere cardiaco. La miscela di gas è composta da: CO₂ (65 %), metano (27%), azoto molecolare (7%), tracce di O₂ (0,6%), idrogeno (0,2%) e idrogeno solforato (0,01%) e può variare in funzione della dieta somministrata agli animali. La produzione di gas è direttamente correlata alla degradabilità di un alimento.

Il primo a stimare la degradabilità ruminale di un alimento, misurando la produzione dei gas di fermentazione, fu Mc Bee (1953) e a seguire Hungate (1966). Altri svilupparono tale tecnica applicando un manometro ad ogni contenitore in cui era presente l'alimento con il liquido ruminale per misurare il gas prodotto. Wilkins (1974) sviluppò un diverso approccio per determinare la cinetica di fermentazione in vitro, usando dei contenitori a tenuta stagna con un rilevatore di pressione che rilevava in continuo le produzioni da gas; si trattava di un metodo semplice e molto efficace che è stato poi largamente impiegato. La tecnica di misurazione tramite l'uso di rilevatori di pressione è un metodo semplice e pratico ma alcuni fattori possono incidere sulla determinazione della cinetica di produzione di gas, da parte di certi alimenti; si tratta di

fattori di tipo ambientale, come pressione atmosferica, temperatura, condizioni fisiologiche degli animali donatori dell'inoculo microbico, modo di operare del personale e molti altri fattori variabili da caso a caso. Queste sono problematiche non sono ancora state del tutto risolte e la metodica potrà essere nel futuro sottoposta a successive modifiche per migliorare le ripetibilità dei risultati.

Metodo delle siringhe

Czerkawski e Breckenridge (1975) svilupparono una tecnica che prevedeva l'impiego di siringhe nelle quali veniva incubato l'alimento con una miscela di terreno di coltura e inoculo microbico. La produzione dei gas di fermentazione veniva valutata misurando lo spostamento dello stantuffo della siringa. Il metodo delle siringhe originariamente fu ideato per determinare la produzione cumulate di gas che si sviluppavano nel corso di 24 h di incubazione. In Germania il metodo della gas produzione è utilizzato come metodica ufficiale per la valutazione della fermentescibilità degli alimtescibilità. La registrazione a intervalli regolari di tempo del gas prodotto dalle fermentazioni, è possibile studiare anche la cinetica del processo fermentativo.

Metodo delle bottiglie

Questo metodo prevede l'impiego di Bottiglie chiuse ermeticamente con tappi di butile e ghiera di alluminio, contenenti il substrato da testare e l'inoculo ruminale tamponato. Per misurare il gas accumulato nello spazio di testa delle bottiglie si impiega un trasduttore di pressione connesso, tramite una valvola, ad un dispositivo a tre uscite. Il trasduttore, collegato ad un voltmetro con scala modificata a lettura digitale, misura la pressione riportata sul display direttamente in p.s.i. . Quando l'ago è inserito nel tappo di gomma della bottiglia, il trasduttore di pressione permette quindi di apprezzare la pressione interna e di misurare il corrispondente volume di gas sviluppato. La pressione ed il volume di gas vengono registrati ad intervalli regolari, ogni 2-4 h nelle prime 24 h, e poi meno frequentemente fino al termine dell' incubazione che si protrae fino a 96, 120 o 144 ore. Il metodo prevede inoltre la rimozione del gas prodotto durante la fermentazione dopo ogni lettura (Calabrò,2007)

Una tecnica innovativa basata sul metodo delle bottiglie è stata recentemente sviluppata dalla "ANKOM Technology". La strumentazione (AnkomRF gas production system - RF) permette di misurare la degradabilità e la produzione di gas tramite unità di incubazione composta da una giara in vetro e un modulo elettronico che rileva i valori di pressione del gas prodotto all'interno

della giara e li trasmette in tempo reale, via wireless, ad un computer che li registra. L'alimento viene incubato con liquido ruminale e saliva artificiale (tampone o medium Menke (Menke et al., 1979).

Con la gas production si possono avere ottime informazioni sulla degradabilità della sostanza organica, in particolare, fornendo informazioni sulla cinetica di degradazione come ad esempio quanto gas prodotto in un determinato lasso di tempo. L'impiego combinato della tecnica della degradabilità e della gas production può essere inoltre interessante ai fini della valutazione dell'efficienza di crescita microbica (ECM). Alcuni recent studi hanno osservato una elevate corrispondenza tra I valori di crescita microbica rilevati in vitro con quelli misurati in vivo (Makkar, 2004).

Il medium di fermentazione

La funzione del medium di fermentazione in un incubazione *in vitro* e quella di creare un ambiente adatto al processo fermentativo aggiungendo alla soluzione (liquido ruminale + substrato) elementi nutritivi supplementari e fornendo sostanze tampone per mantenere il pH.

Spesso però questi medium sono costosi e richiedono lunghe procedure di preparazione e possono richiedere l'impiego di sostanze tossiche per i tecnici di laboratorio come il sodio solfito. A tal riguardo il medium più ampiamente utilizzato è quello sviluppato da Menke che prevede la preparazione di 5 soluzioni (soluzione tampone, macrominerali, microminerali e soluzione riducente) alcune delle quali devono essere preparate immediatamente prima dell'incubazione come la soluzione riducente che non può essere conservata, mentre le altre possono essere preparate il giorno prima perchè hanno lunga capacità di conservazione.

Da questo la necessità di sviluppare un medium semplificato, con elementi poco costosi e di facile preparazione.

Quando si fanno delle incubazioni con delle giare in vetro da 280 ml si usano 60 ml di soluzione al 50% di inoculo-medium (30 ml inoculi + 30 ml medium). La riduzione della proporzione di inoculo microbico per innescare le fermentazioni ha il vantaggio di limitare l'interferenza della sostanza organica disciolta nell'inoculo sui processi fermentativi e di ridurre la quantità di liquido ruminale da prelevare dall'animale ma può determinare anche una riduzione dell'attività microbica e quindi rallentare il processo di fermentazione degli alimenti.

Al fine di semplificare le procedure di incubazione, un aspetto importante riguarda la possibilità di riutilizzare il liquido di fermentazione che residua al termine dell'incubazione come inoculo per le

successive incubazioni. Questa procedura permetterebbe di ridurre la necessità di effettuare continui prelievi di liquidi ruminale dagli animali donatori con i conseguenti benefici in termini di benessere animale e riduzione dei costi di manodopera.

Descrizione di alcuni sottoprodotti agroalimentari

Bucchette di pomodoro

Il pomodoro (*Lycopersicon Esculentum*) è una solanacea originaria dell'America Latina che fu per lungo tempo coltivata in Europa al solo scopo ornamentale, poiché i frutti non erano ritenuti commestibili.

In Italia la coltivazione del pomodoro ha una lunga tradizione e figura al terzo posto nella graduatoria mondiale per la produzione e l'esportazione. Il pomodoro è diffuso come coltura orticola in tutta Italia, ma in pieno campo è coltivato soprattutto in Puglia, Campania, Emilia-Romagna, Calabria e Sicilia. A seconda della destinazione del prodotto si ha infatti la coltura per consumo fresco o da mensa e quella da industria per la produzione di pelati, concentrati e succhi. Dopo l'estrazione dell'olio dai semi, i residui della lavorazione, bucce e semi, vengono utilizzati come sottoprodotti industriali per la preparazione di mangimi ad uso zootecnico. La lavorazione industriale del pomodoro è praticata intensamente in talune provincie dell'Emilia e della Campania. Le buccette e i residui della produzione di pelati e/o di passata che contengono anche parte dei semi presenti nella bacca sono sottoprodotti utilizzabili nell'alimentazione del bestiame.

Metodi di lavorazione

Le buccette di pomodoro si ricavano dalla lavorazione del pomodoro pelato in scatola il frutto selezionato e lavato viene sottoposto, in un apparecchio a nastro continuo, a getti di vapore e subito dopo ad un getto d'acqua fredda (scottatura).

La buccetta esterna, per l'azione successiva del caldo e del freddo, si distacca e si screpola agevolando la pelatura che viene praticata attraverso un processo industriale.

Le buccette vengono poi sottoposte a rapido essiccamento in corrente d'aria calda e cedute a prezzo conveniente, per l'alimentazione del bestiame

Composizione chimica

Il prodotto è caratterizzato da enorme voluminosità, che ne rende disagiata e costosa il trasferimento. I dati analitici mettono in evidenza l'alto tenore di fibra (42,35%). Buono è il contenuto in grassi (6,5%) e modesto quello delle proteine (10,3%). Di un certo interesse è il contenuto di xantofille e caroteni, questi ultimi contenuti nelle bucce di pomodoro in ragione di 10,34 mg per kg, pari a 17000 U.I. di vitamina A.

Il prodotto è abbastanza omogeneo e appetibile. Il valore nutritivo è piuttosto alto grazie all'apporto degli estrattivi inazotati.

Le buccette di pomodoro, contenendo una percentuale alta di fibra grezza, possono essere destinate solo a ruminanti; in maggior quantità sono destinate al bovino all'ingrasso e in quantità minore ai vitelli.

Utilizzazione delle buccette di pomodoro nell'alimentazione animale

Le buccette di pomodoro possono essere somministrate agli animali in diverse forme: prodotto fresco, essiccato, inserito in un mangime commerciale o in una determinata razione. In forma di prodotto fresco, va somministrato direttamente agli animali. Se utilizzato come prodotto essiccato è più facilmente conservabile in azienda. Sono state eseguite prove sperimentali utilizzando questo prodotto nell'ingrasso dei bovini, come parziale sostituzione al fieno. Da queste prove è emerso che la fibra grezza presente nelle buccette di pomodoro, ha una digeribilità piuttosto elevata e quindi contiene poca lignina. L'appetibilità delle buccette di pomodoro può essere aumentata macerando il prodotto per 8-10 ore, in soluzione melassata. Le buccette di pomodoro rappresentano in primo luogo una fonte di proteine, senza trascurare il valore energetico dovuto al buon titolo in grassi e alla scarsa lignificazione della fibra.

Pastazzo di agrumi

In base alle attuali esperienze industriali, oltre il 60% in peso degli agrumi inviati alla trasformazione industriale per la produzione di succhi, viene trasformata in una miscela di residui (bucce, parte della polpa, semi) denominata pastazzo. Essi possono essere utilizzati allo stato fresco (es. per l'alimentazione animale) o essiccato. In Italia l'industria di trasformazione agrumaria produce 1.000.000 di tonnellate di frutta ogni anno e 600.000 tonnellate di pastazzo.

Con il termine “pastazzo di agrumi” si intendono i residui dell'estrazione del succo di arance e limoni, che contengono bucce (60-75%), polpa (23-33%) e semi (0-9%).

Sono alimenti dotati di alto tenore in fibra e di buona appetibilità; essi costituiscono la componente energetica delle diete per ruminanti e monogastrici e possono essere utilizzati direttamente nell'alimentazione animale o lavorati per estrarre dalle bucce, degli oli essenziali. Il residuo finale viene spesso commercializzato come pastazzo essiccato.

Le scorze e le polpe che rappresentano i maggiori costituenti del pastazzo sono formate principalmente da:

- acqua (75- 85%); proteina che è digeribile per il 40% circa;
- mono e di saccaridi, composti principalmente da glucosio, fruttosio e saccarosio (6-8%); polisaccaridi (pectina, proto pectina, cellulosa ed emicellulosa) pari a circa 1,5 -3%; estrattivi inazotati (zucchero invertito, saccarosio, pentosani e pectine), digeribili quasi totalmente. (61,9%);
- acidi organici dallo 0,5-1,5% (citrico, malico, isocitrico);
- altre sostanze con spiccate proprietà biologiche quali vitamine, flavonoidi, amminoacidi ed elementi

principali agrumi contenuti nel pastazzo:

Limone: è il più importante frutto acidulo sia per il consumo diretto sia per la lavorazione industriale. Per quanto l'albero sia molto sensibile al gelo, può essere coltivato in aree marginali poiché l'acidità e la succosità vengono raggiunte anche se la stagione della maturazione è relativamente fresca

Pompelmo: questa specie relativamente nuova è diventata di grande importanza sia nell'industria di trasformazione sia per il consumo come frutto fresco. Nel primo caso viene utilizzato nella produzione di succhi e nella conservazione degli spicchi in scatola. La varietà principale, coltivata in tutto il mondo è il Marsh e si presta molto ai suddetti scopi grazie alle rese elevate, al sapore gradevole (blandamente amarognolo) e alla mancanza di semi. Nel Texas e in Florida si coltivano le varietà rosate (Thompson e Redblush), destinate principalmente al mercato del fresco, poiché poco idonei alla lavorazione industriale.

Arancio amaro: (anche arancio di Siviglia, bigarade, melangolo). Il frutto non è commestibile ed è usato principalmente nella produzione di marmellate amare; dalle foglie e dai fiori viene estratto l'olio.

Arancio dolce: questo è l'agrume commestibile maggiormente consumato fresco. Esso si suddivide in: arancia comune, arancia polpa rosso scuro (sanguigno) e navel (che contiene una minuscola arancia non sviluppata al polo opposto al punto di attacco, ossia il navel = ombelico).

Mandarino: di questo frutto esistono diverse varietà, con la scorza non molto aderente alla polpa, in genere usate fresche malgrado sopportino poco il trasporto e l'immagazzinamento. Questo frutto viene conservato in quantitativi rilevanti soltanto in Florida e in Giappone.

Metodi di lavorazione

Attraverso i residui dell'estrazione del succo degli agrumi, si ottiene il pastazzo; esso è composto da circa 60-75% di bucce, 23-33% di polpa e 0-9% di semi. Il pastazzo viene utilizzato per l'alimentazione animale sia come composto fresco e sia come composto essiccato.

Per i pastazzi freschi è necessario ricorrere all'insilamento con aggiunta di paglia con funzione assorbente per evitare inquinamenti del suolo da parte delle acque di percolazione. In genere i pastazzi contengono circa l'85% di acqua per cui esistono notevoli problemi di smaltimento del residuo fresco. L'acidità di cui sono dotati i pastazzi e il forte contenuto in glucidi fermentescibili, ne favoriscono la conservazione in silo, da soli o stratificati con foglie di cereali o altri prodotti fibrosi. Nell'operazione di essiccazione, il pastazzo viene dapprima frantumato grossolanamente, poi ridotto in piccoli pezzi e mescolato con calce viva (CaO). In tal modo le pectine vengono salificate e il prodotto non risulta più igroscopico (cioè non assorbe più acqua perché le pectine non sono più in grado di formare una struttura a gel, assorbendo acqua in quantità pari a venti volte il loro peso) e viene facilmente asciugato. L'essiccazione ha luogo per gradi, attraverso una prima torchiatura e disidratazione con impiego di vapore diretto. Dato il costo elevato questo processo interessa, nel nostro paese, una frazione limitata di agrumi, consentendone un'ottima conservabilità e facilitandone l'impiego e il trasporto.

Per frutti interi di aranci e mandarini, qualche difficoltà nell'utilizzazione zootecnica si incontra per il sapore amarognolo della buccia (dovuto alla presenza di oli essenziali) che li rende poco graditi dagli animali.

Composizione chimica

La composizione chimica del pastazzo varia in funzione del tipo di agrume e della lavorazione subita; in particolare la presenza dei semi aumenta il contenuto in proteina e in lipidi

Utilizzazione del pastazzo di agrumi nell'alimentazione animale

Il pastazzo di agrumi è un ottimo sottoprodotto dell'industria agrumaria ed è impiegato per la sua benefica azione dietetica nell'alimentazione delle vacche in lattazione. La somministrazione di pastazzo a bovine, con quantitativi anche elevati di polpe essiccate, non deprime la produzione di latte, non influisce negativamente sull'appetibilità da parte delle bovine, né interferisce se non favorevolmente sul sapore del latte, e provoca un aumento qualitativo e quantitativo del latte stesso. Può essere impiegato anche nei bovini da carne aumentando l'accrescimento giornaliero. L'elevato tenore di pectine del pastazzo di agrumi, svolge un'azione astringente antidiarroica, soprattutto in animali giovani)

Cardo mariano

Il cardo mariano è una coltura che nel nostro Paese occupa 1.200 ettari e che trova i suoi areali preferenziali in Toscana e soprattutto in Piemonte. Da millenni il cardo oggetto è di coltivazione a scopo alimentare; la parte edibile è costituita dalle coste, formate dal picciolo, dalla costola e da una ridotta porzione di lembo fogliare (in pratica si consumano i due terzi inferiori della foglia). Private della luce (eziolamento) con mezzi diversi, le coste diventano chiare e tenere; si possono consumare fresche dopo cottura, tal e quali (solo condite) o in preparazioni alimentari della cucina tradizionale.

Utilizzazione del cardo mariano nell'alimentazione animale

Per testare l'azione epatotonica e galattogena svolta da *S. marianum*, è stata condotta una prova somministrando, Silimarina ad un gruppo di bovine nel periodo del periparto. Le 15 bovine di ogni gruppo sperimentale, erano omogenee per ordine di parto, produzione nella lattazione precedente, stato sanitario, e BCS. La Silimarina è stata somministrata ai gruppi sperimentali da 7 giorni prima del parto a 14 giorni dopo il parto.

La somministrazione di una sostanza naturale quale la Silimarina a bovine da latte, ha mostrato un effetto migliorativo sul benessere dello stato sanitario e produttivo degli animali. Infatti è stata osservata una condizione corporea (BCS) migliore nella fase iniziale della lattazione delle vacche del gruppo sperimentale, che ha permesso alle bovine di affrontare questo periodo particolarmente delicato in una situazione più favorevole rispetto agli animali non trattati. Le bovine trattate hanno mostrato minore incidenza di dismetabolie post-partum rispetto alle bovine

di controllo, arrivando a superare la prima fase di lattazione in buone condizioni sanitarie e corporee. Si può affermare quindi che la somministrazione della Silimarina supporta la bovina, non solo in una fase di bilancio energetico negativo e di forte stress come quella del periparto, ma anche durante l'intera lattazione.

Gli studi recenti sulla Silimarina hanno quindi messo in evidenza l'azione benefica di questo epatoprotettore naturale, che può essere estratto dai frutti maturi del cardo mariano. Il meccanismo d'azione è essenzialmente di protezione a livello di membrana delle cellule epatiche, contrastando l'ingresso di tossine negli epatociti.

Obiettivi

Obiettivo generale: Ridurre la complessità delle procedure di incubazione e ridurre i costi analitici della metodica *in vitro* della gas produzione finalizzata a determinare il valore nutrizionale degli alimenti

Obiettivi specifici:

- Testare la possibilità di utilizzare un medium "semplificato" in alternativa al medium convenzionale denominato "Menke"
- Testare la quantità di inoculo necessaria per sostenere le fermentazioni microbiche
- Verificare la possibilità di utilizzare i residui di fermentazione di un'incubazione per re-inoculare altri substrati alimentari.

Materiale e metodi

Disegno sperimentale

Le incubazioni sono state eseguite utilizzando differenti condizioni sperimentali:

- Due medium diversi: “Menke” (M) e un “medium semplificato” (S)
- Due livelli di inoculo: Alto (30ml inoculo ruminale e 30 ml medium), Basso (5ml inoculo ruminale e 55ml di medium)
- Quattro combinazioni alimentari: buccette di pomodoro (B), pastazzo di agrumi (P), buccette di pomodoro e cardo (BC), pastazzo di agrumi e cardo (PC)
- Tre re-incubazioni successive

Le 4 combinazioni alimentari sono state quindi incubate nelle seguenti condizioni:

- Medium Menke e bassa dose di inoculo = M5
- Medium Semplificato e bassa dose di inoculo = S5
- Medium Menke e alta dose di inoculo = M30
- Medium Semplificato e alta dose di inoculo = S30

Complessivamente sono state preparate 80 giare per ogni incubazione: per ogn’una delle 4 combinazioni alimentari sono state preparate 16 giare con l’aggiunta di altre 16 senza alimento definite “testimone”.

Delle 16 giare preparate per ogni alimento, 4 sono state incubate per ogn’uno dei medium e dei livelli di inoculo precedentemente indicati. Le incubazioni della durata di 12 h sono state ripetute per tre volte in successione. Come inoculo di fermentazione della prima incubazione è stato utilizzato liquido ruminale mentre per le successive è stato utilizzato parte del liquido di fermentazione ricavato dall’incubazione precedente. Questa operazione è stata ripetuta per 2 volte (per una durata complessiva della prova di 36 h) e il trasferimento di liquido di fermentazione è avvenuto mantenendo la medesima combinazione alimentare, medium e livello di inoculo della giara da cui il liquido veniva prelevato.

Medium

Preparazione del medium Menke

La preparazione di 1 litro di Medium, è stata fatta prima dell'incubazione, e le soluzioni che compongono il Medium (tampone, macromineraie, micro minerale e resazurina, sono state preparate il giorno prima, mentre la soluzione riducente, è stata preparata il giorno stesso, il tutto portato a 39°C, tramite bagnomaria e poi miscelato con il liquido ruminale.

1. acqua deionizzata
2. soluzione micromineraie
3. soluzione macromineraie
4. soluzione tampone
5. soluzione riducente B preparate il giorno stesso dell' incubazione
6. Resazurina

Composizione delle soluzioni:

- Soluzione tampone:

Componenti		Quantità in grammi x litro
Sodio bicarbonato	NaHCO ₃	35
Ammonio bicarbonato	NH ₄ HCO ₃	4
Acqua distillata	H ₂ O	1 litro

- Soluzione macromineraie:

Componenti		Quantità in grammi x litro
Sodio fosfato, bibasico	Na ₂ HPO ₄	5.7
Potassio fosfato, monobasico	KH ₂ PO ₄	6.2
Magnesio solfato eptaidrato	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.6
Acqua distillata	H ₂ O	1 litro

- Soluzione micro minerale:

Componenti		Quantità in grammi x 100 ml
Calcio cloruro diidrato	CaCl ₂ -2H ₂ O	13.2
Manganese cloruro tetra idrato	MnCl ₂ -4H ₂ O	10.0
Cobalto cloruro esaidrato	CoCl ₂ -6H ₂ O	10.
Ferro cloruro esaidrato	FeCl ₃ -6H ₂ O	8.0
Acqua distillata	H ₂ O	A 100 ml

- Soluzione riducente

Acqua distillata		ml	47.5
NaOH 1M	NaOH 1N	ml	2.0
Sodio solfuro nonoidrato		G	0.336

Per la preparazione della soluzione riducente le quantità in tabella sono riferite ad 1 litro di soluzione finale.

Le soluzioni tampone, micro-minerale, macro-minerale possono essere preparate in anticipo anche in grosse quantità perché possono essere conservate a temperatura ambiente per molto tempo. La soluzione riducente deve essere fatta poco tempo prima della preparazione del medium.

Preparazione di un litro di medium Menke

475 ml acqua deionizzata

0.12 ml della soluzione micro minerale

240 ml di soluzione macrominerali

240 ml di soluzione tampone

1.22 ml di resazurina

Tutte le soluzioni devono essere portate a temperatura di 39° C prima di ogni operazione. A questo punto si aggiunge la soluzione riducente, sempre preriscaldata. In questo modo la soluzione vira passando da blu a rosa fino a diventare quasi incolore. Tutte le operazioni vanno eseguite insufflando anidride carbonica. Il medium di norma va preparato almeno un ora prima dell'incubazione

Preparazione del medium semplificato

Il medium semplificato è costituito esclusivamente dai seguenti sali:

Componenti		g/l
Urea	CO(NH ₂) ₂	0.18
Sodio bicarbonato	NaHCO ₃	10

Prelievo del liquido ruminale

Il liquido ruminale è stato prelevato, da bovine da latte in fase di asciutta, stabulate presso le strutture dell'Azienda Agraria Sperimentale "L.Toniolo" dell'Università di Padova. Il prelievo è stato effettuato il giorno dell'incubazione. Tutte le vacche erano a digiuno da almeno 3 ore prima del prelievo, ed è stata utilizzata una sonda esofagea munita di filtro nella parte terminale, che impediva l'aspirazione del materiale più grossolano, collegata ad una pompa del vuoto tramite una cannula flessibile. La sonda arrivata al rumine ha permesso di prelevare il liquido ruminale, che raccolto in una beuta è stato filtrato attraverso 3 strati di garza da casaro e messo in thermos di 500 ml di capacità tramite un imbuto.

Prima del prelievo si sono riscaldati riempiendo con acqua calda, sia i thermos che la beuta di raccolta; per tutto il tempo delle operazioni di prelievo questi contenitori sono stati conservati in una bacinella anch'essa riempita precedentemente con acqua calda.

La temperatura dell'acqua all'interno dei thermos era pari a 40-43°C ed è stata controllata con apposito termometro al momento del riempimento; i thermos sono stati svuotati dall'acqua immediatamente prima di introdurre il liquido ruminale. In questo modo sono stati ridotti al minimo gli eventuali rischi di stress termico per i microrganismi ruminali. Anche i tempi di esecuzione delle operazioni di prelievo sono stati contenuti al fine di ridurre al minimo il periodo di esposizione dei microrganismi a condizioni di aerobiosi, non idonee per la sopravvivenza della

microflora. In laboratorio è stata eseguita una seconda filtrazione con uno strato di garza da casaro.

Preparazione dei campioni alimentari

I campioni, preventivamente essiccati, sono stati pesati emessi su una giara numerata a cui successivamente è stato assegnato un modulo RF. Ad ogni giara venivano pesati 2 grammi di sottoprodotti, nel caso di combinazione di alimenti ne sono stati pesati 1 grammo per ogni alimento. Queste operazioni sono state ripetute per le tre incubazioni successive assegnando ad ogni giara il corrispettivo alimento o combinazione.

Incubazione degli alimenti

Ogni giara da 280 ml con l'alimento contenuto è stata messa a riscaldare a bagnomaria fino ad una temperatura di 39°C. nelle bottiglie sono stati aggiunti 60 ml di soluzione medium-inoculo anch'esso preriscaldato alla t di 39 °C e nelle proporzioni precedentemente definite (rapporto inoculo/medium rispettivamente Alto 30/30 e Basso 5/55). Le bottiglie sono state quindi equipaggiate con l'apparecchiatura "Ankom RF" per la misurazione delle produzioni di gas e messe in incubatore.

Apparecchiatura Ankom RF

Il gas che si produce dalla degradazione di un alimento, esercita una pressione, che viene rilevata dal PC, mediante un sensore presente nel modulo, tramite un collegamento wireless. I moduli RF sono di forma cilindrica, di materiale plastico, e presentano nella parte soprastante una chiusura a tappo, al cui interno, si trova una scheda elettronica con antenna per comunicazione wireless con il software che controlla e gestisce la ricezione dei dati e pacchetto di 4 batterie da 1,5 V che alimenta il modulo.

Ogni modulo è munito di una valvola, che in caso di eccesso di pressione, si apre per far fuoriuscire il gas. I moduli sono collegati ad un centralino che trasmette i dati al computer, un modulo "zero" che registra la pressione atmosferica. I dati sono registrati dal software su un foglio MICROSOFT

EXCEL; tramite il software è inoltre possibile controllare e gestire tutte le funzioni di apertura e chiusura delle valvole, e controllare il corretto funzionamento.

Analisi chimiche

Determinazione del pH

Nelle giare dopo l'incubazione è stata effettuata la determinazione del pH mediante pHmetro, . Tra una giara e l'altra è stata effettuata un'accurata pulizia all'elettrodo sempre con H₂O distillata, in modo da non rischiare di alterare i risultati.

Inoltre è stato misurato il pH dei due medium, del liquido ruminale e della miscela tra liquido ruminale e medium prima dell'incubazione

Determinazione del N-ammoniacale

Il metodo di determinazione dell'azoto ammoniacale, si basa sull'impiego dell'elettrodo specifico del tipo a diffusione gassosa per la determinazione dell'azoto ammoniacale in campioni previamente alcalinizzati con aggiunta di NaOH . Una membrana permeabile al gas consente il passaggio dell'ammoniaca dalla soluzione in esame alla soluzione interna all'elettrodo; l'entità di tale passaggio dipende dalla concentrazione dell'azoto ammoniacale nella soluzione in esame ed è quantitativamente misurata attraverso una variazione del pH dello strato di elettrolita a più stretto contatto con la parete interna della membrana. Dalle provette preventivamente congelate con liquido ruminale e acido metafosforico sono stati prelevati 2 ml di campione. Questi sono stati inseriti in una beuta, nella quale si introduceva l'elettrodo. Posta su un agitatore magnetico, si è portata quindi a volume (20 ml) con acqua distillata e poi la soluzione è stata alcalinizzata con l'aggiunta di 1 ml di NaOH al 40%. I valori espressi dal lettore sono in mv/l.

Analisi statistica dei dati

Tutti I dati sperimentali sono stati sottoposti ad analisi della varianza utilizzando il pacchetto statistic (SAS, 2000). I valori di produzione di gas, ammoniaca e di pH misurati al termine delle 3 incubazioni successive sono state elebotate secondo una procedura Proc Mixed. In questo modello è stata considerate come replica la singola bottiglia di incubazione e come fattori di variazione il

medium (n=2), la dose di inoculo (n=2), l'alimento (n=4), l'incubazione (n=3) e le relative interazioni.

Inoltre, I dati relative ad ogni singola combinazione alimentare sono stati sottoposti ad una seconda elaborazione (Proc Mixed) che ha considerate come fattori di variazione il medium (n=2), la dose di inoculo (n=2), l'incubazione (n=3) e le relative interazioni. Per i due modelli utilizzati medie stimate dei diversi fattori di classificazione sono state confrontate mediante contrasti ortogonali ed è stata considerate come soglia di significatività $P < 0.01$.

Risultati e discussione

Effetto del medium, e della dose di inoculo microbico su alcuni parametri di fermentazione di sottoprodotti agroalimentari

In tabella 1 sono riportate le medie stimate relative delle produzioni cumulate di gas (GP), di pH e di NH₃, ottenute dopo 12 ore di fermentazione. Il lavoro sperimentale ha valutato l'effetto di due livelli di inoculo (basso, con rapporto inoculo/medium di 5/55, e alto, con rapporto 30/30), due differenti medium di fermentazione (medium Menke e medium semplificato). Inoltre, in tabella sono stati riportate le medie stimate per i diversi parametri di fermentazione relative alle diverse combinazioni alimentari e alle tre incubazioni successive.

Per quanto riguarda l'effetto dell'inoculo di fermentazione, l'impiego di un'elevata dose di liquido ruminale rispetto alla dose ridotta, ha determinato una significativa ($P < 0.01$) riduzione della produzione di gas. Inoltre il pH al termine dell'incubazione è stato mediamente inferiore quanto è stato utilizzato un elevato dosaggio di inoculo. La riduzione della produzione di gas suggerisce un effetto negativo di un elevato dosaggio di inoculo microbico sulla crescita microbica. Questo effetto può essere dovuto agli acidi presenti nell'inoculo microbico che possono aver determinato l'acidificazione del terreno di coltura e ridotto il pH del medium con effetti negativi sull'attività di alcuni ceppi microbici.

Il medium Menke rispetto a quello semplificato ha favorito una maggiore produzione di gas di fermentazione. Questo risultato può essere spiegato con la maggiore presenza di elementi nutritivi presenti nel medium Menke. Con il medium semplificato le fermentazioni si sono sviluppate intensamente anche se l'attività microbica sembra essere stata inibita per effetto della carenza di alcuni principi nutritivi.

Sorprendentemente, le buccette di pomodoro hanno prodotto quantità di gas simili quando erano fermentate singolarmente (2 g di sottoprodotto) o in combinazione al 50% con il cardo (1 g di sottoprodotto e 1 g di Cardo mariano). Infatti da precedenti studi risulta che il Cardo Mariano si caratterizza per una limitata fermentescibilità e la maggior parte del gas viene prodotto dal sottoprodotto. In altri termini quindi, per grammo di buccette di pomodoro incubato si sono

ottenute produzioni di gas doppie quando il sottoprodotto è stato incubato in combinazione con il Cardo rispetto alla incubazione del solo sottoprodotto.

Ancora più evidente è risultato effetto del cardo sulla fermentazione del pastazzo di agrumi. Quando il pastazzo di agrumi è stato incubato con il cardo è stato osservato un aumento della produzione di gas ($P < 0.01$) rispetto a quanto è stato incubato singolarmente. Questi risultati possono essere spiegati dalla capacità del cardo di tamponare l'acidificazione del liquido di fermentazione nel corso dell'incubazione come suggerito dai valori di pH al termine dell'incubazione (Pastazzo agrumi pH = 4.69 vs. Pastazzo + cardo pH = 5.84; Buccette di pomodoro pH = 5.89 vs Buccette + Cardo pH = 6.84).

Nel corso della prima incubazione è stata registrata una produzione di gas mediamente superiore rispetto alle successive. Questo suggerisce che l'attività dei microrganismi tende a ridursi nel tempo.

Tabella 1. Medie stimate dei valori di produzione di gas (GP), pH e delle concentrazioni di ammoniaca (NH₃) ottenuti dalla fermentazione delle diverse combinazioni alimentari.

	GP, ml	pH	NH ₃ , mg/l
Dose inoculo			
- basso (5 ml)	146 ^A	5.98 ^A	24.2
- alto (30 ml)	135 ^B	5.44 ^B	22.9
Medium			
- Menke (M)	159 ^A	5.77 ^A	23.0
- Semplificato (S)	122 ^B	5.64 ^B	24.1
Alimento			
- Buccette di pomodoro	162 ^A	5.89 ^B	38.5 ^A
- Pastazzo di agrumi	119 ^C	4.69 ^C	16.1 ^B
- Buccette + Cardo	142 ^B	6.42 ^A	22.2 ^B
- Pastazzo + Cardo	139 ^B	5.84 ^B	17.6 ^B
Incubazione			
- 1°	164 ^A	5.81 ^A	19.9 ^b
- 2°	129 ^B	5.69 ^B	25.0 ^a
- 3°	129 ^B	5.62 ^C	25.8 ^a
SED	2.8	0.016	1.69
Significat. effetti, P			
Dose inoculo (D)	0.0074	<.0001	0.5205
Medium (M)	<.0001	<.0001	0.5911
Alimento (A)	<.0001	<.0001	<.0001
Incubazione (I)	<.0001	<.0001	0.0311
D*M	0.0047	<.0001	0.4719
D*A	<.0001	<.0001	0.0059
M*A	0.1363	<.0001	0.2357
D*M*A	0.6651	0.0130	0.1934
D*I	<.0001	<.0001	0.5039
M*I	0.0001	0.0005	<.0001
A*I	0.0006	<.0001	0.0896

SED= errore standard delle differenze

I valori relativi ad ogni fattore di classificazione con lettere differenti differiscono significativamente: ^{A,B,C} P<0.01; ^{a,b,c} P<0.05

Effetto delle condizioni di incubazione sulla fermentazione delle buccette di pomodoro

In tabella 2 sono riportati i valori di produzione gassosa, pH e ammoniaca relativi alle buccette di pomodoro nelle tre incubazioni successive e utilizzando i due dosaggi di inoculo e i due terreni di coltura.

Con questo alimento, l'impiego del medium convenzionale Menke e un basso dosaggio di inoculo (tesi M5) ha permesso di ottenere produzioni di gas relativamente costanti al termine delle tre incubazioni e pari a circa 190 ml ($P > 0.01$) come evidenziato in figura 2. Questo risultato non si è ripetuto quando il medium Menke è stato aggiunto ad un'elevata quantità di inoculo (M30). In questo caso infatti, è stata osservata una progressiva diminuzione della produzione di gas passando dalla prima (202 ml) alla terza (155 ml) incubazione ($P < 0.01$).

In generale, quando le buccette di pomodoro sono state incubate con il medium semplificato (S) è stata misurata una minore produzione di gas rispetto al medium convenzionale ($P < 0.01$). Analogamente a quanto rilevato con il medium Menke, quando il medium semplificato è stato incubato con una ridotta quantità di inoculo (tesi S5) la produzione di gas è stata relativamente costante nelle tre incubazioni e mediamente pari a 150 ml. Viceversa, il medium semplificato in combinazione con un elevato dosaggio di inoculo ha determinato un progressivo crollo delle produzioni gassose (da 195 ml a 91 ml rispettivamente nella 1° e 3° incubazione; $P < 0.01$).

Complessivamente, il medium convenzionale Menke ha avuto una maggiore capacità di tamponare le variazioni di pH rispetto al medium semplificato come evidenziato dai più elevati valori di pH registrati al termine delle incubazioni (Figura 2). In generale, quando l'alimento è stato incubato con una ridotta quantità di inoculo microbico (M5 e S5), il pH del terreno di coltura non è sceso al di sotto della soglia di 6. In queste condizioni si ritiene che l'acidità del medium non determini un rilevante effetto inibitorio sull'attività microbica fermentativa (Menke et al., 1988). In presenza di un elevato dosaggio di inoculo microbico (M30 e S30) è stata osservata una progressiva riduzione del pH nel succedersi delle incubazioni (da valori prossimi al 6 fino a valori di 5.5 rispettivamente nella 1° e 3° incubazione). Questo progressivo calo di pH può essere spiegato con il fatto che utilizzando un'elevata dose di inoculo (30 ml), si trasferiscono da un'incubazione alla successiva oltre che i microrganismi anche considerevoli quantità di acidi grassi che tendono ad acidificare la soluzione. In questo range di pH, l'acidità del medium determina un effetto

inibitorio sulle fermentazioni microbiche che ha portato ad una progressiva riduzione nella produzione di gas.

Tabella 2. Produzioni di gas (GP), pH e concentrazioni di ammoniaca ottenuti dalla fermentazione delle buccette di pomodoro

	GP, ml			pH			NH ₃ mg/l		
	Incubazione			Incubazione			Incubazione		
	1°	2°	3°	1°	2°	3°	1°	2°	3°
Menke basso (M5)	184 ^{AB}	190 ^A	192 ^A	6.25 ^A	6.22 ^B	6.24 ^A	11.2 ^B	48.3 ^a	40.9
Semplificato basso (S5)	163 ^B	140 ^B	130 ^C	6.09 ^B	5.96 ^C	6.06 ^B	51.2 ^A	21.3 ^b	33.9
Menke alto (M30)	202 ^A	172 ^A	155 ^B	6.03 ^B	5.67 ^C	5.55 ^C	16.2 ^B	38.9 ^{ab}	60.3
Semplificato alto (S30)	195 ^A	132 ^B	91 ^D	5.83 ^C	5.44 ^D	5.35 ^D	48.7 ^A	43.3 ^{ab}	48.2
SED		7.58			0.034			8.15	
Signif. effetti, P									
- Dose inoculo (D)		0.0891			<.0001			0.1042	
- Medium (M)		<.0001			<.0001			0.2894	
- Incubazione (I)		.0001			<.0001			0.0697	
D*M		0.4307			0.7834			0.5105	
D*I		<.0001			<.0001			0.4003	
M*I		0.0008			0.1124			0.0004	
D*M*I		0.7115			0.6256			0.1985	

SED= errore standard delle differenze

I valori con lettere differenti differiscono significativamente: ^{A,B,C} P<0.01

Figura 1: Effetto delle condizioni di incubazione sulla produzione di gas ottenuta dalla fermentazione delle buccetti di pomodoro

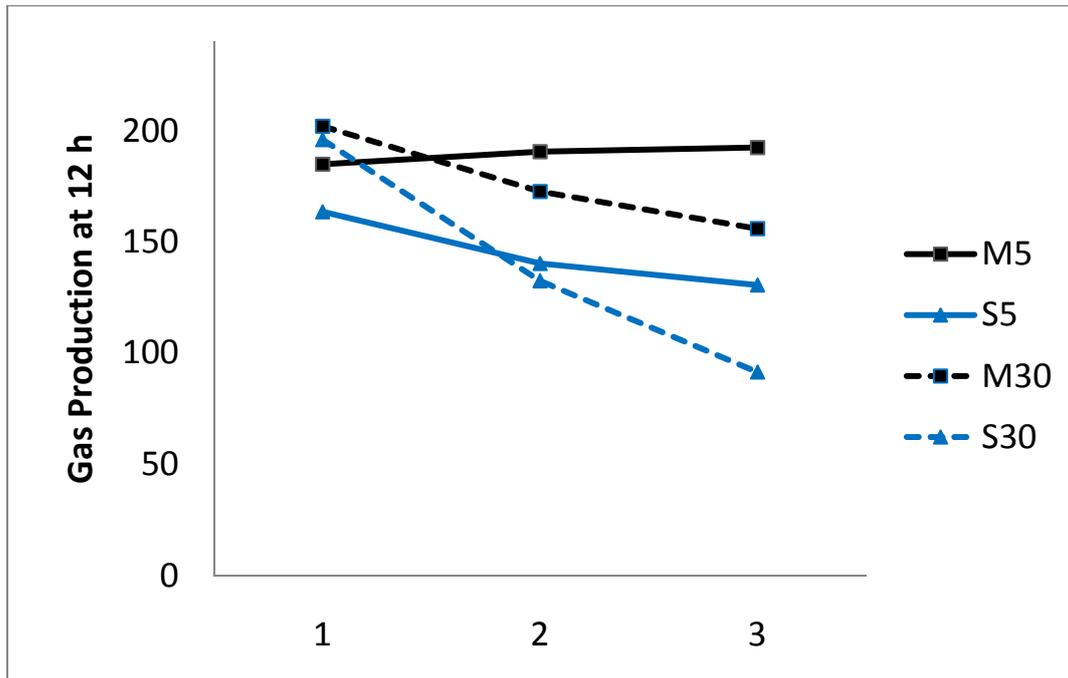
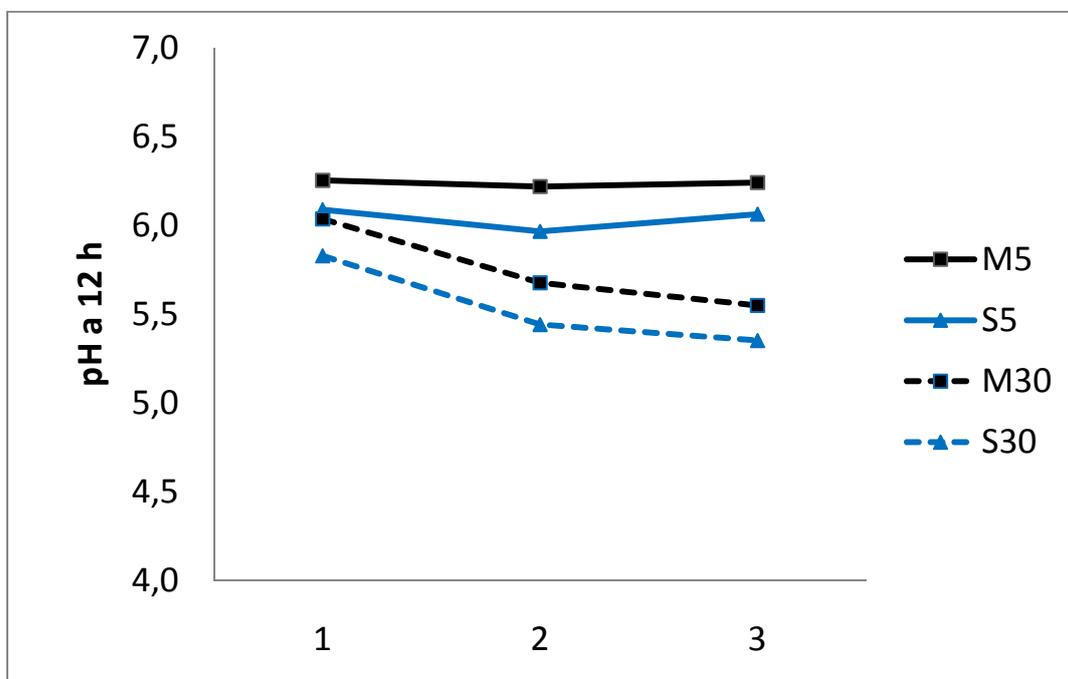


Figura 2: Effetto delle condizioni di incubazione sul pH del liquido di fermentazione delle buccetti di pomodoro



Effetto delle condizioni di incubazione sulla fermentazione delle buccette di pomodoro + cardo

In tabella 3 sono riportati i valori di produzione di gas (GP), pH, NH₃, riferiti alla combinazione di alimenti buccette di pomodoro e cardo nelle tre incubazioni successive.

La produzione di gas nella prima incubazione è risultata superiore a 150 ml di gas per tutte le combinazioni di medium e inoculo microbico tranne nel caso in cui il medium semplificato è stato incubato con una ridotta quantità di inoculo microbico (S5) (P<0.01). Rispetto alla prima incubazione, la produzione di gas tende a ridursi in misura significativa (P<0.01) in tutte le condizioni di fermentazione tranne quando è stata utilizzata la combinazione M30 che consente di mantenere elevata la produzione di gas (Figura 3).

A differenza di quanto osservato incubando solo buccette di pomodoro, la combinazione di questo alimento con cardo determina il mantenimento del pH del liquido di fermentazione a valori superiori alla soglia di 6 che garantiscono condizioni ottimali per lo sviluppo della flora microbica (Figura 4). Questo risultato può essere associato alla capacità del cardo di tamponare gli acidi prodotti dalla fermentazione microbica. Come osservato anche precedentemente, con le combinazioni M30 e S30 è stata osservata una progressiva diminuzione del pH nelle 3 successive incubazioni.

Come osservato anche con le sole buccette di pomodoro, la combinazione M30 tradizionalmente utilizzata per studiare la fermentescibilità degli alimenti (Menke and Steingass, 1988) permette di ottenere le migliori condizioni fermentative se il pH del liquido di fermentazione è superiore a 6. Va comunque osservato che in queste condizioni di pH, le tesi M5 e S30 permettono di sostenere un'elevata attività fermentativa anche se limitatamente alla 1° incubazione.

Tabella 3. Produzioni di gas (GP), pH e concentrazioni di ammoniaca ottenuti dalla fermentazione delle buccette di pomodoro e cardo

	GP,ml			pH			NH ₃ , mg/l		
	Incubazione			Incubazione			Incubazione		
	1°	2°	3°	1°	2°	3°	1°	2°	3°
Menke basso (M5)	159.2 ^A	138.3 ^B	132.4 ^B	6.62 ^A	6.66 ^A	6.67 ^A	9.9 ^B	35.2 ^A	43.8 ^A
Semplificato basso(S5)	113.9 ^B	93.0 ^C	108.1 ^C	6.62 ^A	6.58 ^A	6.63 ^A	28.8 ^A	31.0 ^{AB}	20.1 ^B
Menke alto (M30)	162.6 ^A	158.6 ^A	178.5 ^A	6.53 ^B	6.37 ^B	6.22 ^B	13.1 ^{AB}	16.5 ^B	13.9 ^B
Semplificato alto (S30)	171.4 ^A	147.6 ^{AB}	144.0 ^B	6.29 ^C	6.03 ^C	5.90 ^C	17.3 ^{AB}	23.0 ^{AB}	14.0 ^B
SED		5.93			0.032			3.93	
Signif. effetti, P									
Dose Inoculo(D)		<.0001			<.0001			0.0010	
Medium (M)		<.0001			<.0001			0.9264	
Incubazione (I)		0.0010			<.0001			0.0027	
D*M		0.0022			<.0001			0.2461	
D*I		0.4128			<.0001			0.0440	
M*I		0.3168			0.0968			0.0008	
D*M*I		0.0018			0.8963			0.0044	

SED= errore standard delle differenze

I valori con lettere differenti differiscono significativamente: ^{A,B,C} P<0.01

Figura 3: Effetto delle condizioni di incubazione sulla produzione di gas ottenuta dalla fermentazione delle buccette di pomodoro e cardo

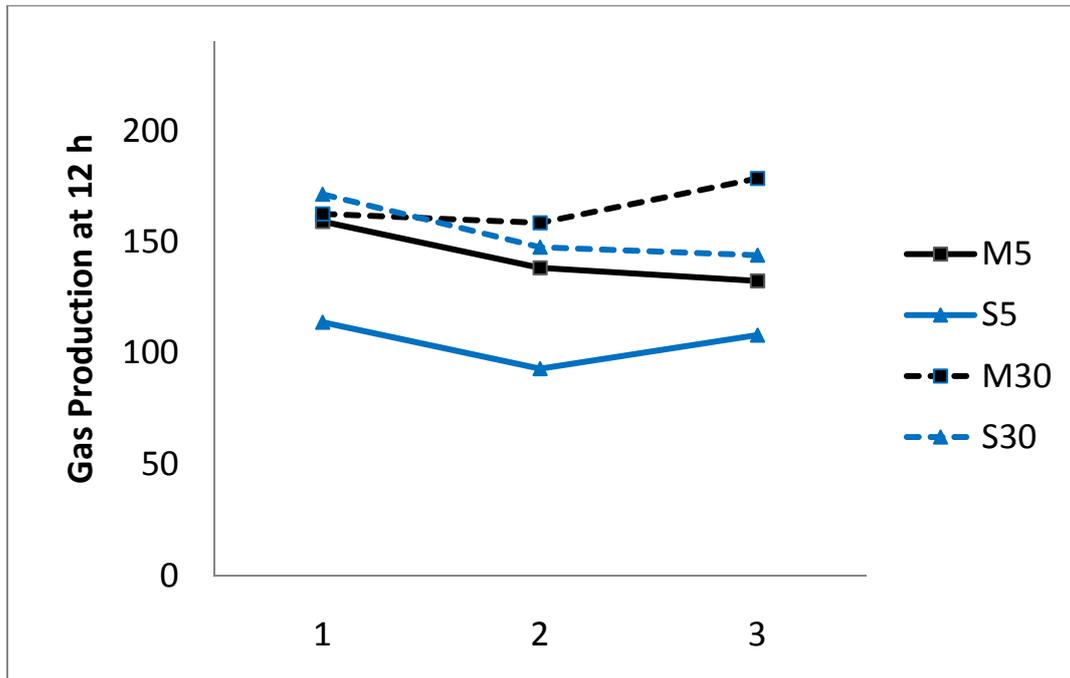
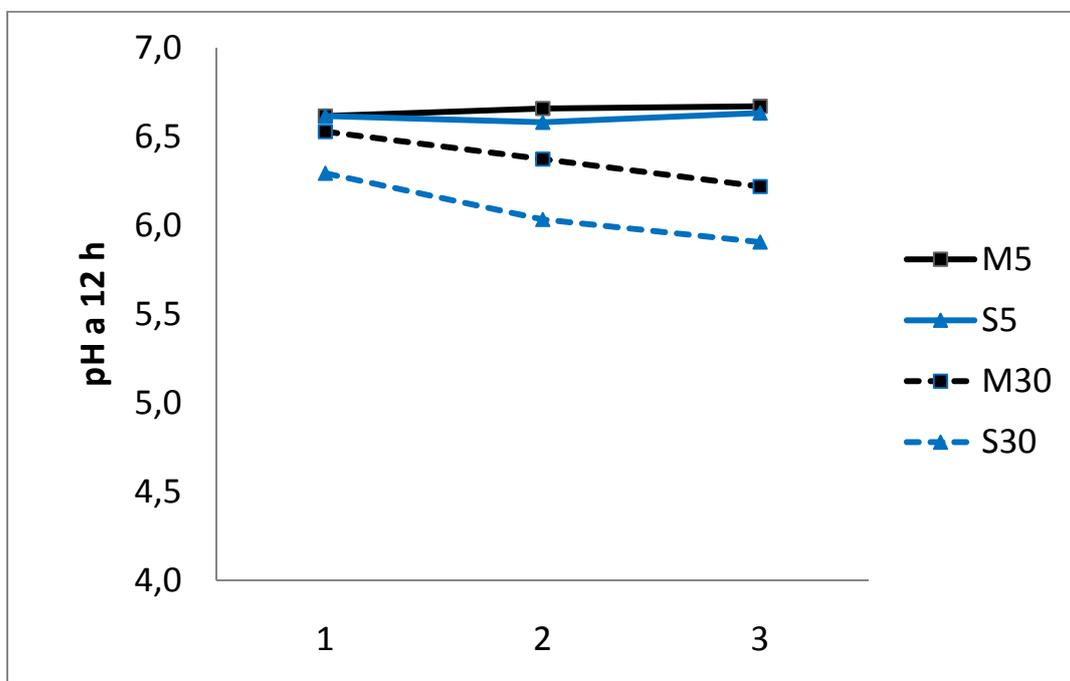


Figura 4: Effetto delle condizioni di incubazione sul pH del liquido di fermentazione delle buccette di pomodoro e cardo



Effetto delle condizioni di incubazione sulla fermentazione del pastazzo di agrumi

In tabella tre sono riportati i valori di produzione di gas (GP), pH, NH₃, riferiti al sottoprodotto pastazzo di agrumi nelle tre incubazioni successive e con le diverse combinazioni di medium e inoculo.

Con il medium Menke, la produzione di gas ha superato i 160 ml in tutte le incubazioni quando sono stati utilizzati ridotti dosaggi di inoculo icrobico (M5). Viceversa, quando questo medium è stato combinato con elevati dosaggi di inoculo (M30), la produzione di gas ha superato i 150 ml solo nella prima incubazione per poi crolla nelle successive incubazioni ($P < 0.01$). Come osservato per le buccette di pomodoro, con il medium semplificato le produzioni di gas sono risultate sensibilmente inferiori rispetto a quelle ottenute con il medium convenzionale Menke. In generale, l'andamento delle produzioni di gas nelle tre incubazioni con il medium semplificato è analogo a quello osservato per il medium Menke. Infatti, il medium semplificato con un basso livello di inoculo (S5) ha prodotto una ridotta quantità di gas (120 ml circa) che però si è mantenuta costante nelle incubazioni successive. Viceversa, questo medium con un alto livello di inoculo (S30) ha prodotto una quantità di gas maggiore nella prima incubazione rispetto alle successive.

Il pH è risultato molto basso e inferiore a 5.5 con tutte le combinazioni alimentari e in tutte le incubazioni. L'unica tesi sperimentale che può essere giudicata accettabile è quella che ha previsto l'impiego del medium Menke e di un basso livello di inoculo perché si nota una buona produzione di gas in tutte le incubazioni.

Tabella 4. Produzioni di gas (GP), pH e concentrazioni di ammoniaca ottenuti dalla fermentazione del pastazzo di agrumi.

	GP, ml			pH			NH ₃ , mg/l		
	Incubazione			Incubazione			Incubazione		
	1°	2°	3°	1	2	3	1	2	3
Menke basso(M5)	163.5 ^A	176.2 ^A	206.0 ^A	4.96 ^A	4.83 ^B	4.88 ^B	11.9 ^B	21.5 ^a	9.5 ^B
Semplificato basso(S5)	131.5 ^{AB}	104.2 ^B	114.3 ^B	4.49 ^C	5.34 ^A	5.45 ^A	31.5 ^A	5.4 ^b	6.8 ^B
Menke alto (M30)	155.2 ^{AB}	82.8 ^C	77.8 ^C	4.78 ^B	4.32 ^C	4.19 ^C	9.2 ^B	21.9 ^a	39.1 ^A
Semplificato alto(S30)	117.0 ^B	50.4 ^C	52.1 ^C	4.55 ^C	4.28 ^C	4.18 ^C	22.1 ^{AB}	6.3 ^b	8.3 ^B
SED		14.98			0.046			4.86	
Signif. effetti, P									
Dose Inoculo (D)		0.0004			<.0001			0.3103	
Medium (M)		0.0018			0.0794			0.1156	
Incubazione (I)		<.0001			0.7563			0.2960	
D*M		0.2004			0.0002			0.0988	
D*I		0.0001			<.0001			0.0112	
M*I		0.3684			<.0001			<.0001	
D*M*I		0.1227			<.0001			0.0805	

SED= errore standard delle differenze

I valori con lettere differenti differiscono significativamente: ^{A,B,C} P<0.01

Figura 5: Effetto delle condizioni di incubazione sulla produzione di gas ottenuta dalla fermentazione del pastazzo di agrumi

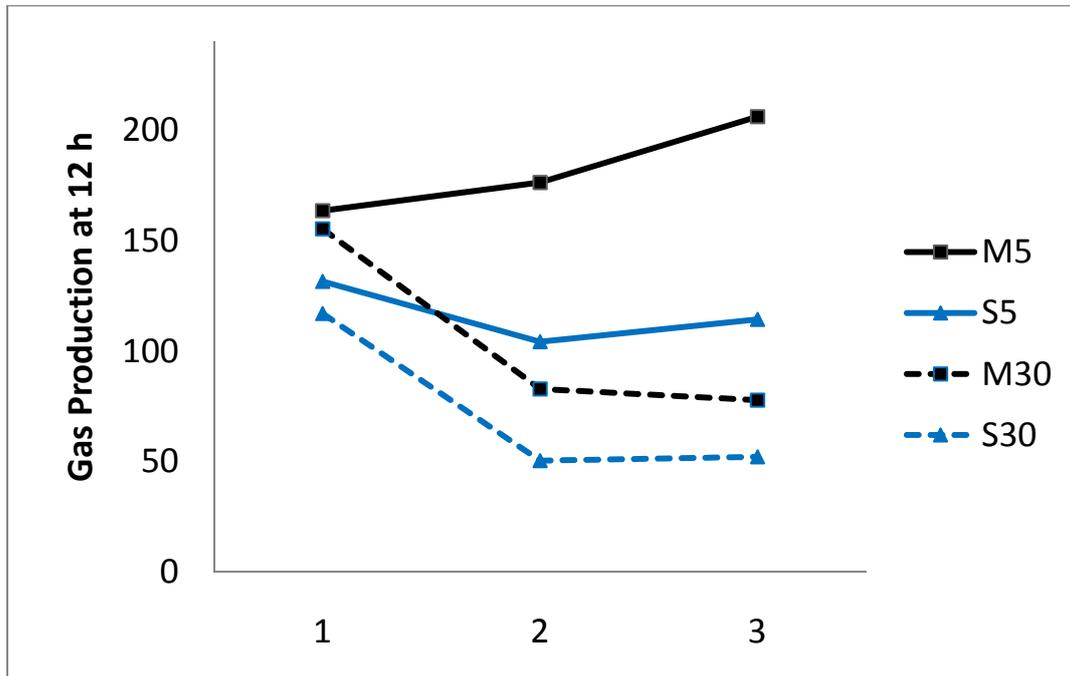
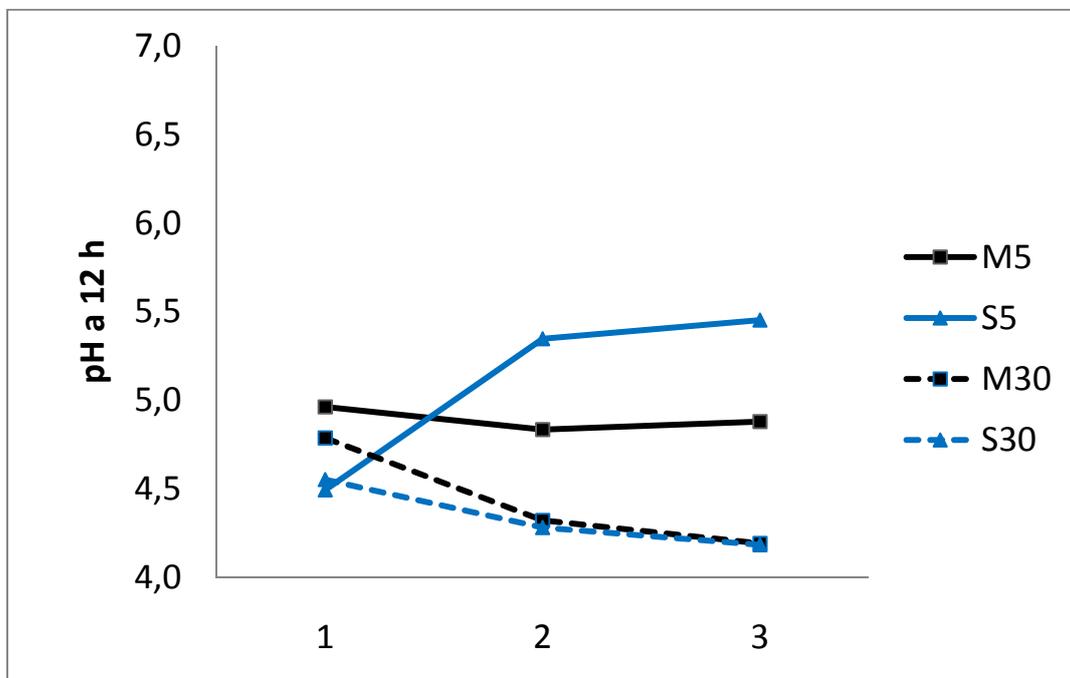


Figura 6: Effetto delle condizioni di incubazione sul pH del liquido di fermentazione del pastazzo di agrumi



Effetto delle condizioni di incubazione sulla fermentazione del pastazzo di agrumi e cardo

In tabella 5 sono riportati i valori di produzione di gas (GP), pH, NH₃, riferiti alla combinazione di alimenti pastazzo di agrumi e cardo nelle tre incubazioni successive.

Come osservato anche precedentemente, con questa combinazione alimentare, la tesi sperimentale M5 ha permesso la produzioni di una elevata quantità di gas nella prima incubazione, circa 180 ml, che si è mantenuta elevata anche nelle incubazione successive.

Con la combinazione M30, normalmente utilizzata per lo studio degli alimenti, la produzione di gas è stata elevata nella prima incubazione ma poi è calata nelle successive, passando da circa 180 ml a circa 110 ml nella prima e terza incubazione rispettivamente.

Il medium semplificato ha determinato produzioni i gas molto variabili nelle tre incubazioni con i due dosaggi di inoculo microbico. Infatti, con la combinazione S5 è stata osservata una produzione di gas di 150 ml nella prima incubazione, un drastico calo nella seconda incubazione e nuovamente un aumento nella terza incubazione. Con la combinazione S30 è stato osservato un progressivo calo delle produzioni di gas dalla prima alla terza incubazione.

L'andamento del pH del liquido di fermentazione rispecchia le variazioni nelle prodzioni di gas e non è mai sceso al di sotto di valori pari a 5. Questo risultato e le elevate produzioni di gas osservate quando il pastazzo di agrumi è stato incubato con il cardo sembrano confermare la capacità di quest'ultimo alimento di tamponare il pH del medium e quindi di stimolare l'attività fermentativa microbica.

Tabella 5: Produzioni di gas (GP), pH e concentrazioni di ammoniaca ottenuti dalla fermentazione del pastazzo di agrumi e cardo

	GP, ml			pH			NH ₃ , mg/l		
	Incubazioni			Incubazione			Incubazione		
	1°	2°	3°	1°	2°	3°	1°	2°	3°
Menke basso (M5)	179.0 ^A	169.1 ^A	161.6 ^A	6.30 ^A	6.33 ^A	6.16 ^A	13.1 ^A	23.7 ^A	7.0 ^A
Semplificato basso (S5)	151.3 ^B	84.4 ^D	131.1 ^B	5.98 ^B	6.2 ^A	6.09 ^A	14.1 ^A	25.4 ^A	37.0 ^B
Menke alto (M30)	177.7 ^A	127.2 ^B	113.5 ^C	5.99 ^B	5.54 ^B	5.35 ^B	8.7 ^B	30.3 ^A	9.1 ^{AB}
Semplificato alto (S30)	190.3 ^A	103.4 ^C	87.0 ^D	5.78 ^C	5.28 ^C	5.09 ^C	12.7 ^B	8.7 ^B	21.2 ^{AB}
SED	5.2			0.038			5.60		
Signif. effetti, P									
Dose Inoculo (D)	0.0185			<.0001			0.2033		
Medium (M)	<.0001			<.0001			0.2515		
Incubazione (I)	<.0001			<.0001			0.0343		
D*M	0.0033			0.1879			0.1178		
D*I	<.0001			<.0001			0.8836		
M*I	<.0001			0.1209			0.0008		
D*M*I	<.0001			0.0209			0.1771		

SED= errore standard delle differenze

I valori con lettere differenti differiscono significativamente: ^{A,B,C} P<0.01

Figura 7. Effetto delle condizioni di incubazione sulla produzione di gas ottenuta dalla fermentazione del pastazzo di agrumi e cardo

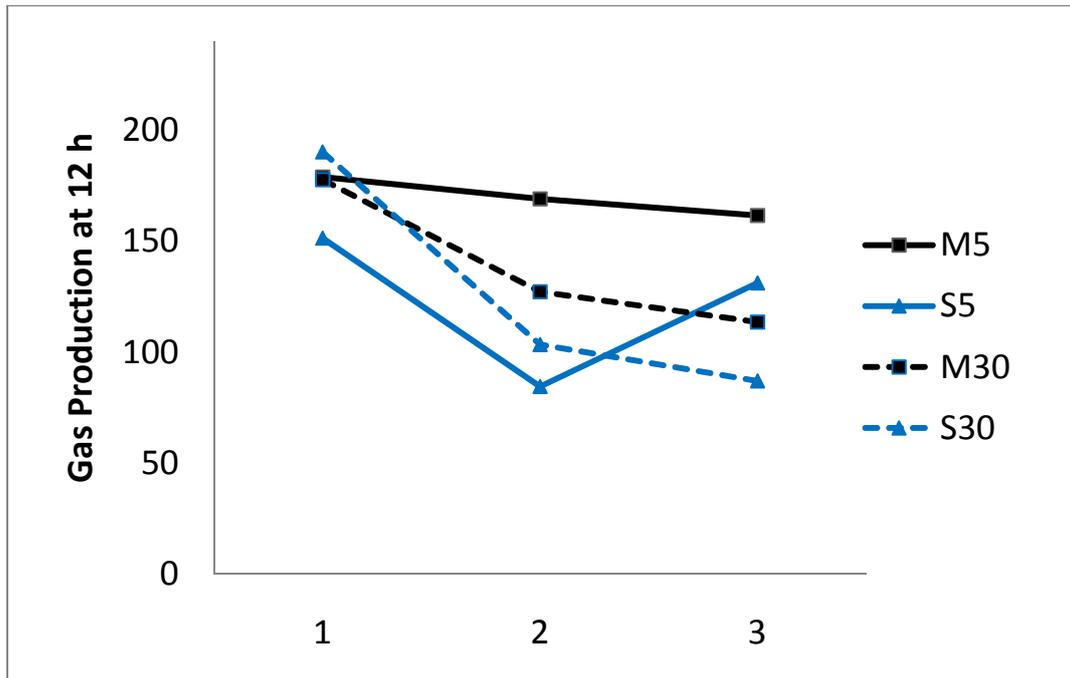
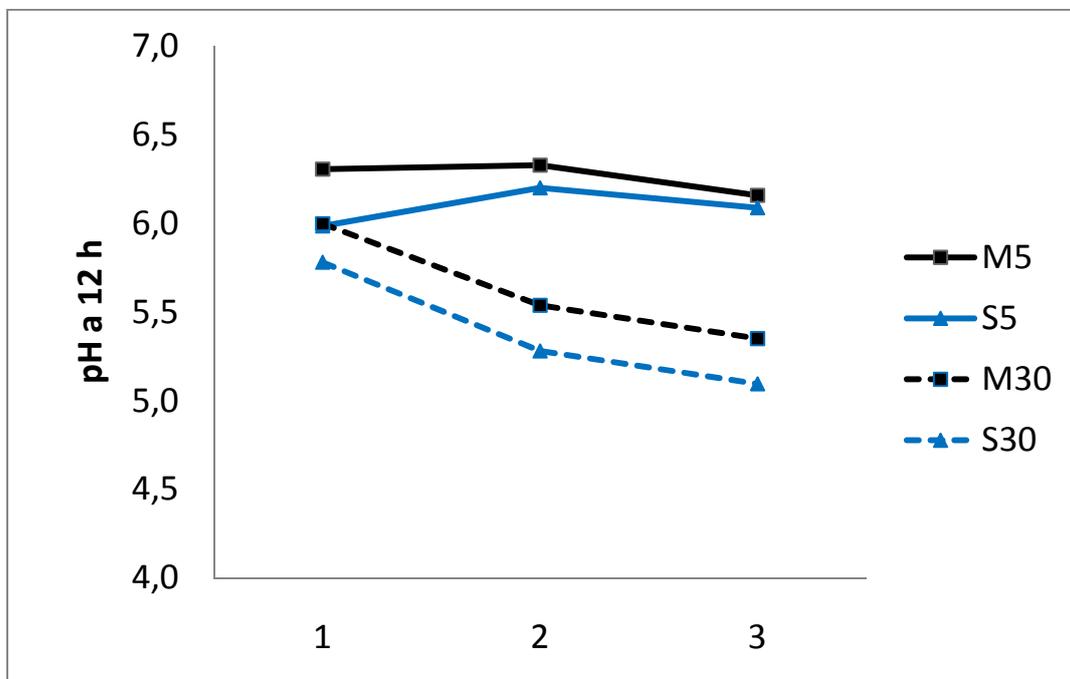


Figura 8. Effetto delle condizioni di incubazione sul pH del liquido di fermentazione pastazzo di Agrumi e Cardo



Conclusioni

I risultati della presente ricerca indicano che:

- I medium comunemente utilizzati per lo studio della fermentescibilità *in vitro* degli alimenti possono essere sostituiti da medium semplificati, costituiti esclusivamente da un tampone, può essere utilizzato in sostituzione a quelli normalmente utilizzati, a patto che: i) il pH del liquido di fermentazione non scenda al di sotto di valori pari a 5.5; ii) venga utilizzato un elevato dosaggio di liquido ruminale come inoculo microbico.
- La dose di liquido ruminale da utilizzare come inoculo di fermentazione può essere ridotta dai convenzionali 30 a circa 5 ml senza effetti negativi sulle produzioni di gas. La riduzione della dose di inoculo sembra essere vantaggiosa se l'obiettivo della ricerca prevede di impiegare i residui di fermentazione per realizzare incubazioni ripetute.
- I residui di fermentazione possono essere utilizzati come inoculo microbico per la realizzazione di incubazioni ripetute, a condizione che: i) venga impiegato un medium complesso (come il Menke); ii) la dose di inoculo microbico sia ridotta dai convenzionali 30 ml a circa 5 ml.
- Il pastazzo di agrumi e le buccette di pomodoro sono alimenti caratterizzati da un'elevata fermentescibilità. La dose di 55 ml di medium non è risultata sufficiente per ottenere la completa fermentazione di 2 g di questi substrati. La dose di medium necessaria per sostenere la degradazione microbica dei sottoprodotti sembra essere doppia rispetto a quella utilizzata nella presente ricerca.
- Il cardo si caratterizza per la capacità di tamponare il pH ruminale e stimolare l'attività fermentativa microbica soprattutto quando il pH del medium scende sotto valori pari a 6.
- L'incubazione combinata di sottoprodotti e cardo determina un incremento della produzione di gas di fermentazione che può essere dovuto a effetti associativi positivi tra questi alimenti.

Bibliografia

- A.A.V.V., 1979. Utilizzazione dei sottoprodotti agricolo-industriali e sfruttamento delle aree marginali in zootecnia. Atti del III Congresso Nazionale A.S.P.A., Edagricole, Bologna.
- Careri P., Gulisano G., Strano A., 2008. Il pastazzo di agrumi va bene nella dieta di bovini e ovini. *L'informatore Agrario*, 28: 28-29.
- Cevolani D., 2005. Materie prime e razioni per bovine ad alta produzione . In *Gli alimenti per la vacca da latte*, coordinatori Barbieri L., Pepe F., Frigerio E., Bombardieri R., Cavassini P., Landini I., Mattiello S., Vertini F., Seconda edizione. Ed. Edagricole.
- Gaertner L., 2002. Cardo mariano, cardo lattato o cardo picchiettato. *L'informatore Agrario* 3, 86.
- Groot J.C.J., Cone J.W., Williams B.A., Dabersaques F.M.A. e Lantinga E.A. 1996. Multiphasic analysis of gas production kinetics for in vitro fermentation of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*. 64:77-89.
- Guadagnin M., 2008. "Impiego della gas production technique" (GPT) per la stima della cinetica di degradazione ruminale degli alimenti di interesse zootecnico. Tesi di laurea. Università degli studi di Padova.
- Makkar, H.P.S., 2005. Recent advances in the in vitro gas method for evaluation of nutritional quality of feed resources. In: *Assessing Quality and Safety of Animal Feeds*. FAO Animal Production and Health Series 160. FAO, Rome, pp. 55–88.
- Menke K., Raab L., Salewski A., Steingass H., Fritz D., e Schneider W. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquors in vitro. *Journal of Agriculture Science. (Camb.)* 93, 217-222.
- Milazzo G., Romeo E., Mineo A., Guerra B., 2007. Compostaggio dei sottoprodotti dell'industria agrumaria. Dispense dell' Istituto Tecnico Industriale Stanislao, Istituto di Cannizzaro Catania A.A. 2007-2008
- Piccioni M., 1979. *Dizionario degli alimenti per il bestiame*. Quarta edizione. Ed. Edagricole.
- Rossi L., Piccinini S., 2007. Sottoprodotti agroindustriali, un potenziale da sfruttare. *L'informatore Agrario*, 67-70.
- Sogni S., 1997 La coltivazione del cardo. *L'informatore Agrario* 43, 57-60.

- Vecchietini M., Gaspari F., Bortolotti M., Sandrini E., Rossi L., 2007. Scarti agroindustriali efficienti nella dieta dei bovini da carne. L'Informatore Agrario

Ringraziamenti

Ringrazio i miei genitori, Fosca e Ilario, per avere creduto in me ed avermi accompagnato in questa mia splendida esperienza.

Ringrazio lo zio Leandro per avermi incoraggiato e sostenuto durante tutto il cammino.

Grazie a Daniele e amici per essermi stati sempre vicini.

Un particolare ringraziamento va al Dr. Franco Tagliapietra per avermi seguito con pazienza nella prova e nella stesura della tesi.