

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- **UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA**
- **COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE**

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

PRODUZIONE E SANITÀ DEI PRODOTTI DI ORIGINE ANIMALE

XX CICLO

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

**UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI
ALIMENTAZIONE LATTEA**

COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

COORDINATORE:

Chiar.ma Prof.ssa Maria Luisa Cortesi

RELATORE:

Ch.mo Prof. Vincenzo Proto

DOTTORANDO:

Dott.ssa Maria Luisa Varricchio

Dott. Maria Luisa Varricchio

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- **UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA**
- **COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE**

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

2007

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- **UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA**
- **COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE**

UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

1. LO SVEZZAMENTO

1.1. PREMessa

Lo svezzamento è la tecnica di allevamento che consente al vitello di trasformarsi progressivamente da monogastrico funzionale a ruminante, passando gradualmente da un periodo esclusivamente di allattamento ad una alimentazione solida costituita da mangimi e fieno (Parigi Bini e Someda De Marco, 1989; Monetti, 2001). Si tratta di un periodo di transizione estremamente delicato e complesso per l'animale che affronta una serie di trasformazioni morfologiche, anatomiche e funzionali che influiranno sulla successiva carriera produttiva e riproduttiva (Blum, 2006). Il passaggio dall'alimentazione a base di solo latte a quella con alimenti solidi può causare un ritardo nello sviluppo, particolarmente quando la diminuzione della quantità di latte somministrata è elevata (Hepola, 2003).

I primi lavori scientifici sullo sviluppo del rumine e sullo svezzamento (riassunti da Warner, 1991), indicano che i vitelli in buono stato di salute hanno un buon appetito e consumano, generalmente, livelli crescenti di alimenti secchi per permettere al rumine di svilupparsi. Ricerche condotte dalla Cornell University hanno evidenziato che i vitelli riescono a consumare sufficienti quantità di mangime nelle prime 4 – 6 settimane di età che gli permettono di prevenire rallentamenti repentini della crescita durante lo svezzamento (Drackley, 2001).

L'alimentazione del vitello deve essere sempre appropriata alle sue esigenze nutritive per garantire lo sviluppo delle sue potenzialità produttive (Church, 1991). Secondo Cappa (1982) un corretto svezzamento ha un'importanza tecnica ed economica pari a quella degli aspetti igienici e di ricovero dell'allevamento.

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Lo svezzamento può essere suddiviso in due fasi:

- una di alimentazione esclusivamente lattea che assicura buoni accrescimenti ponderali;
- una di adattamento alla dieta solida, durante la quale l'animale va incontro alle maggiori modificazioni fisiologiche e la crescita ponderale risulta piuttosto ridotta.

Segue, poi, una fase di post-svezzamento, in cui si registrano i più elevati accrescimenti.

La durata di queste fasi dipende da molteplici fattori, ma è sostanzialmente condizionata dal peso vivo iniziale del vitello, dalle sue caratteristiche genetiche e dal tipo di dieta impiegata (Bonsembiante e Susmel, 1978).

La lunghezza del periodo di svezzamento varia a seconda delle tecniche adottate; attualmente i sistemi più diffusi sono:

- svezzamento precocissimo (a 30 giorni);
- svezzamento precoce (a 60 giorni);
- svezzamento normale (a 90 giorni ed oltre) (Monetti, 2001).

Ai fini di un armonico sviluppo dell'animale, quest'ultimo tipo è maggiormente adottato.

Si è cercato, con numerosi tentativi, di stimolare lo sviluppo del rumine per svezzare i vitelli in età precoce cercando allo stesso tempo di evitare i disordini digestivi dovuti al cambiamento di alimentazione.

L'impiego degli additivi alimentari che promuovono lo sviluppo metabolico del rumine potrebbe, ad esempio, essere un utile mezzo per realizzare questi obiettivi (Di Francia *et al.*, 2007a; Di Francia *et al.*, 2007b).

1.2. SVILUPPO ANATOMICO DELL'APPARATO DIGERENTE

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Nel vitello, come nell'animale adulto, lo stomaco è costituito da quattro cavità: i tre prestomaci (reticolo, rumine e omaso) e lo stomaco vero, denominato abomaso (Succi e Hoffmann, 1997).

Nei primi mesi di vita i prestomaci del vitello subiscono uno sviluppo allometrico differenziale. Alla nascita, infatti, l'abomaso occupa il 49% del complesso gastrico e il rumine-reticolo solo il 38%, mentre a sedici settimane le proporzioni si invertono: l'omaso occupa solo il 15% mentre il rumine-reticolo, il cui peso cresce in modo proporzionalmente più veloce del peso vivo dell'animale, occupa il 67% del volume complessivo (Ash, 1964).

Alla nascita solo l'abomaso è funzionante e con la sua capienza di circa 1.5 - 2.0 litri, costituisce la maggior parte del volume complessivo degli stomaci; il complesso reticolo - rumine - omaso presenta, invece, una capacità pari a un solo litro, equivalente a poco più del 30% del totale. Con l'avanzare dell'età dell'animale il rumine è interessato da un processo di sviluppo molto rapido che lo porta a raggiungere nel bovino adulto la capienza di 100 - 150 litri (pari all'80% della capacità degli stomaci). Il volume dell'abomaso, al contrario, cresce molto lentamente fino ad assestarsi intorno ai 15 litri, equivalenti a circa l'8% del totale (Foto 1). La velocità con cui si realizza il processo di sviluppo dell'apparato digerente del vitello dipende dalla natura degli alimenti introdotti; il ricorso ad una regolare somministrazione di cibi solidi fin dalle prime settimane di vita favorisce, in particolare, il rapido accrescimento dimensionale del rumine e la sua precoce attivazione fisiologica (Succi e Hoffmann, 1997).

L'aumento del volume del rumine è dovuto all'azione meccanica di sfregamento delle particelle alimentari che stimolano le zone riflessogene della motilità (Gennari e Davoli, 1988), il cui meccanismo nervoso è potenzialmente funzionante già a due settimane di età, per cui è sufficiente un modesto stimolo per iniziare la ruminazione (Parigi Bini e Someda De Marco, 1989).

Durante il primo periodo di vita il latte ingerito dal vitello è convogliato direttamente nell'abomaso attraverso una sorta di canale che consente di evitare la sosta

Dott. Maria Luisa Varricchio

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

nel rumine ancora inattivo, allontanando i rischi di processi fermentativi anomali. Il canale, denominato doccia esofagea, una plica muscolare che si estende sulla superficie interna del rumine e del reticolo dal cardias all'ostio reticolo - omasico (Gobetto e Pellegrini, 1979), si forma in seguito alla contrazione di specifici muscoli e ha la funzione di collegare direttamente l'esofago all'ingresso dell'abomaso. La chiusura della doccia è determinata da un riflesso nervoso generato dal contatto del latte con alcuni recettori presenti nella mucosa della parete posteriore della cavità orale e della faringe, sensibili alle proteine e agli ioni minerali (Na^+ soprattutto) in esso contenuti (Gobetto e Pellegrini, 1979; Succi e Hoffmann, 1997). Durante la suzione, in seguito al contatto con il latte, le due labbra della plica, per contrazione riflessa della muscolatura che la percorre, si accorciano e si avvicinano tra loro a formare un canale chiuso che convoglia il latte direttamente dall'esofago all'omaso-abomaso, impedendo, così, che ristagni nel rumine-reticolo (Aguggini *et al.*, 1992). La sostituzione delle proteine del latte con proteine di diversa origine sembra esercitare un effetto di depressione nei riguardi di tale riflesso nervoso (Succi e Hoffmann, 1997).

La stimolazione della chiusura del canale esofageo è più efficace quando il latte è assunto dal poppatoio piuttosto che dal secchio, in quanto l'insorgere del riflesso è strettamente associato all'atto di succhiare (Church, 1991). Infatti, se la suzione avviene con la testa protesa in avanti ed in alto, è favorita la contrazione che, invece, non avviene in modo del tutto efficiente se il latte è assunto dal secchio, a sorsate, come se l'animale bevesse, per la postura che il vitello deve assumere, con conseguente eventuale caduta di latte nel rumine-reticolo (Frandsen, 1987; Aguggini *et al.*, 1992), possibile instaurarsi di fermentazioni anomale, meteorismo, irritazione delle mucose, intossicazioni anche letali e diarrea (Bettini, 1987; Gnudi, 1989). L'adozione del poppatoio, inoltre, rappresenta un vantaggio rispetto alla distribuzione con il secchio per il suo effetto di rallentamento dell'ingestione. La secrezione dell'esterasi salivare è stimolata dall'assunzione del latte e la

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

sua presenza nella saliva è tanto più abbondante quanto più l'ingestione è lenta (Succi e Hoffmann, 1997).

Secondo Ørskov (1978), la doccia esofagea si chiude e il rumine è effettivamente oltrepassato solo quando il soggetto è in uno stato di stimolazione "giovanile", mentre se beve forzatamente (es. somministrazione di medicinali) o per sete, il liquido cade nel rumine. La stimolazione "giovanile" è, dunque, un condizionamento che si crea nel vitello quando si trova in presenza di una serie di sollecitazioni che ricordano la poppata. Di conseguenza più un vitello è lasciato con la madre, tanto più è condizionato ad un certo comportamento di suzione (Parigi Bini e Someda De Marco, 1989).

Il riflesso di chiusura del canale esofageo tende a regredire lentamente col passaggio dell'animale dalla dieta lattea a quella solida e con l'avanzare dell'età dell'animale a mano a mano che le funzioni ruminali si avviano alla normalità (Aguggini *et al.*, 1992; Succi e Hoffmann, 1997). Tuttavia, numerosi studi hanno dimostrato che, tramite particolari accorgimenti, è possibile mantenere o ripristinare questo riflesso anche nel bovino adulto con lo scopo di ottenere il completo by-pass di alcuni principi nutritivi somministrati per via liquida (Succi e Hoffmann, 1997). È stato osservato, invece, che se si somministrano ai vitelli solo diete liquide, il riflesso permane e lo sviluppo dei prestomaci è ritardato fino a 4 - 6 mesi di età. La forte restrizione del consumo di latte, invece, favorisce l'ingestione di alimenti solidi in età molto precoce (Monetti, 2001). Infatti, a dodici settimane la capacità del complesso reticolo-rumine risulta doppia nei vitelli alimentati a diete miste rispetto a quelli che ricevono solo latte.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

1.3. CENNI DI FISIOLOGIA DIGESTIVA

I ruminanti sono caratterizzati dalla presenza dei prestomaci, la cui funzione consiste nel rimescolare, fermentare e degradare la gran parte dell'alimento che l'animale ingerisce. L'azione di degradazione avviene a mezzo di una ricca flora microbica localizzata nel rumine. Alla nascita il vitello è privo di microrganismi, ma già dopo poche ore essi si diffondono precocemente nell'intestino. Nel corso dello svezzamento, dunque, l'apparato digerente del vitello è soggetto ad una serie di trasformazioni istologiche, anatomiche e fisiologiche, che interessano lo sviluppo dei prestomaci, l'insediamento della microflora e della microfauna nel rumine-reticolo, la differenziazione delle papille della mucosa dei prestomaci e l'inizio dell'attività metabolica della mucosa stessa (Parigi Bini e Someda De Marco, 1989).

1.3.1. SVILUPPO DELLE FUNZIONI DIGESTIVE

L'introduzione di sostanze alimentari nel rumine promuove la moltiplicazione batterica mentre la formazione dei prodotti terminali delle fermentazioni microbiche (soprattutto gli acidi grassi volatili) stimola lo sviluppo morfologico e fisiologico dell'organo. Generalmente, quando si somministrano precocemente alimenti secchi, la motilità ruminale è regolare già a due settimane di vita (Succi e Hoffmann, 1997).

I primi batteri che colonizzano il rumine sono rappresentati principalmente da lattobacilli e coliformi che con il tempo sono sostituiti dalle specie microbiche più tipiche (batteri amilolitici, cellulolitici e protozoi); il processo di impianto della flora specifica si verifica tanto più rapidamente quanto più precoce e massiccia è l'assunzione di cibi solidi. Lo sviluppo della microflora "matura" del rumine determina l'eliminazione per competizione degli altri microrganismi e per questa ragione costituisce uno dei mezzi di

Dott. Maria Luisa Varricchio

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

difesa più efficaci nei confronti di gran parte dei germi patogeni dell'apparato digerente; questo fenomeno spiega la drastica riduzione delle patologie gastrointestinali registrabile in corrispondenza della completa attivazione delle funzioni ruminali e giustifica gli sforzi volti all'anticipazione dell'età dello svezzamento (Succi e Hoffmann, 1997).

L'impiego dei probiotici potrebbe essere un utile mezzo per il controllo delle patologie gastrointestinali attraverso la colonizzazione precoce del tratto gastroenterico con ceppi microbici benefici di origine locale (Di Francia *et al.*, 2007a; Di Francia *et al.*, 2007b).

Il ritmo di accrescimento del ruminante quando l'alimentazione è esclusivamente latte è proporzionale al peso vivo dell'animale, mentre con l'ingestione di foraggi e concentrati cresce in misura quattro volte superiore al ritmo di accrescimento del peso vivo (Bonsembiante, 1975; Roy, 1980). L'aumento di volume è dovuto all'azione meccanica di sfregamento delle particelle alimentari, che stimolano le zone riflessogene della motilità (Gennari e Davoli, 1988), il cui meccanismo nervoso è potenzialmente funzionante già a due settimane di età (Parigi Bini e Someda De Marco, 1989). La capacità di assorbimento della mucosa ruminale è legata allo sviluppo delle papille, assenti nel vitello preruminante. Il processo di differenziazione si svolge per stimolazione chimica ad opera degli acidi grassi volatili (AGV) presenti nel liquido del ruminante: in presenza di propionati, ovvero con diete ricche di concentrati, si assiste ad una rapida crescita delle papille al contrario di quanto avviene in presenza di elevate proporzioni di acido acetico (Roy, 1980). Durante lo svezzamento è necessario somministrare al vitello una dieta che, da un lato, contenga una giusta quantità di fibra al fine di garantire un buono sviluppo dimensionale dei tre stomaci e, dall'altro, la dose di cereali necessaria a favorire la differenziazione delle papille ruminali e ad assicurare l'energia per adeguati accrescimenti (Bonsembiante e Susmel, 1978). Secondo Gennari e Davoli (1988) i concentrati devono rappresentare il 70 – 90 % della sostanza secca della razione e i foraggi il 10 – 30 %.

Lo sviluppo dimensionale del reticolo-ruminante è condizionato, quindi, in maniera rilevante,

Dott. Maria Luisa Varricchio

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

dal rapporto foraggi/concentrati (Bonsembiante e Susmel, 1978): con un regime alimentare ricco di sostanze concentrate, il volume del rumine raggiunge gli 8-10 litri per 100 kg di peso vivo a 12 settimane di età, mentre con un regime alimentare ricco di fieno raggiunge un volume di 18 litri (Parigi Bini e Someda De Marco, 1989).

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

1.3.1.1. DIGESTIONE DEI PROTIDI

Le proteine del latte e dei sostitutivi sono digerite nell'abomaso e nell'intestino grazie agli enzimi proteolitici e la digestione varia in funzione del corredo enzimatico dell'animale, della struttura della proteina e della velocità di transito degli alimenti (Succi, 1990). Quando il latte giunge nell'abomaso la caseina coagula nel giro di 3 - 6 minuti trattenendo il grasso e rilasciando il siero (costituito da sieroproteine, lattosio e acqua) che passa direttamente nell'intestino tenue. La coagulazione del latte e la prima digestione delle molecole proteiche sono il risultato dell'azione congiunta dell'acido cloridrico e degli enzimi prodotti nell'abomaso (chimosina e pepsina) (Succi e Hoffmann, 1997). L'attività della tripsina pancreatica è molto debole alla nascita ed aumenta nel corso della prima settimana. Un trattamento termico eccessivo del latte o l'utilizzazione di proteine di soia o di pesce comportano una diminuzione del volume del succo pancreatico e quindi dell'attività proteolitica. La digeribilità delle proteine del latte è molto elevata anche nel giovane animale, mentre quella delle proteine sostitutive è generalmente inferiore: soddisfacente per il siero e per quelle del pesce parzialmente idrolizzato, meno elevata per quelle di origine vegetale (Succi, 1990). Durante i primi giorni di vita la secrezione di acido cloridrico è ancora scarsa e il pH abomasale si mantiene piuttosto elevato; poiché in condizioni di insufficiente acidità la pepsina risulta inattiva è probabile che, nel corso della prima settimana di vita, la coagulazione del latte e la degradazione proteica siano assicurate dall'azione della sola chimosina che ha un pH ottimale più elevato rispetto alla pepsina. Successivamente, invece, con l'abbassarsi del pH abomasale, la pepsina verrebbe gradualmente ad affiancare la chimosina fino a sostituirla del tutto quando il vitello passa alla condizione di ruminante. È importante sottolineare la differente specificità che caratterizza i due enzimi: la chimosina risulta attiva soprattutto nei confronti della caseina, mentre la pepsina è in grado di attaccare efficacemente anche altri tipi di proteine. La successione temporale con cui si manifesta l'attività dei due enzimi giustifica la pratica di

Dott. Maria Luisa Varricchio

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

somministrare durante i primi 7 – 10 giorni dalla nascita solo latte naturale o latte ricostituito nel quale la fonte proteica sia rappresentata in prevalenza da caseina. Infatti, la presenza massiccia di proteine di origine diversa, capaci di sfuggire all'azione della chimosina, determinerebbe la mancata coagulazione del latte e il suo rapido passaggio nell'intestino con possibile sviluppo di diarree. A partire dalla seconda settimana di vita, con il graduale aumento dell'attività della pepsina nell'abomaso e degli enzimi proteolitici di origine pancreatica nell'intestino, è possibile adottare latti sostituiti più economici contenenti quote più o meno rilevanti di proteine diverse dalla caseina (siero, pesce, soia, ecc.). A questo proposito è tuttavia importante tenere presente che mentre la caseina risulta caratterizzata da una digeribilità molto elevata (oltre il 90%), le proteine sostitutive, e in particolare quelle di origine vegetale, mostrano generalmente valori di digeribilità molto più contenuti (Succi e Hoffmann, 1997).

Gli aminoacidi provenienti dalla digestione delle proteine sono assorbiti e trasportati dalla vena porta al fegato e poi ai distretti di utilizzazione. In generale, la quantità di azoto trattenuta aumenta con l'aumentare dell'azoto alimentare apportato ma questo dipende dal rapporto tra le quantità di azoto e di energia ingerite. Se questo rapporto è troppo elevato, cioè se il vitello non dispone di energia sufficiente per soddisfare i propri fabbisogni, una parte degli aminoacidi sarà utilizzata per fornire energia. Ne consegue una diminuzione dei coefficienti di ritenzione dell'azoto. La quantità di proteine fissate dal vitello aumenta con l'età dell'animale e con la velocità di crescita, per poi stabilizzarsi in seguito (Succi, 1990).

1.3.1.2. DIGESTIONE DEI GLUCIDI

L'attività amilolitica del succo pancreatico è debole alla nascita, ma aumenta fino all'età di due mesi; è accresciuta se si somministra al vitello un alimento ricco di glucosio e

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

amido. L'amilasi pancreatica attacca più facilmente gli amidi dei cereali sottoposti a cottura (Succi, 1990).

Il lattosio è il principale costituente del latte o dei sostitutivi (35 – 40 % sul secco); si possono poi trovare amido (2 – 10 %), piccole quantità di saccarosio (1 – 2 %) e altri zuccheri più complessi (α -galattosidi) quando si utilizzano alimenti di origine vegetale (ad esempio soia) in sostituzione parziale delle proteine della polvere di latte scremato (Succi, 1990). Il lattosio è degradato nel duodeno ad opera di una lattasi specifica ed è caratterizzato, già nel vitello neonato, da una digeribilità assai elevata (circa il 99%) (Succi e Hoffmann, 1997). Per contro, gli amidi, i derivati amilacei (destrine, maltosio) e il saccarosio, prodotti normalmente presenti nei latti sostitutivi e nei mangimi evidenziano, almeno inizialmente, valori di digeribilità piuttosto bassi; infatti, fino ai due mesi di età, il corredo enzimatico glicolitico del vitello è relativamente scarso. Durante le prime otto settimane di vita è, quindi, consigliabile contenere l'impiego di prodotti amilacei entro valori prudenziali dell'8 – 12 % sul secco della razione; il mancato rispetto di questi limiti causa un accumulo di composti glucidici ingeriti nel tratto intestinale e favorisce l'insorgere di fermentazioni microbiche anomale, responsabili dello sviluppo di forme diarroiche più o meno gravi (Succi e Hoffmann, 1997). In seguito, il vitello pre - ruminante può utilizzare quantità più elevate di amido, fino al 30%. I processi tecnologici che determinano destrinizzazione o gelatizzazione dell'amido ne migliorano la digeribilità: da qui la diffusione dei fiocchi di cereali nelle miscele per svezzamento. I prodotti terminali liberati per idrolisi enzimatica sono zuccheri semplici come glucosio e galattosio che passano molto rapidamente nel circolo sanguigno. Alcuni idrati di carbonio sfuggiti all'azione enzimatica possono subire un attacco da parte della microflora dell'intestino crasso dando luogo ad AGV, acido lattico e gas. L'accumulo di tali prodotti nell'intestino, che sono assorbiti molto limitatamente, provoca la comparsa di diarree, sia a causa dell'irritazione della mucosa che comporta sempre un aumento della peristalsi e della velocità di transito e sia a causa di un aumento di escrezione di acqua. Tali forme

Dott. Maria Luisa Varricchio

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

diarroiche di tipo “nutrizionale” compaiono quando si esagera con la somministrazione di alimenti amilacei nelle prime fasi durante le quali la digeribilità degli amidi è bassa (Succi, 1990).

1.3.1.3. DIGESTIONE DEI LIPIDI

I grassi subiscono nell'abomaso un'idrolisi parziale grazie all'esterasi pregastrica salivare e probabilmente sotto l'azione di una lipasi presente nello stomaco. Ma è la lipasi pancreatica che svolge un ruolo più importante idrolizzando i trigliceridi in acidi grassi liberi, monogliceridi e digliceridi (Succi, 1990). L'esterasi pregastrica agisce efficacemente soprattutto nei confronti del butirrato di cui è ricco il grasso del latte; questa specificità giustifica la migliore digeribilità del grasso del latte rispetto ai grassi di origine diversa che solitamente sono introdotti nel latte sostitutivo (oli vegetali, sego, strutto). La secrezione dell'esterasi salivare è stimolata dall'assunzione del latte e la sua presenza nella saliva è tanto più abbondante quanto più l'ingestione risulta lenta. L'attività lipolitica dell'esterasi pregastrica è favorita da una buona coagulazione del latte e da una prolungata ritenzione dei coaguli nell'abomaso; tutti i fattori che tendono ad accelerare il passaggio del latte nell'intestino (ad esempio la presenza massiccia di proteine che non coagulano) influiscono negativamente sulla digeribilità dei grassi (Succi e Hoffmann, 1997). La presenza della bile è indispensabile per assicurare una digestione normale. L'utilizzazione digestiva dipende dalla natura del grasso. Più un acido grasso è a catena lunga e satura meno è digeribile. La digeribilità dei lipidi del latte, ricchi in acidi grassi a catena corta è superiore a quella del sego che è molto ricco in acido palmitico e stearico, acidi grassi a lunga catena. Essa dipende anche dalla modalità seguita per l'incorporazione del grasso nell'alimento finito. La via umida è la migliore: consiste nell'incorporazione del grasso nel latte scremato liquido e omogeneizzazione sotto pressione. La via secca (miscelazione

Dott. Maria Luisa Varricchio

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

energica del grasso fuso alla polvere di latte) che fino a qualche anno fa deprimeva la digeribilità, con la tecnologia attuale che prevede l'aggiunta di emulsionanti, sembra dare risultati altrettanto soddisfacenti. L'assorbimento dei lipidi avviene principalmente nel duodeno e nel digiuno. Come nei monogastrici, gli acidi grassi alimentari del vitello non subiscono modificazioni nel corso della digestione e dell'assorbimento. Essi passano preferenzialmente nella linfa la cui composizione lipidica è molto simile a quella dell'alimento. Gli acidi grassi con meno di 14 atomi di carbonio passano in gran parte nella vena porta. La composizione degli acidi grassi dei lipidi corporei è, dunque, fortemente influenzata da quella dei grassi alimentari (Succi, 1990).

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

1.4. ASPETTI SANITARI DELL'ALLEVAMENTO DEL VITELLO

Da numerosi studi condotti in differenti parti del mondo, è emerso che la mortalità dei vitelli è molto elevata, variando tra l'8.7 e il 64% circa a seconda delle condizioni igienico – sanitarie di allevamento, sia nei bovini sia nei bufali ed è la maggiore causa di perdita economica per l'allevatore. È approssimativamente stimato, infatti, che una mortalità dei vitelli del 20% può ridurre il profitto netto dell'allevatore del 38% (Blood e Radostis, 1989).

Circa l'84% dei decessi avviene nel primo mese di vita (Jenny *et al.*, 1981), di cui il 75% tra 0 e 7 giorni di vita e la restante parte nella terza settimana di vita (Umoh, 1982).

Le malattie dei vitelli possono essere suddivise, a seconda del periodo in cui si manifestano, in:

- MALATTIE FETALI: sono le malattie che colpiscono il feto durante la vita intrauterina, ad esempio gestazione prolungata, difetti congeniti, aborti e morte del feto con riassorbimento o mummificazione dello stesso;

- MALATTIE DELLA GESTANTE: sono le malattie associate con la distocia che causano anossia cerebrale e lesioni al tessuto scheletrico;

- MALATTIA PERINATALI: colpiscono entro le 48 ore dopo la nascita, come malnutrizione causata da inadeguate cure materne, ipotermia dovuta ad esposizioni al freddo o anche allo scarso istinto materno, insufficiente vitalità successiva a malnutrizione e malattie particolari quali infezioni all'ombelico o colibacilliosi;

- MALATTIE NEONATALI: colpiscono nel periodo compreso tra 2 e 7 giorni dalla nascita, causate per lo più da scarso istinto materno, inedia e aumento della suscettività alle infezioni dovute a bassi livelli di ingestione di gammaglobuline;

- MALATTIE POSTNATALI; insorgono nel periodo da 1 a 4 settimane dalla nascita e sono rappresentate, ad esempio, dalla malattia del muscolo bianco e da enterotossinemie.

Dott. Maria Luisa Varricchio

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

I fattori che influiscono sullo stato di salute del vitello lattante sono legati essenzialmente all'ambiente (sistema di allevamento, microbismo, clima e affollamento), all'alimentazione (cambiamenti bruschi, igiene delle attrezzature) e alle cure dell'allevatore, che concorrono nel determinare l'insorgenza di importanti patologie quali: turbe digestive (Simensen e Norheim, 1983; Perez *et al.*, 1990; Olsson *et al.*, 1993), immunodeficienza (White e Andrews, 1986), malattie respiratorie (Svensson *et al.*, 2000a), affezioni cutanee (rogne e micosi) (Gola, 1992), difficoltà al parto (Szenci e Kiss, 1982), sesso, peso alla nascita, scelte imprenditoriali poco idonee (Fedida *et al.*, 1985).

Nei primi dieci giorni di vita le malattie gastroenteriche rappresentano oltre l'80% delle cause di mortalità; dal 10° al 30° giorno prendono il sopravvento le malattie respiratorie e, in seguito, l'importanza dei due gruppi di patologie si equilibra (Parigi Bini e Someda De Marco, 1989).

La diarrea è, dunque, il risultato dell'interazione tra un certo numero di relativi fattori di rischio tra i quali, in particolare, le difese inadeguate dell'ospite e l'eccessiva esposizione ambientale ai patogeni (De Rycke *et al.*, 1986; Waltner-Toews *et al.*, 1986) liberati nell'ambiente da animali che potrebbero essere portatori sani e non mostrare evidenti segni clinici della presenza di malattie (Crouch e Acres, 1984; McLaren e Wray, 1991; Lucchelli *et al.*, 1992; Collins *et al.*, 1993). Le strategie di controllo delle malattie infettive per la mortalità neonatale dovrebbero dare molta importanza alla formazione di gruppi di vitelli poco numerosi e separati dagli animali adulti, a massimizzare l'igiene e limitare il contatto con i soggetti potenzialmente malati che fungono da serbatoi di infezione (Larson *et al.*, ???). I numerosi studi condotti anche in altri paesi, come: Argentina (Barrandeguy *et al.*, 1988), Italia (Castrucci *et al.*, 1988), Iraq (Hasso *et al.*, 1983), India (Kaushik *et al.*, 1893), Finlandia (Neuvonen *et al.*, 1982), Giappone (Sato *et al.*, 1981), USA (Schlarfer e Scott, 1979), Germania (Schulz, 1983), Francia (Schwers *et al.*, 1983), Egitto (Shalaby *et al.*, 1981), Bulgaria (Simeonov *et al.*, 1982) e Gran Bretagna (Woode, 1978) dimostrano che il problema della diarrea dei vitelli interessa ogni parte del mondo.

Dott. Maria Luisa Varricchio

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

1.4.1. CAUSE INFETTIVE

Le turbe digestive possono essere di natura infettiva (virale e batterica), parassitaria e metabolica, che provocano diarree, anche mortali. Gli agenti infettivi maggiormente coinvolti sono: *Rotavirus*, che attacca e si replica nelle cellule epiteliali del piccolo intestino dei vitelli giovani e si ritrova generalmente nelle feci dei vitelli diarroici fino alla terza settimana di vita (Mebus *et al.*, 1975; Stair *et al.*, 1973); *Coronavirus*, che ha un'incidenza leggermente più bassa di quella del *Rotavirus* (Khan e Khan, 1991) e si replica anch'esso nelle cellule epiteliali causandone lo sfaldamento e perdita delle cellule superficiali, formazione di cisti e accumulo dei resti dei tessuti cellulari (Mebus *et al.*, 1975); *Escherchia coli*, che aderisce alla mucosa e si moltiplica nell'intestino, producendo una potente enterotossina che stimola un'eccessiva secrezione di fluido dalla mucosa intestinale (Moon, 1974) e causa di severa diarrea principalmente durante le prime due settimane di vita dei vitelli che, solitamente, ospitano il microrganismo nel tratto gastrointestinale senza manifestare alcuna sintomatologia, trasformandosi in serbatoi di trasmissione dell'infezione che si manifesta (Barrandeguy *et al.*, 1988); varie specie di *Salmonella* che producono gastroenteriti con nausea, vomito, crampi (Jones e Hunt, 1983) e diarrea dall'1 al 12% degli animali colpiti e morbidità maggiore del 20%, nei vitelli neonati (28 giorni di età) in generale, mentre negli allevamenti bufalini la salmonellosi è una forma batterica non molto frequente che s'insedia dopo la prima settimana di vita dei vitelli (dal 10° al 60° giorno); *Cryptosporidium* che causa un disequilibrio tra l'assorbimento intestinale e la secrezione di acqua, generalmente associata o ad un danneggiamento dell'epitelio che comporta la diminuzione della superficie assorbente dell'intestino o a perdita di elettroliti dalla sierosa verso il lume intestinale ma in questo caso l'epitelio è generalmente integro (Morin *et al.*, 1976; Tzipori, 1981; Reynolds *et al.*, 1986; Snodgrass *et al.*, 1986) ed è

Dott. Maria Luisa Varricchio

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

particolarmente segnalata nell'allevamento ovicaprino e bufalino; in questa ultima specie i soggetti eliminatori di oocisti sono risultati variare da un 7% fino al 20% e l'infezione è stata riscontrata in tutti i paesi dove questa specie animale è allevata (Canestri-Trotti e Quesada, 1983; Canestri-Trotti *et al.*, 1984; Rodriguez-Diego *et al.*, 1991; Dubey *et al.*, 1992). Tra gli agenti infettivi citati, *E. Coli* gioca il suo ruolo fino alla seconda settimana di vita, mentre il *Rotavirus* fino alla terza settimana (Snodgrass *et al.*, 1986) e sono i principali responsabili di elevata mortalità e morbilità nei giovani vitelli. Un certo coinvolgimento come potenziale causa di enteriti nei vitelli, è stato riconosciuto anche al *Campylobacter* (Al-Mashat e Tylor, 1980) sebbene alcuni studiosi lo considerano parte della normale flora enterica dei ruminanti (Snodgrass *et al.*, 1986).

Le turbe gastrointestinali non infettive sono, invece, da ricondurre essenzialmente ad errata preparazione del latte ricostituito (temperatura non ottimale, irregolarità dei pasti), ingestioni di quantità eccessive di alimento o a scarsa igiene delle attrezzature che causano diarrea per liberazione di metaboliti tossici o irritanti da parte della flora batterica che attacca il materiale indigerito a livello intestinale (Gola, 1992).

1.4.2. CAUSE NON INFETTIVE

La diarrea è, dunque, una sindrome dall'eziologia molto complessa che coinvolge, oltre a fattori di tipo infettivo, anche fattori ambientali, nutrizionali, fisiologici e gestionali (Khan e Khan, 1991). Ad esempio, la carenza di proteine in gravidanza avanzata può essere un fattore che contribuisce alla manifestazione di parti distoici o prematuri e, quindi, ad aumentare il tasso di mortalità neonatale (Waldhalm *et al.*, 1979; Kvasnicka, ?). Inoltre, la moderna tecnica di allevamento del vitello, che prevede il suo allontanamento precoce dalla madre per l'utilizzazione commerciale del latte, è estremamente nociva per la salute del neonato, che dovrebbe essere allevato nel modo più naturale e rimanere a contatto con la madre il più possibile. Infatti, il solo colostro non è sufficiente ad apportare al vitello il corredo di difesa necessario alla sopravvivenza, in quanto, attraverso il contatto

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

con la madre, si stabilisce uno scambio biotico per cui egli assume oltre alla saliva, residui di fieno, paglia, microrganismi ed enzimi importanti per il successivo sviluppo del rumine e per una buona vitalità. Da tutto ciò, quindi, appare chiaro il motivo per cui con l'introduzione della mungitura meccanica si è avuto un incremento della mortalità neonatale (Rania e Correale, 1982). Il vitello, come già evidenziato in precedenza, nasce senza alcuna protezione immunitaria avendo i ruminanti una placenta sindesmocoriale impermeabile agli anticorpi materni (Stott *et al.*, 1979; Osburn *et al.*, 1984). L'immunità parentale, quindi, è trasmessa solo dopo la nascita attraverso il colostro.

1.4.3. IL COLOSTRO

Subito dopo la nascita, il vitello ha bisogno di alimenti molto nutrienti, poco ingombranti e ricchi di anticorpi. Il colostro, che rappresenta la secrezione mammaria prodotta nei primi giorni (4 - 5) dopo il parto, presenta tutte queste caratteristiche (Balasini, 1998). È un alimento dal valore nutritivo estremamente elevato; rispetto al latte è più digeribile, più energetico, ricco di vitamine (per alcune da 5 a 10 volte più del latte), contiene maggiori quantità di sali minerali e di oligominerali. In esso sono, inoltre, presenti elevate quantità di enzimi, ormoni, fattori di crescita immunoglobuline (Ballarini, 1989). L'assunzione del colostro è, dunque estremamente importante per le funzioni che esso svolge:

- *funzione nutritiva ed energetica*, per l'elevato contenuto in sostanze nutritive necessarie a coprire i fabbisogni del vitello neonato;
- *funzione immunitaria*, per l'elevato contenuto in gammaglobuline; il vitello, infatti, nasce senza alcuna protezione immunitaria avendo i ruminanti una placenta sindesmocoriale impermeabile agli anticorpi materni (Stott *et al.*, 1979; Osburn *et al.*, 1984).
- *funzione lassativa*, che consente al vitello di liberarsi del "meconio", costituito

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

dai residui di sfaldamento epiteliale e dalle secrezioni accumulate nell'intestino durante la vita fetale. Per la corretta funzionalità dell'apparato digerente tale sostanza va eliminata (Frandsen, 1987);

- *funzione antianemica*, per il maggior contenuto in ferro rispetto al latte;
- *funzione vitaminica*, dovuta all'apporto di vitamine, ben superiore a quello del latte (Parigi Bini e Someda De Marco, 1986), soprattutto della vitamina A, la cui carenza è alla base di una maggiore recettività alle infezioni (Mornet e Espinasse, 1979).

Il vitello assume alla nascita e, quotidianamente per i primi 3 – 4 giorni di vita, in ragione dell' 8 – 10 % del proprio peso corporeo, il colostro che ha importanti effetti sullo sviluppo e sulle funzioni gastrointestinali, sullo stato nutrizionale, sul metabolismo e sul sistema endocrino dovuti all'ingestione di sostanze nutritive e non che contribuiscono alla sopravvivenza nel periodo di forte stress postnatale (Blum, 2006), ma soprattutto apporta elevate quantità di immunoglobuline, quali IgG₁, IgM, IgA e IgG₂, di cui l'IgG₁ è predominante rappresentando l'80% del totale delle immunoglobuline assorbite dal vitello neonato (Blom, 1982). Esse, importantissime per la formazione dell'attività anticorpale e dell'immunoprotezione e, per questo, essenziali per la sopravvivenza, entrano in circolazione dal piccolo intestino del vitello neonato mediante un processo di micropinocitosi (Blood e Radostits, 1989) da parte delle cellule epiteliali della mucosa (Parigi Bini e Someda De Marco, 1986). Il picco massimo di assorbimento si ha nelle prime 6 – 8 ore dopo la nascita (Blom, 1982), benché esista un'elevata variabilità individuale (Church, 1991). Nel primo giorno dopo il parto, la quantità di immunoglobuline è pari a 55 – 68 g/l, con un picco di 80 g/l nella prima ora, mentre a 48 ore dal parto, la concentrazione si riduce a circa il 10% di quella iniziale (Alais, 1984). I vitelli, quindi, riescono ad assorbire gli anticorpi colostrali solo per un breve periodo subito dopo la nascita (Matte *et al.*, 1982); già 12 ore dopo la nascita la capacità di assorbimento diminuisce drasticamente, cessando infine tra uno e due giorni di età (Stott *et al.*, 1979; Osburn *et al.*, 1984). È, dunque, di estrema importanza l'ingestione tempestiva e precoce del colostro sulla salute del vitello

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

(Tyler *et al.*, 1998). Infatti, la causa più comune del mancato trasferimento dell'immunità passiva dalla madre al redo sembra essere il ritardo nella suzione del colostro (Kuse, 1970; Selman *et al.*, 1970; Muggli *et al.*, 1985; Perino *et al.*, 1995). Tuttavia, è noto che il mancato trasferimento dell'immunità passiva è abbastanza frequente; si stima, infatti, che dal 10 al 40% dei vitelli possono non ricevere adeguate quantità di anticorpi dalle madri (Logan e Gibson, 1975; McGuire *et al.*, 1976), si ammalano molto più probabilmente durante i primi 28 giorni di vita (20.4 *vs* 7.5%) a causa di diarrea e malattie respiratorie associate a diminuzione del peso allo svezzamento o, addirittura muoiono prima dello svezzamento (8.3 *vs* 1.6%), rispetto a quelli che hanno invece ingerito sufficiente colostro (Wittum e Perino, 1995)

Studi basati sull'osservazione suggeriscono che una concentrazione sierica di IgG < di 1000 mg/dl è associata con aumento della mortalità e della morbilità e diminuzione delle *performance* (Stott *et al.*, 1979).

Sono state proposte una serie di procedure per stimare lo status del trasferimento passivo dell'immunità nei vitelli. Ad esempio, concentrazioni di sieroproteine maggiori o uguali a 5.2 g/dl sono indicative di un adeguato trasferimento passivo di immunoglobuline colostrali in vitelli manifestamente sani (Tyler *et al.*, 1996; Calloway *et al.*, 2002) e una concentrazione di sieroproteine maggiori di 5.5 g/dl sono indicative di un adeguato trasferimento passivo nei vitelli malati (Tyler *et al.*, 1999).

Durante il periodo di assorbimento, si verifica una certa competizione tra i microrganismi e le immunoglobuline per i recettori intestinali adibiti al trasporto in circolo. I batteri intestinali possono causare la sindrome da malassorbimento poiché occupano i recettori per le immunoglobuline, provocando in tal modo ipo o agammaglobulinemia nei vitelli neonati (Snodgrass *et al.*, 1986).

Una razionale modalità di somministrazione del colostro è indispensabile al fine di ottenere una buona trasmissione dell'immunità. Ricerche riportate da Levieux (1983) indicano che nei vitelli allevati alla mammella l'ingestione del colostro è del 41% superiore

Dott. Maria Luisa Varricchio

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

rispetto a quella al secchio con succhiotto. Il vitello dovrebbe ricevere almeno 1.5 - 2.0 litri di colostro nelle prime 5 - 6 ore di vita (Ballarini, 1989).

Se, per un qualsiasi motivo, la quantità di colostro prodotto dalla madre è insufficiente, allora, per problemi di biosicurezza, sarebbe opportuno non fare ricorso a colostro proveniente da altre aziende. La prevalenza di alcune malattie croniche, come ad esempio il virus della leucemia e il *Mycobacterium avium paratuberculosis*, sono rapidamente trasmessi ai vitelli neonati attraverso l'ingestione del colostro (Piper *et al.*, 1979; Streeter *et al.*, 1995). In più, patogeni molto comuni che causano diarrea, o sono dispersi nel colostro o possono essere trasmessi come risultato di una contaminazione fecale. Per questi motivi dovrebbe essere evitato l'uso di colostro proveniente da altre aziende, ma in alternativa si potrebbe far ricorso a prodotti commerciali dalle caratteristiche simili al colostro e fonti di immunoglobuline prontamente assorbibili (Garry *et al.*, 1996; Holloway *et al.*, 2002).

Paragonando la somministrazione artificiale del colostro con la suzione diretta, si è visto che quest'ultima è la maggiore fonte di assorbimento delle immunoglobuline colostrali, quindi generalmente si raccomanda di permettere al vitello di succhiare direttamente dalla madre per i primi due giorni dopo il parto (Blom, 1982).

Nel caso specifico dei vitelli bufalini, tra le cause alimentari dirette di mortalità neonatale, è da considerare anche l'utilizzo di latte in polvere per bovini, pur essendo disponibili, ormai da qualche anno, formulati specifici per vitelli bufalini. A questo proposito, Zicarelli *et al.* (1981) hanno evidenziato una maggiore sensibilità della specie bufalina all'intossicazione da rame.

Le caratteristiche chimico - fisiche del latte di vacca sono leggermente diverse rispetto a quelle del latte di bufala; in particolare, la caseina vaccina è costituita da micelle più piccole, che danno origine ad un coagulo irregolare nell'abomaso del bufalo, con conseguente scarsa assimilazione delle proteine. Nei primi giorni di vita, inoltre, l'eccesso di carboidrati nel latte ricostituito (amidi crudi e maltosio) non sono digeriti e possono essere causa di diarrea fermentativa. I grassi, invece, sono digeriti grazie alla lipasi

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

prodotta dalle ghiandole palatine e dalla ghiandola pancreatica; essi sono necessari al vitello per la termoregolazione dopo la nascita. Per quanto riguarda la frazione proteica, le proteine diverse da quelle naturali del latte (proteine "extralatte"), specialmente quelle di origine vegetale, non sono digerite, con la conseguente messa in circolo di sostanze tossiche responsabili di fenomeni di tipo allergico (Rania e Correale, 1982).

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

2. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Aguggini G. Beghelli V., Giulio L.F. 1992. Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia. UTET, Torino. 848 pp.
- Alais C., 1984. Scienza del latte. Tecniche nuove, Milano, 717 pp.
- Balasini, 1998. Zootecnica speciale. Edagricole, Bologna, 652 pp.
- Barrandeguy ME, Coranaglia EM, Gottaschalk MM, Fijtman N, Pasini MI, Yafal AG, Parrand JR, Schudel AA : Rotavirus, enterotoxigenic Escherichia coli and other agents in the faeces of dairy calves with and without diarrhea. Rev Lat America Microbiol, 30:239-245, 1988.
- Bettini T.M., 1987. Elementi di Scienza delle produzioni animali. Edagricole, Bologna, 1008 pp.
- Blom JY 1982. The relationship between serum immunoglobulin values and incidence of respiratory diseases and enteritis in calves. Nord Vet-Med, 34:276-284.
- Blood D.C., Radostis O.M., 1989. Veterinary Medicine, 7th Ed, ELBS, Oxford.
- Blum J.W. 2006. Nutritional physiology of neonatal calves. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 90 (1-2), 1–11. doi:10.1111/j.1439-0396.2005.00614.x
- Bonsempiante M. e Susmel P. 1978. Gli allevamenti intensivi nella produzione della carne bovina. In: aspetti tecnici della carne nelle regioni meridionali. Quaderni Regionali-Formez, Vol. 1: 403 pp.
- Braun RK, Tennant BC : The relationship of serum globulin levels of assembled neonatal calves to mortality caused by enteric diseases. Agri-Practice, 4:14-15, 1983
- Calloway, CD, JW Tyler, RK Tessman, et al. Comparison of refractometers and test endpoints in the assessment of passive transfer status in calves. J Am Vet Med Assoc, 2002;221:1605-1608.

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- Canestri-Trotti G e Quesada A. 1983. Primo reperto di *Cryptosporidium* sp. in bufali italiani (*Bubalus bubalis*). Atti Soc. It. Sci. Vet. 38: 737.
- Canestri-Trotti G., Quesada A., Visconti S. 1984 Ricerche sulla fauna protozoaria intestinale del bufalo (*Bubalus bubalis*). Atti Soc. It. Buiatria. 16: 443.
- Cappa V. 1982. Un adeguato svezzamento a garanzia di elevate prestazioni. L'Informatore Agrario, 37: 22531-22537.
- Castrucci G, Frigeri FM, Ferrari M, Cilli V, Gualandi GL, Aldrovandi V : Neonatal calf diarrhea induced by rotavirus. Comp Immun Microbiol Infect Dis, 11:71-84, 1988.
- Church D.C. 1991. Livestock feeds and feeding. Prentice hall, Englewood Cliffs, 546 pp.
- Collins JK, Riegel CA, Olson JD, et al. Shedding of enteric coronavirus in adult cattle. Am J Vet Res 1987;48:361-365.
- Crouch CF, Acres SD. Prevalence of rotavirus and coronavirus antigens in the feces of normal cows. Can J Comp Med 1984;48:340-342.
- DeRycke J, Bernard S, Laporte J, et al. Prevalence of various enteropathogens in the feces of diarrheic and healthy calves. Annales de Recherches Veterinaires 17:159-168, 1986.
- Di Francia A., F. Masucci, De Rosa G., Varricchio M.L., Proto V. 2007a. Effects of *Aspergillus oryzae* extract and a *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on intake, body weight gain and digestibility in buffalo calves, Anim. Feed Sci. Technol. doi:10.1016/j.anifeedsci.2007.02.010.
- Di Francia A., F. Masucci, Varricchio M.L., Bilancione A., Proto V. 2007b. Effect of *Enterococcus faecium* SF68 on growth performance and in vivo digestibility in buffalo calves.
- Drackley, J.K. 2001. Milk feeding strategies for calves: Does "accelerated growth" make sense? Pages 27-36 in Proc. 5th Annu. Professional Dairy Heifer Growers Assoc. National Conf., Seattle, WA. PDHGA, Savoy, IL.
- Dubey J.P., Fayer R., Rao J.R. 1992. Cryptosporidial oocysts in faeces of water buffalo and zebu cattle in India. J. Vet. Parasitol. 6: 55.

Dott. Maria Luisa Varricchio

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- Frandsen R.D., 1987. Anatomia, fisiologia e morfologia degli animali domestici. Edi-ermes, Milano, 645 pp.
- Fuller R. 1992. History and development of probiotics. In: Probiotics: The Scientific Basis, pp. 1-8. Chapman & Hall, New York, NY.
- Garella E. 1993. Cosa succede al vitello se il latte non coagula. *Informatore zootecnico*. 40: (1). 36-3.
- Garry FB, Adams R, Cattell MB, et al.. Comparison of passive immunoglobulin transfer in dairy calves fed colostrum or commercially available colostrum-supplement products. *J Am Vet Med Assoc* 1996;208:107-110.
- Genchi C., Hermon J., Sangalli G., Traldi G. 1984. La criptosporidiosi del vitello, fattore determinante nella diarrea neonatale. *Praxis Vet*. 3:5.
- Genchi C. e Leoni A. 1985. La criptosporidiosi, patologia emergente nell'allevamento intensivo del bovino. *Obiettivi e Documenti Vet*, 6, 17-23,
- Genchi C. 1988. Criptosporidiosi: aspetti veterinari, in "Le Antropozoonosi", atti del convegno svolto a Croara il 17 Giugno 1988. 26 pp.
- Gennari E. e Davoli R., 1988. Allevamento della vitella da rimonta: lo svezzamento. Bianco e Nero, 27 (1): 31-32.
- Gnudi G. 1989. Malattie digestive non infettive del vitello. *Obiettivi veterinari*. 10 (4): 21-25.
- Gobetto A, Pellegrini S. 1979. Anatomia e fisiologia degli animali zootecnici. UTET. 668 pp.
- Gola G. 1992. Patologia del vitello lattante. *Informatore Zootecnico*. 34 (22): 57-61.
- Hasso SA, Pandey R, Thapliyal DC, Al-Samarrae SAG. Rotavirus infection of young calves in Iraq. *Acta Virologica*, 27:93, 1983.
- Hepola, H. 2003. Milk feeding systems for dairy calves in groups: effects on feed intake, growth and health. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 80: 233 – 243.
- Holloway NM, JW Tyler, J Lakritz, et al. Serum IgG concentrations in calves fed fresh colostrum or a colostrum supplement. *J Vet Intern Med* 2002; 16:187-191.

Dott. Maria Luisa Varricchio

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- Jenkins K.J, Hidioglou M. 1990. Effects of elevated iodine in milk replacers on calf performance. J. Dairy Sci. 73: 804-807.
- Jenny B.F., Cramling G.E., Glaze T.M., 1981. Management factors associated with calf mortality in South Carolina dairy herds. J. Dairy Sci. 64: 2284 – 2289.
- Jones TC, Hunt RD. Veterinary Pathology, 5th ed, Lea and Febiger, Philadelphia, PA 19106, USA, 1983.
- Kaushik AK, Srivastava RN, Prasad S : Prevalence of rotavirus antibody in Indian Buffaloes and cattle. Zentralblatt Vet Med B, 30:156-158, 1983. (Vet Bull, 53:4565, 1983
- Khan A, Khan MZ : Immunoglobulins in relation to neonatal calf mortality. Pakistan Vet, 11: 1991. (In press).
- Kuse V. Absorption of immunoglobulin from colostrum in newborn calves. Anim Prod 1970;12:627-638.
- Levieux D. 1983. Citato da Ballarini, 1989.
- Logan EF, Gibson T. Serum immunoglobulin levels in suckled beef herds. Vet Rec 1975;97:229-230.
- Lucchelli A, Lance SE, Bartlett PB, et al. Prevalence of bovine group A rotavirus shedding among dairy calves in Ohio. Am J Vet Res 1992;53:169-174.
- McGuire TC, Pfeiffer NE, Weikel JM, et al. Failure of colostral immunoglobulin transfer in calves dying from infectious disease. J Am Vet Med Assoc 1976;169:713-718.
- McLaren IM, Wray C. Epidemiology of Salmonella typhimurium infection in calves: Persistence of salmonellae on calf units. Vet Rec 1991;129:461-462.
- Mebus CA, Newmann LE, Stair E.L. 1975. Scanning electron, light and immunofluorescent microscopy of intestines of gnotobiotic calf infected with calf diarrheal coronavirus. Am J Vet Res, 36:1719-1726,
- Monari S. 1987. Latti acidi. Professione allevatore, 14 (10): 45-46.
- Monetti P.G. 2001. Allevamento dei bovini e dei suini. Giraldi, 391 pp.

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Moon WH : Pathogenesis of enteric diseases caused by Escherichia coli. Adv Vet Sci Comp Med, 18:179-211, 1974

Morin M., Lariviere S., Lallier R. 1976. Pathological and microbiological observations made on spontaneous cases of acute calf diarrhea. Can. J. Comp. Med. 40: 228.

Mornet e Espinasse, 1979

Muggli, N. E., W. D. Hohenboken, L. V. Cundiff, and K. W. Kelley. 1984. Inheritance of maternal immunoglobulin G1 concentration by the bovine neonate. J. Anim. Sci. 59:39.

Nagy et al., 1986;

Neuvonen E, Veijlainen P, Sarkkinen H, Ek-Kommonen C : Rotavirus as causal agent in neonatal calf diarrhea in Finland. Suoman Elainlaakarilehti, 88:18-28, 1982. (Vet Bull, 52:3877, 1982).

Ørskov K. 1978. Citato da Parigi Bini R. e Someda De Marco A. 1989.

Osburn BI, MacLachlan NJ, Terrell TG. Ontogeny of immune system. J Am Vet Med Assoc 1984;181:1049-1052.

Pancieria RJ, Thomassen RW, Garner FM : Cryptosporidium infection in calf. Vet Pathol, 8:479-484, 1971.

Parigi Bini R. e Someda De Marco A. 1989. Zootecnia speciale dei bovini. Produzione della carne. Patron editore, Bologna, 253 pp.

Perino L.J., Wittum T.E e Ross G.S. 1995. Effects of various risk factors and plasma protein and serum immunoglobulin concentrations of calves at postpartum hours 10 and 24. Am. J. Vet. Res. 56:1144.

Piper CE, Ferrer JF, Abt DA, et al. Postnatal and prenatal transmission of the bovine leukemia virus under natural conditions. J Natl Cancer Inst 1979;62:165-168.

Rania U. e Correale E. 1982. Morbi-mortalità neonatale dei vitelli bufalini. Obiettivi Veterinari, 3 (11): 19-22.

Reynolds DJ, Morgan JH, Chanter N, Jones PW, Bridger JC, Debney TG, Bunch KJ : Microbiology of calf diarrhoea in southern Britain. Vet Record, 119:34-39, 1986.

Dott. Maria Luisa Varricchio

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- Rodriguez-Diego J., Abreu J.R., Perez E., Roque E., Cartas O. 1991. Presencia de *Cryptosporidium* sp. En bufalos (*Bubalus bubalis*) en Cuba. Rev. Salud. Animal. 78.
- Roy J.H.B. 1980. Factors affecting susceptibility of calves to disease. J. Dairy Sci. 63: 650 - 664.
- Sato K, Inaba Y, Shinozaki T, Matumoto M : Neutralizing antibody rotavirus in various animal species. Vet Microbiol, 6:259-261, 1981.
- Schlarfer DH, Scott FW : Prevalence of neutralizing antibody to rotavirus in New York cattle. Cornell Vet, 69:262-271, 1979.
- Schulz W : Immunofluorescent detection of rotavirus and coronavirus in calves with diarrhoea in the Magdeburg region of German Democratic Republic. Monatshefte Vet-Med, 37:849-851, 1982 (Vet Bull 53:1779, 1983).
- Schwers A, Pastoret PP, Maenhoudt M, Dgenais L, Broecke CV, Goossens A, Werenne J : Experimental reproduction of rotavirus diarrhoea in colostrum deprived newborn calves. Annales Rech Vet, 14:265-270, 1983.
- Selman IE, McEwan AD, Fisher EW. Serum immune globulin concentrations in calves left with their dams for the first two days of life. J Comp Pathol 1970;80:419-427.
- Shalaby MA, Saber MS, El-Karamany MR : Rotavirus infections associated with diarrhoea in calves in Egypt. Vet Res Comm, 5:165-170, 1981.
- Sharpee RL, Mebus CA, Bass EP : Characterization of a calf diarrhoea coronavirus. Am J Vet Res, 37:1031-1041, 1976.
- Simeonov I, Peev Y, Iordanov V : Aetiology of enteritis in newborn calves in the Varchan region of Bulgaria. Vet Sbirka 79:19-23, 1981 (Vet Bull 52:3255, 1982).
- Snodgrass D.R., Terzolo H.R., Campbell D., Sherwood I., Menzies J.D., Synge B.A., 1986. Aetiology of diarrhea in young calves. Vet. Record. 119: 31 – 34.
- Stair SL, Mebus CA, Twiehaus MJ, Underdahl NR : Neonatal calf diarrhea: electron microscopy of intestines infected with a reovirus-like agent. Vet Pathol, 10:155-170, 1973.

Dott. Maria Luisa Varricchio

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- Stott GH, Marx DB, Menefee BE, et al. Colostral immunoglobulin transfer in calves I. Period of absorption. *J Dairy Sci* 62:1632-1638, 1979.
- Streeter RN, Hoffsis, GF, Bech-Neilsen S, et al. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. *Am J Vet Res* 1995;56:1322-1324.
- Succi G. Hoffmann I. 1997. *La vacca da latte*. Città Studi. Milano 886 pp.
- Succi G. 1990. *Zootecnica speciale*. Clesav. 469pp
- Svensson C., Emanuelson U., Pettersson K. 2000. Health status of dairy calves in individual pens or in group pens with or without automatic milk feeder. In: Tielen M.J.M., Voest M.T. (Eds.). *Proceedings of the 10th International Congress on Animal Hygiene*. Vol. I. Maastricht. The Netherlands, 2 – 6 July 2000. PP. 426 – 430.
- Tyler JW, BJ Steevens, DE Hostetler, et al. Colostral IgG concentrations in Holstein and Guernsey cows. *Am J Vet Res* 1999;60:1136-1139.
- Tyler JW, DD Hancock, SM Parish, et al. Evaluation of three assays for failure of passive transfer in calves. *J Vet Int Med* 1996;10:304-307.
- Tyler JW, SM Parish, TE Besser, et al. Detection of low serum immunoglobulin concentrations in clinically-ill calves. *J Vet Int Med* 1999;13:40-43.
- Tzipori S : The aetiology and diagnosis of calf diarrhoea. *Vet Record* 113:510-515, 1981.
- Umoh J. U., 1982. Relative survival of calves in a university herd in Zaire, Nigeria. *British Vet. J.* 138: 507 – 514.
- Waldhalm, D.G., Hall, R.R., DeLong, WIJ., et al. 1979. Restricted dietary protein in pregnant beef cows. 1. The effect on length of gestation and calfhood mortality. *Theriogenology*, 12:61-68.
- Waltner-Toews D, Martin SW, Meek AH. An epidemiological study of selected calf pathogens on Holstein dairy farms in southwestern Ontario. *Can J Vet Res* 1986;50:307-313.

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Warner R. G. 1991. Nutritional factors affecting the development of a functional ruminant. A historical perspective. Pages 1-12 in: Proc. Cornell Nutr. Conf., Cornell Univ., Ithaca, NY.

White DG, Andrews AH : Adequate concentration of circulating colostral proteins for market calves. Vet Record, 119:112-114, 1986.

Woode GN : Epizootiology of bovine rotavirus infection. Vet Record, 103:44-46, 1978.

Wray C, Thromlinson JR : Lesions and bacteriological findings in colibacillosis of calves. British Vet J, 130:189-199, 1974.

Zicarelli L., Macri A., Vittoria A., Padula P., Costantini S., Rania V., Giordano R. 1981. Intossicazione da rame in vitelli bufalini. Riv. Zoot. Vet., Vol. 9 (4): 246-251.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

3. PROBIOTICI

Il termine “probiotico” deriva dal greco e significa “per la vita”. Microrganismi probiotici, quali *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus*, sono stati usati da sempre nelle preparazioni a base di latte fermentato, il cui consumo ha una storia che va indietro di centinaia di anni, come dimostrato dai disegni nelle grotte precristiane raffiguranti il trasferimento del latte fermentato nel latte fresco allo scopo di mantenere vivi i fermenti. Questi primi produttori erano probabilmente consapevoli dell'effetto preservante che la fermentazione aveva sul latte (Fuller, 1992; Gorbach, 2002).

Il concetto di probiotico è nato alla fine del 19° secolo all'Istituto Pasteur di Parigi ad opera di Elie Metchnikoff (1907). Da allora, gli scienziati hanno tentato di spiegare e definire i probiotici e i loro effetti. Nel 1965, Lilly e Stillwell hanno descritto i probiotici come sostanze secrete da un microrganismo che stimolano la crescita di un altro microrganismo. Più tardi il termine probiotico è stato usato per descrivere estratti di tessuto che stimolano la crescita microbica (Sperti, 1971). Il primo ad usare il termine probiotico per indicare un supplemento microbico alimentare/nutrizionale è stato Parker (1974) che ha definito i probiotici come “organismi e sostanze che contribuiscono all'equilibrio microbico intestinale”. Nel 1989, Fuller ha dato una definizione dei probiotici più particolareggiata definendoli come “supplementi alimentari microbici vivi che, ingeriti in numero sufficiente, influenzano positivamente l'ospite animale attraverso il miglioramento del suo equilibrio microbico intestinale, al di là del mero effetto nutrizionale” mettendo in tal modo in risalto la natura vitale degli stessi (Fuller, 1989; Gorbach, 2002). Questa definizione, che indica i requisiti indispensabili che i microrganismi devono possedere, essere vivi e vitali, non pastorizzati e presenti generalmente in numero elevato, è ora stata riconosciuta come generalmente accettabile ed è largamente usata per spiegare i probiotici (Tannock, 1999; Gorbach, 2002).

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Dagli inizi del 1990, si è cercato di dare una definizione ancora più precisa dei probiotici e Havenaar *et al.* (1992) hanno suggerito che fossero definiti come “colture di un solo microrganismo o più microrganismi vivi che, se ingeriti dall’animale o dall’uomo, influenzano positivamente l’ospite migliorando le proprietà della microflora locale”. La definizione di Havenaar *et al.* (1992) è stata la prima che ha applicato il termine probiotici sia all’uomo sia all’animale e ha esteso le attività “probiotiche” oltre alla microflora intestinale a tutte le parti del corpo.

Alla fine del 1990, in considerazione delle applicazioni già note e degli effetti dimostrati dei probiotici, Salminen *et al.* (1999) hanno proposto una ulteriore definizione: “i probiotici sono preparazioni di cellule microbiche o componenti di cellule microbiche che hanno effetto benefico sulla salute e sul benessere dell’ospite. Questa definizione include sia le cellule microbiche (vive o spente) sia le parti di cellule come probiotici (Xi-Yang Wu, 2006). Recentemente, per Ouwehand *et al.* (2002) questi batteri sono stati definiti come “microrganismi vivi che, usati in numero sufficiente come supplemento alimentare, procurano effetti benefici all’ospite modificandone la microflora intestinale”. La definizione di probiotico è, dunque, soggetta a continui cambiamenti che cercano di definirne gli usi più appropriati e intuire nuove applicazioni che potrebbero portare benefici all’ospite (Gorbach, 2002).

Esistono molti criteri per valutare e selezionare un ceppo probiotico. Fuller (1992) ne propose uno in base al quale esso deve possedere le seguenti caratteristiche: essere in grado di sopravvivere in prodotti preparati su scala industriale; rimanere stabili e vitali per lunghi periodi e in condizioni ambientali differenti; essere capaci di aderire al tessuto dell’epitelio intestinale, abili a persistere nel tratto gastrointestinale, sopravvivere (non necessariamente crescere) nell’intestino; essere geneticamente stabili e resistenti all’acidità gastrica e alla tossicità della bile; avere comportamento non patogeno, riconosciuto generalmente come sicuro (GRAS: Generally Regarded As Safe) per l’ospite; produrre effetti benefici nell’ospite animale (figura 1).

Dott. Maria Luisa Varricchio

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE



Figura 1. *Principali effetti benefici esercitati dai probiotici.*

In conseguenza del diffondersi dell'uso dei probiotici in vari settori, il Ministero della Salute ha indicato come ufficialmente riconosciuti quelli riportati nella tabella 1, ma essa è continuamente aggiornata con l'introduzione di nuovi ceppi batterici costantemente scoperti e riconosciuti idonei a fronte di una precisa documentazione che ne attesti le proprietà e la sicurezza (Bordoni, 2006).

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Tabella 1. Principali ceppi microbi impiegati come probiotici (Young, 1998; modificato da Shah, 2000).

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Altri batteri lattici	Altre specie
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus</i> spp.
<i>L. brevis</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>E. coli</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Leuconostoc lactis</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. cellobiosus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	
<i>L. delbrueck</i> subsp. <i>Bulgaricus</i>	<i>B. latenti</i>	<i>Sporolactobacillus inulins</i>	
<i>L. fermentum</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus cremoris</i>	
<i>L. gallina rum</i>	<i>B. thermophilum</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>	
<i>L. gasseri</i>		<i>Streptococcus lactis</i>	
<i>L. GG</i>		<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>L. lactis</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

Il Ministero ha anche ampliato i criteri proposti da Fuller (1992) per la classificazione dei microrganismi come probiotici con definizioni più dettagliate:

- devono essere di provenienza intestinale, e più precisamente devono essere normali componenti della microflora dell'intestino umano in condizioni di salute;
- devono essere assolutamente sicuri per l'impiego nell'uomo senza causare effetti collaterali specialmente in pazienti debilitati o immunocompromessi;
- devono essere attivi e vitali alle condizioni ambientali che sono presenti a livello intestinale;
- devono essere resistenti ad un basso pH, al succo gastrico, alla bile ed al succo pancreatico;

Dott. Maria Luisa Varricchio

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

– devono essere in grado di persistere, almeno temporaneamente, nell'intestino umano.

Inoltre, sempre secondo il Ministero, i microrganismi probiotici possono avere attività nel:

– sintetizzare sostanze ad azione antimicrobica. La possibilità di sintetizzare sostanze ad attività antibatterica come batteriocine, sostanze con azione simile alle batteriocine, acido lattico e perossido di idrogeno, conferisce ad alcuni microrganismi una vera e propria attività antimicrobica diretta;

– stimolare la risposta del sistema immunitario intestinale (GALT: Gut Associated Lymphoid Tissue) per proteggere, in maniera indiretta, l'ospite dall'insediamento e/o dal raggiungimento di livelli numerici pericolosi da parte dei germi patogeni presenti nell'intestino. È stato dimostrato che alcuni batteri sono in grado di aumentare il titolo di IgA, l'attività macrofagica e il numero di cellule killer, cellule T, interferone ed interleuchine;

– migliorare e stabilizzare la funzione di barriera intestinale (es. costituzione di un biofilm protettivo, diminuzione della permeabilità intestinale, ecc.).

Occorre sottolineare, per la sicurezza dell'applicazione sull'uomo, che in presenza di opportune condizioni, teoricamente, anche un probiotico potrebbe causare infezioni. Tuttavia, fino ad oggi nessuna infezione clinica è stata sicuramente ricondotta all'utilizzo di probiotici, e quindi si può affermare che il rischio è estremamente basso, considerando anche che tutti i probiotici sono sensibili agli antibiotici (tabella 2) (Bordoni, 2006).

Tabella 2. Potenziali rischi di infezione da probiotici (Bordoni, 2006).

Organismo	Potenziale infezione
<i>Lactobacillus</i>	Principalmente non patogeno, qualche infezione opportunistica (solitamente in pazienti immunocompromessi)
<i>Lactococcus</i>	Principalmente non patogeno
<i>Leuconostoc</i>	Principalmente non patogeno, alcuni isolati casi di infezione

Dott. Maria Luisa Varricchio

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

<i>Streptococcus</i>	Principalmente non patogeni gli streptococchi orali (<i>Streptococcus thermophilus</i> incluso); alcuni possono causare infezioni opportunistiche
<i>Enterococcus</i>	Alcuni ceppi sono patogeni opportunistici con attività emolitica e resistenza agli antibiotici
<i>Bifidobacterium</i>	Principalmente non patogeno, alcuni casi isolati di infezione umana
<i>Saccharomyces</i>	Principalmente non patogeno, alcuni casi isolati di infezione umana

Il principio dell'impiego di batteri innocui per eliminare i patogeni è stato riconosciuto per molti anni. La convinzione degli effetti benefici dei probiotici è basata sulla consapevolezza che la microflora intestinale può proteggere l'uomo dalle infezioni e che i suoi disordini possono aumentare la suscettibilità alle infezioni (Rolfe, 2000).

Molti dei probiotici in commercio contengono Lattobacilli (LAB) e Bifidobatteri; questi ultimi presenti in quantità minore perché sono meno conservabili, ma hanno il vantaggio di superare meglio la barriera gastrica. Ambedue, sono comuni commensali dell'uomo e colonizzano intensamente tutte le parti non sterili del corpo umano, in modo particolare la bocca, il tratto gastro-intestinale e l'area vaginale. Sono considerati microrganismi saprofiti privi di ogni patogenicità dimostrata dal loro largo impiego nella preparazione, da tempi immemorabili, di alimenti fermentati come ad esempio yoghurt, formaggi, salami, crema, burro e vino; sono pertanto comunemente classificati nella categoria "GRAS" (Generally Regarded As Safe), ossia generalmente riconosciuti come sicuri (Fuller, 1992; Donohue e Salminen, 1996; Saxelin *et al.*, 1996; Bordoni, 2006). Gli effetti benefici dei lattobacilli e bifidobatteri sono dovuti ad alcune loro peculiarità, come la resistenza all'acidità gastrica, ai sali biliari e agli enzimi pancreatici, la capacità di aderire alla mucosa e di colonizzare prontamente il tratto intestinale. Essi sono considerati importanti componenti della flora intestinale e relativamente innocui (Rolfe, 2000).

Tuttavia, in virtù del crescente interesse del consumatore e la continua richiesta di nuovi e più specifici microrganismi con proprietà probiotiche, è necessario porre

Dott. Maria Luisa Varricchio

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

l'attenzione sull'aspetto della sicurezza nei confronti dei nuovi microrganismi inseriti nei prodotti alimentari per l'uomo e negli additivi alimentari nei prodotti per animali, per cui, i nuovi ceppi devono essere valutati e testati accuratamente per la sicurezza e l'efficacia dell'uso proposto.

Fino ad ora non esiste nessuna linea guida generale per attestare l'indiscutibile sicurezza dei probiotici. Teoricamente essi potrebbero, come microrganismi viventi, essere responsabili per quattro tipi di effetti collaterali negli individui suscettibili: (1) infezioni; (2) attività metaboliche dannose; (3) eccessiva stimolazione immunitaria; (4) trasferimento genico (Salminen *et al.*, 1998).

In accordo con Salminen *et al.* (1998), per valutare la sicurezza di un ceppo probiotico ci si potrebbe avvalere di tre criteri: studi sulle proprietà intrinseche del ceppo; studi sulla farmacocinetica del ceppo; studi che cercano le interazioni tra il ceppo e l'ospite.

La determinazione delle proprietà intrinseche dei potenziali probiotici è un punto cruciale per l'intero processo di valutazione della sicurezza del probiotico (Salminen *et al.* 1998).

Lo stato attuale delle prove suggerisce che gli effetti probiotici sono specifici del ceppo. L'identità del ceppo è, dunque, importante per collegare uno specifico effetto sulla salute come pure per consentire un accurato controllo degli studi epidemiologici (Fuller, 1992). Alcuni prodotti probiotici commerciali, includono specie di *Lactobacillus* e *Saccharomyces* (Canganella *et al.*, 1997), *Pediococcus* ed *Enterococcus* (Hamiton–Miller *et al.*, 1999) e *Bacillus* (Green *et al.*, 1999). La particolare attenzione sulla sicurezza dei prodotti che contengono i microrganismi prima citati, è suscitata dal fatto che alcune specie di *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Bacillus* sono patogeni opportunisti. Quindi, per accertarsi della sicurezza dei probiotici devono essere studiate geneticamente e fenotipicamente le proprietà intrinseche che includono: codifica del gene per i fattori di virulenza quali quelli richiesti per la tossina, invasione, adesione, protezione e antibiotico resistenza; abilità a

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

produrre fattori di virulenza e di antibiotico resistenza; trasferimento plasmidico; attività metaboliche nocive (ad esempio, produzione di D – lattato, deconiugazione dei sali di bile) (Donohue e Salminen, 1996; Salminen *et al.*, 1998).

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

3.1. MECCANISMO DI AZIONE DEI PROBIOTICI

Esiste una relativamente ampia documentazione bibliografica che supporta l'uso dei probiotici nella prevenzione o nel trattamento dei disordini intestinali. Tuttavia, solo di recente sono state stabilite le basi scientifiche dell'uso dei probiotici e si è iniziato a pubblicare gli studi sui segni clinici del loro impiego (Rolfe, 2000).

Esistono diversi meccanismi attraverso i quali i probiotici migliorano l'equilibrio della microflora, proteggendo l'ospite dai disordini intestinali, in più lo stesso probiotico può inibire differenti patogeni attraverso differenti meccanismi. Essi includono: la stimolazione della risposta immunitaria mediata dalle IgA; la competizione, cioè l'antagonismo tra microrganismi (bifidobatteri e LAB, e *Bacteroides*, clostridi, *E.coli*), con i patogeni per nutrienti disponibili in quantità limitate, l'inibizione dell'adesione e della colonizzazione dell'epitelio e della mucosa, l'inibizione competitiva di siti recettori di microrganismi patogeni, la produzione di sostanze antimicrobiche, la modificazione della composizione di mucine, l'idrolisi di recettori e tossine, la produzione di IL-10 e TGF-beta e la mancata produzione di citochine pro infiammatorie (Goldin *et al.*, 1992; Rolfe, 2000; Morita *et al.*, 2002; Caramia, 2004). L'insieme di tutti i processi attraverso i quali i batteri inibiscono la colonizzazione di altri ceppi è chiamata resistenza alla colonizzazione (Rolfe, 2000). Durante la conservazione tutti i microrganismi probiotici subiscono una diminuzione nel numero di cellule vive e questo in dipendenza di diversi fattori quali, in particolare: le caratteristiche generali di specie e di ceppo; la temperatura di conservazione; il valore di pH; il contenuto in ossigeno; la velocità di autolisi cellulare; la durata della conservazione.

I bifidobatteri hanno elevata sensibilità a questi fattori, pur con differenze da specie a specie e da ceppo a ceppo, mentre ad elevata tolleranza è la specie *Enterococcus faecium* ed in second'ordine, ad esempio, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* e *Streptococcus thermophilus*.

Dott. Maria Luisa Varricchio

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

È impossibile fornire un'indicazione esatta di quanti batteri sono necessari per ottenere la colonizzazione dell'intestino, perché sono molti i fattori che la influenzano: la specie impiegata, le sue caratteristiche probiotiche, lo stato di vitalità del ceppo al momento del suo utilizzo, il tipo di probiotica o prebiotica alimentare seguita, il regime alimentare del consumatore. Da un punto di vista generale si può ritenere, per ceppi di riconosciuta capacità colonizzante, che la quantità sufficiente per ottenere una temporanea colonizzazione sia non meno di 10^9 cellule vive per giorno per persona adulta (Bordoni, 2006).

La digestione dei nutrienti, l'assorbimento, la tolleranza nei confronti di antigeni alimentari, la protezione contro agenti infettivi e la convivenza con i germi commensali, rappresentano il risultato di interazioni sofisticate tra flora batterica, mucosa e sistema immune della mucosa intestinale (GALT, gut associated lymphoid tissue) (Morelli, 2003; Rosselli *et al.*, 2003). Si realizza così una particolare barriera mucosale, la famosa "pellicola microbica" o biofilm di Zobell e Andersen (Probert e Gibson, 2002), che condiziona l'assorbimento, e modula le risposte immunitarie nei confronti di antigeni ubiquitari quali batteri commensali ed alimenti (tolleranza) (Caramia G., 2004).

Numerosi studi sia *in vivo* sia *in vitro* hanno dimostrato che la normale flora intestinale è una barriera estremamente efficace contro i microrganismi patogenici e opportunistici che ostacolano la normale flora del tratto gastrointestinale, rendendo l'ospite animale suscettibile alle malattie (Fuller, 1991; Rolfe, 2000).

Poiché di solito sono richiesti microrganismi vitali e biologicamente attivi al sito obiettivo dell'ospite, è essenziale che i probiotici siano in grado di withstand la naturale barriera dell'ospite contro l'ingestione di batteri (Rolfe, 2000).

3.1.1. CAPACITÀ DI ADESIONE ALLA MUCOSA INTESTINALE

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

L'adesione dei microrganismi patogeni alla mucosa intestinale sembra essere fondamentale per l'inizio del processo infettivo. Una delle conseguenze dell'adesione dei batteri patogeni alla mucosa è la lesione di quest'ultima, che permette l'ingresso dei batteri, la loro proliferazione e la conseguente morte delle cellule epiteliali.

La microflora presente nell'intestino costituisce una barriera contro l'adesione dei batteri patogeni. Sono stati ipotizzati svariati meccanismi per spiegare quest'azione difensiva dei probiotici.

Alcuni autori (Larioa e Martin, 1990) hanno suggerito che la produzione di acidi organici, come l'acido lattico e l'acido acetico, da parte dei probiotici, in special modo da parte di alcuni ceppi di LAB, abbassa il pH intestinale ed inibisce la crescita dei patogeni. Inoltre, gli stessi autori hanno visto che i probiotici stimolano la peristalsi che, indirettamente, rimuove i patogeni accelerandone la velocità di transito nell'intestino (Larioa e Martin, 1990).

Un meccanismo accreditato da vari studi è quello della capacità dei probiotici di competere con i patogeni nell'adesione alla mucosa intestinale. Alcuni probiotici possono, infatti, inibire l'adesione dei patogeni ai loro siti di legame presenti sulla superficie della membrana intestinale per competizione di legame.

L'adesione dei LAB all'epitelio potrebbe avvenire mediante un componente proteico secreto dal batterio, che si lega al recettore della cellula intestinale. Inoltre, da studi vari è emerso che *L. acidophilus* inibisce efficientemente l'adesione di tre ceppi di *E. coli* che causano diarrea (ETEC, EPEC, DAEC) e *Salmonella typhimurium* (Coconnier *et al.*, 1992; Bernet *et al.*, 1993). Studi più recenti (Gopal *et al.*, 2001), hanno confermato che alcuni LAB, quali *L. rhamnosus* DR20, *L. acidophilus* HN017 e *B. lactis* DR10, sono in grado di aderire a linee di cellule intestinali *in vitro* e di diminuire la colonizzazione e l'ingresso dei patogeni all'interno della mucosa intestinale.

Ulteriori studi hanno suggerito l'ipotesi che i probiotici siano in grado di inibire l'adesione di patogeni all'epitelio intestinale mediante la propria capacità di aumentare la

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

produzione delle mucine intestinali MUC-2 e MUC-3 (Mack *et al.*, 1999), suggerendo che l'aumento delle mucine crea un ingombro sterico che impedisce ai batteri patogeni di trovare i siti di legame alle cellule epiteliali.

3.1.2. ADESIONE ED ESCLUSIONE COMPETITIVA

La normale attività intestinale è favorita dalla funzione biologica dei microrganismi probiotici che, aderendo agli enterociti, inibiscono l'adesione da parte dei ceppi enteropatogeni attraverso un meccanismo di esclusione competitiva. Danno così luogo alla produzione di batteriocine, citochine ed acidi grassi a corta catena, in particolare l'acido butirrico, che inibiscono la replicazione dei patogeni, promuovono la risposta immunitaria e l'azione antinfiammatoria ed immunostimolante a livello locale e generale anche se, a tutt'oggi, l'effetto diretto di tale modulazione sulla salute non è, per moltissimi aspetti, ancora chiaro. È noto che vari ceppi di LAB possono essere usati per prevenire o trattare la diarrea acuta causata da *E. coli*, *Salmonella* o *Shigella*. È stato ipotizzato che tale effetto sia dovuto alla produzione di batteriocine da parte di diversi ceppi di probiotici utilizzati (Alm, 1983; Barefoot e Klaenhammer, 1983).

La terapia con probiotici si basa pertanto sul concetto di creare una condizione in cui si stabilisca una normale e salutare microflora intestinale che potrebbe svolgere, a livello locale e generale, un'azione preventiva e terapeutica per varie condizioni clinico-patologiche (Guarino *et al.*, 2003; Miniello *et al.*, 2003; Morelli, 2003; Rosselli *et al.*, 2003).

L'adesione alla superficie dell'intestino è, dunque, considerata un'importante proprietà dei ceppi probiotici autoctoni, quali alcuni *Lactobacillus*, *Bifidobacteria* e *E. coli*, che sono in grado di colonizzare l'intestino e stimolare il sistema immunitario (Havenaar *et al.*, 1992).

L'adesione batterica alla mucosa intestinale è un processo *multistep*, influenzato sia dalla natura chimica e fisica delle superfici coinvolte che dalle condizioni chimico-fisiche

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

dell'ambiente circostante. Sono coinvolte sia interazioni elettrostatiche e forze di idrofobicità (generalmente deboli), sia interazioni specifiche tra i determinanti molecolari sulla superficie batterica e specifici recettori sulla mucosa intestinale (generalmente più forti). Sulla superficie batterica sono, invece, determinanti proteine quali adesine, polisaccaridi, acidi lipoteicoici o strutture specifiche quali pili, fimbrie o appendici esterne ricoperte di lectine (Simonetti, 2007).

La capacità dei batteri probiotici di colonizzare le superfici intestinali è estremamente utile per evitare che le specie patogene prendano il sopravvento. D'altra parte, quei ceppi probiotici non in grado di colonizzare tempestivamente l'intestino quali, ad esempio, alcuni ceppi di *Bacillus* o ceppi di origine non intestinale (ad esempio *Saccharomyces* e funghi) e alcuni LAB, sono capaci di proteggere l'organismo dall'attacco dei patogeni quali: *Salmonella* spp., *E. coli*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens* e *Yersinia enterocolitica*, attraverso il meccanismo dell'esclusione competitiva. (Xi-Yang Wu, 2006).

Il meccanismo di fondo dell'effetto dell'esclusione competitiva non è comunque ancora completamente chiaro ma potrebbero essere coinvolti vari fattori antimicrobici, quali pH, H₂S, batteriocine, acidi grassi, competizione per i nutrienti o per i recettori sulle pareti dell'intestino.

Schneitz e Mead (2000) hanno riassunto l'effetto dell'esclusione competitiva in quattro principali azioni generali: (1) la creazione di un ambiente fisiologicamente restrittivo, (2) la competizione per i siti dei recettori batterici, (3) la produzione di antibiotici e (4) l'esaurimento dei substrati essenziali.

Una volta colonizzato l'intestino, i probiotici, esplicano la loro azione positiva attraverso la modulazione di svariati meccanismi fisiologici, tra i quali ricordiamo (tabella 3):

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Tabella 3. Principali effetti positivi dei Probiotici (Bordoni, 2006).

Riduzione della possibilità di colonizzazione dell'intestino da parte di germi patogeni	Per competizione, amensalismo, effetto predatorio, parassitismo Una terapia con probiotici pare aumentare la resistenza alla colonizzazione da parte di patogeni quali Helicobacter pilori, Salmonella sp., Clostridium difficile e l'infezione da Rotavirus, grazie alla conservazione dell'integrità delle pareti intestinali.
Sintesi di Vitamine	Vitamine K, B2, B12, Acido Pantotenico, Acido Folico e Biotina. Non è però ancora stata determinata l'entità dell'assorbimento di queste Vitamine, per cui rimane necessario un apporto nutrizionale.
Sintesi di Acidi Grassi a catena corta (SCFA)	Acido Acetico, Propionico e Butirrico. Quest'ultimo, in particolare, non solo è utilizzato dagli enterociti a scopo energetico, ma sembra ridurre il rischio di trasformazioni in senso neoplastico.
Aumento della digeribilità del Lattosio nei soggetti intolleranti	Meccanismo non chiarito, forse stimolazione della lattasi residua da parte dei batteri.
Aumento della digeribilità dei Lipidi	Idrolisi dei Trigliceridi alimentari in Acidi Grassi e Glicerolo.
Aumento della digeribilità delle Proteine	Proteolisi delle Proteine alimentari.
Riduzione del riassorbimento degli Acidi biliari	Gli Acidi biliari primari vengono ridotti a secondari, con conseguente minore assorbimento e riciclo tramite il circolo enteroepatico. La riduzione del pool degli Acidi biliari disponibili ne determina una maggiore sintesi epatica a partire dal colesterolo, con sua conseguente eliminazione.
Eliminazione di sostanze potenzialmente tossiche e metalli pesanti	Diversi meccanismi.
Mantenimento dell'equilibrio ormonale	Eliminazione degli ormoni in eccesso (Gorbach, 2002)
Effetto protettivo sulla mucosa intestinale	Sia legandosi a particolari Glicoproteine della mucina, e quindi impedendo il legame alle stesse dei batteri patogeni, sia ispessendo la barriera costituita dalla mucosa.

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Stimolazione del sistema immunitario dell'intestino	Sia stimolando l'immunità di tipo umorale (aumento di produzione di IgA), sia quella cellulo-mediata (stimolazione dell'attività fagocitaria dei macrofagi, proliferazione dei linfociti T).
---	--

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

3.2. IMPIEGO DEI PROBIOTICI IN CAMPO UMANO

Dal moderno concetto di equilibrio dinamico tra microflora, nutrizione e ospite nasce la possibilità di utilizzare batteri per migliorare la salute dell'uomo. Si tratta di un approccio non nuovo, visto che Metchnikoff lo enunciava nel 1907, partendo dalle proprietà fermentative del *Lactobacillus bulgaricus*, da egli stesso scoperto. Per anni nel mondo, e particolarmente in Italia, sono stati usati batteri per la terapia della gastroenterite acuta. I cosiddetti fermenti lattici sono stati tra le più frequenti strategie terapeutiche utilizzate partendo dall'ipotesi del ripristino della flora intestinale dismicrobica e l'Organizzazione Mondiale della Sanità prospetta il ricorso all'uso terapeutico di batteri per superare i crescenti problemi legati al diffondersi delle resistenze agli antibiotici nei batteri patogeni (Guarino e Bruzzese, 2001).

Un numero sempre crescente di studi ha messo in evidenza che i batteri probiotici sono in grado di influenzare positivamente lo stato di salute, grazie alle numerose attività da loro svolte, in particolare: il mantenimento di un giusto equilibrio nella microflora intestinale, la protezione contro patogeni intestinali e la modulazione della risposta immunitaria che sembrano portare ad un miglioramento nelle allergie alimentari, disturbi autoimmuni, eczema atopico, diarrea del viaggiatore, infezioni da *Candida* (figura 1) (Fuller 1989; Ballongue 1993; Sanders, 1993; Hilton *et al.*, 1995; Salminen *et al.*, 1996; Majamaa *et al.*, 1997; Walker e Duffy 1998; Kalliomaki *et al.*, 2001).

Gli effetti positivi legati all'utilizzo dei probiotici concretamente dimostrati sono sostanzialmente riconducibili alla prevenzione ed al trattamento di diarree e gastroenteriti causate da rotavirus e nella riduzione degli effetti collaterali legati all'uso degli antibiotici, che si prestano a molte considerazioni critiche (Arvola *et al.*, 1999; Vanderhoof *et al.*, 1999; Guandalini *et al.*, 2000; Szajewska *et al.*, 2001).

Alcuni autori hanno usato il *L. casei* GG aggiunto allo yogurt, per curare la diarrea associata al trattamento da antibiotici, la cui somministrazione, come è noto, può portare

Dott. Maria Luisa Varricchio

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

ad uno squilibrio microbico con netta riduzione della flora intestinale "benefica", principale responsabile della resistenza verso la colonizzazione dei patogeni. I risultati di questo studio hanno mostrato che il gruppo che ha ricevuto il probiotico insieme all'antibiotico ha mostrato minor diarrea rispetto agli individui che hanno consumato solo yogurt pastorizzato come controllo (Siitonen *et al.*, 1990).

Studi sperimentali hanno dimostrato che alcuni ceppi di LAB possono prevenire o diminuire disordini della permeabilità intestinale. È stato, infatti, visto che l'esposizione prolungata a latte vaccino induceva un aumento della permeabilità intestinale in ratti allo svezzamento, che veniva soppressa quando insieme al latte veniva somministrato *L. casei* GG. Questi studi dimostrano che la stabilizzazione e la funzionalità della barriera intestinale può essere migliorata dalla presenza nel lume intestinale di alcuni ceppi di LAB (Isolauri *et al.*, 1993).

Numerosi studi suggeriscono inoltre, che l'utilizzo dei probiotici può avere benefici effetti nel trattamento di malattie infiammatorie dell'intestino (morbo di Crohn e Colite ulcerative); della sindrome del colon irritabile; della carie dentali e delle infezioni da *Helicobacter pylori* (Aiba *et al.*, 1998; Gorbach, 2002). L'incidenza del morbo di Crohn, della colite ulcerosa e della sindrome infiammatoria intestinale, è in continuo aumento nei Paesi industrializzati. I cambiamenti nello stile di vita, inclusa una maggiore igiene e una riduzione nel consumo di cibi contenenti fermenti batterici, possono alterare il giusto equilibrio microbico necessario per lo sviluppo di un corretto sistema immunitario intestinale (Shanahan, 2004). Ciò può portare alla comparsa di reazioni immunitarie verso la flora batterica intestinale, che si ritengono essere il primo passo che conduce allo sviluppo della sindrome infiammatoria intestinale e di altri disordini legati ad una errata risposta immunitaria.

Tra i diversi effetti benefici esercitati dai probiotici, molto importante è la loro capacità di interagire con il sistema immunitario (Salminen *et al.* 1998). Vi sono numerose evidenze che suggeriscono un'azione stimolante dei batteri acido lattici sulla risposta

Dott. Maria Luisa Varricchio

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

immunitaria sia innata sia acquisita, sulla funzione linfocitaria, sulla produzione di anticorpi e della citochine (Perdigon *et al.* 1991; Matsuzaki *et al.*, 1998; Pessi *et al.* 2000).

Numerosi studi hanno evidenziato che il trattamento con alcuni ceppi di probiotici è in grado di potenziare la risposta immunitaria antigene-specifica nei confronti di infezioni naturali e immunizzazioni. L'effetto si esplica essenzialmente sulla produzione di IgA a livello delle mucose (Perdigon *et al.*, 1991). L'aumento della produzione di immunoglobuline da parte dei probiotici è stato osservato, oltre che nei topi anche nell'uomo (Tejada-Simon *et al.*, 1999).

Dalle molteplici funzioni ascrivibili ai probiotici si può facilmente intuire come sia vasta la loro possibilità di utilizzo clinico, anche se non tutte sono supportate da evidenze scientifiche (figura 2). L'efficacia dell'utilizzo dei probiotici varia a seconda della patologia considerata, e per alcune condizioni patologiche il trattamento con probiotici va considerato un coadiuvante ad altre terapie.

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE



Figura 2. Indicazioni all'uso dei probiotici in relazione alle dimostrazioni di efficacia (Guarino e Bruzzese, 2001).

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

3.3. USO DEI PROBIOTICI IN CAMPO ZOOTECNICO

L'uso dei probiotici in alimentazione differisce a seconda che essi siano applicati in campo umano o animale, così come anche i microrganismi usati come additivi alimentari sono di origine microbica differente, come evidenziato nella tabella 4 (Simon, 2005):

Tabella 4. Probiotici in nutrizione umana e animale (Simon, 2005).

	Nutrizione umana	Nutrizione animale
Obiettivo	Effetti a lungo termine	Risposta rapida
Efficacia	Difficile da valutare	Facile da valutare
Modalità di somministrazione	Insieme ad una piccola porzione di alimento	Come additivo miscelato agli alimenti
Frequenza di somministrazione	Una volta al giorno o di più?	10 – 20 volte al giorno
Microorganismi più frequenti	<i>Lactobacillus spp.</i> <i>Bifidobacterium spp.</i> <i>Enterococcus spp.</i>	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Bacillus spp.</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Habitat naturale	Tratto digestivo Prodotti a base di latte	Tratto digestivo Suolo Frutta

I probiotici sono preparazioni selezionate di microrganismi in grado di replicarsi anche se presentati sotto forma essiccata. Sono utilizzati come adiuvanti alimentari per facilitare la digestione, per incrementare le produzioni e per prevenire le sindromi enteriche nei giovani animali. Di uso frequente sono: i LAB (*acidophilus* e *bulgaricus*), gli streptococchi (*lactis* o *faecium*), i bacilli (*subtilis* o *cerens*) e, negli erbivori, i lieviti (*Saccharomyces cerevisiae*). Il loro impiego nell'alimentazione animale è indicato per favorire l'attività della microflora dell'apparato digerente limitandone gli effetti negativi senza la necessità di ricorrere all'uso degli antibiotici che si prestano a molte considerazioni critiche.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Negli anni passati sono stati diffusamente impiegati, negli allevamenti zootecnici, additivi alimentari a base di antibiotici definiti “promotori della crescita” che, somministrati a dosi subterapeutiche, hanno portato ad una serie di effetti benefici sulla salute e sulle prestazioni degli animali in allevamento, quali la riduzione della frequenza della diarrea dovuta alla loro influenza sulla microflora e sull’ambiente del tratto digestivo (Simon, 2005), l’aumento dell’efficienza di conversione alimentare e, di conseguenza, riduzione dei costi complessivi di produzione.

L’uso di antibiotici come additivi alimentari è stato lanciato intorno al 1950 per il loro effetto sul controllo di patologie di tipo infettivo (Xi-Yang Wu, 2006) e sul miglioramento della crescita e della conversione alimentare degli animali (dimostrando di migliorare del 3 – 5% l’incremento di peso degli animali) (Krehbiel *et al.*, 2003). Tuttavia, in seguito sono emersi gli effetti dannosi secondari dell’uso degli antibiotici quali promotori della crescita, come messo in evidenza da:

- induzione della diarrea negli animali;
- aumento dei patogeni antibiotico – resistenti;
- aumento della colonizzazione dell’intestino dei polli da parte delle Salmonelle;
- acquisizione dei geni della resistenza agli antibiotici da parte di alcuni batteri patogeni per l’uomo (Barton, 1998);
- possibile problema di salute pubblica in relazione all’aumento degli antibiotici presenti nella catena alimentare (Xi-Yang Wu, 2006).

Nel 1969, in virtù dei problemi emersi, la Swann Committee ha richiesto di restringere l’uso degli antibiotici negli alimenti per gli animali a quelli non usati a scopi terapeutici; in seguito a questa decisione e alla presa di coscienza dell’insorgenza di effetti collaterali, è aumentata la pressione internazionale per ridurre l’uso degli antibiotici anche attraverso una legislazione che ne regolamentasse l’impiego. La crescente preoccupazione, peraltro ampiamente documentata, che l’uso prolungato degli antibiotici contribuisse ad

Dott. Maria Luisa Varricchio

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

incrementare la resistenza dei batteri, ha portato l'Unione Europea a decidere di bandire l'uso degli antibiotici come additivi alimentari per gli allevamenti zootecnici a partire dal 1° Gennaio 2006 (Commission Regulation EC No 2200/2001). Di conseguenza, sono state avviate numerose ricerche per trovare altre sostanze in grado di modificare l'ecosistema intestinale e avere effetti benefici sugli animali.

Fra le cosiddette "alternative agli antibiotici" sono stati proposti acidi organici, oli essenziali, prebiotici, probiotici, additivi microbici alimentari (Simon, 2005). Proprio su questi ultimi si è concentrato un nascente interesse che ne ha favorito la diffusione e l'impiego nelle aziende zootecniche allo scopo di migliorare la salute e il rendimento dei ruminanti allevati (Kumagai *et al.*, 2004).

Il concetto di probiotico è stato applicato oltre che all'uomo, anche all'alimentazione animale in modo particolare nel corso degli ultimi decenni (Simon, 2005) e si basa sui potenziali effetti sia a livello ruminale, con il controllo dei fenomeni di acidosi, sia postruminale, attraverso il miglioramento della colonizzazione della microflora intestinale benefica (Fuller, 1999) e la riduzione o l'eliminazione degli agenti patogeni enterici dal tratto intestinale (Ohya *et al.*, 2001).

Oltre a probiotici, in particolare LAB, anche alcuni funghi e alcuni ceppi di lievito sono stati indicati per la loro influenza positiva sulla fermentazione microbica ruminale e sulle *performance* dei ruminanti grazie all'apporto di sostanze nutritive importanti, come vitamine, amminoacidi essenziali, fattori di crescita.

Tra questi, *Saccharomyces cerevisiae* e/o *Aspergillus oryzae* hanno avuto effetti sulla digestione della fibra attraverso i cambiamenti nella microflora ruminale (Gomez-Alarcon *et al.*, 1991; Varel e Kreikemeier, 1993).

Tuttavia, sono disponibili informazioni limitate che documentano gli effetti dei probiotici sulle prestazioni dei ruminanti ed i risultati delle prove condotte fino ad ora (Martin e Nisbet 1992), sono contraddittorie e variabili per una serie di fattori, tra cui un'elevata variabilità nella risposta degli animali al tipo di additivo probiotico, che

Dott. Maria Luisa Varricchio

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

possono influire sulla risposta al trattamento (Fuller, 1992). Non esiste, poi, un rapporto ben definito tra dose somministrata e risposta dell'animale, ma piuttosto si parla di concentrazione raccomandata che è approssimativamente di 10^9 U.F.C. (unità formanti colonie) per kg di alimento.

L'azione dei probiotici si basa essenzialmente sulla modificazione della popolazione batterica intestinale e la loro efficacia dipende da fattori tra i quali il tipo di probiotico impiegato, le quantità, le condizioni dell'allevamento e quelle del singolo animale. Di conseguenza, è comprensibile l'elevata variabilità della risposta al loro impiego (Simon, 2005).

✓ **Tipo di organismo utilizzato.** Mentre è forse evidente che risultati ottenuti con due differenti specie di microrganismi non possono essere confrontati, spesso non si considera che è possibile, per due differenti ceppi della stessa specie, dare risultati differenti. Quindi, anche se due probiotici contengono, ad esempio, *L. acidophilus* i due ceppi usati possono differire in qualche aspetto apparentemente secondario che può invece influire significativamente sulla risposta al trattamento. È noto, ad esempio, che la capacità di aderire all'epitelio intestinale dell'ospite è specifica per ogni ceppo, nel senso che un *L. acidophilus* isolato dall'intestino del pollo, non può aderire all'epitelio del suino. Anche altri fattori che permettono la colonizzazione dell'intestino dell'animale ospite, quali la resistenza all'acidità e la tolleranza alla bile possono variare all'interno della stessa specie. Conoscere le caratteristiche dei ceppi probiotici da utilizzare è, dunque, importante per determinarne la risposta al loro impiego, giacché la variabilità si potrà riflettere sull'effetto ottenuto (Fuller, 1992).

✓ **Metodo di produzione.** Anche il metodo di produzione di un prodotto probiotico può influire sul risultato finale, anche se i ceppi di partenza sono uguali, come messo in evidenza da Lauland (1994). Sono state rilevate da Ushe e Nagy (1985), ad esempio, delle differenze tra l'impiego di probiotici in polvere o in sospensione liquida. Tuttavia, ciò che non è evidente sono i cambiamenti che possono essere indotti dal mezzo

Dott. Maria Luisa Varricchio

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

nel quale il probiotico è cresciuto e si è sviluppato. Per esempio, la fonte di carboidrati nel terreno di crescita può influenzare la capacità di aderire all'epitelio intestinale che, peraltro, può cambiare anche durante il ciclo di sviluppo (Fuller, 1975).

✓ **Metodo di somministrazione.** Il probiotico può essere somministrato all'animale in vari modi: in polvere, in tavolette, in sospensione liquida, in capsule, pasta o spray. Inoltre, la quantità e l'intervallo di somministrazione può variare secondo le necessità; ad esempio, si può somministrare una sola volta o periodicamente ad intervalli giornalieri o settimanali. Sono poche le notizie circa la dose minima richiesta per ottenere un certo effetto probiotico; da prove condotte su ratti, suini e uomo è stato, però, osservato che l'effetto cessa nei periodi successivi alla somministrazione (Cole e Fuller, 1984; Goldin e Gorbach, 1984). Quindi, sembra che molto probabilmente l'effetto ottenuto è influenzato dalla quantità e dalla frequenza della somministrazione (Fuller, 1992).

✓ **Variabilità nella preparazione.** Le preparazioni probiotiche non sempre contengono il numero di microrganismi vitali dichiarati nel cartellino. Alcuni risultati negativi riportati da studi pubblicati potrebbero essere ricondotti al numero insufficiente di cellule vitali presenti nel preparato probiotico utilizzato. In un'indagine condotta da Gilliland (1981) su 15 preparati probiotici disponibili in commercio, è emerso che il numero di cellule vitali varia notevolmente tra le preparazioni controllate e, addirittura, tre di esse non contenevano LAB vitali, mentre in qualche caso erano presenti altri LAB diversi da quelli riportati sul cartellino (Fuller, 1992).

✓ **Condizioni dell'ospite.** È ampiamente diffusa l'opinione che prima si introduce il supplemento probiotico e più efficace sarà il suo effetto sull'ospite. Durante la prima fase della vita in cui la microflora intestinale è in una condizione instabile, gli organismi assunti per via orale probabilmente trovano un ambiente da colonizzare facilmente. Nei mammiferi, inoltre, il periodo di allattamento è differente per molti aspetti dal periodo post svezzamento e i supplementi microbici somministrati sopravvivranno o meno a seconda se troveranno l'ambiente adatto. Sono state, ad esempio, osservate delle

Dott. Maria Luisa Varricchio

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

differenze nelle risposte ai prodotti fungini somministrati a vacche in lattazione e non. Ancora, mentre i LAB possono essere molto efficaci nei vitelli, essi sono di uso limitato nei ruminanti adulti dove sono invece molto efficaci gli additivi microbici alimentari (Fuller, 1992).

✓ **Condizioni della microflora intestinale.** L'intestino e la microflora intestinale rappresentano un complesso ecosistema nel quale diversi fattori ne influenzano la composizione. Il concetto di esclusione competitiva, che rappresenta il più importante meccanismo d'azione dei probiotici, da un punto di vista microbiologico implica la prevenzione della colonizzazione di un microrganismo in un ambiente perché questo ambiente è già occupato da un microrganismo competitivo meglio adattato a vivere in esso. Una buona conoscenza della composizione dell'ecosistema microbico intestinale e dei suoi meccanismi di controllo (tabella 5), è necessaria per migliorare l'efficienza d'uso delle colture probiotiche commerciali da applicare in produzione animale (Piva e Belladonna, 1993).

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Tabella 5. Meccanismi di regolazione che incidono sulla composizione della flora microbica intestinale (Spring, 1996).

Meccanismi di regolazione	Fattori di controllo
Utilizzazione dei nutrienti	Competizione per i nutrienti o i fattori di crescita Utilizzazione sinergica dei nutrienti
Adesione	Competizione per i siti recettori Stimolazione del turnover delle cellule dell'epitelio intestinale
Creazione di un ambiente restrittivo	pH Produzione di acido lattico Produzione di AGV H ₂ S Eh Resistenza ai sali biliari Induzione di processi immunologici
Produzione di sostanze antimicrobiche	NH ₃ H ₂ O ₂ Emolisina Enzimi batterici Batteriofagi Batteriocine Antibiotici

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

3.3.1. APPLICAZIONE DEI PROBIOTICI NEL VITELLO

Il vitello, nelle prime settimane di vita, è soggetto a dismicrobismi gastro-intestinali; si tratta, in generale, di alterazioni dell'equilibrio microbico, con incremento del numero di germi putrefattivi e/o patogeni e conseguente sviluppo di condizioni patologiche clinicamente evidenti (diarrea), o di condizioni sub-cliniche (evidenziate da scarso accrescimento) (Villa e Giardini, 2007).

Tabella 6. Schema generale della successione microbica nel tratto gastroenterico nei mammiferi (Villa e Giardini, 2007).

Fase	Evoluzione
<i>Nascita</i>	Tratto gastroenterico sterile
<i>Poche ore dopo la nascita</i>	Presenza iniziale di una microflora in gran parte anaerobia facoltativa o aerotollerante, di origine in parte materna (vaginale, fecale e dei capezzoli), in parte ambientale
<i>Inizio svezzamento</i>	Il consumo di alimenti solidi (inizio dello slattamento) favorisce la microflora strettamente anaerobia, che tuttavia raggiunge livelli di dominanza solo nel ruminale o nel grosso intestino
<i>Animale svezzato</i>	La stabilità del microbiota gastroenterico si verifica solo a svezzamento concluso. La flora strettamente anaerobia è ampiamente dominante, superando di 100-1000 volte quella facoltativa.

Queste condizioni dismicrobiche ("disbiosi") si ripercuotono negativamente sulla funzionalità digestiva, sulla vitalità, sulla produttività e sulla sicurezza sanitaria delle carni macellate. Le cause delle disbiosi gastroenteriche sono tipicamente correlate alle condizioni di alimentazione e di allevamento, ma anche agli stessi trattamenti antibiotici (Villa e Giardini, 2007).

Tabella 7. Incidenza malattie infettive dei vitelli dalla nascita allo svezzamento (Succi, 1990).

Agente Patogeno	Età Vitelli	Infezioni Generalizzate	Broncopolmoniti	Diarree	Artriti
-----------------	-------------	-------------------------	-----------------	---------	---------

Dott. Maria Luisa Varricchio

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

<i>E. coli</i>	1 ^a sett.	+++	+	+++	+
<i>Pneumococchi</i>	1 ^a – 6 ^a sett.	+++	+	+	+
<i>Pasteurelle</i>	1 ^a – 7 ^a sett.	+	+++	+	+
<i>Piogeni</i>	dalla 2 ^a sett.	+	+	+	+
<i>Salmonella</i>	dalla 2 ^a sett.	++	+	+++	+

Occorre ribadire che alla nascita il vitello è separato dalla vacca e questo impedisce il completo passaggio della microflora protettiva materna (LAB) al redo: questa è la prima ragione per somministrare i LAB probiotici

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

4. MICRORGANISMI SPERIMENTATI

In termini generali, i prodotti utilizzati come integratori nelle diete dei ruminanti sono riferibili a tre tipologie di additivi: quelli che contengono lieviti "vivi", quelli che includono colture spente e gli estratti della loro fermentazione e quelli che racchiudono i prodotti finali della fermentazione di un fungo filamentoso e anche in questo caso normalmente privi di cellule vive.

In accordo con la direttiva CEE 70/524, è stato autorizzato l'impiego di nuovi additivi per i ruminanti. Questi microrganismi appartengono a ceppi differenti *Bacillus cereus*, *Bacillus cereus toyoi*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus farciminis*, *Pediococcus acidilactici* e *Saccharomyces cerevisiae* che hanno dimostrato avere effetti positivi in specie diverse come, ad esempio, polli, vitelli, bovini da carne, vacche da latte, suini e conigli.

Gli effetti generalmente osservati in nutrizione animale sono riconducibili essenzialmente ad aumento della produttività e miglioramento delle condizioni sanitarie che possono essere spiegati con un insieme di modi di azione dei probiotici e degli additivi microbici (Breul, 1998).

4.1. ENTEROCOCCUS FAECIUM

Il genere *Enterococcus* appartiene ad un gruppo di microrganismi conosciuti come batteri lattici (LAB). Gli Enterococchi sono Gram – positivi, non sporigeni, anaerobi facoltativi, che si ritrovano singoli, a coppia (diplococchi) o a catena e sono difficili da distinguere dagli Streptococchi sulla base delle sole caratteristiche fisiche. I batteri che producono acido lattico appartengono a diversi generi e per questo vengono definiti proprio in base al loro metabolismo: i batteri lattici sono un gruppo di microrganismi che

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

produce acido lattico come principale prodotto della fermentazione dei carboidrati (Teuber in *Biological Fundamentals*, 1993). Sono privi di catalasi, di nitrato riduttasi e di citocromo ossidasi, infatti non hanno catena respiratoria e il loro metabolismo è, come già detto, fermentativo. Si possono definire quindi microrganismi eterotrofi e chemiorganotrofi, che si sono adattati a vivere su substrati complessi e che necessitano non solo di carboidrati come fonte di energia, ma anche di aminoacidi, nucleotidi e vitamine (Kandler e Weiss in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1986).

I membri di tale genere erano classificati come *Streptococco* del Gruppo D fino al 1984 quando l'analisi genomica del DNA indicò che era appropriata una classificazione di genere separata (Schleifer e Kilpper-Bälz, 1984).

Dal punto di vista tassonomico, infatti, il genere *Enterococcus* è stato revisionato diverse volte (Schleifer e Kilpper-Bälz, 1987; Devriese et al., 1991). Nel 1984, studi sull'ibridazione del DNA e sul sequenziamento dell'RNA hanno messo in evidenza che le specie di *Streptococcus faecium* e *S. faecalis* sono sufficientemente distinte dagli altri streptococchi e Schleifer e Kilpper-Bälz (1987) hanno proposto il loro trasferimento nel genere *Enterococcus*, quindi 28 specie sono state aggiunte al genere sulla base di evidenze filogenetiche. Comunque, in futuro, si potranno avere ulteriori riclassificazioni.

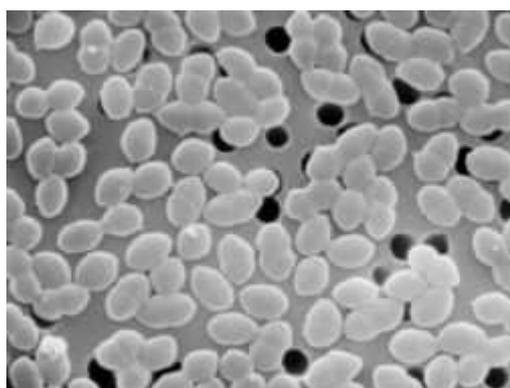


Figura 3. Colonia di Enterococchi

Classificazione scientifica

Dott. Maria Luisa Varricchio

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Regno	<i>Bacteria</i>
Phylum	<i>Firmicutes</i>
Classe	<i>Bacilli</i>
Ordine	<i>Lactobacillales</i>
Famiglia	<i>Enterococcaceae</i>
Genere	<i>Enterococcus</i>

Gli Enterococchi crescono ad una temperatura ottimale di 35°C, sebbene molte specie possono crescere in un *range* di temperatura che va da 10 a 45°C. in presenza di 6.5% NaCl, a pH 9.6 e sopravvivono a riscaldamento a 60°C per 30 min (Foulquié Moreno *et al.*, 2006). Tollerano bene un'elevata acidità, dato che alcune specie continuano a crescere fino a circa pH 3. Due specie sono comuni organismi commensali dell'intestino umano: *Enterococcus faecalis* ed *Enterococcus faecium*.

Molte specie di Enterococchi possono idrolizzare l'esculina in presenza del 40% di sali di bile.

Studi sulla microfloradei formaggi tradizionali dei paesi del Mediterraneo hanno messo in evidenza che gli Enterococchi giocano un importante ruolo nella loro stagionatura, probabilmente attraverso i fenomeni di lipolisi, proteolisi e decomposizione del citrato, contribuendo in tal modo alle caratteristiche organolettiche del prodotto finale (Coppola *et al.*, 1990; Litopoulou-Tzanetaki e Tzanetakis, 1992; Ledda *et al.*, 1994; Giraffa *et al.*, 1997; Manolopoulou *et al.*, 2003). Essi sono anche presenti in prodotti come, ad esempio salsicce (Franz *et al.*, 1999a; Giraffa, 2002; Franz *et al.*, 2003; Hugas *et al.*, 2003) ed olive (Fernández-Díaz, 1983; Franz *et al.*, 1996, 1999a; Floriano *et al.*, 1998; Ben Omar *et al.*, 2004).

Gli Enterococchi sono in grado di produrre batteriocine, le cosiddette enterocine, piccoli peptidi con attività antimicrobica verso batteri strettamente correlati con i Gram positivi, inclusi batteri sporigeni o patogeni, come la *Listeria* (De Vuyst e Vandamme, 1994). Le batteriocine prodotte dai LAB appartengono ad un vasto gruppo di piccoli peptidi naturalmente prodotti da microrganismi, piuttosto idrofobici, sintetizzati nei ribosomi e che variano nello spettro e nel modo d'azione, struttura e massa molecolare,

Dott. Maria Luisa Varricchio

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

termostabilità, range di pH di attività (Klaenhammer, 1993; De Vuyst e Vandamme, 1994; Nes *et al.*, 1996; Nissen-Meyer e Nes, 1997; Moll *et al.*, 1999; Ennahar *et al.*, 2000; Cleveland *et al.*, 2001; McAuliffe *et al.*, 2001; Riley e Wertz, 2002).

Le batteriocine prodotte dai LAB possono essere suddivise in tre classi principali in base alla struttura e alle proprietà fisico – chimiche e strutturali, ma molte di queste non sono state ancora purificate come nel caso delle enterocine prodotte da vari ceppi di *E. faecalis* ed *E. faecium*.

Le enterocine, come molte batteriocine, hanno come loro bersaglio principale la membrana citoplasmatica. Essi formano dei pori nella membrana cellulare, facendo variare in tal modo il potenziale di membrana e/o il gradiente di pH, con il risultato di una fuoriuscita di materiale intracellulare indispensabile (Cleveland *et al.*, 2001). Gli Enterococchi possiedono un ampio spettro di resistenza agli antibiotici di natura sia intrinseca sia acquisita (Klare *et al.*, 2001). Tuttavia, la resistenza agli antibiotici in quanto tale, non può spiegare la virulenza degli Enterococchi. Essi sono diffusi in molti alimenti; sono stati, infatti, ritrovati nei prodotti a base di carne, nei latticini, nei pasti pronti ed anche nei ceppi usati come probiotici (Franz *et al.*, 2001; Giraffa, 2002). Per motivi di sicurezza, quindi, sarebbe opportuno controllare l'assenza della resistenza agli antibiotici negli Enterococchi usati come colture starter negli alimenti (Franz *et al.*, 2001; Vancanneyt *et al.*, 2002; De Vuyst *et al.*, 2003).

Studi condotti da diversi Autori riferiscono anche di alcuni streptococchi β – emolitici che inibiscono la crescita di altri batteri (Sherwood *et al.*, 1949; Jett *et al.*, 1994; Haas e Gilmore, 1999).

L'impiego degli Enterococchi come probiotici resta una questione controversa. Se da un lato i benefici probiotici di alcuni ceppi sono ben noti, l'emergenza e l'aumento dell'associazione degli enterococchi con alcune malattie dell'uomo e la resistenza agli antibiotici ha suscitato preoccupazione per il loro impiego. Gli enterococchi hanno, infatti, un alto potenziale di rischio e sono ritenuti responsabili di importanti infezioni

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

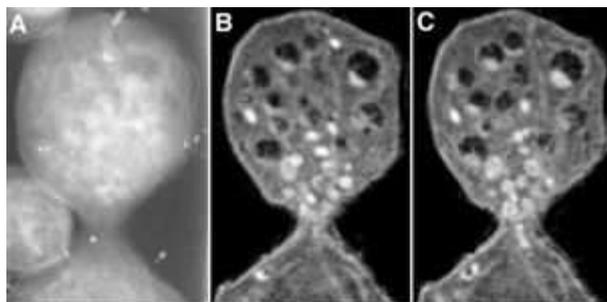
nosocomiali (Weber e Gold, 2003); sono stati implicati in numerosi fattori di virulenza (Jett *et al.*, 1994), come importanti cause di endocarditi, infezioni del tratto urinario, del sistema nervoso centrale, intraddominali e pelviche, così come nell'aumento della resistenza agli antibiotici, basati sulla β -lattamina (alcune penicillinee praticamente di tutte le cefalosporine) così come a molti amino glicosidi (Ryan e Ray, 2004). Negli ultimi vent'anni, sono comparsi ceppi di *Enterococcus* particolarmente virulenti resistenti alla vancomicina (Enterococco Vancomicina-resistente, o VRE) (Endtz *et al.*, 1999; Franz *et al.*, 1999a; Choi *et al.*, 2004; De Leener *et al.*, 2005). Il timore che i geni della resistenza agli antimicrobici o i geni che codificano per i fattori di virulenza possono essere trasferiti in altri batteri nel tratto gastrointestinale, contribuisce ad alimentare questa controversia (Franz *et al.*, 2003).

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

4.2. SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Il *Saccharomyces cerevisiae*, comunemente conosciuto come “lievito di birra”, è un microrganismo unicellulare in grado di adattarsi a condizioni ambientali diverse e che può vivere sia in aerobiosi sia in anaerobiosi (Zambonelli, 1998).

Appartiene agli *Eumycota* divisione Ascomiceti, ordine dei *Saccharomycetales*, famiglia *Saccharomycetaceae*.



Classificazione scientifica

Regno	<i>Fungi</i>
Phylum	<i>Ascomycota</i>
Sottodivisione	<i>Saccharomycotina</i>
Classe	<i>Saccharomycetes</i>
Ordine	<i>Saccharomycetales</i>
Famiglia	<i>Saccharomycetaceae</i>
Genere	<i>Saccharomyces</i>
Specie	<i>S. cerevisiae</i>

Il *S. cerevisiae* è una specie di lievito che si riproduce per gemmazione. È forse il lievito più importante e il suo utilizzo è noto fin dall'antichità per la panificazione e la produzione di birra e vino. Si pensa che sia stato isolato per la prima volta sulla superficie di acini d'uva; è, infatti, presente nella pruina. È uno dei microrganismi eucarioti più intensamente studiati in biologia cellulare e molecolare.

Il *S. cerevisiae* ha forma dall'ovale all'ellittico e diametro di 5-10 micrometri. Si riproduce attraverso un processo di gemmazione. È utile nello studio del ciclo della cellula

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

perché la sua coltura è molto semplice ma, come eucariote, presenta la complessità della struttura interna di piante e animali.

I prodotti terminali del metabolismo sono sostanzialmente il biossido di carbonio e l'etanolo. Questo è in relazione col fatto che questo lievito si trovi in presenza o meno di ossigeno. *Saccharomyces cerevisiae* è infatti anaerobio facoltativo, ossia il ricavo di energia può essere ottenuto o tramite un processo aerobico o tramite un processo anaerobico.

In presenza di ossigeno si ha respirazione mentre in condizioni di anossia si ha fermentazione.

In condizioni aerobiche, dove normalmente prevale la respirazione, se nel substrato la concentrazione di zuccheri supera il 5% si ha la prevalenza dell'attività fermentativa. Questo fenomeno è definito effetto *Crabtree*. L'effetto *Crabtree* limita la crescita del lievito ed è perciò normalmente indesiderato. Tramite aggiunta di substrato questo effetto può essere minimizzato.

Il *S. cerevisiae* è sensibile alla pressione. Quando la pressione nei contenitori per la lievitazione supera le 8 atmosfere, esso comincia a mostrare le sue degenerazioni. Questo effetto viene anche utilizzato per il controllo del processo di lievitazione.

L'uso del *S. cerevisiae* come promotore della crescita per i ruminanti è stato riportato per la prima volta nel 1925 da Eckles e Williams (Wallace e Newbold, 1992).

Secondo alcuni Autori il ruminante non è un mezzo adatto per la crescita dei lieviti (Fantuz *et al.*, 1999; Ouwehand *et al.*, 1999). In condizioni normali, infatti, il *S. cerevisiae* non può colonizzare il tratto digerente, ma una quantità significativa di lievito ingerito (dal 17% al 34% delle cellule viventi) (Fantuz *et al.*, 1999) può essere ritrovata viva nelle feci degli animali trattati, poiché sopravvive durante il passaggio nel tratto digerente suggerendo, in tal modo, un possibile effetto nei compartimenti post-ruminali. Il *S. cerevisiae* scompare rapidamente dal tratto gastrointestinale quando cessa la somministrazione. Nelle pecore (Fiems *et al.*, 1993) e negli agnelli (Durand-Chaucheyras *et*

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

al., 1998) è stata osservata la diminuzione del numero di cellule di lievito vitali 30 ore dopo la sospensione del trattamento.

L'apporto di importanti sostanze nutritive quali vitamine del gruppo B, acido glutammico ed altri amminoacidi indispensabili, nucleotidi e nucleosidi derivanti dagli acidi nucleici, glutadione ad azione immuno-stimolante e fattori di crescita indispensabili allo sviluppo della flora batterica e intestinale evidenzia che l'attività di stimolo sulla popolazione microbica non sembra essere legata all'attività riproduttiva dei lieviti ma, piuttosto, alla loro attività metabolica (Cevolani, 2005). Questa è la principale differenza con i probiotici, come i batteri lattici, per i quali l'adesione alla mucosa intestinale è strettamente correlata con gli effetti biologici (Ouwehand *et al.*, 1999).

Gli effetti dell'aggiunta dei lieviti sono stati studiati nei ruminanti (Williams e Newbold, 1990; Newbold *et al.*, 1995; Doreau e Jouany, 1998; Lesmeister *et al.*, 2004; Stella *et al.*, 2007) e quindi anche su vitelli da latte preruminanti (Wagner *et al.*, 1990; Quigley *et al.*, 1992; Seymour *et al.*, 1995; Kumar *et al.*, 1997). Essi sono generalmente riconducibili ad aumento dell'ingestione di SS, della degradabilità della SO, della fibra e delle proteine; aumento del numero dei batteri ruminanti, in particolare di quelli cellulolitici; stabilizzazione del valore del pH ruminale; capacità di utilizzare l'azoto ammoniacale in eccesso e gli ioni idrogeno, altrimenti perduti sotto forma di metano; capacità di apportare principi nutritivi indispensabili e fattori di crescita fondamentali per lo sviluppo della flora batterica ruminale (Tassinari e Aretano, 2005).

L'effetto del *S. cerevisiae* sulla stabilizzazione del pH è generalmente associata a diminuzione dei livelli di acido lattico nel rumine dopo il pasto (Williams *et al.*, 1991) conseguente alla stimolazione della crescita dei batteri utilizzatori di ac. lattico (*Megasphaera elsdenii* e *Selenomonas ruminantium*) (Girard, 1996; Mathieu *et al.*, 1996; Chaucheyras *et al.*, 1997; Newbold *et al.*, 1998; **Auclair**, 2000) attraverso l'apporto di vitamine, amminoacidi, acidi organici (Callaway e Martin, 1997).

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

L'aumento del numero totale di batteri nel rumine, soprattutto cellulolitici e in misura minore degli utilizzatori di acido lattico (Newbold, 1998) sembra essere una delle più importanti risposte all'aggiunta dei lieviti (Newbold, 1996; Durand-Chaucheyras *et al.*, 1997), peraltro strettamente dipendente dal ceppo di lievito usato. Infatti, non tutti i ceppi di *S. cerevisiae* hanno le stesse proprietà. Alcuni ceppi, come *S. boulardii* CBS 5926, aumentano il contenuto di vitamine e l'attività delle disaccaridasi della mucosa, ma riducono anche i ceppi infettivi di *E. coli* e *Salmonella*. La parete cellulare di questi lieviti si lega in modo specifico ai batteri *E. coli* di tipo I dotati di fimbrie attraverso i mannani della parete cellulare (Vanbelle, 2002).

In generale, l'aggiunta di *S. cerevisiae* implica cambiamenti nelle fermentazioni ruminali, in particolare aumento dell'attività batterica che, a sua volta, porta all'aumento della degradabilità dei foraggi e del flusso di proteina microbica ruminale e di amminoacidi nel piccolo intestino (Erasmus *et al.*, 1992; Wallace e Newbold, 1992). Anche Kumar *et al.* (1994) hanno evidenziato che l'aggiunta di lievito spento ad una dieta per vitelli bufalini con un elevato livello di concentrato, aumenta la popolazione microbica e altera le fermentazioni ruminali. Al contrario, Putnam *et al.* (1997) non hanno osservato alcun effetto del lievito sul passaggio delle frazioni azotate e degli amminoacidi nel piccolo intestino. Questo effetto sembra essere dipendente dalla dieta.

Comunque, ancora non è chiaro come, piccole quantità di lievito aggiunte alla dieta possano stimolare la crescita della popolazione microbica ruminale (Auclair, 2000).

Tra i meccanismi proposti, è stato suggerito l'apporto di vitamine (specialmente tiamina) che stimolano la crescita della microflora ruminale (Chaucheyras *et al.*, 1995), acidi carbossilici, in modo particolare acido malico che ha un importante effetto di stimolazione sia *in vitro* (Nisbet e Martin, 1990) ma soprattutto *in vivo* (Newbold *et al.*, 1996).

Un altro meccanismo d'azione proposto è la rimozione dell'ossigeno che potrebbe inibire la crescita dei batteri ruminali strettamente anaerobi (Dawson, 1993; Wallace e

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Newbold, 1993; Chaucheyras *et al.*, 1995; Newbold *et al.*, 1998). Più del 99% dei batteri ruminali sono anaerobi stretti e quindi anche quote ridotte di ossigeno che arrivano nel rumine possono influenzare negativamente la fermentazione batterica, inibendo la crescita e l'adesione dei batteri cellulolitici ai substrati fibrosi. La capacità di differenti ceppi di *Saccharomyces* di stimolare la crescita del numero di batteri vitali nel rumine sembra essere in relazione con la loro abilità a ridurre la quantità di ossigeno dal fluido ruminale, tramite l'attività respiratoria (Newbold *et al.*, 1996; Wallace e Newbold, 1993).

Le risposte ai trattamenti con il *Saccharomyces* sono state molto variabili e probabilmente influenzate da diversi fattori, tra cui il tipo di dieta (Williams *et al.*, 1991; Fiems *et al.*, 1993; Wallace e Newbold, 1993), la quantità di lievito aggiunto e il tipo di coltura testata (Williams *et al.*, 1991; Newman e Spring 1993; Newbold *et al.*, 1995).

L'aggiunta di colture di lievito alla dieta per vitelli, in quantità tra 0.001% e 1.0%, ha determinato effetti differenti a seconda dei parametri considerati; infatti, l'ingestione di SS, l'incremento ponderale medio giornaliero, la % di giorni di diarrea, l'ammoniaca ruminale, la produzione di acido lattico e propionico ruminale, o sono diminuiti o non hanno subito alcun effetto (Wagner *et al.*, 1990; Quigley *et al.*, 1992; Seymour *et al.*, 1995), mentre l'efficienza alimentare, il pH ruminale, la concentrazione totale di AGV ruminali e la produzione di acetato e butirrato sono aumentati (Quigley *et al.*, 1992; Kumar *et al.*, 1997). Williams *et al.* (1991) suggeriscono che l'aggiunta di lievito alla dieta per vitelli può aumentare la regolazione del pH ruminale attraverso la riduzione della produzione di acido lattico. Inoltre, l'aumento della produzione di butirrato, diminuisce la produzione di acido lattico e, di conseguenza, l'aumento del pH ruminale potrebbe influenzare lo sviluppo del rumine del vitello neonato.

Tuttavia, gli effetti dell'aggiunta del lievito sullo sviluppo del rumine ancora non sono ben determinati (Lesmeister *et al.*, 2004). Ricerche condotte da vari Autori indicano anche che il lievito spento influenza la digeribilità degli alimenti, la produzione e

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

l'efficienza microbica e il flusso di amminoacidi dal duodeno (Erasmus *et al.*, 1992; Mutsvangwa *et al.*, 1992; Yoon e Stern, 1996).

Come già accennato, il *S. cerevisiae* esercita una funzione benefica specialmente per i batteri cellulolitici, ciò si traduce in maggior utilizzazione della parete cellulare dei foraggi, ed in un' aumentata produzione di acido acetico, precursore nella sintesi di grasso nel latte (Piva *et al.*, 1989).

I lieviti vivi, inoltre, ridurrebbero la produzione di metano ed i rischi di acidosi (sono in grado di incorporare frammenti di amido) nonché la concentrazione ammoniacale del ruminante attraverso uno stimolo delle sintesi microbiche. In tal modo si spiegano sia la riduzione di urea nel latte, sia l'aumento delle quantità di caseina prodotta giornalmente. Essi, inoltre, sono in grado anche di stimolare l'ingestione degli alimenti, grazie all'azione aromatizzante di alcuni componenti cellulari quali acidi nucleici e derivati e dell'acido glutammico. Per questo motivo l'aggiunta di lieviti consente di riequilibrare, in molti casi, situazioni di stress, da elevata temperatura ambientale, da parto, da trasporto ecc. che comportano perdita di appetito (Piva *et al.*, 1989).

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

4.3. *ASPERGILLUS ORYZAE*

Tutti gli *Aspergilli* sono saprofiti diffusi in ogni ambiente tanto da risultare fra i più comuni contaminanti delle colture microbiche.

La relativa rarità dell'infezione nell'uomo è giustificata dal carattere tipicamente opportunistico della malattia.

Gli *Aspergillus* sono caratterizzati dalla loro particolare modalità di riproduzione conidiale: presenza di un conidioforo (detto anche stipe terminante con un rigonfiamento denominato vescicola; su quest'ultima si formano le fialidi, o direttamente o attraverso una serie di corte cellule sterili dette metulae (*Sterigmates*); ogni fialide produce una catena di spore ramificate; l'insieme della vescicola, delle fialidi e delle spore prende il nome di testa aspergillare.

Anche se la maggior parte degli aspergilli non presenta la forma di riproduzione sessuale, alcuni di essi sono in grado di produrre delle formazioni sessuate dette cleistoteche contenenti degli aschi ad 8 ascospore.

Nel genere è incluso un gran numero di specie (185), raccolte in ben 18 gruppi, la cui chiave analitica di identificazione sfrutta caratteristiche colturali diverse.

Classificazione scientifica	
Regno	<i>Fungi</i>
Phylum	<i>Ascomycota</i>
Ordine	<i>Eurotiales</i>
Famiglia	<i>Trichocomaceae</i>
Genere	<i>Aspergillus</i>
Specie	<i>A. oryzae</i>

Gli *Aspergilli* sono delle muffe ubiquitarie presenti nell'ambiente.

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Vivono a spese della materia organica in decomposizione e si sviluppano dentro ai silos, al compost, alle balle di fieno ma anche nei cereali e su diverse piante. Alcune specie termotolleranti si riscontrano più frequentemente nelle regioni tropicali.

Le spore hanno un tallo e una morfologia (tonde, rugose da 2 a 3 μ m di diametro) tali da favorire sia la loro disseminazione, poiché minore è l'attrito con i movimenti dell'aria, sia il loro passaggio attraverso il tratto respiratorio fino agli alveoli polmonari, dove possono provocare micosi primarie, particolarmente in individui immunodepressi o compromessi.

I ceppi riconosciuti patogeni sono oggi circa una ventina ed appartengono per oltre il 90% alla specie *A. fumigatus*, in ragione della sua termotolleranza a 37 °C.

L'incidenza dell'aspergillosi invasiva è incrementata drammaticamente nell'ultimo ventennio: l'esame delle autopsie ha rivelato un aumento dallo 0,4% degli anni '70 al 4 % degli anni '80.

Un recente studio di laboratorio ha mostrato un'incidenza dell'aspergillosi invasiva di 12,4 casi per milione in un anno.

Nonostante tutti gli sforzi diagnostici e terapeutici l'aspergillosi invasiva è di esito spesso fatale: l'intervallo di mortalità va dal 50 al 100 % nei casi studiati.

Quindi le misure preventive rivestono un ruolo di importanza primaria nel controllo di questa patologia e richiedono una piena conoscenza dell'epidemiologia di questa malattia devastante.

E' certo che anche l'aria, così come l'acqua, giochino un ruolo cruciale nell'incremento dell'incidenza: le spore rilasciate nell'ambiente possono rimanere in sospensione per lunghi periodi, contaminando tutto ciò che ne viene a contatto. E' stato ipotizzato che l'inalazione del pulviscolo atmosferico contenente spore di *Aspergillus*, sia direttamente che indirettamente attraverso la colonizzazione nasofaringea, è la causa principale delle infezioni polmonari nei pazienti immunocompromessi o neutropenici, che hanno un'alta probabilità di sviluppare l'aspergillosi invasiva. Le spore delle specie

Dott. Maria Luisa Varricchio

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

patogene più comuni di *Aspergillus* appartengono alle specie *A. fumigatus*, *A. flavus* ed *A. terreus* con un diametro che va dai 2 ai 5 μm .

Negli ultimi anni il ruolo patogeno di alcuni *Aspergilli* è aumentato notevolmente, sia nei pazienti "a rischio": leucemici, trapiantati d'organo, immunodepressi e sottoposti a terapie immunosoppressive; sia in soggetti sensibilizzati alle spore. Non trascurabile risulta anche il ruolo patogeno esercitato dalle micotossine prodotte da questo micete.

Le aflatossine sono delle sostanze che agiscono legandosi al DNA ed impedendo di conseguenza tutte le sintesi macromolecolari. Hanno anche azione cancerogena. Sono responsabili di intossicazioni di vari animali domestici, nutriti con alimenti nei quali si sia moltiplicato il micete produttore di aflatossine. Tracce di aflatossina sono state ritrovate nel latte e nei latticini ottenuti da bovini alimentati con foraggi contaminati, per cui non è esclusa la possibilità di intossicazioni alimentari umane.

Le aflatossine conferiscono alla muffa che le produce un vantaggio competitivo nei confronti di altre muffe o dei batteri. Sono associate alle spore della muffa ma anche al suo corpo (micelio) ed al substrato sul quale la muffa produttrice di tossine si è sviluppata, esercitando il loro effetto tossico indipendentemente dal grado di vitalità della struttura (spora o micelio) che le contiene.

Possono esercitare effetti sulla salute umana ed in particolare a carico del fegato, del rene e del sistema nervoso a seguito di esposizione per ingestione (apparato digerente), contatto cutaneo (pelle) ed inalazione (vie respiratorie). Entrano nelle vie respiratorie dell'uomo in forma di aerosol e ciò si verifica quando le spore, o le altre strutture che possono contenerle, vengono disperse nell'aria.

Fra i fattori di virulenza un ruolo importante è svolto in molti casi dalle stesse dimensioni del tallo fungino, che sono spesso maggiori di quelle delle cellule fagocitarie, dei leucociti neutrofilici in particolare.

In molti altri casi, le dimensioni della spora e del tubulo germinativo iniziale non sono così grandi da impedirne la fagocitosi, ma l'energia meccanica del conidio in

Dott. Maria Luisa Varricchio

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

germinazione risulta però tale da spingere l'ifa in accrescimento al di fuori del fagocita, perforandone la parete. L'abituale accumulo di cellule fagocitarie (granulociti neutrofili e macrofagi) attorno alle ife in accrescimento non riesce perciò a distruggerle o a circoscrivere durevolmente la diffusione.

Un altro prodotto microbico studiato per migliorare la produttività dei ruminanti attraverso la modulazione della funzione ruminale simile a quella determinata dai lieviti, è un terreno di coltura esaurito dalla crescita di *Aspergillus* spp. (Varel e Kreikemeier, 1993; Yoon e Stern, 1996). Come possibile meccanismo d'azione è ipotizzata la permanenza nel terreno di enzimi extracellulari.

Gli incrementi di peso, la produzione di latte la digeribilità dei nutrienti sono influenzati dai differenti meccanismi d'azione dei funghi e delle colture fungine

Come affermato dallo SCAN (2000) per gli animali monogastrici, anche i risultati ottenuti con lieviti ed *Aspergillus* spp. nei ruminanti sono variabili ed imprevedibili. Le risposte della produzione all'impiego di lieviti e derivati di *Aspergillus* sono generalmente più elevate all'inizio piuttosto che a metà o alla fine della lattazione delle bovine da latte (Vanbelle, 2002).

L'estratto di *Aspergillus oryzae* è un prodotto costituito dai metaboliti secreti dal microrganismo fungino dopo un processo di fermentazione multifase. Dopo la fermentazione si provvede ad una stabilizzazione e concentrazione dei metaboliti e dei fattori di crescita prodotti dal fungo stesso seguiti da una fase di devitalizzazione del micelio tramite trattamento termico.

Il prodotto presenta una composizione ricca di enzimi (β -glucanasi, amilasi acido resistente, α -amilasi, β -galattosidasi, glucoamilasi, lipasi) incorporati in genere su un supporto vegetale.

Gli effetti dell'impiego dell'estratto di *Aspergillus oryzae* nei ruminanti possono essere ascrivibili a: aumentata attività da parte dei batteri fibrolitici ruminanti; maggiore stabilità del pH ruminale; riduzione dell'incidenza dei fenomeni legati allo stress da caldo;

Dott. Maria Luisa Varricchio

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

aumento del turn-over dell'acido lattico ruminale (migliore conversione lattato-AGV) (Adams et al., 1981; Judkins e Stobart, 1988).

Questi effetti sono dovuti ad una migliore utilizzazione della fibra per il suo contenuto enzimatico (ed in particolare nelle esterasi di cui il prodotto è ricco) ed alla possibilità di poter aumentare la concentrazione energetica della dieta, soprattutto durante la stagione estiva quando si assiste ad un calo dell'assunzione volontaria di alimento (Beharka e Nagaraja, 1998).

L'estratto di *A.oryzae* è in grado di migliorare l'attività microbica ruminale prevenendo l'accumulo di un eccesso di acido lattico nelle bovine alimentate con diete ricche in concentrati, in quanto i metaboliti dell' *A.oryzae*, sono in grado di stimolare l'assorbimento di acido lattico da parte degli utilizzatori ruminanti di lattato *Selemonas ruminantium* (Nisbet e Martin, 1990; Beharka e Nagaraja, 1998) e *Megasphaera elsdenii* (Waldrup e Martin, 1993; Beharka e Nagaraja, 1998) fornendo loro una fonte di acido malico.

Le ricerche sugli effetti dell'*A. oryzae* sul rapporto acetato/propionato prodotto da colture miste di microrganismi ruminanti sono state inconsistenti (Wiedmeier et al., 1987; Frumholtz et al., 1989), mentre manca un numero sufficiente di ricerche sugli effetti dell'*A. oryzae* sulla crescita dei batteri ruminanti e dei loro prodotti di fermentazione (Beharka e Nagaraja, 1998).

Il principale obiettivo legato all'impiego dell'*A. oryzae* è stato quello di valutare l'effetto sulle *performance* produttive delle bovine. A tal scopo, Ominski *et al.* (2003) hanno provato a valutare gli effetti della somministrazione del prodotto (3 g/d) sulle *performance* produttive di bovine sottoposte a un periodo di stress da caldo. I risultati della ricerca condotta da Ominski *et al.* (2003) hanno mostrato un aumento dell'assunzione volontaria di alimento e della produzione di latte oltre ad un miglioramento delle caratteristiche qualitative del latte stesso legate ad un maggior contenuto in grassi e proteine e ad una riduzione della concentrazione di cellule somatiche. Tali risultati sono equiparabili con

Dott. Maria Luisa Varricchio

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

quanto osservato da Higginbotham *et al.* (2004), che hanno registrato un aumento significativo della percentuale di grasso e proteine nel latte delle bovine alimentate con una dieta cui era stato aggiunto un estratto di *A. oryzae* in ragione di 5 g/d.

L'aggiunta di grassi alla dieta delle bovine, come noto, costituisce un'abile strategia per aumentare la concentrazione energetica della razione. D'altro canto, però, l'attività dei batteri cellulolitici è fortemente depressa dalla presenza di grassi liberi, che determinano una riduzione della degradabilità della fibra. E' stato osservato che, invece, la degradabilità della fibra è aumentata dall'aggiunta dell'estratto di *A. oryzae*. Bertrand e Grimes (1997) hanno osservato, infatti, un aumento della digeribilità della sostanza secca, della fibra e degli acidi grassi della dieta delle bovine integrate con *A. oryzae*. rendendo, in tal modo, possibile poter includere nella dieta una maggiore percentuale di grassi. Questi dati sono avvalorati da ricerche condotte da Yu *et al* (1997), che hanno osservato una riduzione della temperatura rettale durante le ore calde della giornata nelle bovine che assumevano l'estratto di *A. oryzae*. Questo dato era già stato osservato precedentemente da altri Autori (Huber *et al.*, 1985; Marcus *et al.*, 1986; Gomez-Alarcorn *et al.*, 1990; Higginbotham *et al.*, 1994).

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

5. SCOPO DELL'INDAGINE

Scopo della ricerca è stato quello di valutare l'effetto dell'impiego di diversi tipi di prodotti microbici su incremento ponderale, *faecal score* e digeribilità *in vivo* di vitelli bufalini durante il periodo di alimentazione lattea.

La ricerca si è articolata su due linee:

1. utilizzo dell'*Enterococcus faecium* (SF 68 – NCIMB 10415), microrganismo presente nell'intestino di uomo e animale in grado di resistere all'acidità gastrica e che, pertanto, può essere utilizzato come probiotico;
2. utilizzo dell'estratto secco di *Aspergillus oryzae* e di *Saccharomyces cerevisiae*, due prodotti microbici che apportando sostanze nutritive, quali amminoacidi, acidi nucleici, vitamine del gruppo B, possono migliorare la funzionalità ruminale ed, in particolare, possono favorire la crescita e lo sviluppo del ruminale nei vitelli.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

6. UTILIZZO DELL'ENTEROCOCCUS FAECIUM (SF 68 – NCIMB 10415)

6.1. ESAME DELLA LETTERATURA

Gli antibiotici sono stati largamente utilizzati con buoni risultati per prevenire o controllare la diarrea nei giovani vitelli. Tuttavia il loro utilizzo su larga scala, ai fini preventivi o curativi o come stimolatori della crescita, può compromettere la loro efficacia terapeutica nell'uomo. Con il Regolamento CE 2821/98 è stato vietato l'uso di antibiotici nel latte in polvere destinato ai vitelli e dal 1° gennaio 2006 è bandito in tutta l'Unione Europea l'utilizzo degli antibiotici quale additivi negli alimenti animali.

La flora batterica intestinale gioca un ruolo cruciale nello sviluppo del sistema immunitario, come dimostrato dalla sua capacità di modulare l'immunità innata e quella acquisita a livello sia locale sia sistemico (Cebra, 1999; Isolauri *et al.*, 2001).

I probiotici sono microrganismi vitali che mostrano effetti benefici sulla salute dell'ospite attraverso il miglioramento dell'equilibrio microbico intestinale (Kaur *et al.*, 2002). Essi sono stati usati per prevenire o trattare la diarrea nell'uomo (vedere ad esempio le reviews di Sartor, 2005; Johnston *et al.*, 2006; Sazawal *et al.*, 2006) e negli animali da allevamento (Vanbelle *et al.*, 1990; Reid e Friendship, 2002). Per la loro capacità di modulare la microflora intestinale in favore dell'animale, i probiotici possono favorire l'incremento ponderale (Lyons, 1987).

Alcuni ceppi probiotici selezionati sono ritenuti validi stimolatori del sistema immunitario e l'efficacia immuno - modulatrice dei probiotici è stata esaminata da de Roos e Katan (2001), Kaur *et al.* (2001), Ezendam e van Loveren (2006).

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

L'effetto benefico dei probiotici sul sistema immunitario rappresenta il presupposto alla base del loro utilizzo, alternativo agli antibiotici, ai fini della protezione contro gli agenti infettivi e del miglioramento dello stato di salute degli animali (Schiffrin e Blum, 2002).

I batteri lattici sono fra i più importanti microrganismi costituenti la microflora intestinale e, pertanto, sono stati largamente impiegati come probiotici durante lo svezzamento dei vitelli, con risultati non sempre univoci.

Vari studi hanno analizzato nei vitelli la capacità di differenti ceppi di LAB di contrastare la diarrea (Maeng *et al.*, 1987; Abe *et al.*, 1995; Abu-Tarboush *et al.*; 1996; Agarwal *et al.*, 2002; Donovan *et al.*, 2002; Khuntia e Chaudhary, 2002) o di migliorare le *performance* di accrescimento (Cruywagen *et al.*, 1993; Higginbotham e Bath, 1993; Abe *et al.*, 1995; Abu-Tarboush *et al.*, 1996; Timmerman *et al.*, 2006) con risultati spesso contraddittori.

In particolare, Abe *et al.* (1995) hanno rilevato che la somministrazione a vitelli e suinetti di *Bifidobacterium pseudolongum* e *Lactobacillus acidophilus*, può determinare ricadute positive sugli incrementi ponderali e sull'incidenza delle diarree neonatali.

D'altro canto, Higginbotham e Bath (1993), utilizzando un estratto di *Lactobacillus acidophilus*, non vitale o di una mistura contenente ceppi vitali di *Lactobacillus acidophilus* e *Streptococcus faecium*, non hanno evidenziato differenze significative rispetto al gruppo di controllo non trattato con i probiotici.

A risultati analoghi sono giunti Cruywagen *et al.* (1993) che hanno valutato l'effetto dell'aggiunta al latte di ceppi vitali di *Lactobacillus acidophilus* senza evidenziare effetti significativi.

Abu-Tarboush *et al.* (1995) hanno sperimentato colture commerciali di lattobacilli (*Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* 27SC) nello svezzamento di vitelli bovini evidenziando una riduzione del numero dei coliformi a livello intestinale, senza comportare, però, effetti significativi sulle *performance* di accrescimento.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

In un recente studio Donovan *et al.* (2002), hanno confrontato l'Enteroguard (un prodotto a base di allucina, probiotici e fruttooligosaccaridi, una famiglia di oligosaccaridi che favorisce la crescita di *Bifidobacteria* spp e *Lactobacteria* spp.) ed una miscela di antibiotici, senza evidenziare differenze significative relativamente alla crescita ed alle *performance* di vitelli bovini.

Görgülü *et al.* (2003) hanno verificato l'effetto di una miscela *Lactobacillus* spp (*Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus termophilus*) sulle *performance* e sullo stato sanitario di vitelli bovini, mettendo in luce nel gruppo trattato un migliore stato sanitario e riduzione dei costi sanitari.

L'uso dei probiotici nello svezzamento dei vitelli bufalini è stato studiato da Roncoroni *et al.* (2000) che hanno messo in evidenza come l'impiego di yogurt determina un maggiore incremento ponderale rispetto a gruppi alimentati o con solo latte ricostituito o con l'aggiunta di fermenti.

Gli enterococchi sono normali costituenti la microflora intestinale dell'uomo (Mitsuoka, 1992) e degli animali (Willard, 2000), e questo ne giustifica il loro impiego come probiotici. Nell'uomo, l'*E. faecium* ceppo SF 68 (NCIMB 10415) è apparso clinicamente efficace nella prevenzione della diarrea (Bellomo *et al.*, 1980; Wunderlich *et al.*, 1989) e sembra avere effetti inibitori contro importanti enteropatogeni quali salmonelle, siphelle, clostridi e clamidie (Lewenstein, 1989; Pollmann, 2005). La somministrazione di *E. faecium* SF68 è risultata efficace nel controllo della diarrea nei suini (Underdahl, 1983), ha modificato la risposta immunitaria dei suini (Scharek *et al.*, 2004) e ha stimolato la produzione di immunoglobuline A (IgA) intestinali in cani e gatti (Benyacoub *et al.*, 2003, 2005).

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

6.2. MATERIALI E METODI

6.2.1. DIETE E ANIMALI

La ricerca è stata condotta presso un'azienda bufalina sita nel comune di Eboli (SA) nel periodo aprile - giugno 2005.

Quaranta vitelli bufalini (10 maschi e 30 femmine) sono stati separati dalla madre immediatamente dopo la nascita e alloggiati in gabbie individuali (1,0 m di larghezza per 1,7 m di lunghezza). Le gabbie, situate tutte nello stesso edificio, erano in metallo, avevano il fondo grigliato ed erano provviste di mangiatoia manuale ed abbeveratoio automatico; la pulizia delle gabbie era quotidiana. A partire dai 4 giorni di età è stato somministrato, in sostituzione del colostro aziendale, latte ricostituito. All'età di 10 gg, i vitelli sono stati assegnati a 4 gruppi sperimentali, omogenei per numerosità, sesso e peso vivo medio:

- trattamento A: controllo, solo latte ricostituito;
- trattamento B: aggiunta al latte ricostituito di un probiotico contenente *E. faecium* SF68 (2×10^9 ufc/g) per 3 gg consecutivi, con un periodo di intervallo di 7 giorni, per tutto il periodo di alimentazione lattea;
- trattamento C: somministrazione giornaliera del probiotico per 4 settimane (30 giorni);
- trattamento D: somministrazione giornaliera del probiotico fino a completamento del periodo di alimentazione lattea.

Il periodo di alimentazione lattea è durato 11 settimane.

La coltura commerciale di *Enterococcus faecium* SF68 (Primalac NF m, Ascor Chimici, Capocolle di Bertinoro, FC, Italy) è stata aggiunta al latte ricostituito nella quantità raccomandata dal produttore (0.18 g/l di latte ricostituito).

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Il latte (Univor bufalini 60®, Sofivo, Condé sur Vire, France), la cui composizione chimica è riportata nella tabella 8, è stato ricostituito in proporzione pari a 180 g/l ed è stato somministrato (a circa 38°C) con poppatoio in quantità pari a 100 ml/kg di peso corporeo iniziale/d, per le prime due settimane (in media 4 l/d) e, successivamente, secondo il seguente schema:

- 6 l/d fino alla 3° settimana;
- 7 l/d fino alla 4° settimana;
- 8 l/d dalla 5° all'8° settimana;
- 7 l/d fino alla 9° settimana;
- 6 l/d fino alla 10° settimana;
- 4 l/d fino alla 11° settimana.

I vitelli sono stati mantenuti per 5 settimane nella gabbie individuali, dove hanno ricevuto solo latte ricostituito. Dalla sesta settimana, gli animali sono stati alloggiati in 8 box collettivi (5 vitelli per box, 2 box per trattamento), dove hanno ricevuto, oltre al latte ricostituito, due volte al giorno e ad libitum, la stessa miscela unifeed somministrata alle bufale in lattazione cui è stato aggiunto (in quantità pari al 30% in peso) orzo fioccato (tabella 9). I box collettivi erano in legno, con l'area interna (2,6 m²/vitello) ricoperta di paglia e un paddock esterno (1,5 m²/vitello) in terra battuta.

6.2.2. MISURE SPERIMENTALI

I vitelli sono stati pesati individualmente al momento della formazione dei quattro gruppi sperimentali (in media, 40.3 ± 5.7, 39.0 ± 6.2, 38.7 ± 5.5 e 40.5 ± 5.8 kg rispettivamente per i gruppi A, B, C, e D). Le differenze di peso non sono risultate statisticamente significative. Successivamente, i singoli vitelli sono stati pesati ogni 2 settimane, al mattino, subito prima della distribuzione della razione.

Dott. Maria Luisa Varricchio

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

La consistenza delle feci (*faecal score*) è stata valutata due volte a settimana utilizzando la seguente scala:

- 0 - diarrea;
- 1 - semiliquido;
- 2 - semiconsistente;
- 3 - normale;
- 4 - duro.

Ogni settimana, per ciascun box è stato misurato il consumo di unifeed attraverso la differenza tra la quantità di miscela somministrata e i residui di mangiatoia. Contemporaneamente sono stati prelevati campioni di unifeed dal carro miscelatore, in media circa 500 g, su cui è stata immediatamente calcolata la SS per la stima dell'ingestione di SS.

6.2.3. PROVE DI DIGERIBILITÀ

Alla fine delle 11 settimane del periodo sperimentale è stata stimata la digeribilità *in vivo* utilizzando le ceneri acido insolubili (AIA) come marcatore interno.

Durante la prova, la paglia è stata rimossa dal pavimento dei box collettivi e l'accesso al paddock esterno è stato bloccato. Lo schema sperimentale ha previsto un periodo preliminare di adattamento di 5 giorni seguito da un periodo di 3 giorni di raccolta feci, durante i quali i vitelli hanno ricevuto 4 l/d di latte ricostituito e la miscela unifeed *ad libitum* (tabella 10). Le feci sono state raccolte giornalmente dal pavimento dei box e alla fine del periodo di raccolta i campioni giornalieri sono stati uniti in modo da ottenere un campione per box. Il periodo di raccolta delle feci è stato replicato 3 volte, in tal modo sono stati ottenuti 6 campioni di feci per trattamento.

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Il consumo di alimento è stato valutato giornalmente durante ciascun periodo di raccolta.

I campioni di feci e di alimento sono stati pesati con bilancia tecnica e immediatamente analizzati per la determinazione del contenuto in SS.

I CUDa delle diverse frazioni analitiche sono stati calcolati mediante la seguente formula:

$$\text{CUDa} = \frac{\text{Ingesta alimentare} - \text{Escreta fecali}}{\text{Ingesta alimentare}} \times 100$$

6.2.4. DETERMINAZIONI ANALITICHE

I campioni di miscela unifeed raccolti a cadenza settimanale sono stati unificati e il campione così ottenuto è stato analizzato secondo Weende e Van Soest e per il contenuto in amido (Martillotti, 1987). Le medesime determinazioni analitiche sono state effettuate sui campioni di alimento, residuo e di feci raccolti durante la prova di digeribilità, unitamente alla determinazione del contenuto in ceneri acido insolubili, utilizzando acido cloridrico 2N (Van Keulen e Young, 1977).

6.2.5. ELABORAZIONE STATISTICA

I dati sono stati elaborati mediante il pacchetto statistico Statistical Analysis System (SAS, 1990). Per tutte le elaborazioni, l'unità sperimentale è stata rappresentata dal singolo vitello, fatta eccezione per i dati relativi al consumo di SS e alla digeribilità *in vivo*, per i quali è stato impossibile misurare i dati individuali dato che i vitelli erano alloggiati in box

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

multipli. Per questi dati l'unità sperimentale è stata costituita dal singolo box. I dati relativi ai vitelli morti sono stati inclusi nel *data-set* fino alla data di morte.

I dati relativi al *faecal score*, all'incremento di peso medio giornaliero e all'ingestione di SS sono stati elaborati attraverso l'analisi della varianza per misure ripetute, considerando il trattamento sperimentale (A, B, C, D) come fattore fisso e la settimana di osservazione, l'interazione settimana di osservazione per trattamento come fattore ripetuto.

I dati relativi alla digeribilità *in vivo* sono stati elaborati mediante analisi della varianza per misure ripetute, considerando il trattamento sperimentale (A, B, C, D) come fattore fisso e la replica, l'interazione replica per trattamento come fattore ripetuto. L'unità sperimentale è stata costituita dal singolo box.

L'incremento ponderale totale è stato analizzato mediante analisi della varianza considerando il trattamento (A, B, C, D) quale fattore di variazione.

Quando è stata evidenziata la significatività dell'effetto trattamento ($P < 0.05$), sono stati utilizzati contrasti ortogonali (A vs. B, C, e D; B vs. C e D; C vs. D) per determinare le differenze tra i singoli trattamenti.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

6.3. RISULTATI

6.3.1. MORTALITÀ E MORBILITÀ

Durante il periodo sperimentale nel solo gruppo di controllo sono stati registrati 2 casi di mortalità a 26 e 32 giorni di età per diarrea che si è manifestata nei giorni precedenti al decesso.

Non essendo stata eseguita l'analisi necroscopica, le cause della morte non sono state determinate.

6.3.2. FAECAL SCORE

I vitelli sottoposti a trattamento con probiotico hanno mostrato, rispetto al gruppo di controllo, valori di *faecal score* significativamente più elevati ($P < 0.04$) (tabella 11). Nessuna differenza significativa è stata osservata, invece, tra i gruppi che hanno ricevuto l'*E. faecium* SF68, ciò sta ad indicare che la modalità di somministrazione non ha influenzato la risposta al trattamento.

È stato evidenziato un effetto della settimana di osservazione ($P < 0.0001$) che può ascriversi, probabilmente, alla diminuzione dell'incidenza della diarrea negli animali all'aumentare dell'età (grafico 1).

6.3.3. INGESTIONE DI SOSTANZA SECCA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Il latte distribuito ai vitelli è stato interamente consumato e poiché la quantità somministrata è stata determinata per le prime due settimane di sperimentazione in funzione del peso vivo e, successivamente, è stata uguale per tutti gli animali, ne consegue che il consumo di latte non può essere stato influenzato dalla somministrazione di probiotico.

Il consumo della miscela unifeed è progressivamente aumentato durante il periodo sperimentale, ma non è apparso influenzato dalla somministrazione di probiotico (grafico 2).

Il maggior consumo di SS è stato registrato per il gruppo D (1725 g/d), il minimo dal gruppo C (1450 g/d), ma le differenze sono risultate abbastanza ridotte (tabella 12).

6.3.4. INCREMENTI PONDERALI

Il peso dei vitelli è aumentato linearmente durante il periodo di osservazione ($P < 0,001$); inoltre, non sono state osservate perdite di peso (Grafico 3), indice che gli animali non hanno subito stress di natura ambientale con ricadute negative sul peso vivo.

Il peso finale dei vitelli e l'incremento ponderale totale non sono apparsi influenzati dalla somministrazione di *E. faecium*, anche se i gruppi trattati, rispetto al controllo, hanno evidenziato valori numericamente più elevati (89.9, 95.4, 97.6, 97.3, rispettivamente per i gruppi A, B, C, D).

Analogo andamento è stato osservato per l'incremento medio giornaliero (tabella 13) con il gruppo di controllo che ha mostrato valori numericamente inferiori rispetto ai gruppi trattati con *E. faecium*, in particolare dalla 7° all'11° settimana di sperimentazione (Grafico 4).

6.3.5. DIGERIBILITÀ IN VIVO

I coefficienti di digeribilità della SS, SO, PG ed NDF sono riportati nelle tabella 12.

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Per tutte le frazioni analitiche esaminate, i valori sistematicamente più bassi sono stati osservati per il controllo (SS 0.70, SO 0.76, PG 0.65, NDF 0.52). Per il gruppo C, invece, sono stati rilevati i coefficienti di digeribilità più alti (SS 0.75, SO 0.81, PG 0.74, NDF 0.59). Tuttavia, in nessun caso, le differenze hanno raggiunto la soglia della significatività statistica.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

6.4. DISCUSSIONE

La diarrea è il principale problema di ordine sanitario che colpisce i vitelli durante le prime settimane di vita e, di conseguenza, la possibilità di controllarla attraverso l'utilizzo di probiotici è stata oggetto di numerose ricerche.

In diversi studi, la somministrazione di LAB a vitelli ha mostrato di agire favorevolmente sull'incidenza e sulla durata della diarrea (Jenny *et al.*, 1991; Higginbotham e Bath, 1993; Abe *et al.*, 1995; Abu-Tarboush *et al.* 1996; Agarwal *et al.*, 2002; Donovan *et al.*, 2002; Khuntia e Chaudhary, 2002; Timmerman *et al.*, 2005), anche se in altre ricerche non è stato rilevato alcun effetto significativo (Morril *et al.*, 1977; Jenny, 1991; Cruywagen *et al.*, 1996).

Questi risultati contrastanti possono essere messi in relazione a differenze, ad esempio, nelle modalità di somministrazione e/o nei ceppi batterici utilizzati. Probabilmente, però, un ruolo rilevante è giocato anche dalle condizioni di salute dell'animale e, in particolare, dalla presenza di affezioni gastroenteriche che frequentemente colpiscono il giovane vitello.

La popolazione microbica intestinale, infatti, nelle prime fasi di vita dell'animale non ha ancora colonizzato stabilmente la mucosa e, di conseguenza, può facilmente andare incontro ad alterazioni in seguito a stress di origine ambientale quali, ad esempio, bruschi cambiamenti alimentari o variazioni delle condizioni di allevamento.

L'alterazione della microflora rende possibile la colonizzazione della mucosa del tratto gastrointestinale da parte di ceppi batterici enteropatogeni, con l'insorgenza di diarree anche gravi (Savage, 1978). I probiotici, contrastando la moltiplicazione dei microrganismi responsabili delle affezioni gastrointestinali, possono ridurre l'incidenza e la durata della diarrea. Chiaramente, il trattamento probiotico può esplicare la sua efficacia solo in presenza di diarree causate da alterazioni della microflora intestinale; al contrario, quando le condizioni sanitarie degli animali sono buone, con limitata presenza

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

di diarrea, non possono evidenziarsi gli effetti del trattamento (Cruywagen *et al.*, 1996).

In questo studio, lo stato sanitario dei vitelli è risultato abbastanza buono durante le 11 settimane di prova, anche se è stata osservata una elevata incidenza di diarrea nelle prime due settimane. In questa situazione il trattamento con *E. faecium* SF 68 ha potuto dimostrarsi efficace.

Sono stati proposti svariati meccanismi di azione per giustificare l'azione protettiva dei LAB ad azione probiotica nei confronti dei disordini gastrointestinali; l'insieme dei processi attraverso i quali i batteri inibiscono la colonizzazione da parte di altri ceppi è detta resistenza alla colonizzazione (Rolfe, 2000).

Di seguito sono brevemente descritti alcuni meccanismi ipotizzati.

(a) *Produzione di sostanze inibenti.*

I LAB sono in grado di produrre una grande varietà di sostanze in grado di inibire la proliferazione di batteri sia gram-positivi sia gram-negativi. Queste sostanze comprendono acidi organici (acido lattico, propionico, ecc.), perossido di idrogeno e batteriocine. Questi composti non solo riducono il numero di cellule vitali, ma altresì modificano il metabolismo batterico e riducono la produzione di tossine (Rolfe, 2000).

(b) *Blocco dei siti di adesione.*

L'inibizione competitiva per i siti di adesione batterica sulla superficie della mucosa intestinale rappresenta un meccanismo di azione dei LAB per il quale esistono varie indicazioni sperimentali (Kleeman e Klaenhammer, 1982; Conway *et al.* 1987; Goldin *et al.* 1992).

(c) *Competizione per gli elementi nutritivi.*

Un meccanismo di azione ipotizzato è quello della competizione per gli elementi nutritivi: i LAB consumano i nutrienti rendendoli indisponibili ai microrganismi patogeni. Tuttavia, mancano evidenze sperimentali che questa azione si espliciti effettivamente *in vivo* (Rolfe, 2000).

(d) *Inattivazione dei recettori delle tossine.*

Dott. Maria Luisa Varricchio

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

L'inattivazione dei recettori delle tossine presenti sulla mucosa intestinale rappresenta una possibile ipotesi che è stata proposta, in particolare, per spiegare l'azione antagonista del *Saccharomyces boulardii* nei confronti del *Clostridium difficile* (Pothoulakis *et al.* 1993; Castagliuolo *et al.* 1996, 1999).

(e) *Stimolazione del sistema immunitario.*

Numerose ricerche hanno evidenziato che un possibile meccanismo di azione dei probiotici è costituito dalla stimolazione del sistema immunitario (Kaur *et al.*, 2001; Roos e Katan, 2001; Ezendam e van Loveren, 2006). Una delle prime evidenze sperimentali è stata fornita dallo studio di Kaila *et al.* (1992) che ha dimostrato che la somministrazione di *Lactobacillus* GG durante gli episodi di diarrea acuta è associata ad un incremento della risposta immunitaria specifica nei confronti dei *Rotavirus*. Il meccanismo biomolecolare alla base della stimolazione immunitaria non è ancora ben conosciuto, ma probabilmente coinvolge specifici componenti della parete cellulare batterica o della membrana cellulare che coadiuvano e aumentano la risposta immunitaria.

Nel nostro studio non sono state osservate differenze significative tra le diverse modalità di somministrazione dell' *E faecium* SF68.

Probabilmente, il trattamento B, che rappresenta il più basso livello di somministrazione del probiotico, fornisce un sufficiente numero di microrganismi vitali in grado di sopravvivere nell'intestino.

A nostra conoscenza non sono state condotte in precedenza ricerche che hanno valutato l'effetto delle modalità di somministrazione sull'efficacia dei trattamenti probiotici. Taras *et al.* (2007) in una ricerca condotta sui suini hanno evidenziato una relazione tra l'inizio della somministrazione di *E. faecium* SF68 e la sua concentrazione intestinale. Questo risultato può essere spiegato dal fatto che l'*E. faecium* rimane vitale anche dopo aver attraversato il tratto gastrointestinale ed è in grado di colonizzare la mucosa intestinale (Lund *et al.*, 2002; Macha *et al.*, 2005). È necessario, tuttavia, che il

Dott. Maria Luisa Varricchio

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

trattamento probiotico inizi subito dopo la nascita in quanto è difficile modificare una microflora già stabilmente insediata (Savage, 1978; Kirjavainen e Gibson, 1999).

L'aggiunta dell'*E. faecium* non ha avuto alcun effetto sull'ingestione di SS dell'unifeed. Questi risultati sono in accordo con quelli evidenziati da altri Autori (Abu-Tarboush *et al.*, 1996; Kamra *et al.*, 2005), anche se Higginbotham e Bath (1993) hanno rilevato un consumo di mangime starter significativamente maggiore in vitelli che ricevevano un supplemento microbico a base di cellule non vitali di *Lactobacillus acidophilus*. Un consumo di mangime starter statisticamente più basso, invece, è stato osservato da Morrill *et al.* (1977) in vitelli che ricevevano colture vitali di LAB rispetto a vitelli che ricevevano latte pastorizzato.

Non sono state evidenziate differenze statisticamente significative tra i quattro trattamenti sperimentali relativamente agli incrementi ponderali giornalieri che sono apparsi in linea con quelli comunemente osservati per i vitelli bufalini da latte.

Infatti, le numerose ricerche condotte sull'effetto dei LAB su crescita ed incrementi ponderali dei vitelli hanno messo in luce risultati contrastanti. Mentre da un lato alcuni Autori (Bechman *et al.*, 1977; Abe *et al.*, 1995) hanno osservato un significato aumento del peso dei vitelli che ricevevano i probiotici, in particolare durante le prime due settimane del loro impiego (Cruywagen *et al.*, 1996; Timmerman *et al.*, 2005), incrementi ponderali attribuiti da questi autori ad un miglioramento della funzionalità del digerente ad opera dei LAB in seguito alla soppressione dei patogeni intestinali, dall'altro, invece, numerosi Autori (Morrill *et al.*, 1977; Ellinger *et al.*, 1978; Jenny, 1991; Higginbotham e Bath, 1993; Abu-Tarboush *et al.*, 1996; Cruywagen *et al.*, 1996) non hanno riscontrato effetti positivi dei LAB sulle *performance* di accrescimento dei vitelli.

Questi risultati contrastanti complessivamente suggeriscono che l'effetto dei probiotici sugli incrementi di peso è influenzato da fattori ambientali e, in particolare, dalla tecnica di allevamento adottata e dallo stato sanitario degli animali. Secondo Fuller

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

(1989) l'efficacia dei probiotici sugli incrementi ponderali degli animali si manifesta solo quando a livello intestinale è presente una microflora patogena che riduce l'accrescimento.

La digeribilità dei vitelli non è stata influenzata dalla somministrazione dell'*E. faecium* SF68, analogamente a quanto osservato da Abu-Tarboush *et al.* (1996) in vitelli alimentati con diete addizionate con *Lactobacillus acidophilus* e *L. plantarum*.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

6.5. CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

I risultati ottenuti nella prova condotta possono essere così riassunti:

- durante le 11 settimane del periodo di alimentazione lattea sono morti due vitelli per diarrea nel gruppo di controllo, mentre nei gruppi che ricevevano l'*E. faecium* non sono stati registrati casi di mortalità;
- i valori di *faecal score* sono risultati significativamente migliori nei soggetti trattati rispetto al controllo;
- non sono state registrate differenze tra i valori di *faecal score* osservati nei tre gruppi trattati con probiotico; ciò sta ad indicare che le diverse modalità di somministrazione stabilite nel protocollo sperimentale sono risultate statisticamente non dissimili;
- l'ingestione della miscela unifeed è risultata quasi sovrapponibile nei vari gruppi;
- non sono state registrate differenze statisticamente significative tra i vitelli relativamente a: peso vivo medio alle diverse età, incrementi ponderali giornalieri, incremento ponderale totale, peso vivo finale;
- la digeribilità *in vivo* delle diverse frazioni analitiche è risultata statisticamente non dissimile tra i vitelli trattati con *E. faecium* e quelli del gruppo di controllo, anche se per questi ultimi sono stati osservati coefficienti di digeribilità sistematicamente più bassi.

In definitiva, sebbene le differenze tra i vitelli trattati e quelli del gruppo di controllo sono apparse per lo più non significative, i migliori valori di *faecal score* degli animali trattati suggeriscono che la somministrazione dell'*E. faecium* SF 68 durante il periodo di alimentazione lattea può avere effetti benefici sullo stato sanitario degli animali e, quindi, può indirettamente ridurre la mortalità.

Dott. Maria Luisa Varricchio

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

L'aggiunta quotidiana di *E. faecium* al latte dei vitelli per tre giorni consecutivi ogni sette giorni fino a tre mesi di età, permette di raggiungere l'effetto del probiotico al costo più basso.

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Tabella 8. Composizione, caratteristiche chimiche ed integrazione del latte in polvere utilizzato durante la sperimentazione.

Materie prime	
Latte scremato in polvere spray (reg. Ce n° 2799/1999), olii vegetali (palma, colza, copra, siero di latte, farina di frumento, additivi e microingredienti).	
Analisi chimica (%)	
Umidità	4.5
Proteine grezze	22.9
Grassi grezzi	25.0
Ceneri grezze	6.9
Fibra grezza	0.3
Lisina	1.8
Metionina	0.6
Cisteina	0.2
Integrazioni (tenori per kg)	
Vitamina A (UI)	25000
Vitamina D3 (UI)	4000
Vitamina E (Acetato Alpha – Tocoferolo – mg)	50
Vitamina B1 (mg)	15
Vitamina B2 (mg)	3
Vitamina B6 (mg)	2
Vitamina C (mg)	1000
Ferro (solfato ferroso eptaidrato – mg)	10

Tabella 9. Composizione percentuale della razione somministrata ai vitelli.

Alimento	%
Silomais	55.0
Erba di loietto	16.0
Fieno di erba medica	11.7
Tritello di grano duro	6.4
Orzo fioccolato	5.7
Soia f.e.	4.6
Integratore minerale e vitaminico	0.6

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Tabella 10. Caratteristiche chimiche nutrizionali della razione unifeed somministrata ai vitelli.

Caratteristiche chimiche e nutrizionali	
UFL /kg SS	0.88
PG (% SS)	15.40
PDIN	10.60
PDIE	9.80
FG	20.00
NDF	40.20
ADF	23.40
EE	3.20
Amido	21.90
Ca	0.89
P	0.44

Tabella 11. Faecal score dei vitelli appartenenti ai quattro gruppi sperimentali.

	Gruppi sperimentali				SE	Effetto (P)	
	A	B	C	D		settimana	trattamento
<i>fecal score</i>	1,1 ^a	1,6 ^b	1,7 ^b	1,8 ^b	0,7	0,0001	0,04

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Tabella 12. Ingestione di SS e digeribilità delle diverse frazioni analitiche nei gruppi sperimentali.

	Gruppi sperimentali				SE	Effetto (P)	
	A	B	C	D		Trattamento	
Ingestione di SS (g/d)	1665	1590	1450	1725	0.015	0.19	
<i>Digeribilità</i>							
SS	0.70	0.72	0,75	0,73	0.019	0.51	
SO	0.76	0.80	0.81	0.80	0.015	0.37	
PG	0.65	0.70	0.74	0.71	0.022	0.19	
NDF	0.52	0.53	0.59	0.55	0.032	0.64	

Tabella 13. Effetto del trattamento su peso finale, incremento di peso totale e incremento medio giornaliero dei gruppi sperimentali.

	Gruppi sperimentali				SE	Effetto (P)	
	A	B	C	D		Settimana	Trattamento
Peso finale (kg)	89.9	95.4	97.6	97.3	3.40	0.46	
Incremento di peso totale (kg)	50.4	56.4	58.9	56.8	2.60	0.23	
Incremento medio giornaliero (g/d) settimana 1-11	640	708	718	749	122	0.0001	0.20

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

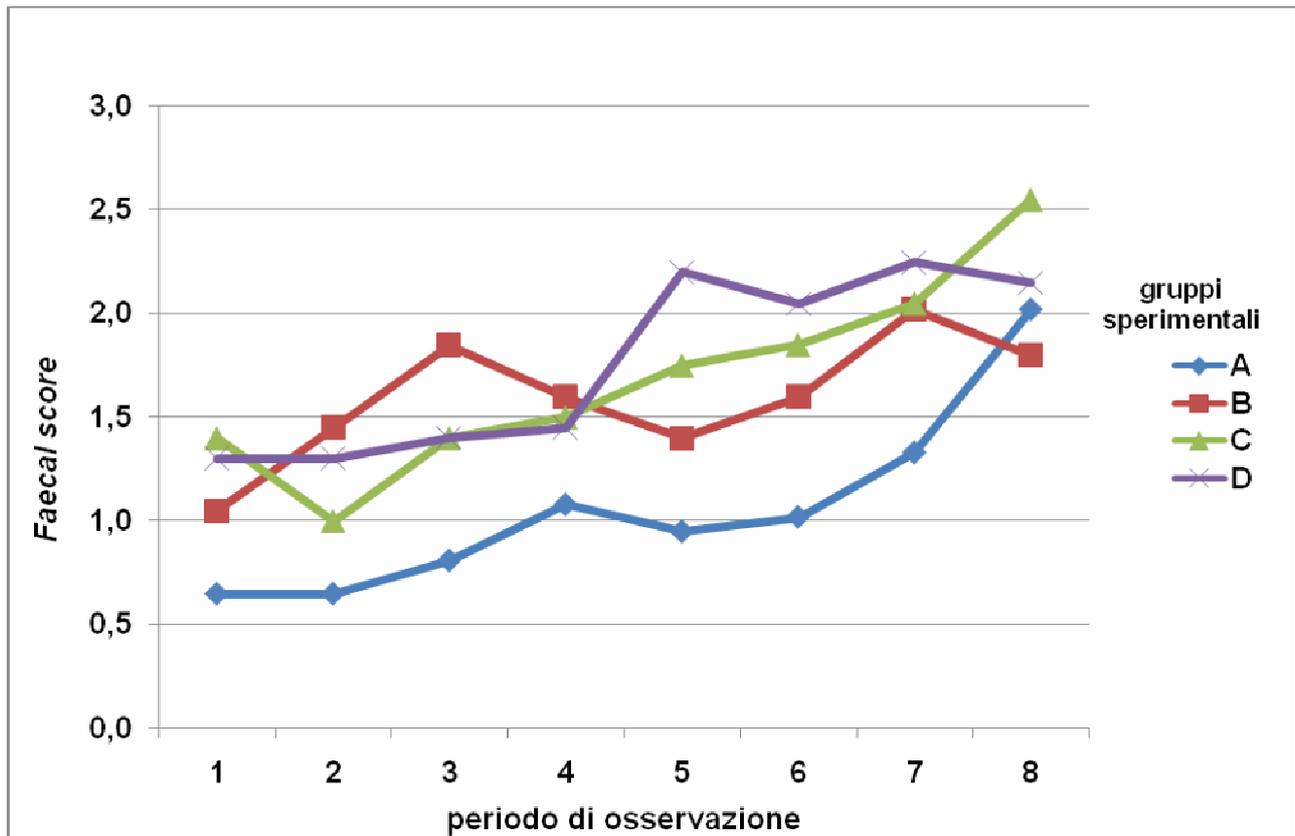


Grafico 1. Andamento del *faecal score* nei quattro gruppi sperimentali

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

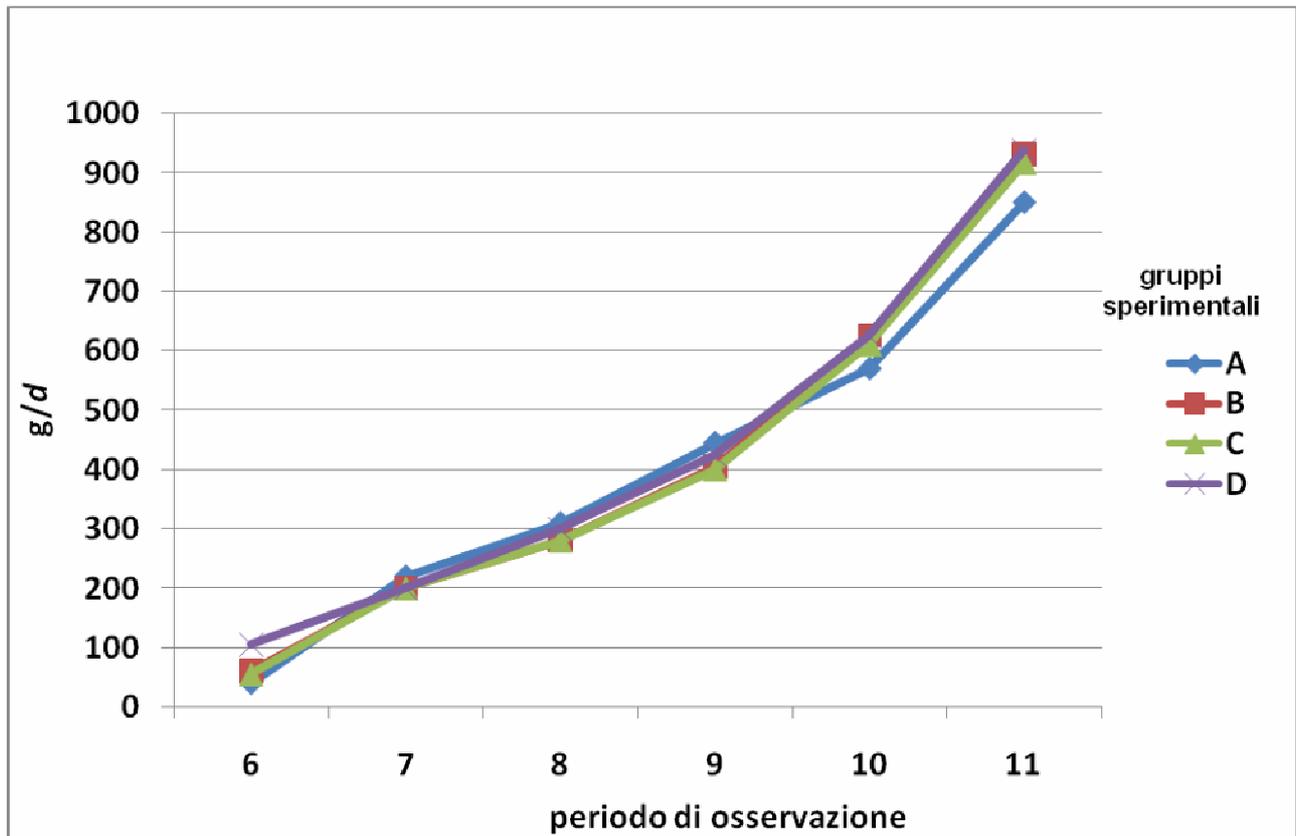


Grafico 2. Ingestione di SS dell'unifeed dei quattro gruppi sperimentali nelle settimane di sperimentazione

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

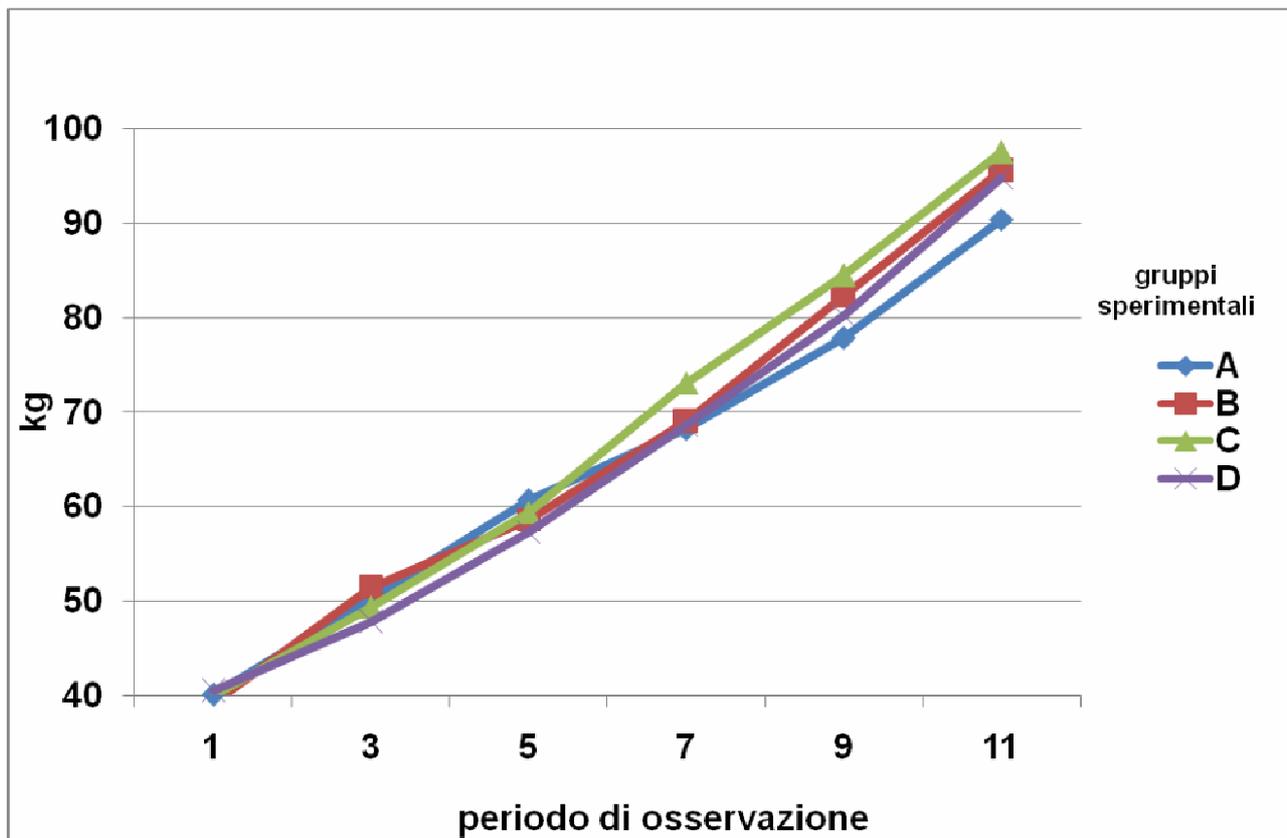


Grafico 3. Andamento del peso vivo dei vitelli dei gruppi sperimentali

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

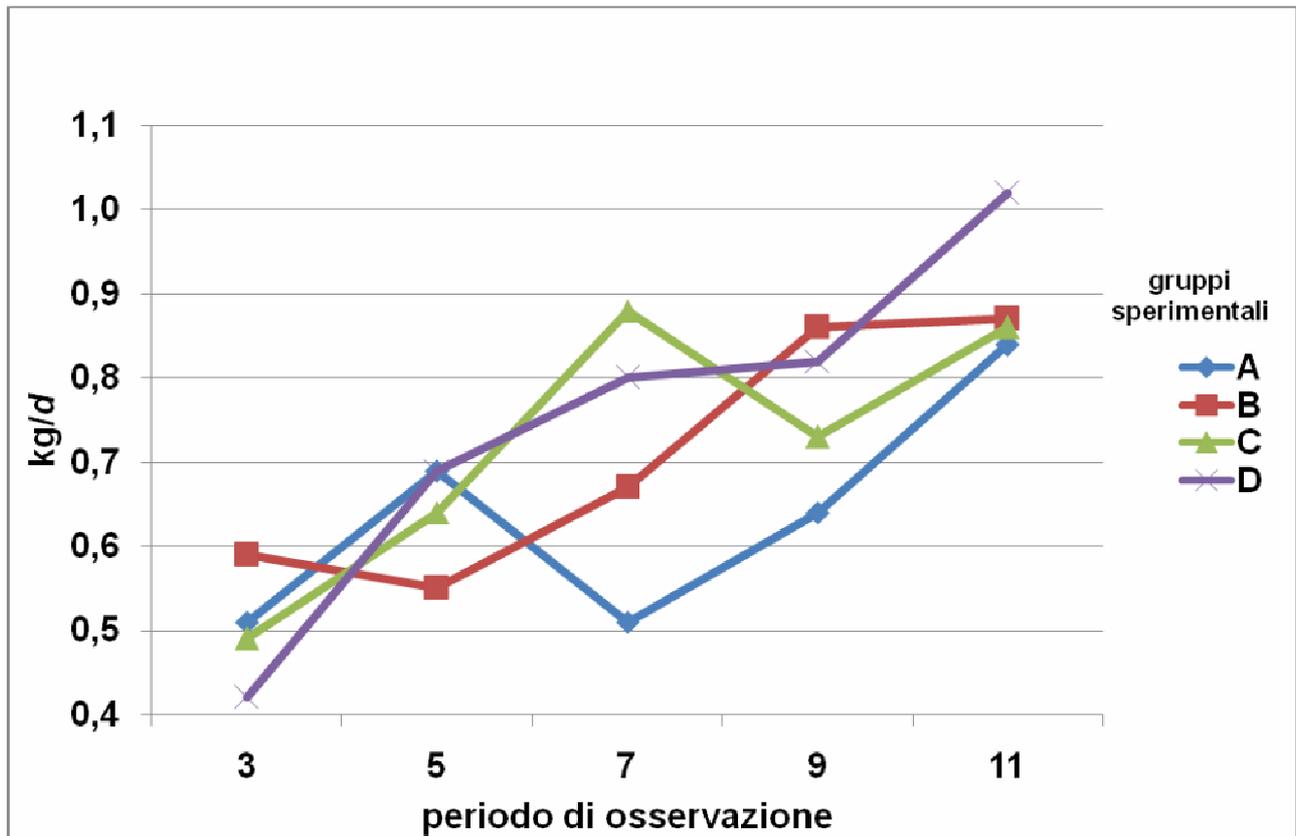


Grafico 4. Incrementi medi giornalieri dei vitelli nel periodo di osservazione

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

7. UTILIZZO DELL'ESTRATTO SECCO DI *ASPERGILLUS ORYZAE* E DI *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

7.1. ESAME DELLA LETTERATURA

Nutrizionisti e microbiologi hanno largamente esaminato la possibilità di modificare l'ecosistema microbico ruminale al fine di migliorare la produttività dei ruminanti domestici e di stimolare lo sviluppo del rumine nei giovani animali per poter anticipare lo svezzamento e limitare i disturbi digestivi (Martin e Nisbet, 1992).

I prodotti microbici generalmente utilizzati per migliorare la funzionalità ruminale si basano sostanzialmente su cellule (vitali o non) di *Saccharomyces cerevisiae* o su estratti della fermentazione dell'*Aspergillus oryzae*, normalmente privo di cellule vitali. L'efficacia di questi additivi fungini sulla produttività dei ruminanti è stata oggetto di numerose ricerche, molte delle quali hanno valutato l'effetto dei lieviti sul consumo di sostanza secca e sulla produzione lattea nei bovini (Harris e Lobbo, 1988; Erdman e Sharma, 1989; Arambel e Kent, 1990; Harris e Webb, 1990; Bernard, 1992; Harris *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1992; Higginbotham *et al.*, 1994). L'utilizzo dei lieviti ha incrementato il numero dei batteri cellulolitici (Wiedreiner, 1987; Harrison *et al.*, 1988) e proteolitici (Yoon e Stern, 1996) con miglioramento della digeribilità delle emicellulose (Wiedreiner, 1987). Tuttavia, le ricerche condotte sulla digeribilità non sempre hanno fornito risultati univoci (Harrison *et al.*, 1988; Kim *et al.*, 1992; Yoon e Stern, 1996). Callaway e Martin (1997), in uno studio condotto allo scopo di determinare l'effetto di una coltura di lievito sull'utilizzazione del lattato e sulla digestione della cellulosa da parte dei batteri ruminali, hanno riscontrato che l'aggiunta del lievito ha fornito fattori di crescita solubili (acidi organici, vitamine del gruppo B e

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

aminoacidi) che hanno stimolato la crescita dei batteri ruminali che utilizzano il lattato e digeriscono la cellulosa, migliorando la fermentazione ruminale.

Williams *et al.* (1991) hanno evidenziato che l'aggiunta di colture fungine contenenti cellule vitali di lievito alla dieta per vacche da latte può aumentare sia l'ingestione, probabilmente per effetto della riduzione del lattato e di un aumento del pH ruminale, sia la produzione di latte. Harris e Lobb (1988), Harris e Webb (1990), Bernard (1992) e Higginbotham *et al.* (1994) hanno evidenziato, in seguito all'utilizzo di colture di lievito, un aumento della produzione lattea, anche se le differenze non hanno raggiunto la soglia della significatività statistica. Un aumento significativo della percentuale di grasso unitamente ad una significativa riduzione del contenuto in proteine nel latte è stata osservata da Harris e Lobb (1988) e Harris e Webb (1990) e Kim *et al.* (1992).

In una prova condotta da Doreau e Jouany (1998) su vacche da latte, sono stati riscontrati, alcune ore dopo il pasto, dei miglioramenti nella digeribilità della fibra e nella concentrazione di acidi grassi volatili, mentre la digeribilità della sostanza organica, il flusso di proteine duodenali, il numero di protozoi ruminali, il pH e la concentrazione di alcuni metaboliti plasmatici, non sono stati influenzati dall'aggiunta del *Saccharomyces*. Secondo Guedes *et al.* (2007), l'aggiunta di *S. cerevisiae* alla dieta incrementa il pH ruminale e la concentrazione di acidi grassi volatili, riduce la concentrazione di lattato e il rapporto acetato/propionato, ma non ha alcun effetto sulla concentrazione di N ammoniacale.

Più limitate sono state le ricerche che hanno studiato l'effetto degli additivi fungini nel vitello pre - ruminante (Wagner *et al.*, 1990; Beharka *et al.*, 1991; Quigley *et al.*, 1992; Seymour *et al.*, 1995; Kumar *et al.*, 1997; Agarwal *et al.*, 2002; Lesmeister *et al.*, 2004); anche in questo caso, i risultati sono stati variabili, probabilmente a causa delle diverse condizioni sperimentali relative, in particolare, al tipo e alla quantità di prodotto esaminato.

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

L'efficacia dell'*A. oryzae* nei vitelli è stato studiato solo da Beharka *et al.* (1991) che hanno evidenziato che questo prodotto permette di anticipare lo svezzamento e di migliorare l'attività microbica ruminale.

Più numerose sono stati gli studi condotti utilizzando il *S. cerevisiae*. Alcuni Autori (Wagner *et al.*, 1990; Quigley *et al.*, 1992; Seymour *et al.*, 1995; Agarwal *et al.*, 2002) non hanno evidenziato alcun effetto dell'aggiunta di *S. cerevisiae* su accrescimento, popolazione microbica ruminale o sui processi fermentativi ruminali nei vitelli giovani.

Al contrario, Kumar *et al.* (1997) hanno riscontrato un aumento del numero di batteri ruminali e modifiche negli acidi grassi volatili ruminali.

Lesmeister *et al.* (2004) hanno rilevato un aumento nell'ingestione di SS e delle *performance* di accrescimento di vitelli da latte alimentati con un mangime starter addizionato con 20 g/kg di SS di una coltura di *S. cerevisiae*.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

7.2. MATERIALI E METODI

7.2.1. DIETE E ANIMALI

Un mangime pellettato per lo svezzamento dei vitelli (Svezzocotton, Petrini, Bastia Umbra, Perugia) è stato addizionato (Concentrato Sperimentale – CSper) con 6 g/kg di SS di estratto secco della fermentazione di *Aspergillus oryzae* (Seb Diet Dry; AKRON, Arese, Milan, Italy) e 26 g/kg di SS *Saccharomyces cerevisiae* (Diamond V XPTM LS, 68 Diamond V Mills Inc., Cedar Rapids, IA, USA). Entrambi gli additivi contenevano cellule microbiche non vitali. Il concentrato privo di additivi fungini è stato utilizzato come controllo (CContr). Il concentrato sperimentale non è disponibile in commercio.

La ricerca è stata condotta nel periodo luglio - settembre 2005 in un'azienda bufalina in provincia di Caserta.

Quaranta vitelli bufalini (12 maschi e 28 femmine) sono stati separati dalle madri immediatamente dopo aver ricevuto il colostro e alloggiati in gabbie individuali (1.2 m di larghezza per 2.4 m di lunghezza) sollevate da terra circa 40 cm e disposte in una stalla ben ventilata. A circa 5 cm dal fondo grigliato delle gabbie era possibile inserire fogli di plastica rigida per raccogliere le feci. Le gabbie erano in metallo, provviste di mangiatoia esterna e di abbeveratoio ed erano pulite quotidianamente.

I vitelli hanno ricevuto per i primi 4 - 5 giorni di vita colostro aziendale e, in seguito, latte in polvere acidificato (Sloten 79 Italia, Crema), ricostituito in proporzione pari a 180 g/l. Il latte, era preparato quotidianamente e distribuito (a 18°) due volte al giorno (alle 8:00 e alle 15:00) mediante secchio munito di tettarella. Il latte è stato somministrato in quantità pari al 10% del peso vivo iniziale (in media 4 l/d), per le prime due settimane, e, successivamente, è stato distribuito seguendo il seguente schema:

- 5l/d dalla 4° alla 10° settimana;

Dott. Maria Luisa Varricchio

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- 4l/d all'11° settimana
- 3l/d alla 12° settimana.

A partire dai 10 giorni di età, i vitelli sono stati assegnati ad uno dei seguenti quattro gruppi sperimentali, omogenei per sesso, peso ed età:

1. CContr = mangime di controllo;
2. CContrF = mangime di controllo e fieno di loietto;
3. CSper = mangime sperimentale;
4. CSper = mangime sperimentale e fieno di loietto.

Il mangime e il fieno di loietto sono stati messi a disposizione degli animali a partire dal 21° giorno di età, in funzione del disegno sperimentale.

7.2.2. MISURE SPERIMENTALI

I vitelli sono stati pesati singolarmente al momento della formazione dei gruppi sperimentali (in media, 46.2, 46.6, 46.1, 46.7 kg per i gruppi CContr, CContrF, CSper, CSperF, rispettivamente); successivamente, i vitelli sono stati pesati ogni due settimane, al mattino subito prima della distribuzione della razione. Contemporaneamente, sono stati raccolti campioni individuali di feci per verificare presenza di parassiti e *Salmonella* spp.

Due volte a settimana è stata valutata la consistenza delle feci mediante *faecal score*, utilizzando la seguente scala

- 0 = diarrea severa;
- 1 = diarrea;
- 2 = semiconsistente;
- 3 = normale;
- 4 = duro.

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

L'ingestione di SS è stata valutata ogni settimana come differenza tra la quantità di alimento somministrata e i residui di mangiatoia.

7.2.3. PROVE DI DIGERIBILITÀ

Alla fine delle 12 settimane del periodo sperimentale, 5 vitelli per ciascun gruppo sperimentale sono stati utilizzati per la stima della digeribilità *in vivo* utilizzando le ceneri acido insolubili (AIA) come marcatore interno.

Il protocollo sperimentale ha previsto un periodo di adattamento di 7 gg, seguito da un periodo di raccolta feci di 6 gg, durante i quali i vitelli hanno ricevuto il 90% della quantità di alimento consumata durante il periodo di adattamento. Durante il periodo di prova, giornalmente è stato misurato il consumo di alimento e sono stati raccolti campioni rappresentativi sia di feci sia di alimenti su cui è stato immediatamente determinato, in stufa a ventilazione forzata (65°C), il contenuto in SS. I campioni così ottenuti sono stati conservati per le successive analisi di laboratorio.

7.2.4. DETERMINAZIONI ANALITICHE

Durante il periodo sperimentale sono stati raccolti campioni di alimenti a cadenza settimanale che sono stati unificati in un unico campione rappresentativo. Quest'ultimo è stato analizzato secondo le procedure suggerite da Martillotti *et al.* (1987) per la determinazione dei contenuti in SS, ceneri e PG come descritto dalle procedure. Il contenuto in sostanza organica (SO) è stato calcolato come differenza tra il contenuto in SS e in ceneri, queste ultime determinate per incenerimento in muffola a 550°C per una notte.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

La fibra al detergente neutro (NDF) e la fibra al detergente acido (ADF) sono state determinate secondo le indicazioni di Van Soest *et al.* (1991) senza l'uso di amilasi e sodio solfito per l'NDF. Il contenuto in lignina è stato determinato per solubilizzazione della cellulosa con acido solforico, in accordo con Robertson e Van Soest (1981). Tutte le analisi sono state eseguite in doppio. I campioni di alimenti, residui e feci raccolti durante la prova di digeribilità, sono stati sottoposti alle stesse analisi condotte per gli alimenti e alla determinazione del contenuto in ceneri acido insolubili mediante l'impiego di acido cloridrico 2N secondo la procedura di Van Keulen e Young (1977).

L'energia lorda è stata determinata mediante calorimetria (IKA C400, Staufen 122 Germany) utilizzando acido benzoico come standard.

7.2.5. ELABORAZIONI STATISTICHE

I dati sono stati analizzati con il pacchetto statistico Statistical Analysis System (SAS, 1990).

I dati di *faecal score*, incremento medio giornaliero, ingestione di SS totale e ingestione di SS del mangime sono stati sottoposti ad analisi della varianza per misure ripetute utilizzando il trattamento (CContr, CContrF, CSper, CSperF) come fattore non ripetuto e la settimana di osservazione e l'interazione settimana di osservazione x trattamento come fattori ripetuti. L'unità sperimentale è stata considerata il singolo vitello.

L'efficienza di conversione alimentare, espressa come la quantità di alimento consumato divisa per incremento ponderale totale, l'incremento ponderale totale e i coefficienti di digeribilità apparente sono stati analizzati mediante analisi della varianza utilizzando il trattamento come fattore di variazione. Quando sono stati evidenziati effetti

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

significativi ($P < 0.05$), sono stati utilizzati contrasti ortogonali (CContr *vs* CSper, CContrF *vs* CSper e CSper *vs* CSperF) per determinare le differenze tra i trattamenti.

L'ingestione di SS del fieno è stata analizzata mediante analisi della varianza per misure ripetute, con il trattamento (CContrF e CSperF) come fattore di variazione e la settimana di osservazione e l'interazione settimana di osservazione x trattamento come fattori entro gli animali.

Dove opportuno, è stato usato il *t* test per identificare le differenze tra le medie. La significatività è stata stabilita con $P < 0.05$ e le tendenze con $0.05 < P < 0.10$.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

7.3. RISULTATI

La composizione chimica degli alimenti e delle diete utilizzate durante il periodo sperimentale è riportata nella tabella 14.

Il mangime sperimentale e quello di controllo hanno presentato una composizione chimica molto simile; alcune differenze sono state evidenziate nella percentuale in NDF del mangime sperimentale che è apparsa più bassa paragonata a quella del mangime di controllo, probabilmente a causa della presenza nel mezzo di crescita degli additivi fungini di zuccheri rapidamente fermentescibili.

Rispetto alle diete a base di solo concentrato, l'integrazione con il fieno ha determinato un aumento in NDF, ADF e lignina e una riduzione del contenuto in PG delle diete.

Non è stato registrato nessun decesso tra gli animali dei gruppi sperimentali, né sono stati trovati campioni di feci positive all'analisi di parassiti o *Salmonella* spp. nelle 12 settimane di prova.

Per tutte le variabili riportate nella tabella 15, l'interazione settimana di osservazione per trattamento inserita nel modello statistico è risultata non significativa.

7.3.1. FAECAL SCORE

L'inclusione degli additivi fungini nel mangime ha portato ad un migliore *faecal score* solo per i vitelli del gruppo CSperF rispetto a quelli del gruppo CContrF ($P < 0.001$). Le differenze tra i gruppi CContr e CSper non hanno raggiunto la soglia della significatività statistica, sebbene sia stata osservata una tendenza ($P < 0.125$) a valori più elevati nei vitelli trattati. Il gruppo CSperF ha mostrato in assoluto il valore più alto di *faecal score* (1.83). L'effetto della settimana di osservazione è apparso altamente

Dott. Maria Luisa Varricchio

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

significativo ($P < 0.001$), probabilmente a causa della progressiva diminuzione dell'incidenza della diarrea tra gli animali (grafico 5).

7.3.2. *INGESTIONE DI ALIMENTO*

L'ingestione di SS del concentrato, del fieno e totale è aumentata durante il periodo sperimentale (tabella 15); di conseguenza l'effetto della settimana di osservazione è sempre stato statisticamente significativo ($P < 0.001$).

La quantità di latte somministrata è stata stabilita in funzione del peso vivo iniziale dei vitelli, per le prime due settimane e, in seguito, è stata la stessa per tutti i vitelli; di conseguenza non può essere stata influenzata dal trattamento sperimentale.

Non sono state osservate differenze statisticamente significative tra i quattro gruppi sperimentali durante il periodo di osservazione relativamente all'ingestione di concentrato. Tuttavia, i vitelli che hanno ricevuto oltre al concentrato anche il fieno hanno consumato meno mangime (in media, - 20%) paragonati con quelli che hanno ricevuto esclusivamente concentrato. Queste differenze giustificano la significatività statistica dell'effetto del trattamento ($P < 0.015$).

Dalla 9° all'11° settimana l'ingestione di fieno è stata significativamente più elevata ($P < 0.015$) nel gruppo CSperF rispetto al gruppo CContrF; di conseguenza, anche l'ingestione di SS totale è apparsa significativamente più elevata per il gruppo CSperF (grafico 6).

7.3.3. *INCREMENTI PONDERALI*

Dott. Maria Luisa Varricchio

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Durante le settimane di osservazione il peso dei vitelli è aumentato linearmente, senza alcuna perdita di peso. Di conseguenza, l'effetto della settimana di osservazione sull'incremento ponderale giornaliero è apparso statisticamente significativo ($P < 0.001$) (grafico 7).

A partire dalla 7° settimana e fino al termine del periodo sperimentale, il gruppo CSperF ha mostrato incrementi medi giornalieri più elevati rispetto al gruppo CContrF (tabella 15).

Al contrario, le differenze tra i gruppi CContr e CSper non sono apparse statisticamente significative durante il periodo di osservazione tranne che nella 7° ed 8° settimana, allorché i vitelli alimentati con il concentrato sperimentale hanno mostrato un maggior incremento ponderale medio giornaliero ($P < 0.02$) (grafico 8).

7.3.4. *DIGERIBILITÀ IN VIVO*

I vitelli dei gruppi CSper e CSperF hanno evidenziato coefficienti di digeribilità maggiori rispetto a quelli dei gruppi CContr e CContrF (tabella 16); le differenze più elevate sono state osservate per i valori di digeribilità dell'NDF (grafico 9).

I coefficienti di digeribilità dei vitelli del gruppo CSperF rispetto a quelli del gruppo CSper sono apparsi più bassi per SS, SO, PG ed energia ($P < 0.001$), ma più elevati per l'NDF ($P < 0.001$) (grafico 9).

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

7.4. DISCUSSIONE

Nel corso della sperimentazione i vitelli sono apparsi in buono stato di salute e indenni da infezioni parassitarie. I risultati relativi al *faecal score* hanno messo in luce un miglior punteggio nei vitelli del gruppo CSperF. Questi dati, insieme alla tendenza osservata per il gruppo CSper a mostrare valori più elevati rispetto al gruppo CContr, sembrano indicare un effetto positivo del trattamento sperimentale sul *faecal score*.

L'effetto della somministrazione combinata di *S. cerevisiae* e *A. oryzae* è stata esaminata solo nelle vacche da latte (Wiedmeier *et al.*, 1987; Higginbotham *et al.*, 1994; Yoon e Stern, 1996), mentre nei vitelli questi additivi sono stati testati singolarmente. Ne consegue che il confronto tra i risultati di questa ricerca con quelli di studi precedenti deve essere fatto tenendo conto di questa differenza.

Beharka *et al.* (1991) non hanno trovato nessun effetto dell'*A. oryzae* sul FS dei vitelli, mentre risultati contrastanti sono stati evidenziati per il *S. cerevisiae*. Seymour *et al.* (1995) hanno notato una diminuzione della durata dei fenomeni diarroici quando il lievito è stato aggiunto alla dieta dei vitelli (10 g/kg di SS), attribuendo questo effetto alle sostanze nutritive, soprattutto vitamine e amminoacidi, apportate dal *S. cerevisiae*, che possono aver aiutato lo sviluppo della microflora intestinale benefica e, di conseguenza, ridotto lo stress e i disturbi digestivi. Agarwal *et al.* (2002) hanno evidenziato una diarrea di minor durata e incidenza nei vitelli che avevano ricevuto cellule vive di *S. cerevisiae*. Al contrario, Lesmeister *et al.* (2004) non hanno osservato alcun effetto dell'aggiunta di lievito spento (in quantità pari a 10 e 20 g/kg di SS) in un mangime per vitelli sulla durata della diarrea.

Nella nostra indagine non è stata rilevata alcuna influenza dell'aggiunta degli additivi fungini sul consumo di concentrato. Del resto, anche Beharka *et al.* (1991) in una prova su 112 vitelli non hanno evidenziato alcun effetto dell'aggiunta di *A. oryzae* sull'ingestione di SS, anche se è stata osservata una maggiore ingestione di SS in un gruppo di 40 giovenche della stessa prova, dovuta forse ad una minor variabilità in questo

Dott. Maria Luisa Varricchio

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

sottogruppo. Le ricerche che hanno preso in considerazione l'effetto del *S. cerevisiae* sull'ingestione di SS non hanno fornito risultati univoci. Alcuni Autori hanno osservato una riduzione dell'ingestione di SS in risposta all'aggiunta di lievito (Wagner *et al.*, 1990; Seymour *et al.*, 1995) alla dieta per vitelli. Quigley *et al.* (1992) hanno osservato che quantità ridotte di lievito incluse nel concentrato (2 g/kg di SS) non hanno effetto sull'ingestione di SS, mentre Lesmeister *et al.* (2004) utilizzando una dose di 20 g/kg di SS, hanno rilevato un aumento dell'ingestione di SS del mangime da parte dei vitelli. In quest'ultima ricerca i vitelli non ricevevano alcun tipo di foraggio ed il tipo di lievito e la quantità di prodotto addizionato al mangime sono stati simili a quelli utilizzati nella nostra prova. Tuttavia nella nostra ricerca, i vitelli sono stati alimentati con latte ricostituito per tutto il periodo sperimentale, mentre nello studio di Lesmeister *et al.* (2004) i vitelli sono stati svezzati a cinque settimane di età. Di conseguenza, l'ingestione di SS del mangime nella fase post svezzamento riportata da Lesmeister *et al.* (2004) è stata approssimativamente quattro volte più elevata rispetto a quella osservata alla stessa età nella nostra prova per i vitelli che ricevevano la dieta CSper (in media 1538 g/d vs 402 g/d, rispettivamente, che corrispondono a circa 31 g/d vs 10 g/d di lievito spento). Sembrerebbe, quindi, che l'effetto del *S. cerevisiae* sull'ingestione di SS sia influenzata dalla quantità somministrata.

L'impiego degli additivi fungini ha determinato una maggiore ingestione di fieno e, quindi, un aumento dell'ingestione di SS totale nei vitelli del gruppo CSperF rispetto ai vitelli del gruppo CContrF. E' possibile che l'impiego del lievito abbia positivamente influenzato l'azione dei microrganismi cellulolitici (Williams *et al.*, 1991), aumentando, di conseguenza, la velocità di transito degli alimenti nel reticolo- rumine e, quindi, l'ingestione di fieno.

Nella nostra ricerca il gruppo CSperF dalla 7° settimana e fino al termine del periodo sperimentale ha fatto registrare incrementi ponderali giornalieri statisticamente più elevati.

Dott. Maria Luisa Varricchio

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Analogamente, Lesmeister *et al.* (2004) hanno osservato una maggiore ingestione di SS e un aumento degli incrementi ponderali nei vitelli alimentati con un concentrato arricchiti di lievito spento. Al contrario, altre ricerche hanno evidenziato un effetto del *Saccharomyces* sull'ingestione di SS e sugli incrementi ponderali lieve, o addirittura negativo, (Wagner *et al.*, 1990; Quigley *et al.*, 1992; Seymour *et al.*, 1995). Nella nostra ricerca i vitelli del gruppo CSperF hanno fatto registrare un maggiore consumo di fieno che, tuttavia, non è sufficiente *per se* a spiegare i maggiori incrementi ponderali osservati. Tuttavia, la maggiore digeribilità della fibra del gruppo CSperF, che sembra indicare una maggiore attività metabolica della microflora cellulolitica ruminale e, quindi, una maggiore disponibilità di acidi grassi volatili, può aver contribuito ad incrementare l'accrescimento dei vitelli. Infine, anche fattori quali idratazione, ingestione di acqua, escrezioni fecali, contenuto ruminale e incidenza di diarrea possono aver influenzato l'incremento ponderale.

Il trattamento sperimentale ha positivamente influenzato la digeribilità *in vivo* degli animali. A nostra conoscenza non sono state condotte in precedenza ricerche volte a valutare l'influenza del *Saccharomyces* e dell'*Aspergillus* sulla digeribilità dei vitelli. Le ricerche condotte sui ruminanti adulti non hanno fornito risultati univoci. Miglioramenti nella digeribilità in seguito all'impiego del *Saccharomyces* sono stati riportati da Dawson *et al.* (1990), Williams *et al.* (1991), Zinn e Borquez, (1993), e Yoon e Stern (1996). Tuttavia, in altre ricerche non è stato riscontrato alcun effetto del *Saccharomyces* sulla digeribilità ruminale o totale (Adams *et al.*, 1981; Dawson *et al.*, 1990; Malcolm e Kiesling, 1990; Doreau e Jouany, 1998; Zinn *et al.*, 1999).

Le modalità attraverso le quali gli estratti fungini migliorerebbero la digeribilità della fibra nei ruminanti adulti sono da ricondurre, per l'estratto di *A. oryzae*, alla presenza nel mezzo di coltura di enzimi extracellulari, e per il *Saccharomyces*, alla presenza di fattori di crescita (acidi organici, vitamine del gruppo B, aminoacidi) o intermedi metabolici che stimolano lo sviluppo dei batteri ruminanti che utilizzano il lattato e digeriscono la cellulosa

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

(Dawson *et al.*, 1990; Varel e Kreikemeier, 1993; Callaway e Martin, 1996). Questa ipotesi è supportata anche dai risultati ottenuti da Kumar *et al.* (1994, 1997), che hanno osservato (con diete sia ad alto sia a basso contenuto in foraggio) un notevole aumento della concentrazione di batteri totali e di batteri cellulosolitici nel fluido ruminale di vitelli bufalini alimentati con cellule spente di *S. cerevisiae*.

La somministrazione di fieno ha influenzato la digeribilità delle diverse frazioni analitiche. Tuttavia, se la minore digeribilità di SS, SO, PG ed energia nei vitelli alimentati con il fieno è un risultato in qualche misura prevedibile, lo stesso non può dirsi per la maggiore digeribilità dell'NDF. Probabilmente, la presenza del fieno nella dieta ha stimolato la crescita dei microrganismi cellulosolitici ruminali in misura maggiore rispetto ai vitelli che non hanno ricevuto il fieno.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

7.5. CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

I risultati relativi all'inclusione di *S. cerevisiae* e dell'estratto della fermentazione di *A. oryzae* in un concentrato del commercio possono essere così riassunti:

- i vitelli del gruppo CSperF hanno evidenziato una migliore consistenza delle feci. Questo risultato, insieme alla tendenza per un miglior FS osservata nei vitelli CSper rispetto a quelli del gruppo CCont, sembra indicare un effetto positivo dell'impiego degli additivi fungini testati sulla consistenza delle feci;
- non sono state evidenziate differenze relativamente al consumo di concentrato, mentre quello del fieno è apparso significativamente più elevato nel gruppo trattato rispetto al controllo dalla 9° all'11° settimana di sperimentazione;
- i vitelli del gruppo CSperF hanno evidenziato migliori incrementi ponderali medi a partire dalla 7° settimana e fino al termine della sperimentazione;
- la digeribilità dei vitelli è stata positivamente influenzata dal trattamento sperimentale

L'insieme dei risultati ottenuti indica che nelle condizioni sperimentali testate, la somministrazione di *Saccharomyces cerevisiae* ed *Aspergillus oryzae*, ha migliorato l'efficienza digestiva dei vitelli bufalini. In presenza di fieno nella dieta, i vitelli trattati hanno evidenziato anche un significativo miglioramento del FS, del consumo di fieno, dell'incremento ponderale giornaliero e della digeribilità dell'NDF. In definitiva gli additivi fungini testati sembrano agire stimolando la crescita dei batteri cellulolitici, con conseguente incremento dell'ingestione di fieno e digeribilità della fibra.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

8. CONCLUSIONI

L'indagine condotta sull'impiego degli additivi microbici durante la fase di alimentazione lattea dei vitelli bufalini ha evidenziato che sia il probiotico a base di *Enterococcus faecium* sia gli estratti *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus oryzae* hanno migliorato la consistenza delle feci. L'utilizzo degli estratti di *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus oryzae*, ha incrementato anche l'efficienza digestiva dei vitelli.

Un miglioramento del *faecal score* rappresenta un risultato di particolare importanza in considerazione del fatto che l'allevamento bufalino, nonostante i notevoli progressi registrati negli ultimi decenni nelle tecniche di svezzamento adottate, è ancora caratterizzato da elevati tassi di mortalità dei vitelli per diarrea, con ripercussioni negative a livello sia economico (perdita di vitelli) sia genetico (i vitelli morti possono essere figli di bufale molto produttive, con conseguente riduzione del differenziale selettivo).

In accordo con Krehbiel *et al.* (2003), un miglioramento delle *performance* di crescita nelle prime fasi della vita dei vitelli, quando prevalgono le malattie enteriche, non risulta particolarmente utile; molto più rilevante, invece, è il miglioramento dello stato di salute e la riduzione dell'incidenza della severità della diarrea.

In conclusione, i nostri risultati indicano che entrambi i prodotti testati possono migliorare lo stato di salute dei vitelli durante la fase di alimentazione lattea. Gli estratti di *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus oryzae* migliorando anche la funzionalità ruminale, possono contribuire maggiormente a ridurre i problemi che si manifestano durante la fase di transizione dall'alimentazione liquida a quella solida.

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Tabella 14. Composizione chimica del mangime sperimentale e di controllo, del fieno di loietto e delle diete usate nella prova di digeribilità.

	Mangime ¹		Fieno di loietto	Diete ²	
	Sperimentale ³	Controllo		Con fieno di loietto	Senza fieno di loietto
Sostanza secca (g/kg)	862	872	898	908	907
Sostanza organica (g/kg)	915.9	921.8	901.9	915.1	919.5
Proteina grezza	180.4	177.2	100.0	176.9	200.7
Grassi	44.8	45.2	22.3	99.0	117.2
NDF	267.9	279.2	577.0	265.6	170.7
ADF	111.4	118.9	328.7	133.6	71.8
Lignina	29.2	25.7	38.1	21.6	17.1
Calcio	11.1	11.0	4.7	8.9	10.4
Fosforo	6.5	6.5	2.1	5.9	7.1
Sodio	2.6	2.5	1.2	3.1	3.7
Cloro	5.2	5.1	5.7	5.9	5.9
Potassio	10.8	10.8	15.2	12.3	11.3
Magnesio	5.3	5.4	2.2	5.3	6.3
Ferro (mg/kg)	12.1	12.0	612.0	417.0	312.0
Zinco	40.4	40.2	21.2	231.5	276.9
Manganese	25.4	25.2	83.0	176.5	190.1
Energia lorda (MJ/kg DM)	19.04	19.32	18.18	20.08	20.57

¹ Composizione mangime: farina estr. di soia, orzo, farina di frumento, melassa, mais fioccato, semi di cotone intero, soia fioccata, bicarbonato di sodio, carbonato di calcio, cloruro di sodio, vitamine e minerali

² Dieta con fieno: a base di concentrato, latte ricostituito e fieno di loietto; Dieta senza fieno: a base di concentrato, latte ricostituito senza fieno di loietto.

Dott. Maria Luisa Varricchio

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

³ Concentrato sperimentale con additivi microbici

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Tabella 15. Faecal score, incremento giornaliero medio, peso finale ed efficienza alimentare dei vitelli sottoposti ai diversi trattamenti.

	Trattamento ¹				ES	Settimana	Probabilità ²		
	CContr r	CContrF	CSper	CSper F			CContr vs CSper	CContrF vs CSperF	CSper vs CSperF
Faecal score	1.37	1.32	1.56	1.83	0.112	0.0003	0.125	0.0018	0.048
Ingestione di SS									
g/d									
mangime	517	403	527	434	17.2	0.0001	0.67	0.204	0.0002
fieno di loietto	-	252	-	290	8.3	0.0001	-	0.047	-
totale	1307	1407	1320	1478	18.0	0.0001	0.60	0.0057	0.0001
IGM³, g/d									
Settimana 1 - 12	451	464	502	529	13.6	0.0001	0.009	0.001	0.16
Peso finale, kg	88.7	90.1	93.2	95.9	2.36	-			
Efficienza alimentare⁴	0.25	0.26	0.22	0.24	0.009	-			

¹ CContr = mangime di controllo; CContrF = mangime di controllo e fieno di loietto; CSper = mangime sperimentale; CSper = mangime sperimentale e fieno di loietto.

² Probabilità dell'effetto della settimana. Quando l'effetto del trattamento è stato significativo ($P < 0.05$), sono stati utilizzati i contrasti ortogonali per individuare le differenze

³ Incremento medio giornaliero

⁴ kg di SS/kg di incremento

Dott. Maria Luisa Varricchio

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Tabella 16. Coefficienti di digeribilità apparente dei vitelli alimentati con i diversi trattamenti.

	Trattamento ¹				ES	Probabilità ²		
	CContr	CContrF	CSper	CSperF		CContr vs. CSper	CContrF vs. CSperF	CSper vs. CSperF
Sostanza secca	0.79	0.69	0.81	0.71	0.008	0.04	0.046	0.0001
Sostanza organica	0.81	0.72	0.83	0.74	0.008	0.034	0.045	0.0001
Proteine grezze	0.82	0.60	0.85	0.64	0.010	0.031	0.01	0.0001
NDF	0.32	0.47	0.41	0.56	0.027	0.029	0.028	0.0008
Energia	0.82	0.74	0.84	0.76	0.007	0.037	0.045	0.0001

¹CContr = mangime di controllo; CContrF = mangime di controllo e fieno di loietto; CSper = mangime sperimentale; CSperF = mangime sperimentale e fieno di loietto.

²Probabilità dell'effetto della settimana. Quando l'effetto del trattamento è stato significativo ($P < 0.05$), sono stati utilizzati i contrasti ortogonali per individuare le differenze

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

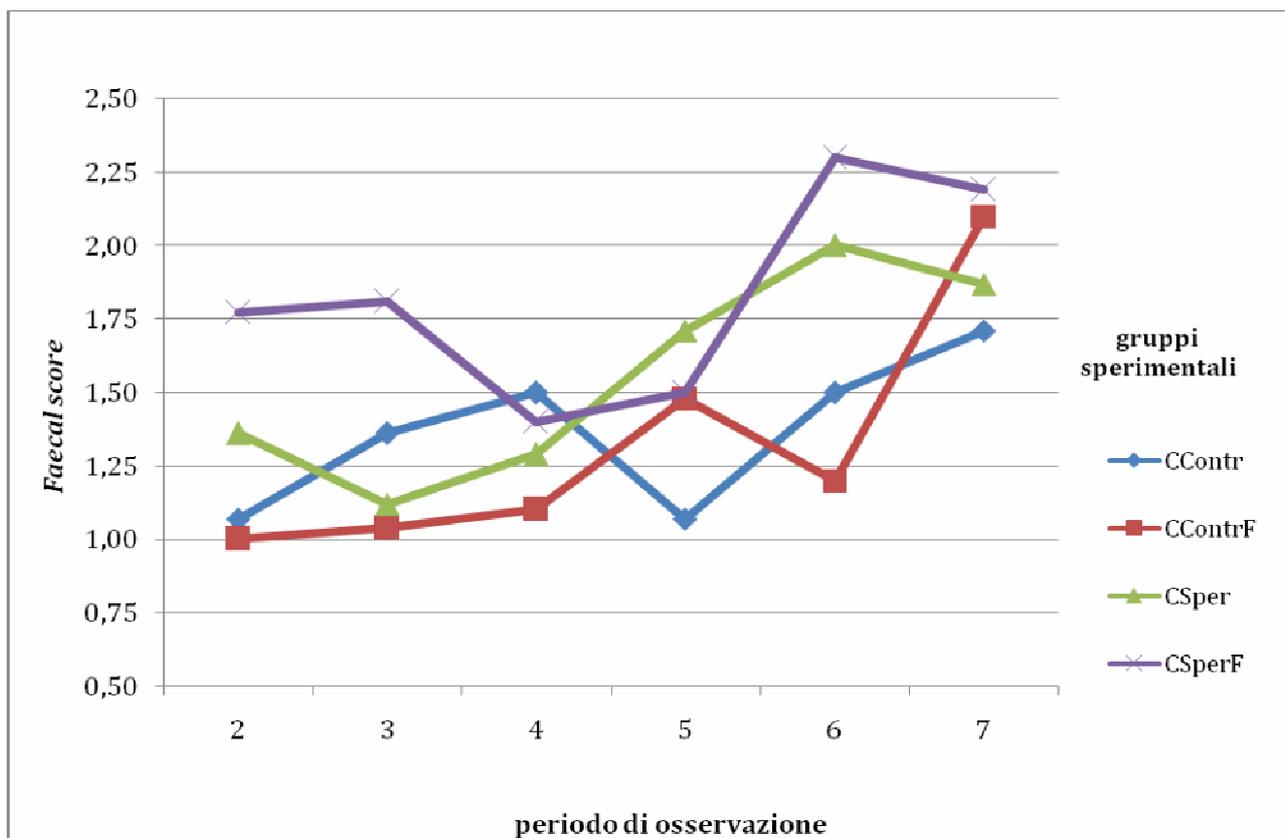


Grafico 5. *Faecal score* dei vitelli nel periodo di osservazione

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

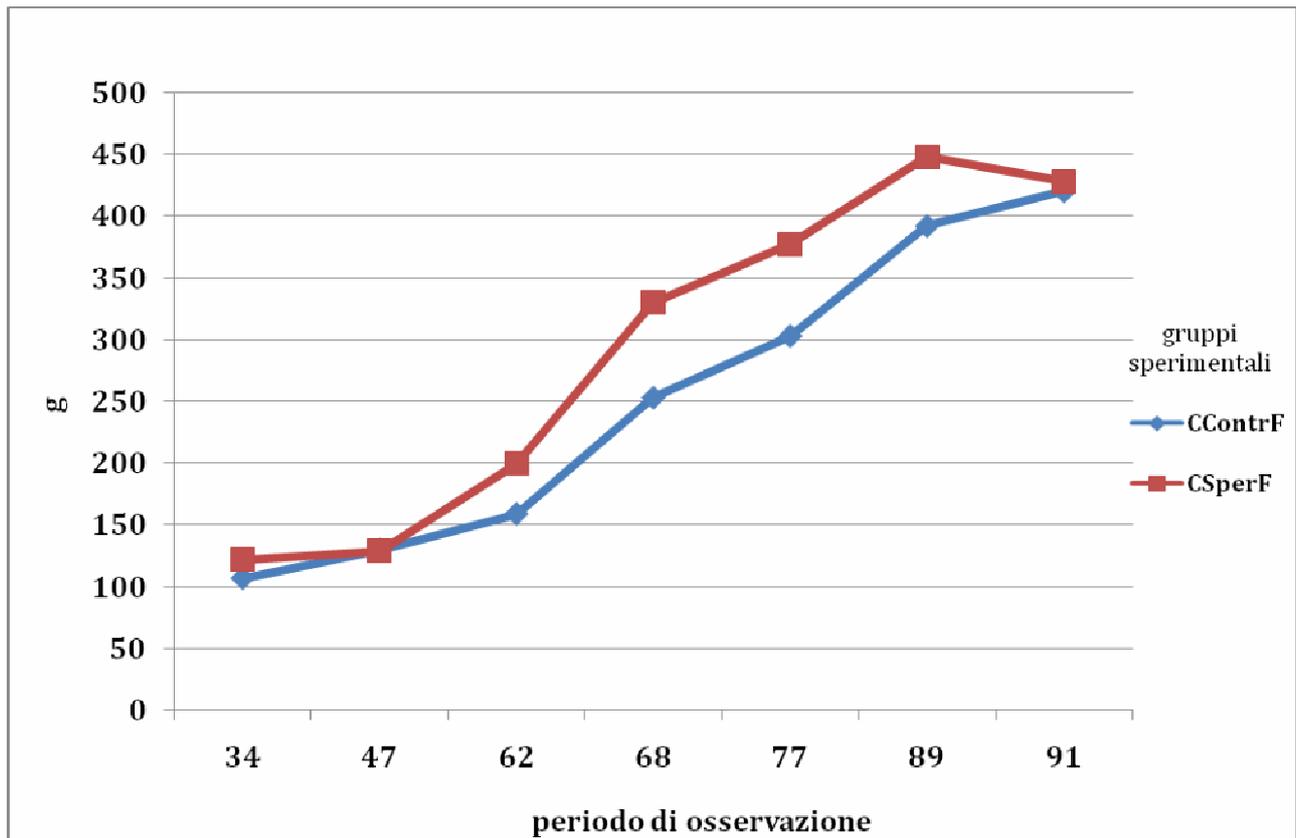


Grafico 6. Ingestione di fieno nei gruppi CContrF e CSperF nel periodo di osservazione

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

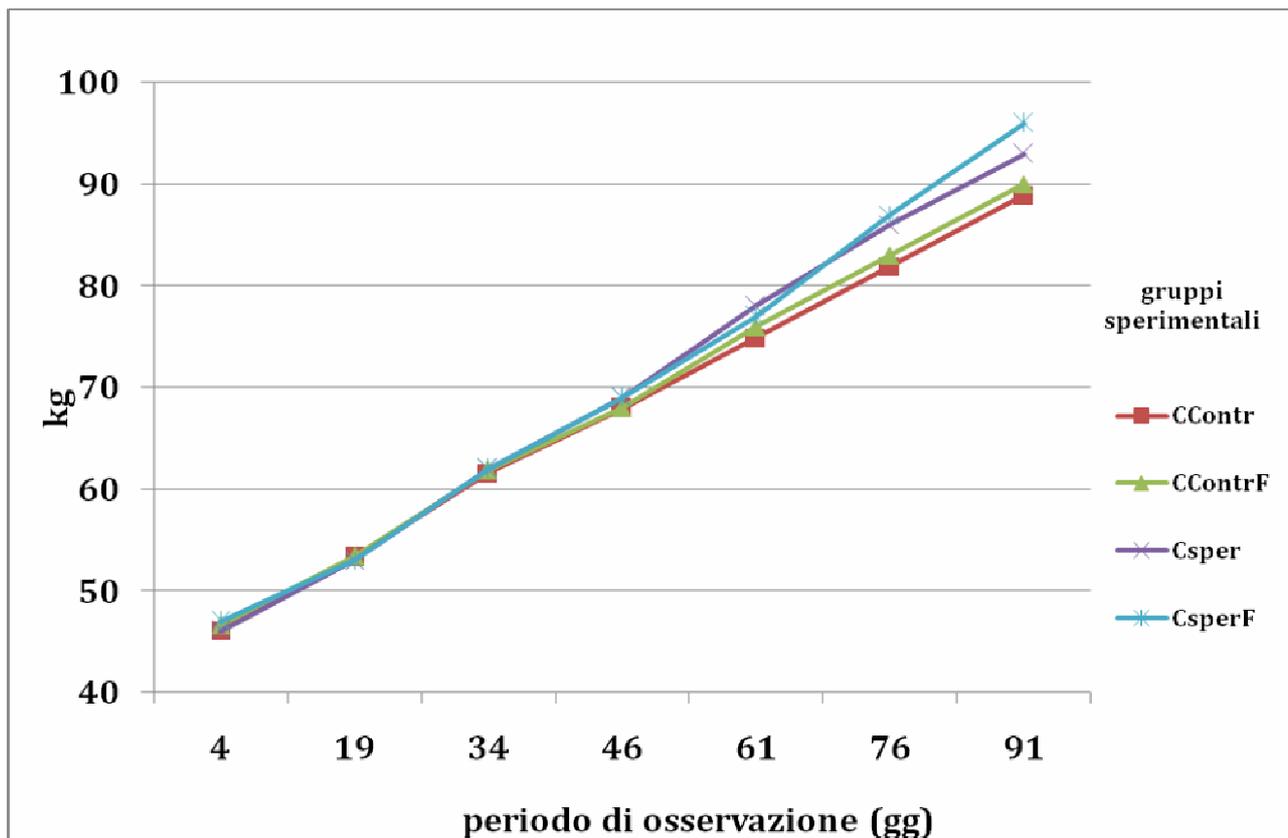


Grafico 7. Andamento del peso corporeo dei vitelli nel periodo di osservazione

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

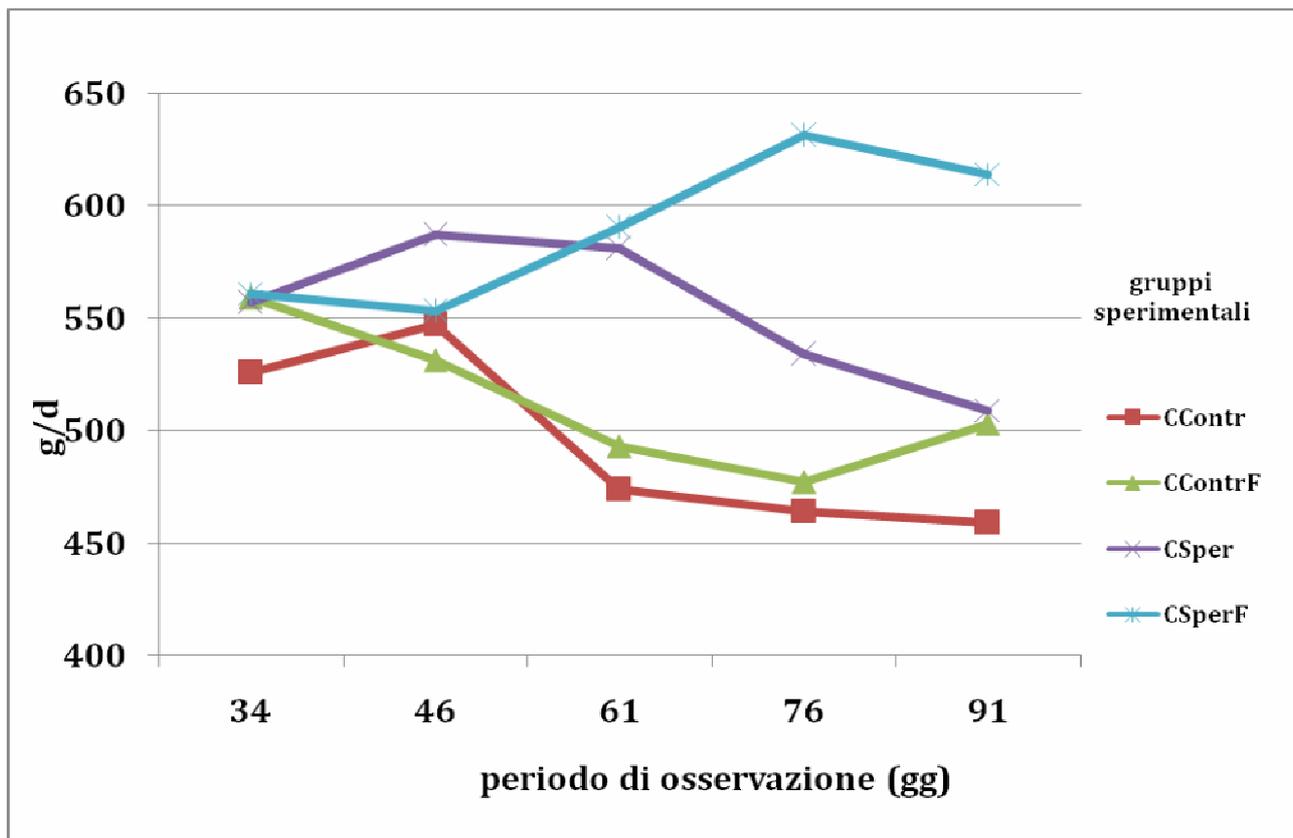


Grafico 8. Incremento medio giornaliero dei gruppi sperimentali durante il periodo di osservazione.

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

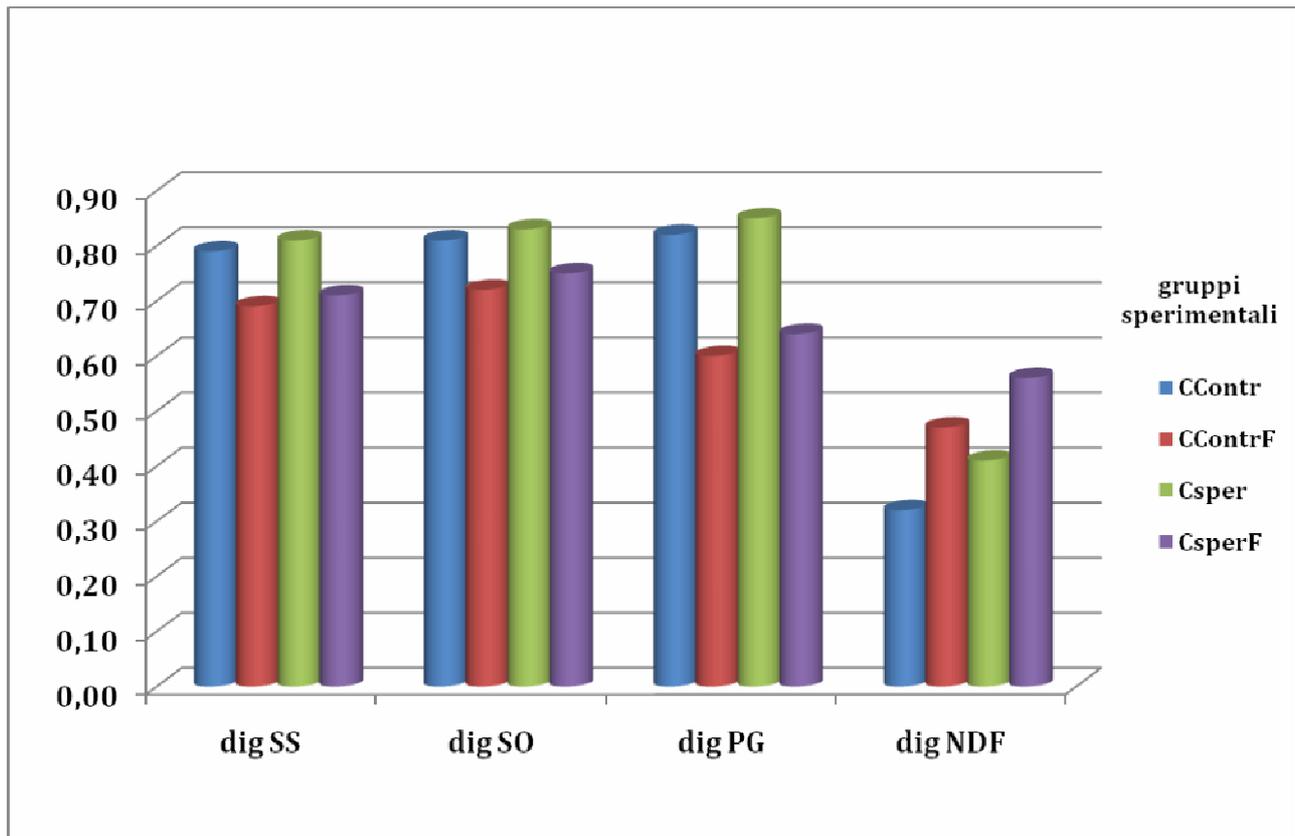


Grafico 9. Coefficienti di digeribilità apparente nei quattro gruppi sperimentali nel periodo di osservazione.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

9. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Adams D.C., Galyean M.L., Kiesling H.E., Wallace J.D., Finkner M.D. 1981. Influence of viable yeast culture, sodium bicarbonate and monensin on liquid dilution rate, rumen fermentation and feedlot performance of growing steers and digestibility in lambs. *J. Anim. Sci.* 53: 780 - 789.
- Aiba Y., Suzuki N., Kabir A.M., Takagi A., Koga Y. 1998. Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *Am. J. Gastroenterol.* 93:2097-2101.
- Ali-Haimoud-Lekhal D., Lescoat P., Bayourthe C., Moncoulon R. 1999. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* on milk yield and composition in dairy cows: A review. *Renc. Rech. Ruminants*, 6: 157.
- Anonymous 1995 Report of the ASM task force on antibiotic resistance. Suppl. to antimicrobial agents and chemotherapy.
- Anonymous 1988. Human health risks with the subtherapeutic use of penicillin or tetracyclins in animal feed. Institute of Medicine, The National Academy of Science, Washington, DC, USA.
- Arvola T., Laiho K., Torkkeli S., Mykkanen H., Salminen S., Maunul L. 1999. Prophylactic *Lactobacillus GG* reduces antibiotic-associate diarrhea in children with respiratory infections: a randomized study. *Pediatrics*;104 e 64.
- Auclair E. 2000. Yeast as an example of the mode of action of probiotics in monogastric and ruminat species. III Conference Show Feed Manufacturing in the Mediterranean.
- Ballongue, J. 1993 Bifidobacteria and probiotic action. In: Lactic acid bacteria (Salminen, A., Von Wreight A., eds.), pp. 357-428. Marcel Dekker, New York.
- Baquero F., Martinez B.J., Loza E., 1991. A review of antibiotic resistance patterns of *Streptococcus pneumoniae* in Europe. *J. Antimicrobial Chemother*, 28, suppl. C, 31-38.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- Bedford M.R. and Schulze, H. 1998 Exogenous enzymes for pigs and poultry. *Nutrition Research Reviews*, 11, 91-114.
- Beerman D.H. 1995 Existing and emerging strategies for enhancing efficiency and composition of meat animal growth. EU meeting presentation, Dec. 1995 Brussels.
- Beharka A.A., Nagaraja T.G. 1998. Effect of *Aspergillus oryzae* extract alone or in combination with antimicrobial compounds on ruminal bacteria. *J. Dairy Sci.* 81: 6.
- Bellomo G., Mangiagle A., Nicastro L., Frigerio G. 1980. A controlled double-blind study of SF68 strain as a new biological preparation for the treatment of diarrhoea in pediatrics. *Current Therapeutic Research.* 28: 927 – 936.
- Ben Omar N., Castro A., Lucas R., Abriouel H., Yousif N.M.K., Franz C.M.A.P., Holzapfel W.H., Pe´rez-Pulido R., Mart´inez-Can˜amero M., Ga´lvez A. 2004. Functional and safety aspects of enterococci isolated from different Spanish foods. *Systematic and Applied Microbiology* 27, 118– 130.
- Benyacoub J., Czarnecki-Maulden G.L., Cavadini C., Sauthier T., Anderson R.E., Schiffrin E.J., von der Weid T., 2003. Supplementation of food with *Enterococcus faecium* (SF68) stimulates immune functions in young dogs. *Journal of Nutrition* 133, 1158– 1162.
- Bernet M.F., Brassart D., Neeser J.R., Servin A.L. 1993. Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions.- *Appl Environ Microbiol* 59, 4121-4128.
- Bertin G., Brault M., Baud M., Mercier M. and Tournut J. 1997a. *Saccharomyces cerevisiae* I- 1079, microbial feed additive: Zootechnical effects on piglets. In: Proc. VIIth Int. Symposium on Digestive Physiology in Pigs, Laplace, J.P., Fevrier, C. and Barbeau, A. (eds), 26-28 May 1997, St Malo (France). EAAP Publication, 88: 446-449.
- Bertin G., Brault M., Mercier M., Baud M., Tournut, J. 1997b. Efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* I-1079 as a microbial feed additive in the diet of the pregnant and lactating sows. In: Proc. VIIth Int. Symposium on Digestive Physiology in Pigs, Laplace, J.P.,

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Fevrier, C. and Barbeau, A. (eds), 26-28 May 1997, St Malo (France). EAAP Publication, 88: 450-453.

Bleichner G., Ble'haut H., Mentec H., Moysse D. 1997. *Saccharomyces boulardii* prevents diarrhea in critically ill tube-fed patients: a multicentre, randomized, doubleblind placebo-controlled trial. *Intensive Care Medicine*. 23: 517.

Boddy A.V., Elmer G.W., Mc Farland L.V., Levy R.H. 1991. Influence of antibiotics on the recovery and kinetics of *Saccharomyces boulardii* in rats. *Pharm. Res.*, 8(6): 796-800.

Bordoni A. 2006. Progetto intesa. Probiotici e prebiotici. Coordinamento scientifico a cura di Unifarm SpA

Breul S. 1998. Les probiotiques en alimentation animale. *Med. Chir. Dig.* 27: 89 - 91.

Brugier G. and Patte F. 1975. Antagonisme in vitro entre l'ultra levure et différents germes bactériens. *Médecin de Paris*, 45: 61-66.

Bull L. S., Bush L. J, Friend J. D., Harris B. Jr., Jones E. W. 1965. Incidence of ruminal parakeratosis in calves fed different rations and its relation to volatile fatty acid absorption. *J. Dairy Sci.* 48:1459-1466.

Buts J.P., Bernasconi P., Van Craynest M.P., Maldague P., De Meyer R. 1986. Response of human and rats small intestinal mucosa to oral administration of *Saccharomyces boulardii*. *Pediatr. Res.*, 20(2): 192-196.

Buts J.P., Bernasconi P., Valrman J.P. Dive C. 1990. Stimulation of secretory IgA and secretory component of immunoglobulins in small intestine of rats treated with *Saccharomyces boulardii*. *Dig. Dis. Sci.*, 35: 251-256.

Buts J.P., De Keyser N., De Reademaeker L. 1994. *Saccharomyces boulardii* enhances rat intestinal enzyme expression by endoluminal release of polyamines. *Pediatr. Res.*, 36: 522- 527.

Callaway E.A. e Martin S.A. 1997. Effect of cellobiose and monensin on in vitro fermentation of organic acids by mixed ruminal bacteria. *J. Dairy Sci.*, 80: 1651-1655.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- Canganella F., Pagnini S., Ovidi M., Vettraino A., Bevilaqua L., Massa S., Trovatelli L. 1997. A microbiology investigation on prebiotic o pharmaceutical products used for human health. *Microbiol. Res.* 152 (2): 171 – 179.
- Caramia G. 2004. I probiotici da Metchnikoff alle attuali possibilità preventive e terapeutiche. *Ped. Med. Chir. (Med. Surg. Ped.)*. 26: 19 – 33.
- Castagliulo I., Lacant T., Nikulassan S.T. Pothoulakis C. 1996. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits *Clostridium difficile* toxin A effects in the rat Ileum. *Infect. Immun.*, 64(2): 5225-5232.
- Cevolani D. 2005. Gli alimenti per la vacca da latte. Materie prime e razioni per bovine ad alta produzione. Edagricole. Bologna, II edizione, 430 pp.
- Chapoy P. 1985. Treatment of acute infantile diarrhea: controlled trial of *Saccharomyces boulardii*. *Annales de Pediatrie*. 32: 561.
- Chaucheyras F., Fonty G., Bertin G. Gouet P. 1995. Effects of live *Saccharomyces cerevisiae* cells on zoospore germination, growth and cellulolytic activity of the rumen anaerobic fungus, *Neocallimastix frontalis* MCH3. *Curr. Microbiol.*, 31: 201-205.
- Chaucheyras F., Millet L. Michalet-Doreau B. 1997. Effect of the addition of Levucell *Saccharomyces cerevisiae* on the rumen microflora of sheep during adaptation to high starch diets. In: *Proc. of Evolution of the Rumen Microbial Ecosystem*, Chesson, A., Stewart, C.S. and Flint, H.J. (eds), RRI-INRA Rumen microbiology Symposium, 20-21 March 1997, Aberdeen (UK).
- Chesson A. 1987. Supplementary enzymes to improve the utilisation of pig and poultry diets. In *Recent Advances in Animal Nutrition- 1987*, pp 71-89. Edited by W. Haresign and DJA Cole Nottingham University Press, Nottingham.
- Chesson, A. 1994 Manipulation of fiber degradation: An old theme revised In. *Biotech. in the feed Ind. Proc.of Alltech's 10th annual Symp.* Edited by T.P. Lyons, KA Jacques, Nottingham University Press. pp. 83-98.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- Choi S.H., Lee S.O., Kim T.H., Chung J.W., Choo E.J., Kwak Y.G., Kim M.N., Kim Y.S., Woo J.H., Ryu J. Kim N.J. 2004 Clinical features and outcomes of bacteremia caused by *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus gallinarum*: analysis of 56 cases. *Clin Infect Dis* 38: 53–61.
- Cleveland J., Montville T.J., Nes I.F., Chikindas M.L., 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* 71, 1 – 20.
- Coconnier M.H., Lievin V., Hemery E., Servin A.L. 1998. Antagonistic activity against *Helicobacter* infection in vitro and in vivo by human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Appl Environ Microbiol*; 64:4573-80.
- Cole, C.B., Fuller R. 1984. A note on the effect of host specific fermented milk on the coliform population of the neonatal rat gut. *J. Appl. Bact.* 56, 495-498.
- Coppola S., Villani F., Coppola R., Parente E. 1990. Comparison of different starter systems for water-buffalo Mozzarella cheese manufacture. *Lait* 70, 411– 423.
- Coppola R., Blaiotta G., Ercolini D. Moschetti G. 2001. Molecular evaluation of microbial diversity occurring in different types of Mozzarella cheese. *J Appl Microbiol* 90: 414– 420.
- Corthier G., Dubos F., Ducluzeau R. 1986. Prevention of *Clostridium difficile* mortality in gnotobiotic mice by *Saccharomyces boulardii*. *Can. J. Microbiol.*, 32: 894-896.
- Cuaron P. 1999. Live yeast use in growing and finishing swine. Development of a study model. In: Proc. 3rd SAF-AGRI Symposium on Biotechnology Applied to Animal Nutrition, Merida, Mexico. 52
- Cummings J.H. 1997. The large intestine in nutrition and disease pp 155 Ed. Institut Danone, rue du Duc, 100 B. 1150 Bruxelles.
- Czop J.K. 1986. Characterization of a phagocytic receptor for Beta-glucan on macrophages cultured from murine bone marrow. *Path. Immunopath. Res.*, 5: 286-296.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- D'Aoust J.Y., Sewell A.M., Daley E., Creco P. 1992 Antibiotic resistance of agricultural and foodborne Salmonella isolates in Canada (1986- 1989). *J. Food Protect.*, 55, 428-434.
- D'Apuzzo V., Salzberg R. 1982. Treatment of acute diarrhea in pediatrics with *Streptococcus faecium*: results of a double blind study. *Therapeutische Umschau*. 39: 1033 – 1035.
- Daenicke R., Flachowsky G. 2001. Zur Wirkung des Probiotikums Toyocerin auf die Leistung von Aufzuchtka"lbern. In: R. Schubert G. Flachowsky G. Jahreis R. Bitsch (eds), *Proceedings of 8th Symposium Vitamine und Zusatzstoffe in der Erna"hrung von Mensch und Tier, Jena/Thuringia, 26–27 September. Fridrich- Schiller Universita" t, Jena, Germany.* pp. 521 – 526.
- Dawson K.A. 1993 Current and future role of yeast culture in animal production: a review of research over the last six years. In: *Biotechnology in the Feed Industry* (Lyons, T. P. ed) pp. 269-291. Alltech Te c h n i c a l Publications, Nicholasville, USA.
- De Leener E., Martel A., De Graef E.M., Top J., Butaye P., Haesebrouck F., Willems R., Decostere A. 2005. Molecular analysis of human, porcine, and poultry *Enterococcus faecium* isolates and their erm(B) genes. *Appl Environ Microbiol* 71: 2766–2770.
- De Vuyst L., Vandamme E.J. 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In: De Vuyst L., Vandamme E.J. (Eds.). *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications*. Blackie Academic & Professional, London, United Kingdom, pp. 91 –142.
- De Vuyst L., Foulquie' Moreno M.R., Revets H. 2003. Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *International Journal of Food Microbiology* 84, 299– 318.
- Devriese L.A., Collins M.D., Wirth R. 1991. The genus *Enterococcus*. In *The Prokaryotes. Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Application* ed. Balows A., Tru"per H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.H.. New York, Springer-Verlag. Pp. 1465 – 1481.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- Di Luzio, N.R. 1977. Küpfer cells and other liver sinusoidal cells, Wise, E. and Knoch, D.L. (eds). Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 397.
- Dierick, N.A. (1989) Biotechnology aids to improve feed and feed digestion enzymes and fermentation. Arch. Anim. Nutr., Berlin, 39, 241-249.
- Dierick, N.A. e Decuypere, J. (1995) Advances in the use of supplementary enzymes in pig nutrition. In 2nd Eur. Symp. on Feed enzymes, pp. 23-29, Proc. of ESFE2, Noordwijkerhout, The Netherlands 25-27 Oct., 1995 Ed. by Vanhartingsveldt, Hessing M, Vander lught, JP. And Somers WAC.
- Donohue D.C. e Salminen S. 1996. Safety of prebiotico bacteria. Asia Pacific Journal of Clin. Nutr. 5: 25 – 28.
- Doreau M. e Jouany J.P. 1998. Effect of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on nutrient digestion in lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 81:3214 – 3221.
- Du Toit M., Franz C.M.A.P, Dicks L.M.T., Holzapfel W.H. 2000. Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. Journal of Applied Microbiology. 88: 482 – 494.
- Ducluzeau, R. and Bensaada, M. (1982). Effets comparés de l'administration unique ou en continu de *Saccharomyces boulardii* sur l'établissement de diverses souches de *Candida* dans le tractus digestif de souris gnotoxeniques. Ann. Microbiol., 133B: 491-501.
- Dunne, C., Murphy, L., Flynn, S., O'Mahony, L., O'Halloran, S., Feeney, M., Morrissey, D., Thornton, G., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., Quigley, E.M.M., O'Sullivan, G.C., Shannon, F. and Collins (1999). Probiotics from myth to realty. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. Anton. Leeuw. Int. J.G. 76, 279-292.
- Durand-Chaucheyras F., Fonty G. Bertin G. 1997. L'utilisation des levures vivantes additive microbien chez le ruminant. Bull. G.T.V., 5-B, 576: 32-52.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- Durand-Chaucheyras F., Fonty G., Bertin G., Theveniot M. Gouet P. 1998. Fate of Levucell S C I-1077 yeast additive during digestive transit in lambs. *Reprod. Nutr. Dev.*, 38: 275-280.
- Eckles, C. H., and V. M. Williams. 1925. Yeast as a supplementary feed for lactating cows. *J. Dairy Sci.* 8:89.
- EEC. Directive 70/524, 1970. *Official J. L.*, 270, 14, 12.
- El Hennawy, A.A., Tse Wong, C. and Kocoshis, S.A. (1994). Failure of *Saccharomyces boulardii* to hydrolyse bile acid in vitro. *Microbios*, 80: 23-29.
- Elliot, D.A., Katcher, V.B. and Lowy, F.D. (1991). A 220-kilodalton Glycoprotein in yeast extract inhibits *Staphylococcus aureus* adherence to human endothelial cells. *Infect. Immun.*, 59(6): 2222-2223.
- Endtz H.P., van den Braak N., Verbrugh H.A., van Belkum A., 1999. Vancomycin resistance: status quo and quo vadis. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 18, 683– 690.
- Endtz H.P., Rijs G.J., Van Klingem B., Jansen W.B., Van der Reyden T., Mouton R.P. 1991. Quinolone resistance in *Campylobacter* isolated from man and poultry following their introduction in veterinary medicine. *J. Antimicrobial Chemother.* 27: 199 - 208.
- Ennahar S., Sashihara T., Sonomoto K., Ishizaki A., 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews* 24, 85–106.
- Erasmus L.J., Botha P.M., Kistner A. 1992. Effect of yeast culture supplementation on production, rumen fermentation and duodenal nitrogen flow in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 75: 3056-3065.
- Fantuz F., Polidori F., Salimei E. 1999. Colture di lievito (*Saccaromyces Cerevisiae*) e fermentazioni ruminali, possibili meccanismi d'azione. *Large Animal Review*, 5: 25-35.
- Fernandez-Diaz M.J. 1983. Olives. In: Rehm, H.J., Reed, G. (Eds.), *Biotechnology. Food and Feed Production by Microorganisms*, vol. 5. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 379–397.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- Fiems L O, Cottyn B G, Dussert L, Vanacker J M 1993 Effect of a viable yeast culture on digestibility and rumen fermentation in sheep fed different types of diets. *Reprod Nutr Devel* 33 43-49.
- Flatt, W. P., R. G. Warner, and J. K. Loosli. 1958. Influence of purified materials on the development of the ruminant stomach. *J. Dairy Sci.* 41:1593–1600.
- Floriano B., Ruiz-Barba J.L., Jimé'nez-Dí'az R., 1998. Purification and genetic characterization of enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a novel antilisterial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 4883–4890.
- Foulquie'Moreno M.R., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E., De Vuyst L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology* 106 1 – 24
- Franz C.M.A.P., Schillinger U., Holzapfel W.H. 1996. Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives. *International Journal of Food Microbiology* 29, 255– 270.
- Franz C.M.A.P., Holzapfel W.H., Stiles M.E. 1999a. Enterococci at the crossroads of food safety *International Journal of Food Microbiology* 47, 1 –24.
- Franz C.M.A.P., Muscholl-Silberhorn A.B., Yousif N.M.K., Vancanneyt M., Swings, J., Holzapfel, W. 2001. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 4385–4389.
- Franz C.M.A.P., Stiles M.E., Schleifer K.H., Holzapfel W.H. 2003. Enterococci in foods—a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology* 88, 105– 122.
- Frumholtz P.P., Newbold C.J., Wallace R.J. 1989. Influence of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on the fermentation of a basal ration in the rumen simulation technique (Rusitec). *J. Agric. Sci. (Camb.)* 113: 169 – 172.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- Fuller, R. 1975. Nature of the determinant responsible for the adhesion of lactobacilli to chicken crop epithelial cells. *J. Gen. Microbiol.* 87, 245-250.
- Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66. 365 – 378.
- Fuller R. 1991. Probiotics in human medicine. *Gut.* 32: 439 – 442.
- Fuller R. 1992. History and development of probiotics. In: *Probiotics, the scientific basis.* Ed. Fuller R. London, New York, Tokyo, Melbourne, Madras. Chapman e Hall.
- Garcia Estefan (1999). Feedyard performance and carcass traits of cattle as influenced by stocker phase implant strategy and yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* 8 x 10⁹ CFU/g; BIOSAF) supplementation during the feedyard phase. PhD Thesis, Texas A&M University, Amarillo.
- Gedek, B., (1981) Factors influencing multiple resistance in enteric bacteria in animals. In ten years on Swann, AVI Symposium London pp. 111- 126. Ed. AVI.
- Gedek, B. e Hagenhoff, G. (1988), Orale Verabreichung von Lebensfähigkeitszellen des Hefestammes *Saccharomyces cerevisiae*. Hansen. CBS. 5926. und deren Schicksal während der Magen-Darm-passage- Therapiewoche, 38, Sonderheft. 33-40.
- Gedek, B. (1989). Interaktion zwischen lebenden Hefezellen und darmpathogenen *Escherichia-colikeimen*. In: *Ökosystem Darm, Morphologie, Mikrobiologie, Immunologie*, Müller, J., Ottenjann, R. and Seifert, J. (eds). Springer Verlag, pp. 135-139.
- Gibson, G.R. and Roberfroid, M.B., (1995). Dietary modulation of the Human Colonic Microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. of Nutrition*, 125, 1401-1412.
- Giger-Reverdin, S., Bezault, N., Sauvant, D. and Bertin, G. (1996). Effects of probiotic yeast in lactating ruminants: Interaction with dietary nitrogen level. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 63: 149-162.
- Gilliland, S.E. 1981. Enumeration and identification of lactobacilli in feed supplements marketed as sources of *Lactobacillus acidophilus*. *Okla. Agric. Exp. Sta., Misc. Publ.* 108, 61-63.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- Giraffa G., Carminati D., Neviani E. 1997. Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. *Journal of Food Protection* 60, 732– 738.
- Giraffa G. 2002. Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews* 26, 163– 171.
- Girard, I.D. 1996. The mechanisms of action of yeast culture in stimulating ruminal fermentation. *Feed Compounder*, 16(11): 16-17.
- Goldin, B.R., Gorbach, S.L. 1984. The effect of milk and lactobacillus feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. *Am. J. Clin. Nutr.* 39, 756-761.
- Goldin B.R., Gorbach S.L., Saxelin M., Barakat S. 1992. Survival of Lactobacillus species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Dig. Dis. Sci.* 37: 121 - 128.
- Gomez-Alarcon R.A., Huber J.T., Higginbotham G.E., Wiesma F., Ammon D., Taylor B. 1991. Influence of feeding *Aspergillus oryzae* culture on the milk yields, eating patterns, and body temperatures of lactating cows. *J. Anim. Sci.* 69- 1733-1740.
- Gorbach S.L. 2002. Probiotics in the Third Millennium. *Digest. Liver. Dis.*:34 (suppl.21): S2 - 7
- Gournier, N., Larpent, J.P., Castellanos, M.I., Larpent, J.L.(1994). Les pro26 Impiego di antibiotici, probiotici, enzimi ed acidi organici nell'alimentazione animale biotiques en alimentation animale et humaine. Ed. Lavoisier. Paris.
- Green D.H., Wakeley P.R., Page A., Barnes A., Baccigalupi L., Ricca E., Cutting S.M. 1999. Characterization of two *Bacillus* probiotics. *Appl. Envir. Microbiol.* 65: 4288 – 4291.
- Guandalini S., Pensabene L., Kikri M.A., Dias J.A., Gobio Casali L., Hoekstra H. 2000 Lactobacillus GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter European trial. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*;30:54-60.
- Guarino, A.; Canani, R. B.; Spagnuolo, M. I., 1997: Oral bacteria therapy reduces the duration of symptoms and of viral excretion in children with mild diarrhea. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 25, 516.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- Guarino A., Bruzzese E. 2001. Interventi rassegna di terapia a cura di A. Martini. i probiotici: indicazioni cliniche certe e potenziali e meccanismi d'azione. dipartimento di pediatria dell'università "Federico II", Napoli. prospettive in pediatria. 31: 309-320 309
- Guarino A., Bruzzese E., Cerni Canani R. 2003. Microflora in inflammatory bowel disease. Atti 2nd Probiotics & Prebiotics, New Foods, Roma 7-9 settembre 2003; 172-193.
- Guilfoyle, D.E., Hirshfield, I.N.(1996). The survival benefit of short-chain fatty acids and the inducible arginine and lysine decarboxylase genes for *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* 22. 1-4.
- Haas W., Gilmore M.S. 1999. Molecular nature of a novel bacterial toxin: the cytolysin of *Enterococcus faecalis*. *Medical Microbiology and Immunology* 187, 183– 190.
- Hamiton-Miller J., Saha S., Winkler J. 1999. Public health issue arising from microbiological and labeling quality of foods and supplements containing probiotic microorganism. *Pubbl Health Nutr.* 2 (2): 223 – 229.
- Hansel R. 1988. Medizinische hefen as paramunitäts.Inducer: III. Inter. Presseworkshop Paris. *Therapie Woche* 38, Sonderheft November, pp. 5-7.
- Havenaar R., Brink N.G., Huis In't Ved J.H.J. 1992. Selection of strains for probiotics use. In: *In probiotics, the scientific basis*. Ed R. Fuller. London, New York, Tokyo, Melbourne, Madras: Chapman e Hall. Pp 210 – 224.
- Hays V.W. 1991. Effects of antibiotics. In: *Growth regulation in farm animals*. Pearson, A.M., Dutson, T.R. Ed., Elsevier Publishing, Essex, England. Vol 7, Chapter 10, pp. 299-320.
- Hinders R. G., e Owen F. G. 1965. Relation of ruminal parakeratosis development to volatile fatty acid absorption. *J. Dairy Sci.* 48:1069–1073.
- Hugas M., Garriga M., Aymerich M.T. 2003. Functionality of enterococci in meat products. *International Journal of Food Microbiology* 88, 223– 233.

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- Isolauri, E.; Juntunen, M.; Rautanen, T.; Sillanauke, P.; Koivula, T., 1991: A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* sp. strain GG) promotes recovery from acute diarrhoea in children. *Pediatrics* 88, 80.
- Isolauri E., Majamaa H., Arvola T., Rantala I., Viortanen E., Arvilommi H. 1993. *Lactobacillus casei* strain GG reverses increased intestinal permeability induced by cow milk in suckling rats. *Gastroenterology*;105:1645-9.
- Jensen B.B. 1993. The possibility of manipulating the microbial activity in the digestive tract of monogastric animals. In 44th. Annual Meeting of the European Association for Animal Production. Aarhus, Denmark.
- Jeroch H., Dänicke S. Brufau. J. 1994. Enzyme preparations in poultry feeding in 45th Annual Meeting of the European Association for Animal Production. Edingburgh, Scotland, 5 - 8 Sept.
- Jett B.D., Huycke M.M., Gilmore M.S. 1994. Virulence of enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*. 7: 462 – 478.
- Jones R.N., Kerhrberg E.N., Erwin. M.E., Anderson S.C. 1994. Prevalence of important pathogens and antimicrobial activity of parenteral drugs at numerous medical centers in the US. *Diagnostic Microbial of Infectious Disease*. 19 (4): 203 - 215.
- Judkins M.B., Stobart R.H. 1988. Influence of two levels of enzyme preparation on ruminal fermentation, particulate and fluid passage and cell wall digestion in wether lambs consuming either a 10% or 25% grain diet. *J. Anim. Sci.* 66: 1010 - 1015.
- Jurgens, M.H., Rikabi, R.A. and Zimmerman, D.R. (1997). The effect of dietary dry yeast supplement on performance of sows during gestation-lactation and their pigs. *J. Anim. Sci.*, 75: 593-597.
- Kalliomaki M., Kirjavainen P., Eerola E., Kero P., Salminen S., Isolauri E. 2001. Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J Allergy Clin Immunol*; 107:129-34.

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- Kelly, D., Begbier, R., King, T.P. (1994). Nutritional influences on interactions between bacteria and the small intestinal mucosa. *Nutr. Research Reviews*, 7, 233-257.
- Kirchgessner, M. and Roth, F.x. (1988). Effekte durch organische Säuren in der Ferkelaufzucht und Schweinemast. *Übersicht Tierernährung*. 16, 93-108.
- Klaenhammer T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 12, 39–86.
- Klaenhammer T.R., Fremaux C., Ahn C., Milton K. 1993. Molecular Biology of Bacteriocins Produced by Lactobacillus. *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria* (Hoover DG & Steenson LR, eds), pp. 151–177. Academic Press, San Diego, CA.
- Klare I., Werner G., Witte W. 2001. Enterococci. Habitats, infections, virulence factors, resistances to antibiotics, transfer of resistance determinants. *Contributions to Microbiology* 8, 108– 122.
- Korhonen, T.K. (1979). Binding specificity of piliated strains of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* to epithel cells. *FEMS Microbiol. Lett.*, 6: 421.
- Krause, D.O., Harrison, P.C., Easter, R.A. (1994). Characterization of the nutritional interactions between organic acids and inorganic bases in the pig and chick. *J. Anim. Sci.* 72. 1257-1262.
- Krehbiel C.R., Rust S.R., Zhang G., Gilliland S.E. 2003. Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: Performance response and mode of action. *Anim. Sci.* 81:E120-E132
- Kumagae S., Mitani K., Endo T. 2004. Effects of supplementary probiotics to two different diets on dry matter intake, daily gain, digestibility, ruminal pH, and fecal microbial populations and metabolites in ewes. *Animal Science Journal*. 75: 219–224.
- Kumar U, Sareen V K, Singh S 1994 Effect of *Saccharomyces cerevisiae* yeast culture supplement on ruminal metabolism in butalo calves given a high concentrate diet. *Anim Prod* 59: 209 - 215.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- Kumar U, Sareen V K, Singh S. 1997. Effect of yeast culture supplementation on ruminal microbial populations and metabolism in buffalo calves fed a high roughage diet. *J. Sci. Food Agric.* 73:231–236.
- Ledda A., Scintu M.F., Pirisi A., Sanna S., Mannu L. 1994. Technological characterization of lactococci and enterococci for the manufacture of Fiore Sardo sheep cheese. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia* 45, 443– 456.
- Lesmeister K.E., Heinrichs A.J., Gabli E.R. M.T. 2004. Effects of supplemental yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). Culture on rumen development, growth characteristics, and blood parameters in neonatal dairy calves. *J. Dairy Sci.* 87: 1832-1839.
- Lewenstein A., Frigerio G., Moroni M. 1979. Biological properties of SF68, a new approach for the treatment of diarrheal disease. *Current Therapeutic Research.* 26: 967 – 981.
- Lilly D., Stillwell R. 1965. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganism. *Science.* 147. 747 – 748.
- Line, J.E., Bailey, J.S., Cox, N.S., Stern, N.J., Tompkins, T. (1998). Effect of yeast supplemented feed on *Salmonella* and *Campylobacter* populations in broilers. *Poultry Sci.*, 77: 405-410.
- Linton A.H. 1981. Has Swann failed? *Vet. Rec.*, 104, 329-335.
- Litopoulou-Tzanetaki E., Tzanetakis N. 1992. Microbiological study of whitebrined cheese made from raw goat milk. *Food Microbiology* 9, 13– 19.
- Loehnert H.-J.; Ochrimenko, W. I.; Bargholz, J., 2000: Toyocerin in der Käseherstellung. *Proceedings of the Society for Nutrition and Physiology* 9, 75.
- Maertens, L. and De Groote, G. 1992. Effect of a dietary supplementation of live yeast on the zootechnical performances of does and weanling rabbits. *J. Appl. Rabbit Res.*, 15: 1079- 1086.
- Maisnier-Patin S., Forni E., Richard J. 1996. Purification, partial characterisation and mode of action of enterococcin EFS2, an antilisterial bacteriocin produced by a strain of

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Enterococcus faecalis isolated from a cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 30: 255 – 270.

Majamaa H., Isolauri E., Saxelin M., Vesikari T. 1995 Lactic acid bacteria in the treatment of acute Rotavirus gastroenteritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*; 20:333-8.

Maloney, C.A., Nemetchek, Hancock, J.D., Park, J.S., Cao, H. and Hines R.H. (1998). Effect of a yeast product in pelleted diets for weanling pigs. *J. Anim. Sci.*, 76, Suppl. 2: 47.

Manolopoulou E., Sarantinopoulos P., Zidou E., Aktypis A., Moschopoulou E., Kandarakis, I.G., Anifantakis E.M. 2003. Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. *International Journal of Food Microbiology* 82, 153– 161.

Martin S.A., Nisbet D.J. 1992. Effect of direct-fed microbials on rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 75: 1736-1744.

Martin, S.A. (1994) Potential for manipulating the gastro-intestinal flora. A review of recent progress. In *Biotechnology in the feed industry*. Alltech's 10th Annual Symposium, Lyons, T.P. (Ed) pp 155-166.

Massot J., Descauclous, J., Astoin, J. 1982. Protection par *Saccharomyces boulardii* de la diarrhée à *E. coli* du souriceau. *Ann. Pharmaceutiques Françaises*, 40(5): 445-449.

Mathieu F., Jouany J.P., Senaud J., Bohatier J., Bertin G., Mercier, M. 1996. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* on fermentations in the rumen of faunated and defaunated sheep; protozoal and probiotic interactions. *Reprod. Nutr. Dev.*, 36: 271-287.

Matsuzaki T. 1998. Immunomodulation by treatment with *Lactobacillus casei* strain shirota. *Int. J. Food Microbiol.* 41, 133-140.

Matsuzaki T., Yamazaki R., Hashimoto S., Yokokura T. 1998. The effect of oral feeding of *Lactobacillus casei* strain Shirota on immunoglobulin E production in mice. *J Dairy Sci*;81:48-53.

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- Mc Farland, L.V., Surowicz, C.M., Greenberg, R.N., Elmer, G.W., Moyer, K.A., Melcher, S.A., Bowen, K.E. and Cox, J.L. (1995). Prevention of Beta-lactam-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii* compared with placebo. *Am. J. Gastroenterology*, 90(3): 439-448.
- McAuliffe O., Ross R.P., Hill C., 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Reviews* 25, 285– 308.
- Metchnikoff E. 1907. *The prolongation of life*. Putman and Sons. 1 - 38.
- Miniello V.L., Francavilla R., Natila M., Leone M., Straziuso S., Armenio L. 2003. Probiotics: requirements and new perspectives in atopy. *Atti 2nd Probiotics & Prebiotics, New Foods, Roma 7-9 settembre 2003*; 196-200.
- Miranda, R.L.A., Mendoza, M.G.D., Barcena-Gama, J.R., Gonzalez, M.S.S., Ferrara, R., Ortega, C.M.E. and Cobos, P.M.A. (1996). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* or *Aspergillus oryzae* cultures and NDF level on parameters of ruminal fermentation. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 63: 289- 296.
- Mitra, A. K.; Rabbani, G. H., 1990: A double-blind, controlled trial of Bioflorin (*Streptococcus faecium* SF68) in adults with acute diarrhea due to *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Gastroenterology* 99, 1149.
- Mitsuoka T. 1992. Intestinal flora and aging. *Nutr. Rev.* 50: 438 – 446.
- Moll G.N., Konings W.N., Driessen J.M. 1999. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 185– 198.
- Morelli L. 2003. Ecosistema intestinale nel neonato e nel lattante. *Atti 59° Congresso Nazionale di Pediatria, Roma. 2*: 245 - 246.
- Morita H., He F., Fuse T., Ouwehand A.C. 2002. Adhesion of lactic acid bacteria to caco-2 cells and their effect on cytokine secretion. *Microbiol. Immunol.* 46: 293 - 297.
- Murray B.E. 1992. Problems and dilemmas of antimicrobial resistance. *Pharmacol.*, 12, 86-93.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- Murray B.E. 1995. What can we do about Vancomycin resistant Enterococci? *Clinical Infection Diseases*, 20, 1134-1136.
- Mutsvangwa, T., I. E. Edwards, J. H. Topps, and G. F. M. Paterson. 1992. The effect of dietary inclusion of yeast culture (YEA-SACC) on patterns of rumen fermentation, food intake, and growth of intensively fed bulls. *Anim. Prod.* 55:35-40.
- Nes I.F., Diep D.B., Havarstein L.S., Brurberg M.B., Eijsink V., Holo H., 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70, 113- 128.
- Newbold C J, Wallace R J, Chen X B, McIntosh F M 1995 Different strains of *Saccharomyces cerevisiae* differ in their effects on ruminal bacterial numbers in vitro and in sheep. *J. Anim. Sci.* 73: 1811 - 1818.
- Newbold C.J. 1996. Probiotics for ruminants. *Ann. Zootech.*, 45, Suppl.: 329-335.
- Newbold, C.J., Wallace, R.J. and McIntosh, F.M. 1996. Mechanisms of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. *Br. J. Nutr.*, 76(2): 249-261.
- Newbold C.J., McIntosh F.M. Wallace R.J. 1998. Changes in the microbial population of a rumen simulating fermenter in response to yeast culture. *Can. J. Anim. Sci.*, 78: 241-244.
- Newman K E, Spring P 1993 A comparison of two different strains of yeast in their ability to alter ruminal and caecal fermentations. *J Anim Sci* 71 (Suppl 1) 289 (abstr).
- Newman, K.E. 1995. Les mannan-oligosaccharides en nutrition animale. In *Alltech European Tour*, pp. 51.
- Nisbet, D.J. e Martin, S.A. 1990. Effect of dicarboxylic acids and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on lactate uptake by the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 3515-3518.
- Nisbet, D.J. e Martin, S.A. 1991. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* culture on lactate utilization by the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. *J. Anim. Sci.*, 69: 4628-4633.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- Nissen-Meyer J., Nes I.F. 1997. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Archives of Microbiology* 167, 67-77.
- Nousiainen, J. and Setälä, J. (1993). Lactic acid bacteria as animal probiotics. In *Lactic acid bacteria*.
- Ofek, I., Mirelman, D. and Sharon, N. (1977). Adherence of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptors. *Nature, UK*, 265: 623-625.
- Ohya T., Akiba M., Ito H. 2001. Use of a trial probiotic product in calves experimentally infected with *Escherichia coli* O157. *JARQ, Japan Agricultural Research Quarterly* 35: 189-194.
- Oksanen, P. J.; Salminen, S.; Saxelin, M.; Hamalainen, P.; Ihantola-Vormisto, A.; Muurasniemi-Isoviita, L.; Nikkari, S.; Oksanen, T.; Porsti, I.; Salminen, E., 1990: Prevention of travellers diarrhoea by *Lactobacillus GG*. *Annals of Medicine* 22, 53.
- Ouwehand A.C., Niemi P., Salminen S.J. 1999. The normal microflora does not affect the adhesion of probiotics bacteria in vitro. *FEMS Microbiol. Lett.*, 177: 35-38.
- Ouwehand A.C., Isolauri E., Salminen S. 2002 The role of intestinal microflora for the development of the immune system in early childhood. *Eur. J. Nutr.* 41: I32-I37.
- Oyofa, B.A., DeLoach, J.R., Corrier, D.E., Norman, J.O., Ziprin, R.L. and Mollenhauer, H.H. (1989). Prevention of *Salmonella typhimurium* colonization with D-mannose. *Poultry Sci.* 68: 1357-1360.
- Park, Y.K., Bearson, B., Bang, S.H., Bang, I.S., Foster, J.W. (1996). Internal pH crisis, lysine decarboxylase and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*.-*Mol. Microbiol.* 20, 605-611.
- Parker R.B. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim. Nutr. Heal.* 29: 4 – 8.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- Perdigon G., De Jorrat M.E.B., De Petrino S.F. De Budeguer M.V. 1991. Effect of oral administration of *Lactobacillus casei* on various biological functions of the host. *Food. Agric. Immunol.* 3: 93-102.
- Pessi T., Sutas Y., Hurme M., Isolauri E. 2000. Interleukin-10 generation in atopic children following oral *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Clin Exp Allergy*; 30:1804-8.
- Pillemer, L., Blum, L., Lepow, I.H., Ross, O.A., Todd, E.W. and Warlaw, A.C. (1954). The properdin system and immunity. I. Demonstration and isolation of a new. *Science*, 120: 279.
- Piva G., Belladonna S., Fusconi G., Sicbaldi F. 1993. Effects of yeasts on dairy cow performance, ruminal fermentation, blood components and milk manufacturing properties, *J. Dairy Sci.*, 76: 2717-2722.
- Piva, A. 1998. Non conventional feed additives. *J. of Anim. and Feed Science.* 7, 143-154.
- Piva, G. e Rossi, F. 1999. Future prospects for the non-therapeutic use of antibiotics. *Proceedings of the A.S.P.A. XIIIth Congress Piacenza. June 21-24.*
- Probert H.M., Gibson G.R. 2002. Bacterial biofilms in the human gastrointestinal tract. *Curr Issues Intest Microbiol.* 3:23-27.
- Pusztai, A. and Bardocz, S. (1995) *Lectins Biomedical Perspectives* Ed. Taylor and Francis.
- Roth, F.X. and Kirchgessner, M. *Zum Einsatz von Ameisensäure in der Tierernährung.* Ludwigshafen, Germany: BASF AG, 1995: 5-20.
- Putnam D.E., Schwab C.G., Socha M.T., Whitehouse N.L., Kierstead N.A., Garthwaite B.D. 1997. Effect of yeast culture in the diet of early lactation dairy cows on ruminal fermentation and passage of nitrogen fraction and amino acids to the small intestine. *J. Dairy Sci.*, 80: 374-384.
- Putnam, D.E., Schwab, C.G., Socha, M.T., Whitehouse, N.L., Kierstead, N.A. and Garthwaite, B.D. 1997. Effect of yeast culture in the diet of early lactation dairy cows on ruminal fermentation and passage of nitrogen fraction and amino acids to the small intestine. *J. Dairy Sci.*, 80: 374-384.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- Quigley J. D. III, Wallis L. B., Dowlen H. H., Heitmann R.N. 1992. Sodium bicarbonate and yeast culture effects on ruminal fermentation, growth, and intake in dairy calves. *J. Dairy Sci.* 75:3531–3538.
- Riggs, S.J. and Di Luzio, N.R. (1961). Identification of a RE stimulating agent in zymosan. *Am. J. Physiol.*, 200: 297-300.
- Rigothier, M.C., Maeconis, J. and Gapral, P. (1994). Effets des levures *Saccharomyces boulardii* sur les trophozoites d'*Entamoeba histolytica* in vitro et dans l'amibiase caecale du jeune rat. *Parasitol. Res.*, 80: 10-15.
- Riley M.A., Wertz J.E. 2002. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie* 84, 357–364.
- Rolfe R.D. 2000 The Role of Probiotic Cultures in the Control of Gastrointestinal Health. *J. Nutr.* 130: 396S – 402S.
- Rosselli M., Finamore A., Britti M.S., Merendino N. 2003. Protective effect of immunomodulation on intestinal cells by probiotics. *Atti 2nd Probiotics and Prebiotics, New Foods, Roma 7-9 settembre*; 205-212.
- Ryan KJ; Ray CG (editors). *Sherris Medical Microbiology*. 4th ed.. McGraw Hill, 2004. ISBN 0-8385-8529-9
- Salminen S., Isolauri, E., Salminen, E. 1996. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenge. *Ant. Leeuwenhoek.* 70: 347-358.
- Salminen S., Von Wright A., Morelli L. 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br. J. Nutr.* 80 (suppl. 1): S 147 – S 171.
- Salminen S., Ouwehand A., Benno Y., Lee Y.K. 1999. Probiotics: how should they be defined? *Trends in Food Science e Technology* 10: 107 – 110.
- Sander, E.G., Warner R.G., Harrison H.N., Loosli J.K. 1959. The stimulatory effect of sodium butyrate and sodium propionate on the development of rumen mucosa in the young calf. *J. Dairy Sci.* 42:1600–1605.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- Sanders M.E. 1993. Effect of consumption of lactic cultures on human health. In: Adv. Food and Nutrition Res (Kinsella, J.E, ed.), Vol 37, pp 67-130. Academic Press, New York.
- Saris, W.H.M., Asp, N.G.L., Bjorck, I., Blaak, E., Bornet, F., Brouns, F., Frayn, K.N., Fürst, P., Ricard, G., Roberfroid, M. and Vogel, M. (1998) Functional food science and substrate metabolism Brit. J. of Nutrition 80 suppl. 1, 47-75.
- Savage, D.C. (1983). Association of indigenous microorganisms with the gastrointestinal epithelial surfaces. In D.J. Hentges (Ed), Humans intestinal microflora and disease, Academic Press. London, pp 55-74.
- Saxelin M. 1999. Colonization of the human gastrointestinal tract by probiotic bacteria. Nutr Today 31, 5S-8S.
- SCAN. (1996) Opinion on the use of Avoparcin as feed additive. May 21.
- SCAN. (1998) Draft Report on Microbial strains: Updated June 4.
- SCAN. (1998) Opinion on the use of Carbadox and Olaquinox : July 10.
- SCAN. (1998) Opinion on the use of Macrolides as feed additive: February 5.
- SCAN. (1998) Opinion on the use of Virginiamycine as feed additive: July 10.
- SCAN. (1999) Adoption of new Guidelines: October 22.
- SCAN. (1999) Draft Opinion on the safety of Bacillus strains.
- SCAN. (2000) Report on how to assess the efficacy of probiotics: February 18.
- Schleifer K.H.; Kilpper-Balz R. 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov.. Int. J. Sys. Bacteriol. 34: 31-34.
- Schöner, F.J. (2000) Nutritional effects of organic acids-In III Conferenceshow Feed Manufacturing in the Mediterranean region. Reus, 22-24 March.
- Schumm, H.; Pohl, R.; Wolf, F.; Siebenlist, H., 1987: Ergebnisse des Einsatzes von Boviferm – *Streptococcus faecium* – bei neugeborenen Kälbern in Problembetrieben mit Fru

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

hdurchfa"llen zur Aufrechterhaltung und Wiederherstellung der gesunden Darmflora. *Tieraerztl Umschau* 42, 754.

Schumm, H.; Pohl, R.; Willeke, H., 1990: Ergebnisse des Einsatzes von Suiferm bei Absatzferkeln mit Durchfa" llen zur Aufrechterhaltung und Wiederherstellung der gesunden Darmflora. *Tieraerztl Umschau* 45, 402.

Seguela, J.P., Massot, J., Nesson, J. and Patte, F. 1978. Action d'un saccharomyces lors d'une infestation expérimentale a *Candida albicans* chez le rat normal et chez le rat traité par antibiotique *Bull. Soc. Mycol. Med.*, 7: 199-202.

Seguela, J.P. e Llanes, J.P. 1982. Dépression des défenses immunitaires par antibiothérapie restauration expérimentale par un saccharomyces. *Bull. Soc. Mycol. Med.*, 11: 343-347.

Seymour W. M., Nocek J. E., Siciliano-Jones J. 1995. Effects of a colostrum substitute and of dietary brewer's yeast on the health and performance of dairy calves. *J. Dairy Sci.* 78:412-420.

Shah N.P. 2000. Probiotic Bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *J. Dairy Sci.* 83: 894 – 907.

Sharon, N. and Lis, H. (1993) Carbohydrates in cell recognition *Scientific American*, January p. 74.

Sherwood N.P., Russell B.E., Jay A.R., Bowman K., 1949. Studies on streptococci: III. New antibiotic substances produced by beta hemolytic streptococci. *Journal of Infectious Diseases* 84, 88– 91.

Shornikova, A. V.; Casas, I. A.; Isolauri, E., 1997: *Lactobacillus reuteri* as a therapeutic agent in acute diarrhea in young children. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 24, 399.

Simon O. 2005 Micro-Organisms as Feed Additives – Probiotics. *Advances in Pork Production* Volume 16, pg. 161

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- Song, M. and Di Luzio, N.R. (1979). Yeast gluca and immunotherapy of infectious diseases. In: Lysosomes in Applied Biology and Therapeutics, Dingle, J.T., Jacques, P.J. and Shaw, I.H. (eds). North Holland Press, Amsterdam, pp. 533-547.
- Sperti G.S. 1971. Probiotics. West point, Cunnecticut. AVI publishing Co.
- Spring, P. 1996. Effects of mannanoligosaccharide on different cecal parameters and on cecal concentrations of enteric pathogens in poultry. PhD Thesis, Swiss Fed. Inst. Technology, Zurich.
- SSC. (1999) Opinion of the Scientific Steering Committee on antimicrobial resistance EU Commission. pp. 52.
- Stella A.V., Paratte R., Valnegri L., Cigalino G., Soncini G., Chevaux E., Dell'Orto V., Savoini G. 2007. Effect of administration of live *Saccharomyces cerevisiae* on milk production, milk composition, blood metabolites, and faecal flora in early lactating dairy goats. *S. Rum. Res.* 67: 7 – 13.
- Succi G. 1990. *Zootecnica speciale*. Clesav. 469pp
- Surawicz, C. M.; Elmer, G. W.; Speelman, P.; MacFarland, L. V.; Chinn, J.; van Belle, G., 1989: Prevention of antibiotic associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii*: a prospective study. *Gastroenterology* 96, 981.
- Swann Committee Report on the use of antibiotics in animal husbandry and veterinary medicine, (1969) CMND 4190(Ed), HMSO, London.
- Swartz, M.N. (1994) Hospital acquired infections diseases with increasingly limited therapies. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 91, 2420-2427.
- Szajewska H., Mrukowicz J.Z. 2001. Probiotics in the treatment and prevention of acute infectious diarrhea in infants and children: a systematic review of published randomized, double-blind, placebo-controlled trials. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*; 33(Suppl 2):S17-25.
- Tannock G.W. 1999. Probiotics: a critical review. Wymondham, United Kingdom. Horizon Scientific Press.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- Tassinari M. e Aretano I. 2005. Lieviti, colture preziose per vacche e vitelloni. *Informatore zootecnico*, 5: 52-58.
- Teller, E. e Vanbelle, M. (1991) Probiotics facts and fiction. *Med. Fac. Landbouw Rijksuniversiteit Gent*. 56, (4a.) 1591-1599.
- Thomke, S. and Elwinger, K. (1998) Growth promotants in feeding pigs and poultry. III Alternatives to antibiotic growth promotants. *Ann. Zootech.* 47, 245-271.
- Tortuero, F., Rioperez, J., Fernandez, E. and Rodriguez, M.L. (1995). Response of piglets to oral administration of lactic acid bacteria. *J. Food Protec.* 58, 1369-1374.
- Underdahl, N.; Torres, A.; Doster, A., 1982: Effect of *Streptococcus faecium* C-68 in control of *Escherichia coli* induced diarrhoea in gnotobiotic pigs. *American Journal of Veterinary Research* 43, 2227.
- Underdahl N.R. 1983. The effect of feeding *Streptococcus faecium* upon *Escherichia coli* induced diarrhea in gnotobiotic pigs. *Progress in Food and Nutrition Science*. 7: 5 – 12.
- Ushe T.C., Nagy B. 1985. Inhibition of small intestinal colonization of enterotoxigenic *Escherichia coli* by *Streptococcus faecium* M74 in pigs. *Zbl. Bakt. Hyg., I.Abt. Orig. B* 181, 374-382.
- Vanbelle, M., Teller, E. e Focant, M. 1989. Probiotics in animal nutrition: A review: *Arch. An. Nutr.*, 7, 543-561.
- Vanbelle M. 2002. Situazione attuale e prospettive future nella comunità europea per l'impiego di antibiotici, probiotici, enzimi ed acidi organici nell'alimentazione animale. *Large Animals Review*. 8 (2).
- Vancanneyt M., Lombardi A., Andrighetto C., Knijff E., Torriani S., Bjorkroth K.J., Franz C.M., Foulquie Moreno M.R., Revets H., De Vuyst L., Swings J., Kersters K., Dellaglio F., Holzapfel W.H., 2002. Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1381–1391.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- Vanderhoof J. A., Whitney D. B., Antonson D.L., Hanner T.L., Lupo J.V., Young R.J. 1999. Lactobacillus GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children. *J Pediatr* . 135:564-8.
- Varel V.H., Kreikemeier K.K. 1993. Influence of feeding *Aspergillus oryzae* fermentation extract (Amaferm) on in situ fiber digestion, ruminal parameters and bacteria in non lactating cows fed alfalfa or bromegrass hay. *J. Dairy Sci.* 71 (suppl 1): 287.
- Vidon, N., Huchet, B. and Rambaud, J.G. (1986). Influence de *Saccharomyces boulardi* sur la sécrétion jejuna induite chez le rat par la toxine cholérique. *Gastroenterol. Clin. Biol.*, 10: 13- 16.
- Villa S., Giardini A. 2007. Probioti nei vitelli. Newsletter di zootecnia, n. 48.
- Villani F., Salzano G., Sorrentino E., Pepe O., Marino P., Coppola, S. 1993. Enterocin 226NWC, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* 226, active against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology*. 74: 380 – 387.
- von Buenau, R.; Jaekel, L.; Schubotz, E.; Schwarz, S.; Stroff, T.; Krueger, M., 2005: *Escherichia coli* strain Nissle 1917: significant reduction of neonatal calf diarrhoea. *Journal of Dairy Science* 88, 317.
- Wagner D. G., Quinonez J., Bush L. J. 1990. The effect of cornor wheat-based diets and yeast culture on performance, ruminal pH, and volatile fatty acids in dairy calves. *Agri-Pract.* 11:7–12.
- Walker W., Duffy, L.C. 1998. Diet and bacterial colonization: role of probiotics and prebiotics. *J. Nutr. Biochem.* 9: 668-675.
- Wallace R. J. e Newbold C. J. 1992. Probiotics for Ruminants. In: Scientific basis of the probiotic concept. R. Fuller (Ed), Chapman Hall London, pp 317-353.
- Wallace, R.J. e Newbold, C.J. 1993. Rumen fermentation and its manipulation: The development of yeast cultures as feed additives. In: T. P. Lyons (Ed.) *Biotechnology in the Feed Industry*. Alltech Technical Publications, Nicholasville, KY. Pp 173 – 192.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- Weber S.G. e Gold H.S. 2003 Enterococcus: an emerging pathogen in hospitals. *Semin Respir Crit Care Med* 24: 49–60.
- Wiedmeier R.D., Arambel M.J., Walters J.L. 1987. Effect of yeast culture and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestibility. *J. Dairy Sci.* 70: 2063 – 2068.
- Willard M.D., Simpson R.B., Cohen N.D., Clancy J S. 2000. Effects of dietary fructooligosaccharide on selected bacterial populations in feces of dogs. *Am. J. Vet. Res.* 61: 820 – 825.
- Williams P.E.V., Newbold. C. J. 1990. Rumen probiosis: The effects of addition of novel microorganisms on rumen fermentation and ruminant productivity. In: W. Haresign and D.J.A. Cole (Ed.)
- Williams P.E.V., Tait C.A.G., Innes G.M., Newbold C.J. 1991. Effects of the inclusion of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yeald and forage degradation patterns in the rumen of sheep and steers. *J Anim. Sci.*, 69: 3016-3026.
- Wunderlich, P. F.; Braun, L.; Fumagalli, I., D'Apuzzo, V.; Heim, F.; Karly, M.; Lodi, R.; Politta, G.; Vonbank, F.; Zeltner, L., 1989: Double-blind report on the efficacy of lactic acid-producing *Enterococcus* SF68 in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and in treatment of acute diarrhoea. *The Journal of International Medical Research* 17, 333.
- Xi-Yang Wu, 2006. Studies on the impact of probotic bacteria on microbial diversity and immune response. A thesis submitted in fulfillment of the requirements for the award of the degree of Doctor of philosophy in biological sciences from University of Wollongong, Australia.
- Yoon, I. K., e M. D. Stern. 1996. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* cultures on ruminal fermentation in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 79:411–417.

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- **UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA**
- **COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE**

Young J. 1998. European market developments in prebiotic and probiotic containing foodstuffs. *Br. J. Nutr.* 80 (suppl. 2). S 231 – S 233.

Zambonelli C. 1998. *Biologia e Microbiologia dei vini*. Edagricole, Bologna, II edizione, 300pp.

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- **UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA**
- **COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE**

COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

1. INTRODUZIONE

1.1. IL LATTE DI BUFALA

Il latte di bufala si presenta di colore bianco neve per l'assenza di carotenoidi, senza odore caratteristico e con un sapore piuttosto delicato. Rispetto al latte vaccino, infatti, nel latte bufalino si riscontra anche una maggior quantità di vitamina A ma non del suo precursore, il β -carotene (Sciancalepore, 1998). Ha una composizione chimica molto simile a quella del latte di vacca da cui si differenzia per i contenuti proteici e lipidici (è ricco di oleina) più elevati rispetto a quello bovino (tabella AG1) e che, in media, risultano rispettivamente dell'8,3% e 4,7% nel latte bufalino e il 3,5% e 3,3% nel latte vaccino; per tale motivo è utilizzato quasi esclusivamente nell'industria casearia per la produzione delle caratteristiche mozzarelle, con una resa che risulta superiore di circa 1.8 volte di quella del latte vaccino: 25 kg di mozzarella di bufala, contro i 13 kg ottenuti mediamente dalla stessa quantità di latte vaccino (Salvadori del Prato, 1998; Sciancalepore, 1998; Zicarelli, 2001; Romano *et al.*, 2003).

Alla componente lipidica sono attribuite la maggior parte delle caratteristiche organolettiche del latte e dei suoi derivati. Essa è, inoltre, utilizzata come *marker* di genuinità per il burro e per la mozzarella (Contarini, 1997).

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Tabella AG1. Valori minimi, massimi e medi per singolo parametro del latte bufalino e bovino (solo valori medi) (Proto, 1995 – modificata 2002).

Componenti	Bufala (%)			Vacca (%)	
	min	max	media	media	
Residuo secco	15.15	24.70	18.50	12.20	
Residuo magro	9.15	11.70	10.20	8.70	
Lipidi	6.00	13.00	8.30	3.50	
Protidi totali	3.80	5.50	4.73	3.30	
Lattosio	4.60	5.30	4.90	4.70	
Ceneri	0.75	0.90	0.80	0.70	
Calcio	0.18	0.21	0.20	0.12	
Fosforo	0.10	0.13	1.12	0.09	
Magnesio	0.14	0.16	0.15	1.10	
Contenuto calorico:					
	Kcal	950	1720	1210	690
	MJ	4.00	7.20	5.10	2.90

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Tabella AG2. Confronto tra la composizione del latte di vacca e di bufala

Composizione chimica	Latte di bufala	Latte di vacca
Acqua	81.5	87.5
Caseina	3.6	2.8
Lattoalbumina e lattoglobulina	0.7	0.6
Calcio (Ca ²⁺) mg/100g	180 - 240	120 - 160
Fosforo (P) mg/100g	120 - 140	65 - 110
Rapporto Ca/P	1.61	1.31
Ceneri	0,8	0,75
pH	6.5 - 6.7	6.6 - 6.7
Acidità (SH)	4.2 - 5.0	3.3 - 3.5
Densità (15°C)	1.031 - 1.034	1.028 - 1.035
Punto crioscopico (-°C)	0.56 - 0.59	0.52 - 0.55
Diametro globuli (micron)	1.0 - 6.0	1.0 - 10.0
Azione al caglio	++++	+++

Fonte: Istituto Nazionale di ricerca per gli alimenti e la Nutrizione (2003)

Il latte di bufala, come quello di tutti i ruminanti, si distingue non solo per un'elevata proporzione di caseina nel totale azotato, ma anche per un altissimo tenore in acidi organici con basso peso molecolare (acidi volatili), conseguenza di una particolare modalità di sintesi (tabella AG2) (Alais, 2001).

Altro aspetto della tipicità del latte di bufala è legato alla sua qualità microbiologica e, quindi, alle attività metaboliche di alcuni ceppi di batteri lattici, presenti in concentrazioni superiori a quelle contenute dal latte vaccino che, oltre ad influire sul fenomeno di acidificazione della cagliata durante la trasformazione, sono responsabili, per la maggior parte, della produzione del sapore e dell'aroma tipici di questo formaggio (Contarini, 1993).

Dott. Maria Luisa Varricchio

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

In Italia, dalla trasformazione del latte bufalino, si ottengono anche prodotti quali ricotta, burro, yogurt e provola; in letteratura non sono riportati dati relativi al consumo diretto del latte. Nel resto del mondo sono diffuse anche altre tipologie di preparazioni (Renaud, 1996).

1.2. LA FRAZIONE LIPIDICA DEL LATTE DI BUFALA

Nel latte di bufala, come è noto, il grasso costituisce, dopo l'acqua, il componente più importante, oscillando in media tra il 7 ed il 10%. Il tenore lipidico del latte bufalino, a differenza di quello bovino, può subire oscillazioni molto ampie (dal 6,0 al 13%) nel corso della lattazione, mentre la variazione del contenuto proteico (dal 3,8 al 5.5%) è più modesta (Proto, 1995).

La frazione lipidica del latte è costituita principalmente (97%) da trigliceridi (TG) e, in percentuale minore, da digliceridi, monogliceridi, steroli (<0,5%) (colesterolo soprattutto), fosfolipidi (<1%), vitamine liposolubili e β -carotene (Christie e Clapperton, 1982; Jensen *et al.*, 1991).

Pochi sono gli studi sulla composizione lipidica del grasso del latte bufalino (Polidori *et al.*, 1997; Bergamo *et al.*, 2003), ma si può fare riferimento a quella bovina che è stata approfonditamente studiata, risultando estremamente complessa e costituita da almeno 400 diversi acidi grassi (AG) di cui soltanto 14 presenti in concentrazione superiore all'1% (Christie e Clapperton, 1982; Parodi, 1983; Timmen e Patton, 1988; Jensen *et al.*, 1991).

La matrice lipidica del latte di bufala è presente sotto forma di globuli in dispersione instabile: questi ultimi si presentano eterogenei ed essenzialmente costituiti da una microgoccia di trigliceridi, circondati da un involucro complesso (membrana o film di adsorbimento). La membrana esterna del globulo, formata dallo 0.5 - 1% dei lipidi totali,

Dott. Maria Luisa Varricchio

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

racchiude il core di trigliceridi che è formato dal 95 - 98% dei lipidi totali del latte (King, 1955; Alais, 2001).

Come nel latte bovino, anche in quello bufalino le dimensioni dei globuli di grasso variano ampiamente, ma il valore medio del loro diametro si attesta tra 4,1 e 4,8 μm contro i 3,0 – 3,5 μm di quelli del latte bovino. In ambedue le specie il diametro medio dei globuli di grasso è lievemente più elevato in estate che in inverno. I meccanismi biologici di formazione e di secrezione dei globuli di grasso da parte della cellula mammaria, nonché la struttura dei globuli stessi, sono stati oggetto di ampie indagini (Stemberg e Patton, 1981; MacPerson e Kitchen, 1983). In particolare, è stato sottolineato che i globuli di piccole dimensioni prevalgono numericamente su quelli di grandi dimensioni, ma è in quest'ultimi che sono contenuti i maggiori quantitativi di grasso (Timmen *et al.*, 1988) perché il rapporto volume/superficie decresce con il decrescere del diametro dei globuli. Tale differenza si riflette in una diversa distribuzione della componente acidica nelle due tipologie di globuli (Cavaliere *et al.*, 1994).

I lipidi si trovano nel latte sotto forma globulare in dispersione instabile e comprendono 3 tipi di sostanze associate:

- ✓ lipidi polari: fosfolipidi di natura complessa che costituiscono circa l'1% del totale;
- ✓ sostanze lipoidiche o insaponificabile: steroli (principalmente colesterolo 0.3%) alcoli e vitamine (A, E, D e K), rappresentanti l'1.2 % del totale;
- ✓ lipidi neutri: sostanza grassa propriamente detta, costituita da gliceridi per circa il 97-98% del totale.

La vitamina A è presente in maggiori quantità nel latte di bufala rispetto al latte vaccino a differenza del suo precursore, il β -carotene, presente in quantità minore (Correale, 1987).

Infine, non può essere trascurato un altro aspetto fondamentale della frazione lipidica del latte di bufala, ovvero quello nutrizionale, dato l'alto contenuto percentuale di

Dott. Maria Luisa Varricchio

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

acidi grassi monoisaturati (MUFA) e polinsaturati (PUFA) essenziali. Tra questi particolare importanza è stata attribuita negli ultimi anni ai CLA (*conjugated linoleic acid*) (McGuire e McGuire, 1999; Bauman *et al.* 1999).

1.2.1. I TRIGLICERIDI (TG)

Il grasso presente nel latte è costituito per la quasi totalità da trigliceridi, che sono triesteri degli AG alifatici e del glicerolo. La distribuzione degli AG sulle tre posizioni della glicerina non è casuale e l'esistenza di siti preferenziali di esterificazione permette di limitare il numero di possibili famiglie trigliceridiche. Sono stati identificati 43 tipi di TG presenti in quantità superiore allo 0.5%. Inoltre, la concentrazione dei vari AG muta in base a diversi fattori quali stadio di lattazione, alimentazione, stagione, animale stesso (Norum, 1992; Gurr, 1995).

Per il latte di vacca la distribuzione stereospecifica degli AG nei TG è la seguente: l'acido butirrico (BA) è esterificato quasi esclusivamente in posizione 3, l'acido palmitico (PA) in ugual misura in posizione 1 e 2, l'acido oleico (OA) preferibilmente in posizione 1 e l'acido linoleico (LA) prevalentemente in posizione 2. Pertanto, sebbene siano stati condotti numerosi studi al fine di identificare i tipi e le proporzioni dei TG presenti nel grasso del latte, non è possibile determinare la composizione in maniera definitiva (Palmquist *et al.*, 1993).

Composizione e struttura dei TG sono molto importanti poiché si ripercuotono sulle proprietà fisiche e nutrizionali del grasso del latte e, quindi, sulle caratteristiche dei prodotti di trasformazione a base di grasso, come il burro (MacGibbon, 1994; Precht, 1997). La struttura dei TG, infatti, è responsabile delle proprietà fisiche, quali cristallizzazione e punto di fusione, che hanno un importante effetto sulla consistenza e sul sapore dei prodotti a base di grasso. La composizione in AG dei TG e la loro posizione sul glicerolo all'interno del TG

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

influisce sulla digeribilità e sulle proprietà nutritive degli stessi e dei singoli AG che li compongono (Norum, 1992; Gurr, 1995).

1.2.2. GLI ACIDI GRASSI (AG)

Dall'idrolisi dei TG si ottengono il 90 % degli AG della frazione lipidica del grasso del latte (Jensen *et al*, 1991).

Gli AG possono essere classificati in funzione del numero di atomi di carbonio in:

- ✓ infissi ($C > 10$);
- ✓ volatili ($C < 10$);
- ✓ basso peso molecolare ($C_4 - C_{10}$);
- ✓ medio peso molecolare ($C_{11} - C_{16}$);
- ✓ alto peso molecolare ($C_{17} - C_{24}$)

Da un punto di vista chimico, essi sono distinti in saturi (SFA), monoinsaturi e polinsaturi a seconda della presenza del doppio legame che conferisce loro tipiche caratteristiche e, a seconda della lunghezza della catena, in AG a catena corta, media e lunga.

Studi sulle diverse proprietà fisiche dei SFA hanno evidenziato relazioni tra la catena lunga e il punto di fusione: il maggior numero di doppi legami negli AG comporta, infatti, un più basso punto di fusione, come dimostra la serie OA, LA e LNA. Oltre ai fattori stagionali, anche l'alimentazione può influire sulla composizione acidica del grasso anche se in misura minore rispetto ai monogastrici (Christie, 1979; Hawke e Taylor, 1995).

Il grasso del latte, rispetto ad altre fonti di grasso animale (carne di suino e manzo), è caratterizzato da un elevato contenuto in AG a catena corta e un più basso tenore in AG C_{18} (Kennelly, 1996); è, inoltre, una fonte relativamente povera di PUFA, con concentrazioni del 3% di $C_{18:2}$ e dell'1% di $C_{18:3}$.

Dott. Maria Luisa Varricchio

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Tra gli SFA sono più abbondanti l'AP con il 30% e acido stearico (SA) con il 21%, mentre tra gli insaturi (UFA) l'OA con il 12,5%. Studi effettuati sul latte bufalino con tecnica gas - cromatografica hanno confermato che circa il 98% degli AG è costituito da un numero pari di atomi di carbonio compresi tra il C₄ e il C₂₀ mentre i dispari sono presenti solo in tracce (Addeo *et al.*, 1981).

Rispetto ad un latte vaccino e pecorino, il latte di bufala riporta un minor contenuto in AG a basso peso molecolare e un maggior contenuto in AG ad alto peso molecolare MUFA e PUFA, tra cui ω_3 e CLA, che lo rendono un alimento ad alto valore nutrizionale (Addeo *et al.*, 1981).

Nella categoria dei PUFA sono racchiuse due importanti sottoclassi di AG:

gli AG ω_3 che comprendono:

- ✓ l'acido α -linolenico (LNA) C18:3 ω_3 ;
- ✓ l'acido eicosapentaenoico (EPA) C20:5 ω_3 ;
- ✓ l'acido docosapentaenoico (DPA) C22:5 ω_3 ;
- ✓ l'acido docosaesaenoico (DHA) C22:6 ω_3 .

AG ω_6 che comprendono:

- ✓ l'acido linoleico (LA) C18:2 ω_6 ;
- ✓ l'acido γ -linolenico (GLA) C18:3 ω_6 ;
- ✓ l'acido arachidonico (AA) C20:4 ω_6 .

I primi sono caratterizzati dall'aver il 1° doppio legame in posizione 3, mentre i secondi in posizione 6.

I meccanismi con cui gli AG di queste due famiglie agiscono sulla salute dell'uomo sono stati negli ultimi anni oggetto di numerosi studi, mentre risulta essere già nota l'importanza del loro apporto attraverso la dieta.

1.2.2.1. ACIDO LINOLEICO CONIUGATO (CLA)

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Il termine CLA è utilizzato per indicare una serie di isomeri posizionali e geometrici dell'LA (Bessa *et al.*, 2000). Essi appartengono agli AG aventi conformazione geometrica di tipo *trans*, e sono tipicamente sintetizzati dai ruminanti, nei cui prodotti (latte e carne) si ritrovano in misura variabile tra le specie, ma sempre, in ogni caso, più rilevante rispetto ai monogastrici. Nel latte e nella carne dei ruminanti sono presenti molti isomeri CLA, anche se quello maggiormente rappresentato (oltre l'80%) è il C_{18:2} *cis*-9, *trans*-11, detto anche acido rumenico (RA) (Kepler *et al.*, 1966; Bauman *et al.*, 1999; Buccioni *et al.*, 2002; Lock *et al.*, 2003; Khanal *et al.*, 2004).

La struttura dei due isomeri più rappresentativi è mostrata in figura AG1.

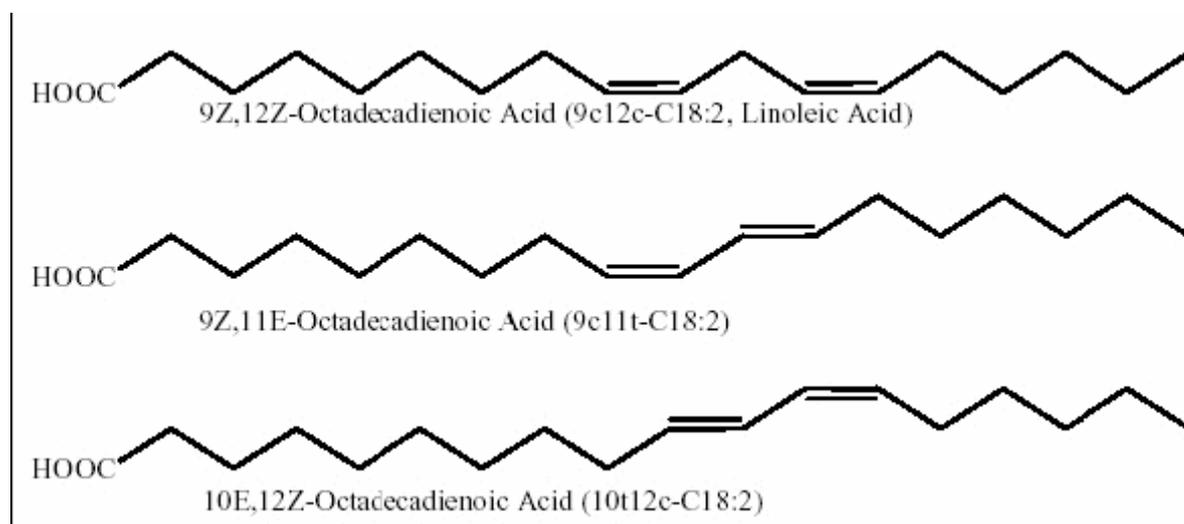


Figura AG1. Struttura chimica dell'acido linoleico e dei CLA (Lock *et al.*, 2003)

Se il RA è il più rappresentato tra i CLA resta comunque inteso che questi AG sono un gruppo ampio. Gli isomeri posizionali fino a questo momento noti e caratterizzati sono: 7/9; 8/10; 9/11; 10/12; 11/13 e 12/14; la loro geometria però, può essere sia *cis-cis*, sia *cis-trans*, sia *trans-cis* o *trans-trans*, per un totale di 24 combinazioni. I più importanti isomeri sono il RA e il C_{18:2} *trans* 10 - *cis* 12 (Kepler *et al.*, 1966; Bauman *et al.*, 1999; Buccioni *et al.*, 2002; Lock *et al.*, 2003; Khanal *et al.*, 2004).

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Il CLA e i suoi isomeri sono conosciuti da lungo tempo, ma l'interesse per queste molecole è relativamente recente. Infatti, diversi studi, sia *in vivo* sia *in vitro*, hanno evidenziato, oltre alle proprietà anticancerogene, anche attività anti-aterogene, anti-diabetiche e la capacità di stimolare le proprietà immunologiche (figura AG1) (Banni *et al.*, 1999; Bertoni e Trevisi, 1999; McGuire e McGuire, 1999). Inoltre, alcuni ricercatori affermano che i CLA possiedono anche interessanti proprietà nutrizionali in quanto la loro presenza nella dieta, sia in animali giovani sia in animali adulti, sembra indurre un aumento della massa magra a scapito di quella grassa (Banni *et al.*, 1999). Infine, sembra che esercitino un effetto protettivo nell'insorgenza della malattia arterosclerotica (Cannella e Giusti, 2000).

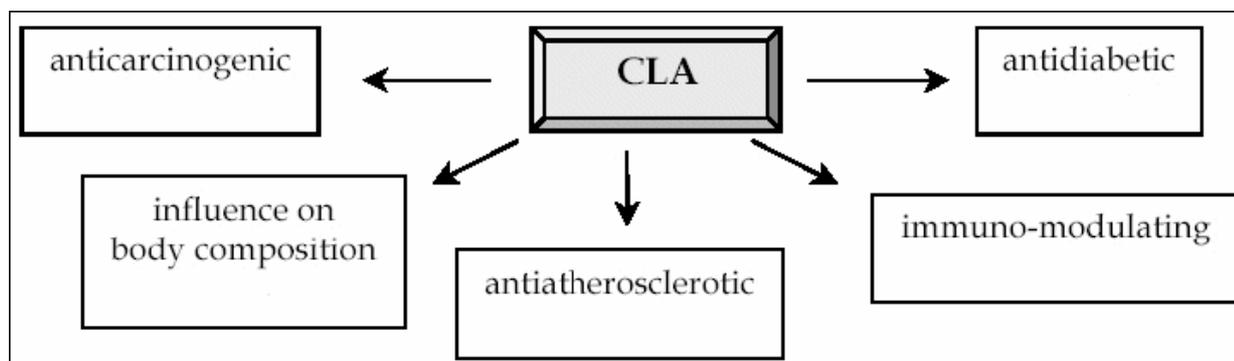


Figura AG1. Effetti fisiologici dei CLA (McGuire e McGuire, 1999).

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

1.3. ORIGINE DEGLI ACIDI GRASSI NEL LATTE

Il grasso del latte è sintetizzato in parte direttamente dagli AG provenienti dai lipidi circolanti nel sangue (ca. 60%), dagli AG a lunga catena della dieta, da sintesi microbiche di AG o dalle riserve corporee di grasso, in parte sono sintetizzati *ex novo* dalla ghiandola mammaria (ca. 40%) a partire dagli AG plasmatici non esterificati (NEFA) o dalle lipoproteine ricche in trigliceridi (lipoproteine a bassa densità, VLDL). I NEFA assorbiti sono direttamente connessi con la loro concentrazione nel plasma, che è essa stessa correlata principalmente con la mobilizzazione del grasso corporeo (Chilliard *et al.*, 1984).

La sintesi *ex novo* degli AG deriva per metà direttamente dal 3-idrossibutirrato (3-HB) che contribuisce alla formazione di circa il 15% degli AG fino a 4C (Chilliard *et al.*, 2000) e per l'altra metà (da C₄ a C_{16:0} e circa una metà dei C_{16:0}) dalla via dell'acetato (Palmquist *et al.*, 1969; Demeyer *et al.*, 1995). Una parte dei C_{16:0} e parecchi degli AG a lunga catena pare derivino dalla seconda fonte lipidica, quella dei lipidi circolanti nel sangue (Bauman e Davis, 1974).

Le principali vie metaboliche che portano alla formazione degli AG coinvolgono due enzimi chiave: l'acetil-CoA-carbossilasi (ACC) e il FA-sintetasi (FAS) (Barber *et al.*, 1997). Tuttavia, ancora non sono stati identificati i fattori cellulari e molecolari che regolano i differenti AG a corta e media catena del latte fra e all'interno delle specie ruminanti (Chilliard *et al.*, 2000).

La capacità del tessuto mammario di utilizzare gli AG dei TG provenienti dalle lipoproteine plasmatiche è determinata dall'attività dell'enzima lipoproteina-lipasi (LPL) che è elevata nella ghiandola mammaria dei ruminanti in lattazione (Chilliard *et al.*, 1986). Di conseguenza, l'assorbimento dei TG nella ghiandola mammaria è generalmente direttamente correlata con la loro concentrazione nel plasma (Gagliostro *et al.*, 1991), ma per concentrazione molto alte (> ca. 0.4 mM) (Baldwin *et al.*, 1980) l'attività della LPL comincia ad essere limitata.

Dott. Maria Luisa Varricchio

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Contrariamente ad altri tessuti nei ruminanti, la ghiandola mammaria in lattazione non è in grado di convertire il C_{16:0} in C_{18:0} mediante l'allungamento della catena (Moore e Christie, 1981). Tuttavia, le cellule mammarie secernenti completamente differenziate esprimono un'alta attività della Δ^9 desaturasi che converte lo SA(C_{18:0}) in OA (C_{18:1 cis-9}) (Kinsella, 1972).

Circa il 40% dello SA originato dalla ghiandola mammaria, è desaturato contribuendo così a più del 50% dell'OA secreto nel grasso del latte (Bickerstaffe *et al.*, 1974; Enjalbert *et al.*, 1998). Inoltre, l'acido vaccenico (VA) (C_{18:1 trans-11}) formato nel rumine e assorbito dall'intestino, può essere desaturato per formare l'acido rumenico (RA) (C_{18:2 cis-9, trans-11}) che è il principale isomero dei CLA nel latte dei ruminanti (Chilliard *et al.*, 2000).

L'attività della Δ^9 desaturasi può essere inibita dai PUFA (Sessler e Ntambi, 1998) così come dall'AG ciclopropenoico (per esempio proveniente dai semi di cotone) (Yang *et al.*, 1999).

La sintesi, l'assorbimento e la desaturazione degli AG contribuiscono alla formazione di un pool di AG esterificati con il glicerolo per formare principalmente i TG del latte.

Le sintesi microbiche nel rumine di AG a catena ramificata o a numero dispari di atomi di carbonio, provenienti dalla fermentazione microbica dei carboidrati, e gli intermedi della bio-idrogenazione ruminale dei PUFA (es. C_{18:2 trans-11}) contribuiscono alla grande variabilità degli AG nel grasso del latte. Il bilancio tra la sintesi *ex novo* di AG a corta e media catena nella mammella e gli AG di origine microbica ed alimentare a lunga catena presenti nella ghiandola mammaria possono essere sostanzialmente modificati attraverso la dieta (Stegeman *et al.*, 1981; Christensen *et al.*, 1994; Khorasani *et al.*, 1991; Kennelly e Khorasani, 1992).

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

1.3.1. BIOSINTESI DEI CLA NEI RUMINANTI

La sintesi dei CLA, piuttosto complessa, ha origine nel rumine con la bioidrogenazione del LA e si completa a livello tissutale (ghiandola mammaria) attraverso la desaturazione dell'acido vaccenico (VA) proveniente dal rumine.

I lipidi che raggiungono il rumine vengono idrolizzati dai batteri liberando AG dai TG e dai fosfolipidi. L'idrolisi è la reazione necessaria per la successiva insaturazione degli UFA. In passato si credeva che l'unico batterio responsabile della bioidrogenazione fosse il *Butyrivibrio fibrisolvens* (Kepler *et al.*, 1966), ma recenti studi (Harfoot e Hazlewood, 1988) condotti su colture cellulari pure hanno evidenziato che il processo di idrogenazione è coordinato da una serie di batteri responsabili delle varie fasi, divisi in due gruppi: quelli che saturano gli acidi LA e LNA con formazione di intermedi quali il RA e il VA e quelli che completano la bioidrogenazione riducendo il VA a SA. (Kepler *et al.*, 1966; Bauman *et al.*, 1999; Buccioni *et al.*, 2002; Lock *et al.*, 2003; Khanal *et al.*, 2004). Il VA, diretto precursore del RA a livello tissutale, tende ad accumularsi nel liquido ruminale, in quanto la sua riduzione a SA rappresenta la fase più lenta del processo di bioidrogenazione; pertanto può essere in larga parte assorbito a livello intestinale e trasportato ai tessuti, dove può essere ossidato a livello dei microsomi cellulari. La reazione di ossidazione è catalizzata dall'enzima stearoil coa-desaturasi (SCD), che inserisce un doppio legame di tipo *cis* in posizione 9 (Heinemam *et al.*, 2003; Ntambi *et al.*, 2004) e converte così il VA in RA.

Schematizzando, la sintesi di CLA nel rumine avviene in due fasi. La prima fase, catalizzata dall'enzima linoleico-isomerasi che agisce sui doppi legami al centro della catena carbossilica, consiste nell'isomerizzazione del C_{18:2} *cis*-9, *cis*-12 (LA) a C_{18:2} *cis*-9, *trans*-11 (RA), uno degli isomeri del CLA. L'enzima utilizzato in questa fase si trova sulle membrane batteriche ed è molto selettivo in quanto riconosce solo i dieni *cis*-9, *cis*-12 sulla catena carbossilica di AG con una funzione carbossilica libera. La seconda fase, piuttosto rapida, è rappresentata dalla saturazione che converte il RA in VA (C_{18:1} *trans*-11). La successiva

Dott. Maria Luisa Varricchio

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

saturazione del VA a SA è molto più lenta per consentire l'accumulo di SA nel rumine e il passaggio nel plasma sanguigno (stadio limitante).

Variazioni della microflora, dovute a cambiamenti delle fermentazioni (es. abbassamento del pH), possono causare cambiamenti nel profilo acidico del grasso del latte; nel caso del CLA, razioni per bovini da carne caratterizzate da un alto tenore di concentrato, possono cambiare il grado di saturazione del LA con la sintesi di altri isomeri trans decenoici come, ad esempio, il C_{18:1} *trans*-10 al posto del VA (Griinari *et al.*, 1998). Il meccanismo ipotizzato coinvolge l'enzima *cis*-9, *trans*-10 isomerasi che porta alla formazione di CLA *trans*-10, *cis*-12 come primo intermedio della conversione del LA, poi la successiva saturazione del legame in posizione 12 porta al C_{18:1} *trans*-10 (Griinari, 2001). Il CLA *trans*-10, *cis*-12 è sintetizzato esclusivamente nel rumine, dove è presente la Δ^{12} desaturasi. La saturazione del LNA avviene in modo molto simile alla bioidrogenazione del LA. Il principale isomero C_{18:3} presente nel cibo è l'LNA. La sua isomerizzazione produce C_{18:3} *cis*-9, *trans*-11, *cis*-15, dal quale, attraverso la saturazione, si ottiene il C_{18:3} *trans*-11. La fermentazione del meno comune α -LNA è molto simile (Griinari e Bauman, 1999). Buccioni (2002), studiando la concentrazione dei principali isomeri del C_{18:3} e del CLA nel liquido ruminale, ha confermato lo stretto legame esistente tra LA, RA e VA durante i processi di fermentazione, sottolineando che l'isomero *cis*-9, *trans*-11, non solo è quello predominante, ma è anche il più rapido ad essere formato e saturato.

1.3.2. METABOLISMO MICROBICO DEI LIPIDI NEL RUMINE

Lo studio del metabolismo lipidico nel rumine della vacca da latte, e quindi della bufala, è molto importante per due motivi fondamentali:

- controllare gli effetti antimicrobici degli AG al fine di arricchire le razioni con fonti di grasso senza interferire con le fermentazioni ruminali e i processi digestivi;

Dott. Maria Luisa Varricchio

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- regolare la bioidrogenazione per controllare l'assorbimento di AG specifici in grado di migliorare le caratteristiche del latte prodotto.

Il rumine è, infatti, il sito di un intenso metabolismo lipidico microbico. La lipolisi dei glicolipidi, fosfolipidi e TG provenienti dalla dieta, porta alla formazione di AG liberi che sono in larga misura idrogenati (Chilliard *et al.*, 2000).

I PUFA sono dapprima isomerizzati e poi idrogenati attraverso vie biochimiche numerose e dipendenti dall'ecosistema microbico. La loro concentrazione nel latte è, quindi, dipendente dalla quantità che ne esce dal rumine. Questa quantità può essere aumentata attraverso l'uso di alimenti ricchi in PUFA e attraverso i fattori che diminuiscono la loro bioidrogenazione, includendo la naturale protezione dovuta, per esempio, al tegumento dei semi.

Studi sul metabolismo lipidico nel rumine (Harfoot e Hazlewood, 1997; Doreau e Ferlay, 1994; Doreau e Chilliard, 1997) hanno dimostrato che i lipidi provenienti dalla dieta, a contatto con i microbi, sono sottoposti a due principali processi: lipolisi e bioidrogenazione.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

1.3.3. LIPOLISI

Nelle diete tradizionali gli AG sono esterificati e, in genere, idrolizzati velocemente nel rumine dai batteri lipolitici (Hawke e Silcock, 1970); i protozoi, invece, non hanno attività lipolitica.

La lipolisi è la produzione di AG liberi a partire dagli esteri della frazione lipidica di origine alimentare, in modo da permettere la successiva bioidrogenazione (riduzione dei doppi legami presenti nella catena carboniosa) (Hawke e Silcock, 1969).

Gli esteri lipidici provenienti dalla dieta sono idrolizzati, poco dopo l'assunzione, dalle lipasi microbiche con rilascio di AG. Uno dei batteri più noti per la sua azione lipolitica è l'*Anaerovibrio lipolyticus*, che produce un'esterasi di membrana e una lipasi (Harfoot, 1978), che è un enzima extra cellulare, che idrolizza completamente i TG ad acidi grassi volatili (AGV) e glicerolo, lasciando una piccola parte di mono e di-gliceridi. Il glicerolo è poi fermentato ad acido propionico. Sebbene l'attività lipasica dell'*Anaerovibrio lipolyticus* sia intensa, se paragonata a quella degli altri microbi non lipolitici, la sua attività esterasica è debole.

Gli AG, oltre che dall'idrolisi enzimatica dei TG, possono provenire anche dall'idrolisi dei galattolipidi e dei fosfolipidi ad opera di diverse galattosidasi e fosfolipasi di origine microbica (fosfolipasi A, fosfolipasi C, lisofosfolipasi e fosfodiesterasi). Sono stati identificati (Kemp *et al.*, 1975) almeno 5 microrganismi, tra cui il *Ruminococcus albus*, in grado di isomerizzare gli AG con più di un doppio legame.

1.3.4. BIOIDROGENAZIONE

La permanenza degli UFA nel liquido ruminale è molto breve a causa della rapida idrogenazione a grassi saturi operata dai microbi ruminali. La percentuale di PUFA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

idrogenati è stata stimata tra il 60 e il 90% (Antongiovanni *et al.*, 2003). Sebbene sia ancora oggetto di dibattito, pare che questo processo è utilizzato dai microbi per proteggere se stessi dagli effetti tossici degli UFA. Nel caso degli UFA con uno dei doppi legami in posizione *cis*-12 (es. LA e LNA), la prima tappa del processo di bioidrogenazione consiste in una reazione di isomerizzazione enzimatica che converte il legame *cis*-12 in *trans*-11. In generale, questa isomerasi dovrebbe avvenire solo in presenza di funzioni carbossiliche libere e, nel caso particolare dei PUFA, in presenza di un diene isolato *cis*-9, *cis*-12. La presenza di un carbossile libero rende la lipolisi una tappa obbligatoria per la successiva riduzione, e rappresenta, pertanto, il fattore limitante di tutto il processo. Sono influenzati anche i prodotti della bioidrogenazione a seconda che i precursori siano AG esterificati o meno (Moore *et al.*, 1969; Noble *et al.*, 1974). Dopo che il legame *trans*-11 si è formato, una riduttasi microbica opera l'idrogenazione in posizione *cis*-9. La quantità di VA ridotta a SA dipende sia dalle condizioni del ruminale sia dalla concentrazione di LA sia inibisce il processo (Harfoot *et al.*, 1973). Moore *et al.* (1969), sostengono che una grande quantità di LA non esterificato può bloccare la seconda tappa della bioidrogenazione, ma questo non avviene quando il LA è in forma esterificata.

1.3.5. SINTESI MICROBICA DEGLI ACIDI GRASSI

La frazione lipidica dei batteri ruminanti (10 - 15% SS) deriva, in parte, dalla degradazione degli alimenti e in parte, da sintesi *ex novo* all'interno della cellula microbica, e dipende dal contenuto di grasso della dieta e dalle specie di batteri presenti nel liquido ruminale (Jenkins, 1993). Se l'apporto di lipidi della dieta è alto, il trasferimento di questi nelle cellule microbiche è facilitato e si formano minuscole gocce di grasso nel citoplasma. La sintesi *ex novo* di AG, invece, porta alla formazione di SA e palmitoleico nel rapporto

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

2,1:1 (Bauchart *et al.*, 1990). Bisogna ricordare, poi, che i microbi non hanno riserve di TG, ma gli AG predominanti sono i fosfolipidi di membrana e i NEFA (Viviani, 1970).

Sia i batteri sia i protozoi sono in grado di sintetizzare AG a lunga catena a partire da catene ramificate o a numero dispari di atomi di carbonio. Per questo motivo, Keeney *et al.* (1962) sostengono che i microbi ruminanti costituiscono un'importante fonte di lipidi per i ruminanti ospiti, grazie al loro alto contenuto di acidi con numero dispari di atomi di C o a catena ramificata.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

1.3.6. EFFETTO DEI LIPIDI SULLE FERMENTAZIONI RUMINALI

L'aggiunta dei lipidi alla dieta dei ruminanti può esplicare effetti negativi sulle fermentazioni ruminali con la riduzione della digeribilità delle fonti di energia non lipidiche. Un apporto di grasso nella razione tra il 10% e il 50% può ridurre la degradabilità ruminale dei carboidrati strutturali (Ikwuegbu e Sutton, 1982; Jenkins e Palmquist, 1984). I grassi si distinguono, infatti, in due tipi: quelli inerti (*by-pass*), che non sono intaccati nel rumine e non interferiscono con le fermentazioni ruminali, e quelli (PUFA) che sono degradati e hanno effetto antimicrobico, con riduzione della digeribilità della fibra e del rapporto acetato/propionato. Questi effetti sono dovuti a caratteristiche riconoscibili dei grassi (gruppo funzionale, grado di saturazione) per cui possono essere scelti in modo opportuno nella razione per modificare le caratteristiche del latte desiderate.

Anche il metabolismo proteico può essere influenzato da aggiunte di grassi alla dieta. È stato osservato che integrazioni lipidiche nella dieta causano la riduzione del contenuto proteico del latte con riduzione della sintesi di caseine e aumento del contenuto in azoto e in azoto non proteico (Palmquist e Jenkins, 1980; De Peters e Cant, 1992). L'apporto di olio di semi di lino nel rumine della pecora o l'aggiunta di olio di mais o di lecitina alla razione di pecore da latte ha evidenziato una riduzione della degradabilità delle proteine, una più bassa concentrazione di ammoniaca e un aumento del flusso di azoto nel duodeno (Jenkins, 1993).

L'effetto dei grassi sul metabolismo ruminale dipende dalla struttura dei lipidi: (a) il grado di insaturazione (i PUFA inibiscono le fermentazioni più dei SFA); (b) la presenza di gruppi carbossilici liberi; (c) livello di saturazione e di esterificazione.

Devendra e Lewis (1975) hanno ipotizzato quattro teorie per spiegare come l'aggiunta di grassi alle razioni per ruminanti possa interferire con le fermentazioni ruminali e con la digeribilità della fibra: (a) la barriera fisica costituita da fibra e grasso

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

impedisce l'attacco microbico; (b) la modificazione della popolazione ruminale a causa dell'effetto tossico del grasso su alcuni microrganismi; (c) l'inibizione dell'attività microbica dall'effetto superficie esplicito dagli AG sulla membrana cellulare dei batteri; (d) la riduzione di cationi disponibili per la formazione di complessi insolubili con AG a lunga catena.

Le prime due teorie sono le più accreditate. Riguardo la prima ipotesi, il rallentamento delle fermentazioni viene spiegato con la formazione di uno strato lipidico che inibirebbe la degradazione della cellulosa coprendo le particelle di alimento e impedendo il contatto fisico tra microbi e alimento necessario perché gli enzimi cellulolitici siano attivi (Jenkins, 1993). La seconda ipotesi, invece, è supportata dal fatto che l'aggiunta a colture pure di batteri ruminanti di AG ne inibisce la crescita, confermando l'effetto antimicrobico diretto dei lipidi.

1.3.7. IL PROFILO ACIDICO IDEALE DEL GRASSO DEL LATTE

In passato, il grasso del latte è stato oggetto di critiche per il suo profilo acidico meno salubre rispetto a quello dei vegetali e dell'olio di pesce. Il grasso del latte è molto ricco di C_{14:0} e C_{16:0}, ma ha un basso contenuto di MUFA e PUFA.

Il profilo ideale del grasso del latte dovrebbe contenere meno del 10% di PUFA più dell'8% di SFA e l'82% di MUFA (O'Donnell, 1993), tuttavia il normale profilo acidico del latte contiene più del 70% di SFA e, quindi, si discosta molto dal profilo suggerito. Sebbene le prove scientifiche delle relazioni tra grassi saturi e malattie cardiovascolari siano ancora ambigue, ci sono numerosi dati che indicano che non è necessario apportare cambiamenti così radicali al profilo acidico del grasso. Molti AG precedentemente ritenuti dannosi, sono oggi considerati indifferenti o positivi per la salute umana: gli AG C_{18:0} e C_{18:1}, ad esempio, svolgono un ruolo importante nella riduzione del colesterolo nel sangue (Jensen *et al.*, 1991).

Dott. Maria Luisa Varricchio

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Poiché elevati contenuti nel latte di $C_{16:0}$ e $C_{14:0}$ creano preoccupazioni in campo medico, si tende a modificare con la dieta il profilo acidico, con un aumento di $C_{18:0}$ e $C_{18:1}$ e una riduzione di $C_{16:0}$ e $C_{14:0}$, ottenendo un latte con caratteristiche migliori per la salute umana e ed anche più adatto alla produzione di un burro più soffice. La possibilità di aggiungere diverse integrazioni di grasso nella razione dei ruminanti da latte consente di modificare opportunamente la composizione acidica del latte attraverso la scelta del grasso col profilo acidico più vicino a quello desiderato, evitando quei grassi che causano un incremento di $C_{16:0}$.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

2. IL CONTENUTO LIPIDICO DEGLI ALIMENTI PER IL BESTIAME

Il tenore lipidico di un alimento è espresso attraverso la frazione analitica dell'Estratto Etereo (EE), che comprende oltre ai lipidi, anche altre sostanze (cere, clorofilla, vitamine liposolubili e sostanze insaponificabili) che rappresentano nei foraggi fino al 50% e nei concentrati fino al 20% dell'EE.

I lipidi presenti nei foraggi e nei semi sono generalmente sotto forma di TG e fosfolipidi. Gli alimenti per ruminanti contengono, in media, circa il 3,5% SS di EE e, di questo, gli AG costituiscono solo il 40% nei foraggi e il 70%, nei concentrati. Gli AG più rappresentati sono quelli a 18 atomi di C di cui il LA è il più rappresentato (mediamente il 60%).

Tra gli AG nei semi oleosi il LA (C_{18:2}) è la frazione predominante, l'LNA (C_{18:3}), invece, è quella più alta nei foraggi (Palmquist e Jenkins, 1980). I foraggi freschi delle regioni temperate contengono circa l'1-3% di AG, soprattutto nel periodo primaverile ed autunnale. Più della metà di questi AG sono rappresentati da α -LA. Nelle regioni tropicali, invece, i foraggi presentano una percentuale di LNA variabile dal 15 al 40% degli AG totali (Chilliard *et al.*, 2001). La composizione acidica dei foraggi è, comunque, influenzata dalla specie e, anche, dalla frequenza di utilizzo del pascolo (Dewhurst *et al.*, 2001). Il profilo acidico è funzione anche del tipo di foraggio: foraggi provenienti da erbai di alta collina, rispetto a quelli di pianura, presentano un più alto contenuto in C_{18:1}, un contenuto doppio di CLA, lo stesso contenuto di acido miristico (MA), ma molto più basso di quello dei concentrati (Kelly *et al.*, 1998; Chilliard *et al.*, 2001; Collomb *et al.*, 2001; Onetti *et al.*, 2001).

La qualità superiore dei foraggi freschi rispetto agli insilati di erba, relativamente al rapporto AG UFA/SFA, è riconducibile alle probabili alterazioni, causate da fermentazioni indesiderate all'interno della massa in fase di maturazione (Chilliard *et al.*, 2001). Tra gli insilati, quello di mais è caratterizzato da un'elevata concentrazione in LA, in quanto, i

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

semi, normalmente presenti per più del 30% nella massa di insilato, ne contengono più del 60%.

Anche la tecnica di conservazione incide sul contenuto in AG dei foraggi: nel fieno si nota, infatti, un calo della concentrazione degli AG a lunga catena e, in particolare, del LNA, con una conseguente riduzione del contenuto degli acidi ω_3 nel latte (Chilliard *et al.*, 2001).

Per quanto riguarda i concentrati, invece, si distinguono in base al tenore lipidico in due gruppi: (a) alimenti a basso tenore lipidico dal 2 al 10% SS (cereali, crusche, farine di estrazione, panelli di semi oleosi, trebbie di birra, *distillers*, melasso, pastazzo di agrumi); (b) alimenti ad alto tenore lipidico al 10 al 45% SS (semi oleosi, germe di mais). Nei semi e derivati la maggior parte degli AG è rappresentata da acidi a 18 atomi di carbonio e, in particolare, il LA e l'OA.

I grassi di origine animale (sego e strutto), invece, sono ricchi di SFA (PA e SA, rispettivamente 26 - 27% e 15 - 20%) e MUFA. I grassi dei pesci, invece, sono ricchi di AG a catena molto lunga (>20C).

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

3. ESAME DELLA LETTERATURA

Il profilo degli AG del grasso del latte è stato oggetto di numerosi studi poiché il rapporto fra SFA, MUFA e PUFA è un aspetto di fondamentale importanza per il controllo di alcune malattie nell'uomo.

Il latte vaccino contiene una quantità eccessiva di AG a corta catena e SFA rispetto a quello che è definito come profilo ideale, mentre è carente in MUFA e PUFA (Buccioni, 2002).

L'integrazione nella razione di alimenti contenenti oli vegetali, ricchi di MUFA e di PUFA, rappresenta una strategia per modificare il profilo dei TG del latte ed avvicinare il profilo degli AG a quello indicato come salubre per l'alimentazione umana (Ashes *et al.*, 1997).

Particolare interesse ha inoltre suscitato la possibilità di aumentare il contenuto degli AG della serie ω_3 , considerato il loro ruolo chiave nel controllo di alcune malattie.

L'aggiunta di olio di pesce nella dieta, ad esempio, determina un aumento significativo di PUFA della serie ω_3 (Jones *et al.*, 1998), ma può avere delle controindicazioni per quanto riguarda il sapore del latte. In alternativa, un aumento significativo del contenuto di ω_3 nel latte può essere ottenuto con la somministrazione di olio di semi di lino (Ward *et al.*, 2002). In entrambi i casi, il coefficiente di trasferimento degli AG a lunga catena nel latte è piuttosto modesto, probabilmente a causa del processo di biosaturazione che avviene nel ruminante e della mancanza di lipoproteine specifiche per idrolizzare i trigliceridi vegetali o animali (Chilliard *et al.*, 2000).

Il contenuto in $C_{16:0}$ nel grasso del latte può essere diminuito attraverso tutti quei fattori che inibiscono la sintesi di AG, così come attraverso l'alimentazione povera in acido palmitico (PA), come seme di ravizzone o di girasole. Per contro, l'aggiunta di sali di calcio dell'olio di palma (770 g/d in 6 prove) incrementa il contenuto in $C_{16:0}$ del grasso del latte con l'uso di 21 mg/g. (Chilliard *et al.*, 2000).

Dott. Maria Luisa Varricchio

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Un altro obiettivo potrebbe essere quello di diminuire il rapporto $C_{18:0}/C_{18:1}$ *cis-9* che inciderebbe sia sulla salute dell'uomo sia sulle caratteristiche organolettiche dei prodotti a base di latte (ad esempio, aumenterebbe la morbidezza del grasso).

La somministrazione di oleamide con l'alimentazione, o di oli sufficientemente protetti, o ancora, di semi ricchi in OA (ad esempio, semi di soia e ravizzone) sono mezzi utili per raggiungere questo obiettivo (Chilliard *et al.*, 2000). Tuttavia, somministrando grassi ricchi in SA, come grassi animali o AG idrogenati, il rapporto $C_{18:0}/C_{18:1}$ non aumenta poiché una grossa parte di SA è desaturata ad OA attraverso la ghiandola mammaria.

L'alimentazione con oli non protetti incrementa gli isomeri del $C_{18:1}$ sia *cis* sia *trans* (Banks *et al.*, 1990), che provengono dal metabolismo ruminale ($C_{18:1}$ *trans*) e dalla desaturazione mammaria del $C_{18:0}$ prodotto nel rumine. Il rapporto $C_{18:0}/C_{18:1}$ nel latte di capre è aumentato notevolmente attraverso l'impiego, nell'alimentazione, di semi di cotone protetti probabilmente a causa dell'inibizione della Δ^9 desaturasi mammaria dovuta all'AG ciclopropenoico proveniente dai semi del cotone (Gulati *et al.*, 1997).

L'impiego di una grossa quantità di olio di cartamo incapsulato produce un grasso del latte ricco in LA (+ del 35% del grasso del latte). L'alimentazione con semi incapsulati di ravizzone, di girasole, di soia o olio di semi di cotone, in prove condotte da diversi Autori, ha provocato un aumento di LA nel grasso totale tra il 15 e il 20% (Kuzdzal-Savoie *et al.*, 1975; McDonald e Scott, 1977; Gulati *et al.*, 1997).

Con la maggior parte delle diete a base di foraggi e prive di qualsiasi supplemento lipidico, la % di LA nel grasso del latte si aggira tra il 2 e il 3%. (Chilliard *et al.*, 2000).

Wu *et al.* (1994) riportano un incremento del LA nel grasso del latte di quasi il 3% utilizzando una miscela di semi di cotone e olio di cartamo (4% della SS della dieta).

In alcune prove è stato evidenziato che la somministrazione di soia sotto forma di seme integrale provoca un incremento dell'1% del LA rispetto alla somministrazione sotto forma di olio (Steele *et al.*, 1971). Questo effetto è chiaramente da ascrivere all'azione protettiva dei tegumenti del seme. D'altra parte però Masucci *et al.* (2006) in una prova su

Dott. Maria Luisa Varricchio

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

ovini alimentati con semi integrali di lupino non hanno evidenziato alcun effetto protettivo dei tegumenti sul grasso contenuto all'interno del seme.

I sali di calcio dell'olio di ravizzone e di soia non comportano un incremento proporzionale del LA nel latte (Ferlay *et al.*, 1992; Enjalbert *et al.*, 1997; Chouinard *et al.*, 1998; Kowalski *et al.*, 1999), poiché i sali si dissociano nel rumine quando il pH scende. Di conseguenza, si avrà un'intensa idrogenazione ruminale.

Il contenuto in LNA, così come quello in LA, può essere modificato da trattamenti alimentari.

Il foraggio fresco è la principale fonte alimentare di LNA, mentre la fienagione determina una notevole riduzione della concentrazione di C_{18:3}, a causa della concomitante riduzione del contenuto in AG totali e della percentuale di C_{18:3} (Chilliard *et al.*, 2000).

Il contenuto in C_{18:3} nel latte può essere 4 volte più basso all'inizio del periodo di utilizzazione del pascolo rispetto alla fine del periodo (Decaen e Ghadaki, 1970). Tuttavia, poiché, il contenuto in AG e in LNA dell'erba è funzione della composizione floristica, dello stadio vegetativo, dell'andamento stagionale e delle modalità di pascolamento non sempre si osserva un incremento del contenuto in LNA nel latte in seguito all'utilizzo del pascolo (Kelly *et al.*, 1998; Lawless *et al.*, 1998).

Tra gli alimenti non-forage, il seme di lino è il solo che ha una significativa quantità di C_{18:3} (in media, più del 50% degli AG) (Chilliard *et al.*, 2000).

In prove condotte somministrando olio di semi di lino protetto, è stato osservato che l'assunzione di grosse quantità (20% della dieta) ha determinato un notevole incremento (più del 20% del totale) di LNA nel grasso del latte (McDonald e Scott, 1977). Utilizzando quantità inferiori di olio di lino protetto (410 g/d), la proporzione di LN nel grasso del latte è aumentata fino al 6.4% (Goodridge e Ingalls, 1998). Questi risultati suggeriscono un'elevata efficienza di trasferimento di tale AG dal duodeno al latte.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Significativi incrementi del contenuto in LNA nel grasso del latte in seguito all'utilizzo di semi di lino sono stati osservati da Kennely (1996), Mansbridge *et al.* (2000) e da Brunschwig *et al.* (1996).

Risultati contraddittori sono stati ottenuti con utilizzando sali di calcio dell'olio di semi di lino: Chouinard *et al.* (1998) non ha osservato alcun effetto, mentre Brzoska *et al.* (1999) hanno evidenziato un significativo incremento in C_{18:2} e C_{18:3} nel latte. Un fattore importante che limita l'uso del seme di lino nell'alimentazione delle vacche da latte è il suo ben noto effetto negativo sulla digestione della fibra (Broudiscou *et al.*, 1994), dovuto ad una grande riduzione della popolazione protozoica (Doreau e Ferlay, 1995) accompagnato da una modifica delle fermentazioni ruminali verso la produzione di propionato (Jouany *et al.*, 2000).

L'isomero C_{18:2} *trans*-10, *cis*-12 è il precursore, nella sintesi ruminale, dell'acido monoenoico C_{18:1} *trans*-10 (Bauman e Griinari, 2001), il cui effetto si esplicherebbe in una inibizione dell'attività della steroil-CoA desaturasi, e quindi in un rallentamento della sintesi *ex novo* degli acidi grassi nella ghiandola mammaria.

Il contenuto di CLA nel latte dipende dalla produzione ruminale di VA e dall'attività della Δ^9 desaturasi, enzima che è in grado di trasformare il primo isomero in C_{18:2} *cis*-9, *trans*-11. Diete con elevate quantità di LA, che comprendono quindi oli vegetali, o concentrati amidacei che riducono il pH ruminale, causano un aumento nel latte di CLA (Jones *et al.*, 2000; Secchiari *et al.*, 2001). Nel primo caso, infatti, si limita la riduzione del VA nel rumine, che è pertanto trasferito in maggiore quantità nella ghiandola mammaria dove è desaturato. La diminuzione del pH causerebbe invece una diminuzione della sintesi del VA nel rumine, a causa probabilmente di una variazione della microflora ruminale, ed un aumento dell'isomero C_{18:1} *trans*-10 (Griinari *et al.*, 1998). Infine, altri fattori interessanti che determinano una variazione del contenuto di CLA nel grasso del latte sono il pascolo, la maturazione del foraggio e la stagione, condizioni che comportano una

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

variazione del contenuto di glicolipidi e di fosfolipidi delle piante (Buccioni, 2002) e quindi di UFA nell'alimento.

Dal momento che i TG costituiscono la principale frazione dei lipidi nel latte, essi sono stati ampiamente studiati per caratterizzare la frazione trigliceridica del grasso del latte e gli AG che la compongono (Bracco *et al.*, 1972; Taylor e Hawke, 1975; Parodi, 1980, 1981; Weber *et al.*, 1988a, 1988b). Le procedure per determinare la distribuzione stereospecifica degli AG nello scheletro del glicerolo sono state oggetto di numerosi studi fin dagli anni '70 (Litchfield, 1972; Breckenridge, 1978; Kuksis, 1984; Christie, 1986).

La relativa posizione degli AG nei TG è molto importante poiché influenza le proprietà fisiche e nutrizionali del grasso del latte (Creamer e MacGibbon, 1996), influenza l'azione lipolitica degli enzimi e, di conseguenza, l'assorbimento, è responsabile delle proprietà reologiche del grasso del latte (Gresti *et al.*, 1993). Ad esempio, quando gli AG in posizione sn-1 e sn-3 sono differenti, la molecola è asimmetrica e ha 2 possibili stereoisomeri (Creamer e MacGibbon, 1996). Studi condotti da diversi Autori hanno messo in evidenza che gli AG C₄ e C₆ sono esterificati in posizione sn-3, mentre gli AG C_{10:0}, C_{12:0} e C_{14:0} sono esterificati per lo più in posizione sn-2 e, ancora, il C_{16:0} è esterificato preferibilmente nelle posizioni sn-1 e sn-2. Il C_{18:0} è esterificato in posizione sn-1, mentre il C_{18:1} si è mostrato esterificato in preferenza in posizione sn-1 e sn-3 (Hawke e Taylor, 1995).

La determinazione della distribuzione degli AG in ciascun TG è estremamente difficoltosa e richiede tecniche particolareggiate che possano differenziare sia i TG sia le posizioni degli AG sulla molecola di glicerolo.

I TG del grasso del latte bovino contengono 13 principali AG (> 1%) a corta, media e lunga catena, oltre ad AG a lunga catena insaturi che in totale risultano pari a 95 mol/100mol. I restanti 5 mol/100mol corrispondono ad AG minori a numero dispari di atomi di C (Gresti *et al.*, 1993).

I risultati di una prova condotta da Blasi *et al.* (2008) su campioni di latte di asina, vacca, pecora, capra e bufala hanno messo in evidenza che tutti i campioni di latte

Dott. Maria Luisa Varricchio

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

contengono TG con una elevata percentuale di SFA, in particolare quelli provenienti da ruminanti (circa il 70%) paragonati al latte d'asina (circa il 60%); inoltre, il latte di queste ultime è apparso più ricco in PUFA (14.6% vs 2.3% di vacca, bufala e capra e 3.9% per la pecora) per cui sembra essere più indicato nella prevenzione delle malattie cardiovascolari rispetto agli altri tipi di latte. Le analisi stereospecifiche della prova condotta da Blasi *et al.* (2008) hanno messo in evidenza delle differenze nella composizione percentuale degli AG che compongono i TG delle differenti specie di mammiferi. In tutti i campioni, i SFA sono prevalentemente esterificati in posizione sn-1 e sn-2, mentre l'OA, il più abbondante MUFA è generalmente esterificato nelle tre posizioni del TG in contenuti percentuali simili.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

4. SCOPO DELL'INDAGINE

L'allevamento della bufala negli ultimi anni è stato interessato da profondi mutamenti che hanno riguardato, in particolare, gli aspetti alimentari che rivestono notevole importanza nel determinare sia i risultati tecnici ed economici dell'azienda zootecnica sia le caratteristiche organolettiche e nutrizionali del principale prodotto, il latte.

La produzione media di latte del bufalo italiano è notevolmente aumentata negli ultimi decenni, fino a diventare la più alta a mondo con una percentuale di grasso che si aggira intorno all'8.3%, ma che, in condizioni particolarmente favorevoli, può raggiungere anche il 15%.

In questo scenario, sono sempre più diffuse le aziende che adottano moderne tecniche di alimentazione, come ad esempio, l'unifeed, e utilizzano specifici standard di razionamento, come quelli proposti dalla Commissione tecnico – scientifica del Consorzio Mozzarella di Bufala Campana (CMBC, 2000).

Inoltre, al fine di incrementare la concentrazione energetica della razione e migliorare, quindi, le performance produttive degli animali si sta diffondendo, anche negli allevamenti bufalini, l'utilizzo alimentare di grassi rumino-protetti o semi oleosi. È risaputo, infatti, che anche nella bufala, durante la prima fase della lattazione, è necessario fornire diete con una maggiore densità energetica al fine di bilanciare gli effetti dell'inappetenza. L'utilizzo di un tale tipo di integrazione, inoltre, risulta utile in quanto il rapporto costo dell'integrazione/costo per litro di latte, è molto più favorevole che nella vacca. D'altra parte però, l'utilizzo di questi prodotti può comportare modifiche abbastanza rilevanti sul profilo acidico del grasso del latte e, di conseguenza sulle caratteristiche dei prodotti caseari, peraltro ampiamente studiate per il latte bovino, ovino e caprino, mentre mancano studi specifici relativi alla bufala.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Le caratteristiche quanti – qualitative del latte sono, tuttavia, condizionate anche da altri fattori che riguardano sia l'animale in senso stretto sia l'ambiente che lo circonda ed, in particolare, è la frazione lipidica il costituente del latte che subisce in maniera marcata queste influenze. Nel corso dell'anno, infatti, la composizione chimica del latte, in particolare quello di bufala, è soggetto a continue modifiche legate alla stagionalità riproduttiva e alla distribuzione dei parti.

Lo studio della composizione trigliceridica e acidica del grasso del latte di bufala, della sua variabilità e dei fattori che la influenzano costituisce, inoltre, il presupposto indispensabile per la messa a punto di un profilo standard di riferimento.

Negli ultimi anni, la qualità dei prodotti alimentari, con particolare riferimento alla composizione acidica del grasso del latte e dei suoi derivati, sta suscitando notevole interesse giacché influenza i processi di caseificazione e la qualità del prodotto finito (consistenza, aroma, odore e colore). Inoltre, le caratteristiche degli acidi grassi quali, lunghezza della catena, grado di saturazione, tipo e percentuale di acidi grassi insaturi e polinsaturi, possono incidere, positivamente o negativamente, sulla salute umana.

Il grasso del latte, come altre fonti lipidiche di origine animale, è stato criticato dai dietisti dal momento che contiene considerevoli concentrazioni di acidi grassi saturi C_{14:0} e C_{16:0} e relativamente basse concentrazioni di MUFA e PUFA (Kennelly, 1996). Tuttavia ci sono numerosi componenti del grasso del latte che possono influire positivamente sulla salute umana.

Sono ben documentati, infatti, gli effetti benefici degli ω_3 sulle malattie cardiache, gli effetti anticancerogenici dei CLA e dell'acido butirrico (C_{4:0}) (Molkentin, 2000). Gli studi sulla composizione in acidi grassi del latte del bufalo italiano sono limitati e discontinui (Polidori *et al.*, 1997; Bergamo *et al.*, 2003).

Scopo della ricerca è stato indagare le variazioni nel corso dell'anno della composizione acidica e trigliceridica del grasso del latte di bufala con particolare

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

riferimento al contenuto in: acidi grassi a media catena, acidi grassi polinsaturi, acido linoleico coniugato (CLA).

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

5. MATERIALI E METODI

La prova, della durata di 1 anno (maggio 2004 – aprile 2005), è stata condotta in quattro aziende bufaline da latte (A, B, C, e D) della provincia di Salerno individuate, a seguito di un'accurata indagine preliminare, tra quelle rappresentative delle tipologie aziendali diffuse in Campania.

In ciascuna azienda sono stati raccolti, a cadenza settimanale, campioni di latte di massa rappresentativi delle due mungiture, che, immediatamente congelati a -16°C sono stati successivamente analizzati per la determinazione e del profilo acidico e trigliceridico.

Sono stati, inoltre, eseguiti rilievi aziendali mensili al fine di rilevare la produzione latte media (kg/capo) e l'alimentazione praticata. Sono stati, inoltre raccolti campioni di latte di massa rappresentativi delle due mungiture che sono stati immediatamente analizzati, presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, per la determinazione dei contenuti in grasso, proteine, lattosio, residuo secco magro (Milkoscan 605, Foss Electric, Sweden) e urea (pH – metria differenziale, EUROCHEM CL 10), carica batterica totale (WASP Spiral System), numero di cellule somatiche (SCC - Fossomatic 250, Foss Electric, Sweden).

5.1. ANALISI CHIMICHE

5.1.1. DETERMINAZIONE DEGLI ACIDI GRASSI

La determinazione della composizione acidica del grasso è stata eseguita attraverso l'analisi degli esteri metilici degli acidi grassi come previsto dalla metodica ufficiale

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

(AOAC – UPAC 936.22). Al momento dell'analisi, il latte è stato scongelato lentamente, omogeneizzato e una quantità pari a 120 ml è stata centrifugata per l'estrazione del grasso.

La percentuale di grasso estratta è stata calcolata con la seguente formula:

$$P/L * 100 = \text{Grasso \% (p/v)}$$

dove:

P = peso in grammi del grasso estratto

L = volume di campione utilizzato

p/v = peso/volume

L'analisi degli acidi grassi è stata ottenuta attraverso la reazione di transesterificazione: 1 ml di esano e 0,2 ml di KOH (2N) sono stati aggiunti a 50 ml di estratto lipidico. Dopo 2 min di centrifugazione a 2000 giri/min è stata raccolta la fase esanica, che è stata subito iniettata nel Dani GC-FID, mod. 8521A, utilizzando i seguenti parametri: fase stazionaria 50% cianopropil metil silicone; colonna di 50 m (i.d 0,25 mm, f.t. 0,25 μ m) (Quadrex 007-23).

Parametri operativi: carrier Elio 2 ml/min, split rapporto 1/60 (v/v), FID temperatura 260°C.

Programma temperatura PTV: 50°C per 10 min, 400°C/min fino a 260°; 260°C per 3 min.

Programma temperatura riscaldamento: 50°C per 3 min, 7°C/min fino a 230°; 230°C per 10 min.

L'identificazione dei picchi è stata effettuata confrontando, nelle medesime condizioni operative, i tempi di ritenzione di standard puri esterni a concentrazione nota, con quelli dei campioni in analisi.

L'area percentuale di ciascun composto, riportata sul report d'integrazione, è stata quantificata con il metodo dello standard esterno con calcolo del fattore di correzione.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

5.1.2. ANALISI DEI TRIGLICERIDI

La determinazione della composizione trigliceridica è stata eseguita attraverso la metodica ufficiale (AOAC-UPAC 986.1). È stata preparata una soluzione al 4 % di grasso in esano, centrifugata ed iniettata al gas cromatografo. L'identificazione è stata condotta attraverso l'utilizzo di uno standard esterno BCR (CRM) contenente, in concentrazione nota, i gliceridi con atomi di carbonio compresi tra 26 e 54.

La quantificazione è stata eseguita con il calcolo dei fattori di correzione.

5.1.3. ELABORAZIONE STATISTICA

L'analisi descrittiva della composizione acidica e trigliceridica del grasso del latte è stata effettuata utilizzando i principali indicatori statistici (media, deviazione standard, mediana ecc.).

I dati della composizione acidica e trigliceridica sono stati, inoltre, analizzati mediante analisi della varianza utilizzando l'azienda e il mese di prelievo quali fattori di variazione.

Allorquando è stata evidenziata la significatività statistica del fattore di variazione, sono stati utilizzati contrasti ortogonali per evidenziare le differenze tra le medie.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

6. RISULTATI E DISCUSSIONE

Nella tabella AG2 è riportata la produzione di latte delle diverse aziende. L'azienda B ha mostrato la più alta produzione di latte normalizzato ($9.3 \text{ kg/d} \pm 0.29$), mentre il valore più basso è stato osservato nell'azienda C ($7.6 \text{ kg/d} \pm 0.31$). La produzione di latte e le percentuali di grasso e proteine nelle quattro aziende sono apparse simili o leggermente inferiori rispetto ai valori registrati per le bufale in lattazione in Italia (ANASB, 2003). La conta batterica è apparsa sempre al di sotto del limite europeo di 500.000 ufc/ml. Il numero di cellule somatiche è apparso inferiore alla soglia di 200.000/ml, eccetto che per l'azienda C.

La legislazione italiana relativa alle caratteristiche igienico – sanitarie del latte crudo di bufala stabilisce un limite solo per la conta batterica totale, mentre non ha fissato il valore massimo relativo al contenuto di cellule somatiche. Al contrario, le norme europee hanno stabilito il valore limite per le cellule somatiche pari a 400.000c/ml per il latte di bufala destinato alla produzione di derivati a base di latte crudo. Tuttavia, secondo Terramocchia *et al.* (2001) le cellule somatiche sono in grado di degradare alcune caseine con ripercussioni negative sul processo di caseificazione. Essi hanno anche individuato come limite critico, al di sopra del quale il latte bufalino presenta difficoltà di coagulazione, il numero di 400.000 cellule somatiche/ml. Secondo Terramocchia *et al* (2001), un latte bufalino con un contenuto di 200.000 cellule somatiche/ml ha una buona attitudine alla coagulazione mentre se raggiunge o addirittura supera il valore massimo, non coagula.

Per quanto riguarda l'alimentazione, in tre aziende (A, B, C) è stato adottato il sistema unifeed. Nell'azienda D è stato utilizzato, invece, il sistema di alimentazione tradizionale con distribuzione del concentrato in sala mungitura e dei foraggi (fieno di erba medica o di prato, paglia di frumento) in stalla.

Inoltre:

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

✓ nell'azienda A sono stati utilizzati per tutto l'anno in media 0.15 ± 0.05 kg/d di un prodotto commerciale contenente sali di calcio dell'olio di palma (EE 84% DM; 46% C_{16:0}; 38% C_{18:1}; 11% C_{18:2}; 7% altri AG);

✓ nell'azienda B sono stati utilizzati per tutto l'anno in media 0.19 ± 0.05 kg/d dello stesso prodotto commerciale insieme a circa 1,5 di semi di cotone (in media, 1.53 ± 0.21 kg/d; EE 22% DM; 28% C_{16:0}; 20% C_{18:1}; 46% C_{18:2});

✓ nell'azienda C non sono stati usati né semi oleosi né grassi protetti.

Nella tabella AG3 sono riportate le caratteristiche chimiche e nutrizionali delle razioni usate nelle quattro aziende durante l'anno. Nell'azienda B, la razione utilizzata mostra i valori più alti di PG (2767 g/d \pm 478) e grasso (614 g/d \pm 59) e un più basso rapporto foraggio/concentrato.

6.1. CARATTERISTICHE DEL PROFILO ACIDICO DEL GRASSO DEL LATTE DI BUFALA

Sono stati complessivamente analizzati 203 campioni di latte con individuazione di 21 AG.

Di questi, i più importanti, in termini quantitativi, sono stati:

C_{16:0} (in media, $30.5\% \pm 3.0$);

C_{18:1 c} ($21.5\% \pm 2.0$);

C_{18:0} ($12.0\% \pm 2.5$);

C_{14:0} ($10.7\% \pm 1.2$);

C_{4:0} ($3.4\% \pm 0.5$).

Questa gerarchia è stata rispettata per tutti i campioni e la somma di questi AG ha rappresentato, in media, il 78% degli AG totali. I valori osservati sono paragonabili a quelli

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

riportati per il latte bovino (Kennelly, 1996) e bufalino (Polidori *et al.*, 1997; Bergamo *et al.*, 2003) (tabella AG4).

Gli AG a corta catena ($C_4 - C_{10}$) sono stati in media pari all' $8.10\% \pm 1.27$, con valori compresi tra il 4.70% e il 9.81%. Il C_8 è l'AG a catena corta meno rappresentato (0.96%), mentre il C_4 , che rappresenta uno dei principali AG influenzanti le caratteristiche aromatiche dei prodotti caseari, quello più abbondante (3.40 ± 0.5) (tabella AG5; grafico AG1).

Nei ruminanti la sintesi degli AG a catena corta avviene direttamente nella ghiandola mammaria a partire dai nutrienti veicolati dal flusso circolatorio (acetato e β -idrossibutirrato), quindi essi risentono in misura attenuata dell'influenza dell'alimentazione (Palmquist *et al.*, 1969; Demeyer *et al.*, 1995; Chilliard *et al.*, 2000).

Il contenuto in acidi grassi a media catena ($C_{12} - C_{16}$) è stato in media pari al 48.74 ± 4.17 , con valori compresi tra il 45.93 e il 56.94 (tabella AG5; grafico AG2). Tra di essi, il $C_{16:0}$ è stato il componente quantitativamente più abbondante (in media, il 30%) (tabella AG5; grafico AG2) ed è apparso meno variabile rapportato agli altri AG della stessa categoria, oscillando tra un minimo 27.48% e un massimo del 37.16%. Il $C_{14:1}$ e il $C_{16:1}$ sono stati gli AG a media catena meno rappresentati (rispettivamente in media 0.32 ± 0.05 e 0.39 ± 0.10). Molti degli AG di nuova sintesi (da C_4 a C_{16}) sono saturi poiché l'enzima Δ^9 desaturasi ha un'attività piuttosto bassa sugli AG a catena con meno di 18 atomi di C, per cui solo una minima quota di $C_{14:0}$ e il $C_{16:0}$ è desaturata a $C_{14:1}$ e il $C_{16:1}$ (Massart-Leën *et al.*, 1974). Per di più, gli AG a lunga catena (con 16 o più atomi di C) sono potenti inibitori della sintesi mammaria di AG attraverso un effetto inibitorio diretto sull'attività dell'acetil-CoA-carbossilasi (Barber *et al.*, 1997). Quindi, quando si rende disponibile un'elevata quantità di AG a lunga catena provenienti dalla dieta o dalla mobilizzazione di grasso corporeo, si assiste ad una diminuzione della quantità di AG a corta e media catena (da C_8 a C_{14} o C_{16}) nel grasso del latte (Chilliard *et al.*, 1986a; Chilliard *et al.*, 1986b), dovuta ad un'elevata secrezione di AG a lunga catena provenienti dal sangue (effetto diluizione) e una minore

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

sintesi di AG *ex novo* (Chilliard, 1993). L'effetto inibitorio tende ad essere maggiore all'aumentare del numero di atomi di C che compongono gli AG e/o al grado di insaturazione (Chilliard *et al.*, 2000).

Un altro fattore che può accentuare questi cambiamenti nella composizione acidica è la riduzione della disponibilità di acetato e di 3 - idrossibutirrato per la sintesi mammaria di AG, determinata, ad esempio, da una diminuzione volontaria del livello di ingestione alimentare, così come da una diminuzione del rapporto acetato/propinato nel rumine, determinato dall'aumento di ingestione di UFA non protetti che comportano cambiamenti della popolazione batterica ruminale e, di conseguenza, variazione nei rapporti tra gli AGV (Doreau e Ferlay, 1995; Chilliard *et al.*, 2000). Da tutto ciò si può dedurre come sia estremamente complesso stabilire gli effetti dei grassi provenienti dalla dieta dovuti sia alla natura stessa del grasso aggiunto alla razione (per la sua composizione in AG), sia alla modalità di inserimento (sotto forma di semi oleosi, oli, grassi protetti e non) e, ancora, alla quantità di grasso nella dieta, oltre che all'interazione con i foraggi e/o i concentrati della razione che possono influenzare la bioidrogenazione ruminale (Chilliard *et al.*, 2000).

Dai risultati di numerose ricerche possono essere dedotte alcune osservazioni. In primo luogo, la proporzione di C₄ nel grasso del latte è stata influenzata solo in parte dal contenuto lipidico della razione (Palmquist e Jenkins, 1980; Palmquist *et al.*, 1993; Enjalbert *et al.*, 1998); in secondo luogo la proporzione di AG a corta catena diminuisce solo quando si somministrano oli non protetti che influiscono sulla funzione ruminale (Chilliard *et al.*, 1986; Chilliard *et al.*, 1993). Inoltre, la proporzione di AG C₄, C₆ e C₈ cambia in seguito all'aggiunta di grassi protetti o in seguito all'infusione duodenale di grasso (Drackley *et al.*, 1992; Christensen *et al.*, 1994). Tutto questo è in accordo con l'osservazione di alcuni ricercatori, secondo cui la mobilizzazione di grasso corporeo aumenta le quote di C_{18:0} e C_{18:1} nel grasso del latte a spese di AG da C₁₀ a C_{16:0} senza diminuire significativamente gli AG da C₄ a C₈ (Decaen e Adda, 1970; Storry *et al.* 1980; Chilliard *et al.*, 1986; Chilliard, Dott. Maria Luisa Varricchio

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

1997). Si può ancora osservare che la proporzione di PA diminuisce in seguito all'infusione duodenale di olio di pesce, mentre aumenta notevolmente quando sono aggiunti alla dieta grassi con elevati contenuti di olio di palma (Parodi, 1992).

Come si può dedurre da queste osservazioni, il bilancio tra la sintesi ex novo di AG a corta e media catena nella mammella e gli AG di origine microbica ed alimentare a lunga catena presenti nella ghiandola mammaria possono essere sostanzialmente modificati attraverso la dieta (Christensen *et al.*, 1994; Stageman *et al.*, 1981, Khorasani *et al.*, 1991; Kennelly e Khorasani, 1992).

Gli AG a lunga catena ($C_{18} - C_{22}$) sono apparsi in media pari al $40.82\% \pm 4.86$, con i valori più elevati registrati per il $C_{18:0}$ (11.94 ± 2.53) e per il $C_{18:1 c}$ (21.50 ± 2.12) (tabella AG5; grafico AG3). I valori minimi sono stati osservati, invece, per il per il $C_{18:3}$ (1.17 ± 0.32) e per il $C_{18:1 t}$ (1.96 ± 0.53) (tabella AG5; grafico AG3).

Gli AG a lunga catena della famiglia ω_3 hanno effetti fisio-metabolici differenti tra cui i più importanti sono:

- ✓ modificazione del metabolismo delle lipoproteine con riduzione dei trigliceridi (-30%), sia di quelli a digiuno che di quelli postprandiali; regressione del processo arterosclerotico grazie alla riduzione della sintesi di citochine e interleuchina;
- ✓ prevenzione della trombosi grazie all'inibizione della sintesi, nelle piastrine, del trombossano A2;
- ✓ riduzione della risposta infiammatoria;
- ✓ inibizione della risposta immune (Berra *et al.*, 2003).

Negli ultimi anni è stato osservato che nel latte sono presenti due isomeri posizionali dell'acido linoleico coniugato, il $C_{18:2 trans-10, cis-12}$ e il $C_{18:2 cis-9, trans-11}$ (CLA) che hanno effetti positivi sulla salute dell'uomo (Contato, 2004). Questi isomeri hanno evidenziato, in prove *in vivo* su animali da esperimento, effetti anticancerogeni, soprattutto sui tumori della mammella, dell'intestino e della prostata (Ip *et al.*, 1997; McGuire *et al.*, 1999; Parodi, 1999; Pariza *et al.*, 2001; Secchiari *et al.*, 2005). Svolgono,

Dott. Maria Luisa Varricchio

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

inoltre, attività anticolesterolemica e di protezione delle coronaropatie (CHD), hanno effetti antidiabetici, nei confronti del diabete di tipo II, e immunomodulanti, cioè sono in grado di aumentare le difese aspecifiche e, infine, sono attivi nel ridurre l'obesità. È comunque ritenuto che le specifiche attività biologiche siano da attribuirsi ai singoli isomeri (McGuire *et al.*, 1999, Parodi, 1999).

Il contenuto in CLA è apparso, in media pari a 0.76 ± 0.33 con un minimo che ha raggiunto lo 0.2% ed un massimo pari al 2.81% (tabella AG5; graficoAG3); la variabilità registrata potrebbe essere dovuta al grado di bioidrogenazione ruminale degli UFA o alla conversione endogena di acido transvaccenico (TVA) ad opera della Δ^9 desaturasi nella ghiandola mammaria e nei tessuti adiposi (Kennelly, 1996) o, ancora, a fattori legati soprattutto all'alimentazione (utilizzo o meno di foraggi freschi, semi oleosi integrali, grassi protetti).

Il CLA è un intermediario dell'idrogenazione ruminale del LA, mentre il $C_{18:1}$ *trans*-11 (VA) è un intermediario comune nella bioidrogenazione degli acidi linoleico e α e γ linolenico. Poiché la riduzione del $C_{18:1}$ *trans* è generalmente il fattore che limita la completa idrogenazione dell'AG C_{18} insaturo, si ha spesso un accumulo ruminale di $C_{18:1}$ *trans*, ma raramente di CLA, come suggerito dal basso rapporto (1:40) CLA/ $C_{18:1}$ *trans* (Griinari e Bauman (2001).

Allo stesso modo, poiché in altri studi il CLA nel latte è notevolmente aumentato con diete a basso livello di $C_{18:2}$, ad esempio con l'alimentazione al pascolo (Stanton *et al.*, 1997; Kelly *et al.*, 1998; Lawless *et al.*, 1998) o con diete arricchite di olio di pesce, si può dedurre che è possibile che una certa quota di CLA possa essere sintetizzata dai tessuti.

Questa ipotesi è stata discussa in dettaglio da Griinari e Bauman (1999), riesaminando dati sperimentali *in vivo* ed *in vitro* in differenti specie animali. Essi hanno suggerito che le cellule mammarie dei ruminanti (e quelle adipose) possono sintetizzare CLA *cis*-9, *trans*-11 da $C_{18:1}$ *trans*-11 ed altri isomeri dei CLA da altri isomeri del $C_{18:1}$ *trans*, attraverso l'azione della Δ^9 desaturasi sul $C_{18:1}$ *trans*. In particolare, è stato mostrato nelle

Dott. Maria Luisa Varricchio

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

pecore che l'espressione (mRNA) della Δ^9 desaturasi diminuisce nel tessuto adiposo ed aumenta nel tessuto mammario con l'inizio di lattazione (Ward *et al.*, 1998).

Un'alta attività mammaria della desaturasi potrebbe spiegare perché il rapporto CLA (prodotto)/C_{18:1}trans-11 (precursore) è rimasto ragionevolmente costante in parecchie prove, anche se è variato al variare delle condizioni sperimentali e di laboratorio (Griinari e Bauman, 1999). Griinari e Bauman (1999) suggeriscono che circa il 33% del C_{18:1} trans-11 proveniente dalla ghiandola mammaria è desaturato a CLA *cis*-9, *trans*-11, cioè (più di 90%) l'isomero principale del CLA trovato nel grasso del latte. La presenza di C_{18:1} trans-11 nel grasso del latte dei ruminanti potrebbe aumentare il relativo valore per i consumatori, poiché può essere convertito in CLA (Santora *et al.*, 2000). Tuttavia, nella ghiandola mammaria umana non è stata messa in evidenza la desaturazione di C_{18:0} a C_{18:1} (Jensen, 1999) malgrado siano stati identificati, nei tessuti umani, i geni che codificano per la Δ^9 desaturasi (Tocher *et al.*, 1998). Oltre a questo, un certo contenuto in CLA è probabilmente assorbito dal tratto digestivo e dalla ghiandola mammaria dei ruminanti. Da prove condotte da diversi Autori è emerso che gli isomeri dei CLA infusi nell'abomaso delle vacche sono stati trasferiti nel latte con un'efficienza compreso tra 10 e 26% (Chouinard *et al.*, 1999a) o da 21 a 33% (Chouinard *et al.*, 1999b).

Per quanto riguarda i SFA, mediamente presenti in percentuale pari a 66.24 ± 2.86 , le componenti quantitativamente più basse sono rappresentate dagli acidi C₆ ($1,83 \pm 0.44$), C₈ ($0,96\% \pm 0.23$) e C₁₀ ($1,91\% \pm 0.42$) mentre il C_{14:0} ($10,67 \pm 1.15$), il C_{16:0} e il C_{18:0} ($11,94 \pm 2.53$) sono gli AG presenti in maggiore quantità (tabella AG5; grafico AG4). Proprio per questo elevato contenuto in SFA e relativamente basse concentrazioni di MUFA e PUFA, il grasso del latte è stato criticato dai nutrizionisti (Kennelly, 1996); il Wisconsin Milk Marketing Board, in accordo con l'Università del Wisconsin, nel tentativo di definire il profilo acidico del latte ideale, sono giunti alla conclusione che esso doveva contenere meno del 10% di PUFA, fino a l'8% di SFA e l'82% MUFA. Tuttavia, questa definizione molto restrittiva non tiene conto del fatto che AG come il C_{18:0} e il C_{18:1} sono indifferenti o

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

addirittura positivi per la salute umana. Infatti, è stato dimostrato che il C_{18:0} è efficace quanto il C_{18:1} nel ridurre il livello di colesterolo nel sangue (Kennelly, 1996).

Tra gli UFA, le quote quantitativamente più basse sono rappresentate dagli acidi C_{14:1} (1.42 ± 0.84), palmitoleico (C_{16:1}, 2.08 ± 0.42), LA (C_{18:2}, 2.53 ± 0.70) e LNA (C_{18:3}, 1.17 ± 0.32) (tabella AG5; grafico AG4). Questi ultimi due AG, sia come tali sia come precursori, sono considerati di notevole importanza nell'alimentazione umana, poiché in grado di svolgere un ruolo metabolico, funzionale e strutturale essenziale in diversi processi biometabolici basilari per il mantenimento di un ottimo stato di salute (Cocchi e Turchetto, 1999).

Il contenuto in UFA è stato pari al 31.42 ± 2.68, con un rapporto SFA/UFA uguale a 2.13 ± 0.27 e PUFA/SFA pari a 0.07% ± 0.02 (tabella AG5; grafico AG5).

All'interno degli AG insaturi, il rapporto tra MUFA e PUFA è risultato pari al 6.38% ± 1.63. I rapporti di saturazione più dettagliati (C_{14:1}/C_{14:0}; C_{16:1}/C_{16:0}; C_{18:1cis-9}/C_{18:0}; CLA/C_{18:1trans-11}) sono riportati nella tabella AG5.

Per quanto riguarda i trigliceridi, i più rappresentativi, dal punto di vista quantitativo, sono stati il C₃₈ (15.09 ± 0.90), il C₃₆ (14.28 ± 1.56) e il C₅₀ (10.07 ± 1.14), mentre gli altri hanno mostrato valori medi compresi tra 9.78% (C₄₀) e 0.10% (C₂₄) (tabella AG6).

I trigliceridi a basso numero di atomi di carbonio (C₂₄ – C₃₂) sono risultati presenti in quantità minore (4.96% ± 1.02) rispetto agli altri, con valori compresi tra 3.53% e 6.57%, seguiti da quelli ad alto numero di atomi di carbonio (C₅₀ – C₅₄) (21.11% ± 3.52), i cui valori sono oscillati tra 15.76% e 27.58% (tabella AG7).

I trigliceridi a medio numero di atomi di carbonio sono risultati i più importanti in termini quantitativi, rappresentando, da soli, il 73.42 ± 4.06 dei trigliceridi presenti nel latte di bufala, con valore minimo di 65.18% fino a un massimo di 78.76% (tabella AG7).

Il valore medio del colesterolo è stato pari a 0.20% ± 0.05 con valori compresi tra 0.11% e 0.34% (tabella AG7).

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Rispetto ai dati riportati da Kaylegian e Lindsay (1995) relativi alla composizione trigliceridica del latte bovino non si evidenziano differenze di grande rilievo. Inoltre, analogamente a quanto si osserva per il latte di altre specie, la composizione trigliceridica tende a riflettere quella degli AG. Il contenuto in trigliceridi compresi tra 32 e 38 atomi di carbonio (medium chain triglycerides- MCT) è stato di 39.27 ± 3.71 . Dal punto di vista nutrizionale i MCT si differenziano dai trigliceridi a catena lunga in quanto sono assorbiti direttamente nella circolazione portale e trasportati al fegato dove sono rapidamente ossidati senza seguire il normale meccanismo di trasporto dei lipidi attraverso il sistema linfatico (Babayan e Rosenau, 1991). I MCT possono fornire energia rapidamente disponibile senza incrementare i depositi adiposi e sono particolarmente utili in presenza di by pass coronarici, epilessia infantile e fibrosi cistica, oltre a costituire un importante componente del latte per neonati (Bach e Babayan, 1982; Babayan, 1987).

Gli studi che hanno preso in considerazione la composizione trigliceridica del grasso del latte sono stati più limitati se confrontati con quelli che hanno riguardato la composizione acidica totale. Molte ricerche hanno esaminato l'effetto della struttura dei trigliceridi sull'azione degli enzimi lipolitici e, di conseguenza, sull'assorbimento dei grassi e sulle caratteristiche aromatiche dei formaggi (Jensen e Newberg, 1995; Jensen, 2002). È stato, inoltre, rilevato che la struttura trigliceridica influenza il punto di fusione, il tipo di cristallizzazione e le caratteristiche reologiche dei globuli di grasso (Jimenez-Flores, 1997; Keenan e Patton, 1995; Hawke e Taylor, 1995; Walstra, 1995; Walstra *et al.*, 1995).

Banks *et al.* (1989) e Precht (1991) hanno messo in luce che il profilo trigliceridico è influenzato dalla dieta, e che le modifiche indotte dalla dieta sul profilo acidico non bastano da sole a spiegare le differenze che si rilevano nelle caratteristiche fisiche del grasso del latte (Banks *et al.*, 1989).

La distribuzione dei trigliceridi C52 e C54 nel grasso del latte è influenzata dall'aggiunta di grasso alla dieta e, in misura maggiore, da una severa restrizione

Dott. Maria Luisa Varricchio

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

alimentare (Precht, 1991). In seguito alla somministrazione di vari tipi di olio Banks *et al.* (1989) hanno rilevato una riduzione dei trigliceridi compresi tra 30 - 36 C e 42 -46 C a vantaggio di quelli compresi tra 50 - 54 C. Tuttavia, il tipo di olio, pur influenzando significativamente la composizione acidica, non hanno avuto effetto su quella trigliceridica.

De Peters *et al.* (2001) hanno evidenziato che la somministrazione di olio di canola determina un incremento degli AG a catena lunga e una riduzione di quelli a catena media che si riflette sulla struttura dei trigliceridi

6.2. VARIAZIONE DELLA COMPOSIZIONE ACIDICA NEL CORSO DELL'ANNO

Nella tabella AG9 sono riportati i valori medi della composizione acidica del grasso del latte di bufala nel corso dell'anno. Tutti gli AG identificati sono stati significativamente influenzati dal mese di prelievo ($P < 0.001$) (tabella AG9).

Gli AG a corta catena hanno avuto un andamento piuttosto lineare nel corso dell'anno con un valore minimo pari al 7.35% ad agosto ed un massimo che ha raggiunto il 9.01% a settembre (tabella AG9; grafico AG6). Più in dettaglio, il C₈ (0.81 - 1.10%) e il C₁₀ (1.67 - 2.06%) hanno mostrato un andamento abbastanza costante rispetto al C₄ (3.14 - 3.81) e al C₆ (1.45 - 2.19%), come si può osservare nel grafico AG7.

Il contenuto in AG a media catena è apparso crescente da gennaio ad aprile, mese in cui è stato registrato il valore massimo (53.13%) e, successivamente, decrescente fino a settembre quando è stato osservato il valore minimo (46.95%) (tabella AG9; grafico AG8). In particolare, gli AG C_{12:0}, C_{14:0}, C_{16:0} e C_{16:1t} hanno evidenziato degli andamenti simili tra loro e piuttosto irregolari rispetto ai corrispettivi desaturati C_{14:1}, C_{14:1t}, C_{16:1 cis}. Il valore minimo è stato registrato a dicembre e gennaio rispettivamente per il C_{16:0} (28.74%) e il C_{14:0} (10.05%), mentre per il C_{12:0} (2.17%) e il C_{16:1t} (0.27%) è stato osservato a maggio; il massimo

Dott. Maria Luisa Varricchio

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

valore è stato registrato nei primi mesi dell'anno, da gennaio ad aprile, rispettivamente per C_{16:1t} (0.45%), C_{12:0} (2.96), C_{14:0} (11.41%) e C_{16:0} (33.75%) (tabella AG9; grafici AG9, AG10, AG11, AG12).

Per quel che riguarda gli AG a lunga catena, l'andamento è apparso opposto rispetto a quello degli AG a media catena, con il valore minimo registrato ad aprile (35.74%) ed il massimo ad agosto (42.66%) (tabella AG9; grafico AG13). I singoli AG all'interno di questo gruppo hanno avuto un andamento piuttosto simile tra loro e in linea con quello della serie, facendo registrare il valore minimo ad aprile e il massimo tra luglio e ottobre (grafici AG14, AG15).

Il contenuto in C_{18:0} ha mostrato differenze statisticamente significative ($P < 0.05$) tra il mese di agosto (22.30%) e i mesi di marzo (20.59%), aprile (19.48%), ottobre (20.49%), novembre (20.88%) e dicembre (21.29%) (tabella AG9; grafico AG15).

Il contenuto in C_{18:1t} è risultato più elevato in estate, da maggio (2.08%) ad agosto (2.13%) in cui ha raggiunto il massimo, è rimasto piuttosto costante fino a febbraio, per poi raggiungere il valore minimo ad aprile (1.44%) (tabella AG9; grafico AG14).

L'acido linoleico (C_{18:2}) è oscillato nel corso dell'anno seguendo lo stesso andamento del C_{18:1t}, con la più alta concentrazione riscontrata tra maggio (2.95%) e dicembre (2.51%) con il massimo valore registrato a settembre (2.96%). Dal mese di gennaio (2.16%) l'andamento è stato discendente fino a raggiungere il valore minimo ad aprile (1.97%) (tabella AG9; grafico AG14).

L'acido linolenico (C_{18:3}) ha avuto lo stesso comportamento, con valori compresi tra 1.40% di ottobre e 0.85% di aprile (tabella AG9; grafico AG14).

La maggiore variazione nel profilo acidico del grasso del latte nel corso dell'anno è stata osservata per i CLA, con le concentrazioni significativamente più elevate ($P < 0.05$) rispetto al valore del mese di ottobre, registrate tra gennaio e marzo (0.89% – 0.84%). Tra marzo ed aprile (0.67%) è stata osservata una brusca diminuzione del contenuto in CLA che si è poi mantenuto su valori compresi tra 0.79% di giugno e 0.63%, valore minimo

Dott. Maria Luisa Varricchio

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

registrato ad ottobre. Nel complesso, è stata evidenziata una differenza dello 0.26% tra gennaio e ottobre (tabella AG9; grafico AG16).

In generale, il contenuto in AG saturi (SFA) è apparso più elevato a fine primavera, con il valore massimo ad aprile (68.81%) e più basso in inverno, con il minimo a dicembre (63.56%) (tabella AG9; grafico AG17).

Gli AG monoinsaturi (MUFA) hanno mostrato un andamento discendente da gennaio, in cui è stato osservato il valore più elevato (28.22%) ad aprile, in cui la percentuale riscontrata per questi AG è stata minima (24.44%) rispetto ai valori osservati nel resto dell'anno (tabella AG9; grafico AG18).

L'andamento degli AG polinsaturi (PUFA) è apparso più lineare nel corso dell'anno rispetto a quella dei MUFA, mostrando il valore minimo ad aprile (3.49%) e il massimo a settembre (5.01%) (tabella AG9; grafico AG19).

6.3. VARIAZIONE DELLA COMPOSIZIONE ACIDICA NELLE QUATTRO AZIENDE

Le differenze, tra le aziende, nella composizione acidica del grasso del latte sono apparse statisticamente significative tranne che per il C_{4:0} (3.48, 3.30, 3.44, 3.36% rispettivamente per le aziende A, B, C e D), mentre le maggiori differenze sono state riscontrate per il C_{10:0} (1.78, 1.66, 2.35, 1.84% rispettivamente per le aziende A, B, C e D) (tabella AG8).

Nel complesso, un significativo maggior contenuto in AG a corta catena è stato osservato nell'azienda C (8.82%), mentre nell'azienda B è stato osservato un valore statisticamente più basso (7.63%) (tabella AG8).

Per quanto riguarda gli acidi grassi a media catena, sono state evidenziate differenze statisticamente significative tra le aziende e, in particolare l'azienda A ha

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

mostrato il valore più elevato (51.05%) e l'azienda B il valore più basso (45.99%) (tabella AG8).

Entrando nel dettaglio degli AG a media catena, la maggior percentuale di $C_{14:0}$ è stata osservata nell'azienda C (11.45%), mentre nell'azienda B è stato riscontrato il valore statisticamente più basso (9.97%) (tabella AG8).

La massima concentrazione di $C_{16:0}$ è stata rilevata nell'azienda A (32.39%) in cui sono stati somministrati alle bufale, per tutto l'anno, grassi protetti con alto contenuto in PA, mentre il valore osservato nell'azienda B, che ha utilizzato la stessa integrazione dietetica, non è apparso differente da quello osservato nelle altre aziende in cui non sono stati usati grassi protetti (29.36%, 29.99%, 30.16%, rispettivamente nelle aziende B, C e D) (tabella AG8). Questo risultato sembra indicare un effetto del prodotto commerciale usato che è stato attenuato dalla presenza dei semi di cotone nella razione dell'azienda B.

Per quanto riguarda gli AG a lunga catena (da C_{18} a C_{24}) e PUFA, i valori medi più alti sono stati osservati nell'azienda B. Più in dettaglio, le differenze nel contenuto in $C_{18:0}$ sono apparse statisticamente significative tra le aziende; in particolare, il valore statisticamente più elevato è stato registrato nell'azienda B (14.00%), il più basso nell'azienda A (10.34%). I valori riscontrati nelle aziende C e D sono apparsi simili tra loro (C 11.49%; D 12.16%) e le differenze non sono apparse statisticamente significative (tabella AG8).

Differenze statisticamente significative tra le aziende sono state osservate per i contenuti in $C_{18:1}$, $C_{18:2}$ e $C_{18:3}$ che riflettono le differenze di integrazione di grassi nella dieta. In particolare, i livelli più elevati di $C_{18:1}$ (*cis*, 21.26% vs 22.54%; *trans*, 1.79% vs 1.98%, rispettivamente per le aziende A e B) e $C_{18:2}$ (2.34% vs 2.90%, rispettivamente per le aziende A e B) sono stati ottenuti nell'azienda B che ha utilizzato oltre ai sali di calcio dell'olio di palma anche i semi di cotone (1.38% vs 1.15%, rispettivamente per le aziende A e B) nell'azienda A che ha utilizzato i soli sali di calcio (tabella AG8).

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Riguardo al contenuto in CLA i valori più alti sono stati osservati nell'azienda B (1.06%) dove la concentrazione è aumentata da novembre a gennaio, quando è stata aggiunta alla razione una maggiore quantità di semi di cotone (tabella AG8).

Alti livelli di CLA sono stati ancora osservati nel latte prodotto nell'azienda A (0.80%). Il contenuto in CLA delle aziende C e D (0.64% e 0.51%, rispettivamente), sebbene molto basso rispetto ai valori riportati per le aziende A e B, risulta più alto rispetto ai valori generalmente riportati per le vacche da latte.

Giacchè il profilo acidico del grasso del latte desta sempre maggiore attenzione, qualsiasi manipolazione della razione che consenta di ottenere aumenti di AG desiderabili, ad esempio il C_{18:2} e il C_{18:3} e relative diminuzioni del contenuto in C_{14:0} e il C_{16:0}, è considerato di rilevante importanza per i suoi risvolti sulla salute umana. La conoscenza delle fonti lipidiche da inserire nelle razioni dei ruminanti in lattazione in grado di migliorare il rapporto SFA/UFA a favore di questi ultimi, è da ritenere fondamentale per modificare in positivo il profilo acidico del latte. Dovrebbero essere, quindi, evitate le fonti lipidiche che aumentano, ad esempio, i livelli di C_{16:0}.

La somministrazione di saponi di calcio degli AG dell'olio d'oliva o di grassi provenienti dalla soia estrusa, causa il cambiamento della composizione acidica del liquido ruminale a favore delle frazioni sature, inducendo un aumento della frazione MUFA in entrambi i casi, e un incremento dei PUFA solo nel caso della soia. Questo fenomeno può essere ricondotto alla più alta concentrazione di OA e LA nel liquido ruminale nel caso di diete arricchite in grassi: infatti, mentre la soia è ricca in LA che nel rumine è parzialmente saturato producendo intermedi monoinsaturi, i saponi di calcio dell'olio d'oliva sono naturalmente ricchi in OA. Questi ultimi sarebbero trasformati in altri isomeri C_{18:1} piuttosto che essere saturati a SA, confermando l'incremento di acidi C_{18:1} trans nel grasso del latte di animali alimentati con OA puro (Selner e Schultz, 1980).

La composizione e la proporzione dei lipidi ruminali sono influenzate anche da numerosi fattori di origine alimentare. In primo luogo, la percentuale di cereali ha una

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

netta influenza sul processo di bioidrogenazione. Diete a basso contenuto di fibra, infatti, causano un calo dei processi di riduzione di LA e LNA (59 e 63%, rispettivamente) rispetto a diete caratterizzate da un alto rapporto foraggio/concentrato. Gerson e King (1985) hanno osservato, nella pecora, che il rapporto fibra/amido può influenzare il ritmo di lipolisi e di bioidrogenazione, probabilmente perché riduce l'attività dei batteri cellulolitici responsabili del processo di lipolisi, requisito necessario della bioidrogenazione (Chilliard *et al.*, 2000).

Altri fattori di origine alimentare che deprimono la lipolisi e la bioidrogenazione sono: (a) basso livello di azoto della dieta; (b) foraggi troppo maturi; (c) uso di alimenti finemente macinati. La dimensione delle particelle degli alimenti somministrati, infatti, è molto importante, in quanto influenza l'aderenza dei batteri alla superficie ed aumenta la velocità di transito attraverso il rumine, riducendo i tempi di esposizione all'attività microbica.

Infine, quantità e tipo di grassi somministrati nella razione sono altri fattori che possono influenzare le trasformazioni dei lipidi nel rumine. Grassi ad alto contenuto di LA (olio di soia), soprattutto se libero, inibiscono il processo di riduzione a SA, favorendo l'accumulo di composti intermedi come gli isomeri trans del C_{18:1} e del VA (Moore *et al.*, 1969). Uno degli accorgimenti adottati è quello di lasciar passare gli UFA intatti direttamente nel duodeno proteggendo i grassi. Tra le tecnologie più applicate l'incapsulazione con proteine trattate con formaldeide provoca un significativo aumento degli UFA a livello del duodeno e, quindi, nel latte. Altra strategia adottata è l'aggiunta nella dieta di semi oleosi interi ricchi di grasso, in modo tale che il tegumento ne protegga l'olio contenuto all'interno. Tuttavia, in seguito alla rottura del tegumento con la masticazione, gli oli diventano accessibili ai microrganismi (Murphy *et al.*, 1987; White *et al.*, 1987; Keele *et al.*, 1989). Questo non accade utilizzando, invece, i sali di calcio che sono resistenti alla bioidrogenazione perché riducono la disponibilità di gruppi carbossilici liberi. I sali dell'olio di palma mostrano una più alta resistenza alle trasformazioni

Dott. Maria Luisa Varricchio

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

ruminali rispetto agli altri saponi (calcio linoleato) (Klusmeyer e Clark, 1991; Wu *et al.*, 1991; Wu e Palmquist, 1991; Fotouhi e Jenkins, 1992). Infine, un'altra tecnica per limitare la produzione di gruppi carbossilici liberi è quella di trasformarli in aminoacidi, in questo caso la resistenza sarebbe dovuta all'ingombro sterico della sostituzione dei gruppi legati all'idrogeno (Jenkins, 1993).

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

7. CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Dall'analisi dei dati raccolti nel corso della sperimentazione è stato possibile delineare un profilo acidico del grasso del latte di bufala caratterizzato dalla rilevante incidenza di C16:0, C18:1c, C18:0, C14:0 e C4:0, che insieme rappresentano circa il 78% del totale.

La composizione acidica è apparsa diversa nelle quattro aziende. Anche se alcune delle differenze evidenziate possono essere state determinate da fattori quali il livello produttivo e lo stadio di lattazione, l'effetto più rilevante sembra essere dovuto a variazioni nella composizione della razione, con particolare riferimento all'integrazione con semi oleosi o grassi protetti.

In particolare, i semi di cotone interi hanno influenzato positivamente il profilo acidico, con aumento del grado di insaturazione e del contenuto in CLA, mentre i grassi protetti hanno incrementato il contenuto di C16:0.

Il profilo trigliceridico ha tendenzialmente riflesso la composizione acidica. I trigliceridi con un numero di atomi di carbonio compresi tra 34 e 48 C sono apparsi percentualmente i più rilevanti. Non sono state, inoltre, evidenziate differenze considerevoli rispetto alla composizione trigliceridica riportata per il latte bovino, anche se sono necessarie ulteriori elaborazioni ai fini della messa a punto di un profilo trigliceridico di riferimento.

In conclusione la ricerca ha permesso di evidenziare l'influenza dell'alimentazione sul profilo acidico e, di conseguenza trigliceridico del grasso del latte di bufala fornendo utili indicazioni per la scelta della fonte di grasso con un profilo desiderabile per la salute umana.

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Tabella AG3. Produzione di latte e caratteristiche delle diete nelle quattro aziende.

		A		B		C		D	
		Medi a	DS	Medi a	DS	Medi a	DS	Medi a	DS
Capi in lattazione	(n)	110	10	106	17	287	48	57	17
Produzione di latte (kg/d/azienda)		8.1	0.5	9.0	1.3	7.8	1.4	8.5	0.9
LN ¹	(kg/d/azienda)	8.5	0.24	9.3	0.29	7.6	0.31	7.8	0.34
Grasso	(%)	8.85	0.38	8.85	0.30	8.04	0.24	7.45	0.27
Proteine	(%)	4.69	0.02	4.70	0.05	4.66	0.03	4.30	0.07
Cellule Somatiche	(log ₁₀)	5.17	4.20	5.20	4.40	5.34	4.52	5.15	4.26
<i>Caratteristiche della dieta</i>									
Ingestione di SS	(kg/d)	16.9	0.8	15.3	0.9	18.1	0.9	18.6	0.8
Proteina grezza	(g/d)	2532	454	2767	614	2527	478	2389	545
ENL	(MJ)	101	2.9	101	4.0	115	9.6	103	10
Grasso	(g/d)	454	38	614	59	478	79	546	86

¹Latte Normalizzato = Grasso (8.3%) e Proteine (4.73%) (Bartocci *et al.*, 2002).

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Tabella AG4. Principali acidi grassi, in termini quantitativi, nell'anno.

AG	Media	Dev. St
C16:0	30,48	2,91
C18:1c	21,50	2,12
C18:0	11,94	2,53
C14:0	10,67	1,15
C4:0	3,40	0,52

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Tabella AG5. Composizione in acidi grassi del grasso del latte di bufala

	Media	Dev st	Min	Max	Mediana	CV
C4:0	3,40	0,52	1,72	4,59	3,45	15,15
C6:0	1,83	0,44	0,82	2,42	1,83	24,18
C8:0	0,96	0,23	0,61	1,23	0,92	23,72
C10:0	1,91	0,42	1,41	2,28	1,85	22,16
C12:0	2,50	0,55	1,94	3,10	2,43	22,03
C14:0	10,67	1,15	9,05	12,73	10,58	10,77
C14:1	0,32	0,05	0,27	0,47	0,31	14,52
C14:1t	1,10	0,25	0,52	1,69	1,11	23,10
C16:0	30,48	2,91	27,48	37,16	30,40	9,56
C16:1t	0,39	0,10	0,20	0,58	0,41	25,73
C16:1c	1,68	0,41	1,30	2,71	1,58	24,25
C18:0	11,94	2,53	8,81	15,13	11,36	21,17
C18:1t	1,96	0,53	1,19	2,23	1,88	26,89
C18:1c	21,50	2,12	16,06	25,43	21,58	9,85
C18:2	2,53	0,70	1,39	3,38	2,42	27,77
C18:3	1,17	0,32	0,75	2,28	1,18	27,12
CLA	0,76	0,33	0,02	2,18	0,72	43,81
AG CORTA C	8,10	1,27	4,70	9,81	8,01	15,73
AG MEDIA	48,74	4,17	45,93	56,94	48,90	8,56
AG LUNGA C	40,82	4,86	34,51	47,00	40,72	11,89
SFA	66,24	2,86	62,23	74,43	66,08	4,32
MUFA	26,96	2,31	20,77	32,15	27,16	8,55
PUFA	4,46	1,04	2,87	6,85	4,27	23,29
UFA	31,42	2,68	23,64	35,71	31,47	8,54
C18 tot	39,10	4,77	32,71	44,81	39,06	12,20
SFA/UFA	2,13	0,27	1,74	3,15	2,09	12,81
MUFA/PUFA	6,38	1,63	4,01	9,02	6,10	25,58
PUFA/SFA	0,07	0,02	0,04	0,11	0,07	25,15
ω 3/ ω 6	0,48	0,13	0,32	1,04	0,47	27,89
Δ 9						
DESATURASE						
INDEX	41,98	0,76	41,06	43,53	41,90	1,81
C14:1/C14:0	0,03	0,00	0,03	0,05	0,03	16,11
C16:1/C16:0	0,07	0,01	0,05	0,11	0,07	20,13
cis9 C18:1/C18:0	2,09	1,20	1,35	2,71	1,99	57,42
CLA/trans11 C18:1	0,03	0,01	0,00	0,06	0,03	41,17
C16:0/C18:0 tot	0,80	0,15	0,68	1,12	0,78	19,39

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Tabella AG6. Principali trigliceridi in termini quantitativi.

	Media	Dev. St
C38	15,09	0,90
C36	14,28	1,56
C50	10,07	1,14
C40	9,78	0,86
C48	8,78	0,89
C52	7,94	1,65
C34	7,25	1,14
C46	6,75	0,76
C42	5,93	0,59
C44	5,56	0,66
C54	3,10	0,97
C32	2,65	0,55
C30	1,16	0,28
C28	0,72	0,17
C26	0,32	0,08
COL	0,20	0,05
C24	0,10	0,05

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Tabella AG7. *Composizione in trigliceridi del grasso del latte di bufala.*

	Media	Dev st	Min	Max	CV
C24	0,10	0,05	0,02	0,25	51,91
COL	0,20	0,05	0,11	0,34	24,05
C26	0,32	0,08	0,21	0,55	24,43
C28	0,72	0,17	0,50	1,05	23,53
C30	1,16	0,28	0,78	1,53	23,83
C32	2,65	0,55	1,87	3,60	20,57
BASSO PM	4,96	1,02	3,53	6,57	20,56
C34	7,25	1,14	5,36	9,09	15,68
C36	14,28	1,56	10,60	17,00	10,93
C38	15,09	0,90	11,46	16,60	5,99
C40	9,78	0,86	7,27	11,09	8,78
C42	5,93	0,59	4,08	7,70	9,95
C44	5,56	0,66	4,31	7,18	11,84
C46	6,75	0,76	5,18	10,53	11,33
C48	8,78	0,89	6,22	13,44	10,13
MEDIO PM	73,42	4,06	65,18	78,67	5,54
C50	10,07	1,14	8,43	12,98	11,29
C52	7,94	1,65	5,59	11,17	20,79
C54	3,10	0,97	0,22	4,53	31,20
ALTO PM	21,11	3,52	15,76	27,58	16,70

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Tabella AG8. Composizione acidica del grasso del latte nelle quattro aziende.

	A	B	C	D	ES	P
C4	3.48	3.30	3.44	3.36	0.073	0.133
C6	1.93a	1.78ab	1.92a	1.65b	0.061	0.0005
C8	0.97a	0.88b	1.10c	0.88b	0.030	0.0001
C10	1.78ac	1.66a	2.35b	1.84c	0.047	0.0001
C12	2.48a	2.26b	2.90c	2.34ab	0.070	0.0001
C14:0	10.77a	9.97b	11.45c	10.48a	0.144	0.0001
C14:1t	1.15a	0.93b	1.10a	1.23ac	0.033	0.0001
C15	1.11a	0.93b	1.00c	1.16a	0.021	0.0001
C16:0	32.39a	29.36b	29.99b	30.16b	0.382	0.0001
C16:1cis1	1.88a	1.43b	1.63c	1.80a	0.053	0.0001
C18:0	10.34a	14.00b	11.49c	12.16c	0.287	0.0001
C18:1t	1.79a	1.98ab	2.00b	2.09b	0.073	0.0116
C18:1c	21.26a	22.54b	20.20c	22.02a	0.274	0.0001
CLA	0.80a	1.06b	0.64c	0.51d	0.038	0.0001
C18:2	2.34a	2.90b	2.91b	1.97c	0.083	0.0001
C18:3	1.38a	1.15b	1.17b	0.96c	0.040	0.0001
AG CORTA C	8.17a	7.63d	8.82c	7.76ab	0.169	0.0001
AG MEDIA	51.05a	45.99b	49.26c	48.48c	0.532	0.0001
AG LUNGA C	38.13a	43.81b	38.62ac	39.94c	0.615	0.0001
SFA	65.99a	64.78b	66.34a	64.84b	0.387	0.0039
MUFA	26.84a	27.54a	25.63b	27.86b	0.305	0.0001
PUFA	4.52a	5.11ab	4.71c	3.45c	0.119	0.0001
INDICE ATEROGENICITÀ	2.46ab	2.15c	2.61a	2.34b	0.055	0.0001

a,b P<0.05

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Tabella AG9. Andamento delle medie degli acidi grassi nell'anno

	GENNAIO	FEBBRAIO	MARZO	APRILE	MAGGIO	GIUGNO	LUGLIO	AGOSTO	SETTEMBRE	OTTOBRE	NOVEMBRE	DICEMBRE	P	MIN	MAX
C4	3,43	3,26	3,22	3,14	3,48	3,63	3,25	3,27	3,81	3,53	3,45	3,36	***	3,14	3,81
C6	1,79	1,77	1,79	1,73	1,56	1,65	1,63	1,45	2,19	2,16	2,14	2,03	***	1,45	2,19
C8	0,91	0,94	1,03	0,99	0,85	0,81	0,90	0,83	1,04	1,10	1,05	1,07	***	0,81	1,10
C10	1,67	1,84	2,06	2,03	1,81	1,86	1,89	1,84	1,96	2,01	1,96	2,02	***	1,67	2,06
C12	2,38	2,70	2,96	2,95	2,17	2,25	2,37	2,49	2,40	2,43	2,41	2,48	***	2,17	2,96
C14:0	10,05	10,78	11,33	11,41	10,43	10,52	10,67	10,57	10,77	10,74	10,44	10,49	***	10,05	11,41
C14:1	0,33	0,32	0,32	0,31	0,32	0,31	0,31	0,31	0,32	0,32	0,33	0,33	***	0,31	0,33
C14:1t	1,17	1,09	1,15	1,17	1,07	1,11	1,07	1,06	0,81	1,15	1,19	1,19	***	0,81	1,19
C16:0	30,42	30,86	31,85	33,75	30,91	30,99	30,79	30,18	29,26	29,23	29,16	28,74	***	28,74	33,75
C16:1t	0,45	0,45	0,43	0,41	0,27	0,33	0,33	0,36	0,40	0,42	0,43	0,44	***	0,27	0,45
C16:1c	1,73	1,51	1,58	1,62	1,81	1,74	1,78	1,65	1,52	1,68	1,81	1,82	***	1,51	1,82
C18:0	11,88	12,14	11,54	11,14	12,43	12,78	12,31	13,17	12,15	11,59	11,21	11,51	***	11,14	13,17
C18:1t	2,00	1,98	1,76	1,44	2,08	1,98	2,00	2,13	1,99	2,09	2,05	1,97	***	1,44	2,13
C18:1c	22,56	21,63	20,59	19,48	22,60	22,41	22,64	22,30	21,04	20,49	20,88	21,29	***	19,48	22,64
C18:2	2,16	2,08	2,03	1,97	2,95	2,84	2,91	2,91	2,96	2,70	2,38	2,51	***	1,97	2,96
CLA	0,89	0,84	0,88	0,67	0,73	0,79	0,68	0,73	0,70	0,63	0,78	0,74	***	0,63	0,89
C18:3	1,05	0,96	0,88	0,85	1,21	1,19	1,18	1,24	1,36	1,40	1,31	1,34	***	0,85	1,40
AG CORTA C	7,80	7,83	8,09	7,88	7,71	7,96	7,65	7,35	9,01	8,80	8,64	8,49	***	7,35	9,01
AG MEDIA C	48,07	49,26	51,08	53,13	48,55	48,83	48,91	48,10	46,95	47,50	47,45	47,09	***	46,95	53,13
AG LUNGA C	40,73	39,82	37,88	35,74	42,19	42,20	41,93	42,66	40,41	39,10	38,92	39,58	***	35,74	42,66
SFA	64,25	66,04	67,43	68,81	65,41	66,22	65,57	65,49	65,26	64,56	63,83	63,56	***	63,56	68,81
MUFA	28,22	27,00	25,79	24,44	28,13	27,91	28,13	27,76	26,11	26,11	26,71	27,01	***	24,44	28,22
PUFA	4,12	3,87	3,80	3,49	4,88	4,83	4,78	4,86	5,01	4,72	4,47	4,59	***	3,49	5,01
C14:1c9/C14:0	0,027	0,025	0,022	0,022	0,025	0,024	0,022	0,022	0,024	0,024	0,027	0,026	***	0,02	0,03
C16:1c9/C16:0	0,051	0,044	0,045	0,044	0,052	0,050	0,053	0,051	0,047	0,052	0,057	0,058	***	0,04	0,06
C18:1c9/C18:0	1,96	1,81	1,82	1,78	1,90	1,84	1,89	1,74	1,78	1,80	1,92	1,93	***	1,74	1,96

Dott. Maria Luisa Varricchio

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

CLA/C18:1t	0,48	0,46	0,52	0,47	0,35	0,40	0,35	0,34	0,35	0,30	0,38	0,37	***	0,30	0,52
C12:0/C10:0	1,40	1,43	1,41	1,45	1,16	1,14	1,21	1,31	1,18	1,17	1,19	1,19	***	1,14	1,45
C15:0/C14:1	0,67	0,68	0,66	0,66	0,74	0,69	0,73	0,71	0,88	0,71	0,72	0,70	***	0,66	0,88
INDICE ATER.	2,23	2,50	2,70	2,93	2,23	2,26	2,28	2,27	2,36	2,39	2,31	2,29	***	2,23	2,93

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Confronti significativi degli acidi grassi nell'anno

C4

	Gennaio	Febbraio	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre
Gennaio									*			
Febbraio						*			**			
Marzo						*			**			
Aprile						**			***	*		
Maggio												
Giugno		*	*	**			*	*				
Luglio						*			**			
Agosto						*			**			
Settembre	*	**	**	***			**	**			*	*
Ottobre				*								
Novembre									*			
Dicembre									*			

C6

	Gennaio	Febbraio	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre
Gennaio								**	**	**	**	+
Febbraio								*	**	**	**	+
Marzo								**	**	**	**	
Aprile								*	***	***	**	*
Maggio									***	***	***	***
Giugno									***	***	***	**
Luglio									***	***	***	**
Agosto	**	*	**	*					***	***	***	***
Settembre	**	**	**	***	***	***	***	***	***			
Ottobre	**	**	**	***	***	***	***	***	***			
Novembre	**	**	**	**	***	***	***	***	***			
Dicembre	+	+		*	***	**	**	***				

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

C8

	Gennaio	Febbraio	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre
Gennaio									+	**	*	*
Febbraio										*		
Marzo					*	**		**				
Aprile					+	*		*				
Maggio			*	+					*	***	**	**
Giugno			**	*					**	***	**	***
Luglio									.	**	*	*
Agosto			**	*					**	***	**	***
Settembre	+				*	**	.	**				
Ottobre	**	*			***	***	**	***				
Novembre	*				**	**	*	**				
Dicembre	*				**	***	*	***				

C10

	Gennaio	Febbraio	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre
Gennaio			**	*					*	*	*	*
Febbraio												
Marzo	**											
Aprile	*											
Maggio												
Giugno												
Luglio												
Agosto												
Settembre	*											
Ottobre	*											
Novembre	*											
Dicembre	*											

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

C12

	Gennaio	Febbraio	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre
Gennaio			***	**								
Febbraio					**	*						
Marzo	***				***	***	**	**	**	**	**	**
Aprile	**				***	***	*	**	**	**	**	**
Maggio		**	***	***								
Giugno		*	***	**								
Luglio			**	**								
Agosto			**	**								
Settembre			**	**								
Ottobre			**	**								
Novembre			**	**								
Dicembre			**	*								

C14:0

	Gennaio	Febbraio	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre
Gennaio		+	***	***					+	+		
Febbraio	+											
Marzo	***				*	*		*			*	*
Aprile	***				*	*		*			*	*
Maggio			*	*								
Giugno			*	*								
Luglio												
Agosto			*	*								
Settembre	+											
Ottobre	+											
Novembre			*	*								
Dicembre			*	*								

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

C14:1

	Gennaio	Febbraio	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre
Gennaio												
Febbraio												
Marzo												
Aprile												
Maggio												
Giugno												
Luglio												
Agosto												
Settembre												
Ottobre												
Novembre												
Dicembre												

C14:1 t

	Gennaio	Febbraio	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre
Gennaio									***			
Febbraio									**			
Marzo									***			
Aprile									***			
Maggio									**			
Giugno									***			
Luglio									**			
Agosto									**			
Settembre	***	**	***	***	**	***	**	**		***	***	***
Ottobre									***			
Novembre									***			
Dicembre									***			

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

C16:0

	Gennaio	Febbraio	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre
Gennaio				***								
Febbraio				**								*
Marzo				*					**	**	**	**
Aprile	***	**	*		**	**	**	***	***	***	***	***
Maggio				**								*
Giugno				**						+	+	*
Luglio				**								*
Agosto				***								
Settembre			**	***								
Ottobre			**	***		+						
Novembre			**	***		+						
Dicembre		**	**	***	*	*	*					

C16:1 t

	Gennaio	Febbraio	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre
Gennaio					***	***	***	**				
Febbraio					***	***	***	**				
Marzo					***	**	**	*				
Aprile					***	*	*					
Maggio	***	***	***	***		+	+	**	***	***	***	***
Giugno	***	***	**	*	+				*	**	**	**
Luglio	***	***	**	*	+				*	**	**	**
Agosto	**	**	*		**					*	*	*
Settembre					***	*	*					
Ottobre					***	**	**	*				
Novembre					***	**	**	*				
Dicembre					***	**	**	*				

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

C16:1 c

	Gennaio	Febbraio	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre
Gennaio												
Febbraio											*	*
Marzo												
Aprile												
Maggio		*							+			
Giugno												
Luglio												
Agosto												
Settembre					+						*	*
Ottobre												
Novembre		*							*			
Dicembre		*							*			

C18:0

	Gennaio	Febbraio	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre
Gennaio												
Febbraio												
Marzo								*				
Aprile						+		*				
Maggio												
Giugno				+								
Luglio												
Agosto			*	*						*	*	*
Settembre												
Ottobre								*				
Novembre								*				
Dicembre								*				

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

C18:1 t

	Gennaio	Febbraio	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre
Gennaio				**								
Febbraio				**								
Marzo								*				
Aprile	**	**			***	**	**	***	**	***	***	**
Maggio				***								
Giugno				**								
Luglio				**								
Agosto			*	***								
Settembre				**								
Ottobre				***								
Novembre				***								
Dicembre				**								

C18:1 c

	Gennaio	Febbraio	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre
Gennaio			**	***					*	***	**	*
Febbraio				**								
Marzo	**				**	**	**	**				
Aprile	***	**			***	***	***	***	*		*	**
Maggio			**	***					*	**	*	+
Giugno			**	***					*	**	*	
Luglio			**	***					*	**	*	*
Agosto			**	***					+	**	*	
Settembre	*			*	*	*	*	+				
Ottobre	***				**	**	**	**				
Novembre	**			*	*	*	*	*				
Dicembre	*			**	+		*					

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

CLA

	Gennaio	Febbraio	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre
Gennaio				*						*		
Febbraio										+		
Marzo										*		
Aprile	*											
Maggio												
Giugno												
Luglio												
Agosto												
Settembre												
Ottobre	*	+	*									
Novembre												
Dicembre												

C18:2

	Gennaio	Febbraio	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre
Gennaio					***	**	***	***	***	**		
Febbraio					***	***	***	***	***	**		*
Marzo					***	***	***	***	***	**		*
Aprile					***	***	***	***	***	***		*
Maggio	***	***	***	***							*	+
Giugno	**	***	***	***							*	
Luglio	***	***	***	***							*	
Agosto	***	***	***	***							*	+
Settembre	***	***	***	***							**	*
Ottobre	**	**	**	***								
Novembre					*		*	*	**			
Dicembre		*	*	*	+			+	*			

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

C18:3

	Gennaio	Febbraio	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre
Gennaio				*				*	***	***	**	**
Febbraio					**	*	*	**	***	***	***	***
Marzo					***	**	**	***	***	***	***	***
Aprile	*				***	***	***	***	***	***	***	***
Maggio		**	***	***						+		
Giugno		*	**	***						*		
Luglio		*	**	***						*		
Agosto	*	**	***	***								
Settembre	***	***	***	***								
Ottobre	***	***	***	***	+	*	*					
Novembre	**	***	***	***								
Dicembre	**	***	***	***								

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Catena Corta

	Gennaio	Febbraio	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre
Gennaio									**	**	*	
Febbraio									**	*	+	
Marzo									*			
Aprile									**	*		
Maggio									**	**	*	
Giugno									*	*		
Luglio									**	**	*	*
Agosto									***	***	**	**
Settembre	**	**	*	**	**	*	**	***				
Ottobre	**	*		*	**	*	**	***				
Novembre	*	+			*		*	**				
Dicembre							*	**				

Catena Media

	Gennaio	Febbraio	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre
Gennaio			*	***								
Febbraio				**								
Marzo	*							*	**	**	**	**
Aprile	***	***			**	**	**	***	***	***	***	***
Maggio				**								
Giugno				**								
Luglio				**								
Agosto			*	***								
Settembre			**	***								
Ottobre			**	***								
Novembre			**	***								
Dicembre			**	***								

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Catena Lunga

	Gennaio	Febbraio	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre
Gennaio				**								
Febbraio				*								
Marzo					**	**	*	**				
Aprile	**	*			***	***	***	***	**	*	+	*
Maggio			**	***						*	*	
Giugno			**	***						*	*	
Luglio			*	***								
Agosto			**	***						*	*	*
Settembre				**								
Ottobre				*	*	*		*				
Novembre				+	*	*		*				
Dicembre				*				*				

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

SFA

	Gennaio	Febbraio	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre
Gennaio		*	***	***		*						
Febbraio	*			*							*	**
Marzo	***				*		*	*	*	***	***	***
Aprile	***	**			***	**	***	***	***	***	***	***
Maggio			*	***								*
Giugno	*			**						*	**	**
Luglio			*	***							+	*
Agosto			*	***							*	*
Settembre			*	***								+
Ottobre			***	***		*						
Novembre		*	***	***		**	*	*				
Dicembre		**	***	***	*	**	*	*	+			

MUFA

	Gennaio	Febbraio	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre
Gennaio			***	***					**	**	*	
Febbraio				***								
Marzo	***				**	**	**	**				
Aprile	***	***			***	***	***	***	*	*	**	***
Maggio			**	***					**	**	+	
Giugno			**	***					*	*		
Luglio			**	***					**	**	+	
Agosto			**	***					*	*		
Settembre	**			*	**	*	**	*				
Ottobre	**			*	**	*	**	*				
Novembre	*			**	+		+					
Dicembre				***								

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

PUFA

	Gennaio	Febbraio	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre
Gennaio					*	*	*	*	**	*		
Febbraio					**	**	**	**	***	**		*
Marzo					**	**	**	**	***	**	*	*
Aprile	+				***	***	***	***	***	***	**	**
Maggio	*	**	**	***								
Giugno	*	**	**	***								
Luglio	*	**	**	***								
Agosto	*	**	**	***								
Settembre	**	***	***	***								
Ottobre	*	**	**	***								
Novembre			*	**								
Dicembre		*	*	**								

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

C14:1 c/C14:0

	Gennaio	Febbraio	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre
Gennaio			**	**			**	**		+		
Febbraio												
Marzo	**										*	*
Aprile	**										*	*
Maggio												
Giugno												
Luglio	**										*	*
Agosto	**										**	*
Settembre												
Ottobre	+											
Novembre			*	*			*	**				
Dicembre			*	*			*	*				

C16:1 c/C16:0

	Gennaio	Febbraio	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre
Gennaio												
Febbraio							*			+	**	**
Marzo											**	**
Aprile							+				**	**
Maggio												
Giugno												
Luglio		*		+								
Agosto												
Settembre											*	*
Ottobre		+										
Novembre		**	**	**					*			
Dicembre		**	**	**					*			

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

C18:1 c/C18:0

	Gennaio	Febbraio	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre
Gennaio								*				
Febbraio												
Marzo												
Aprile												
Maggio												
Giugno												
Luglio												
Agosto	*											+
Settembre												
Ottobre												
Novembre												
Dicembre								+				

CLA/C18:1 t

	Gennaio	Febbraio	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre
Gennaio					*		*	**	*	**		
Febbraio								*		**		
Marzo					**		**	**	**	***	*	*
Aprile					*		*	*	+	**		
Maggio	*		**	*								
Giugno												
Luglio	*		**	*								
Agosto	**	*	**	*								
Settembre	*		**	+								
Ottobre	**	**	***	**								
Novembre			*									
Dicembre			*									

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

IND ATER

	Gennaio	Febbraio	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre
Gennaio		*	***	***								
Febbraio	*			**	*							
Marzo	***				***	**	**	***	*	*	**	**
Aprile	***	**			***	***	***	***	***	***	***	***
Maggio		*	***	***								
Giugno			**	***								
Luglio			**	***								
Agosto			***	***								
Settembre			*	***								
Ottobre			*	***								
Novembre			**	***								
Dicembre			**	***								

C12:0/C10:0

	Gennaio	Febbraio	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre
Gennaio					***	***	**		***	***	***	***
Febbraio					***	***	***	*	***	***	***	***
Marzo					***	***	**		***	***	***	***
Aprile					***	***	***	**	***	***	***	***
Maggio	***	***	***	***				*				
Giugno	***	***	***	***				**				
Luglio	**	***	**	***								
Agosto		*		**	*	**			*	**	*	*
Settembre	***	***	***	***				*				
Ottobre	***	***	***	***				**				
Novembre	***	***	***	***				*				
Dicembre	***	***	***	***				*				

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

C15:0/C14:1

	Gennaio	Febbraio	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre
Gennaio					*				***			
Febbraio									***			
Marzo					*				***			
Aprile					*				***			
Maggio	*		*	*					***			
Giugno									***			
Luglio									***			
Agosto									***			
Settembre	***	***	***	***	***	***	***	***		***	***	***
Ottobre									***			
Novembre									***			
Dicembre									***			

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

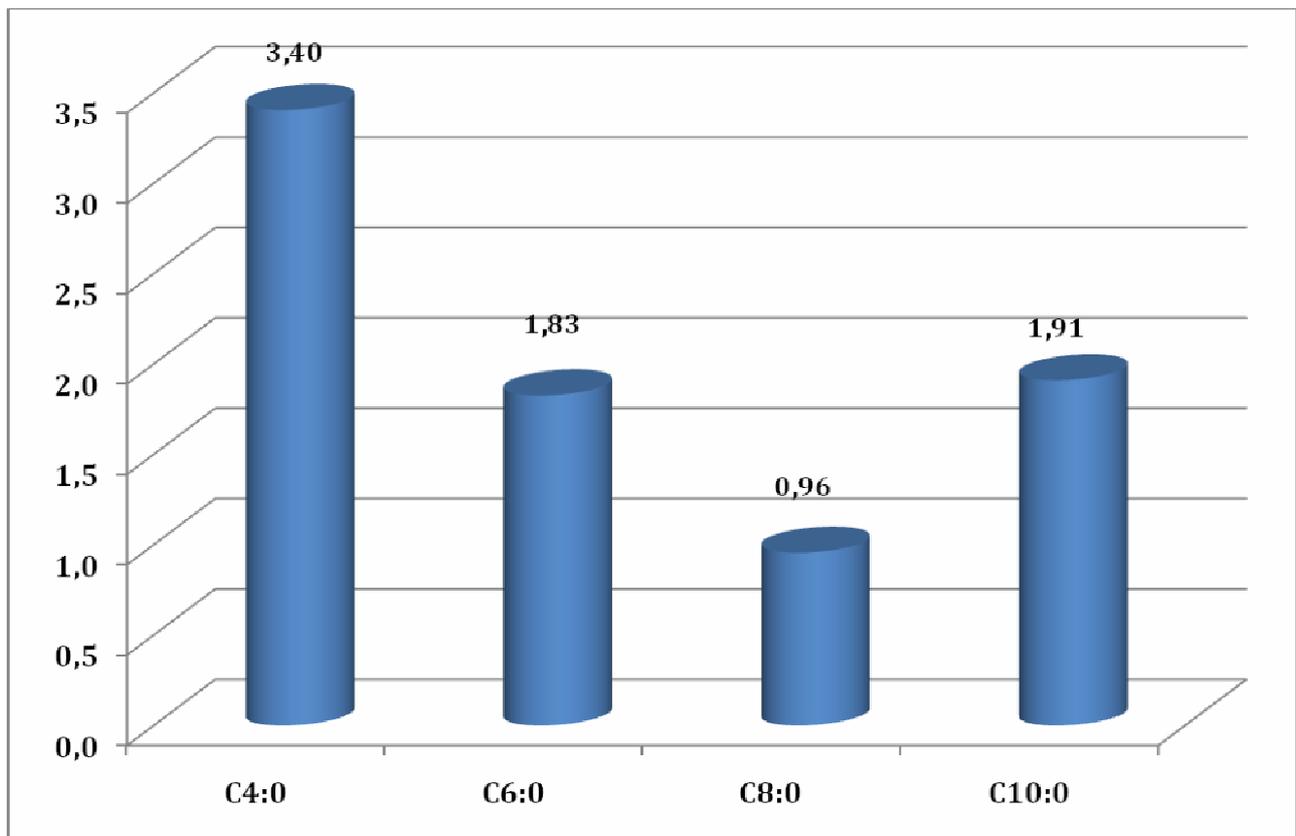


Grafico AG1. Contenuto medio in acidi grassi a corta catena

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

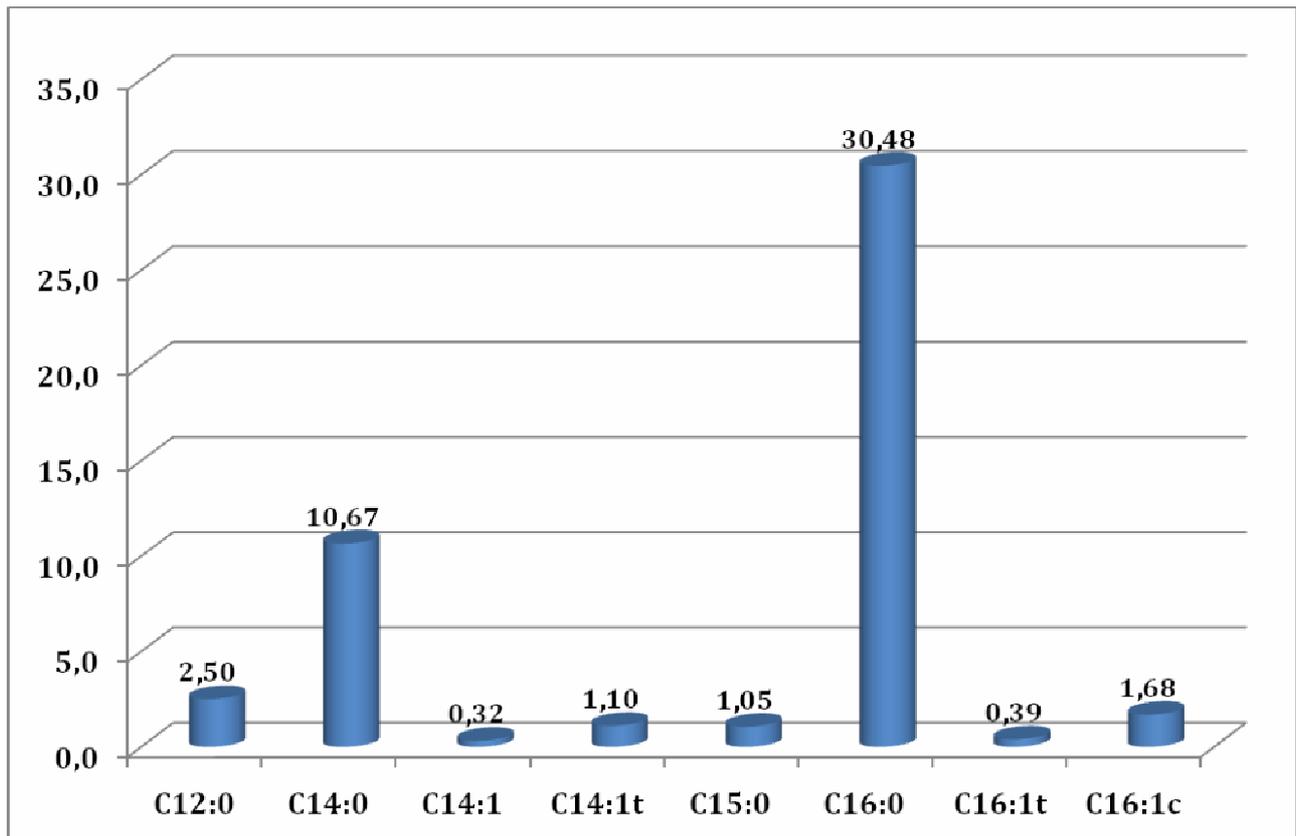


Grafico AG2. Contenuto medio in acidi grassi a media catena

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

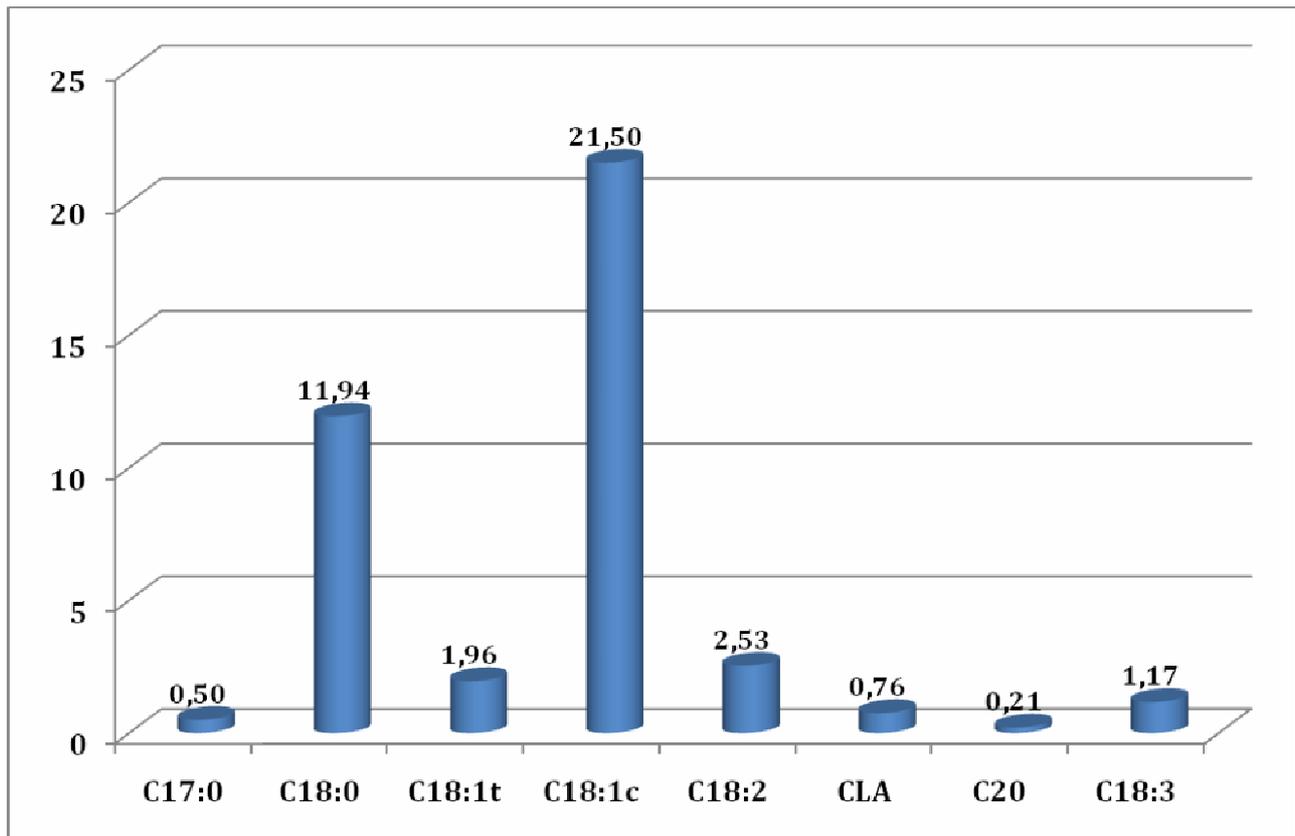


Grafico AG3. Contenuto medio in acidi grassi a lunga catena

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

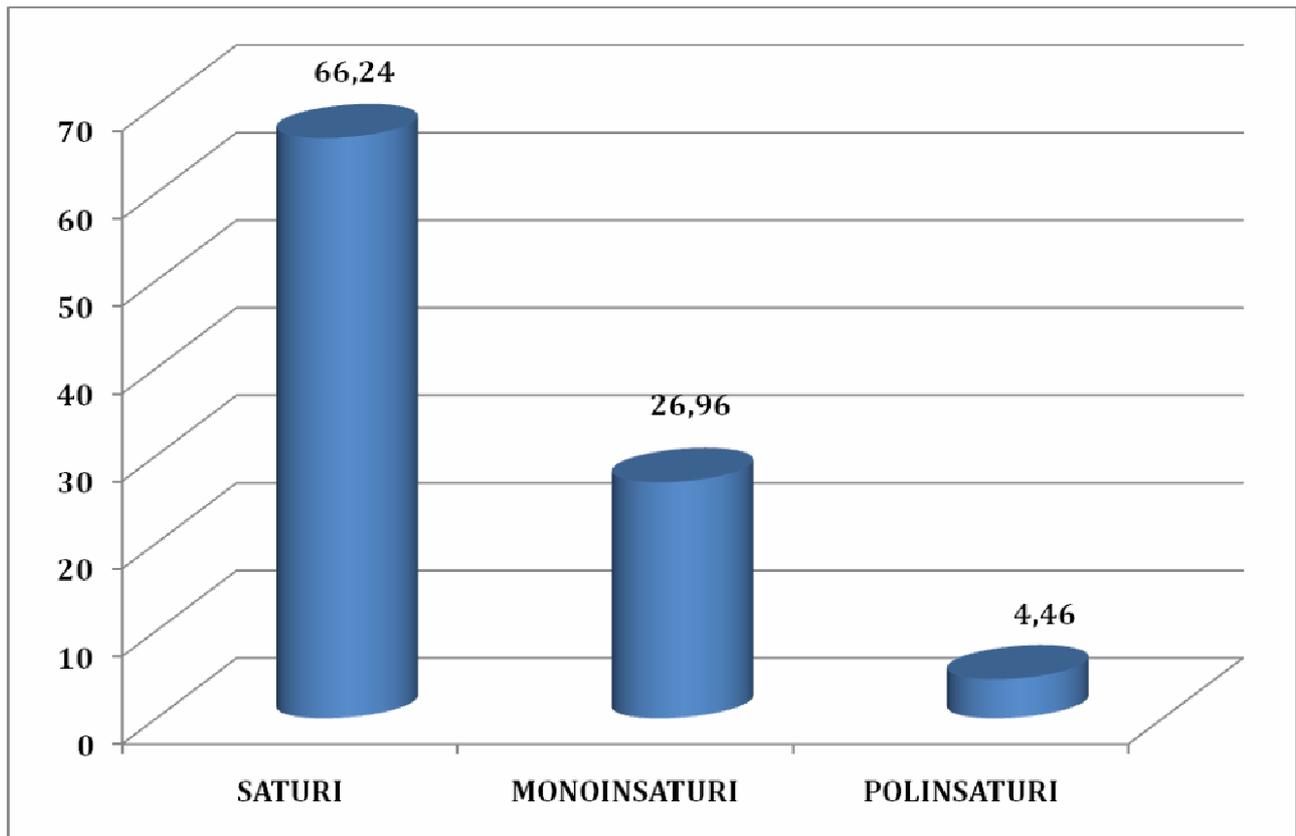


Grafico AG4. Contenuto medio in acidi grassi saturi, monoinsaturi e polinsaturi

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

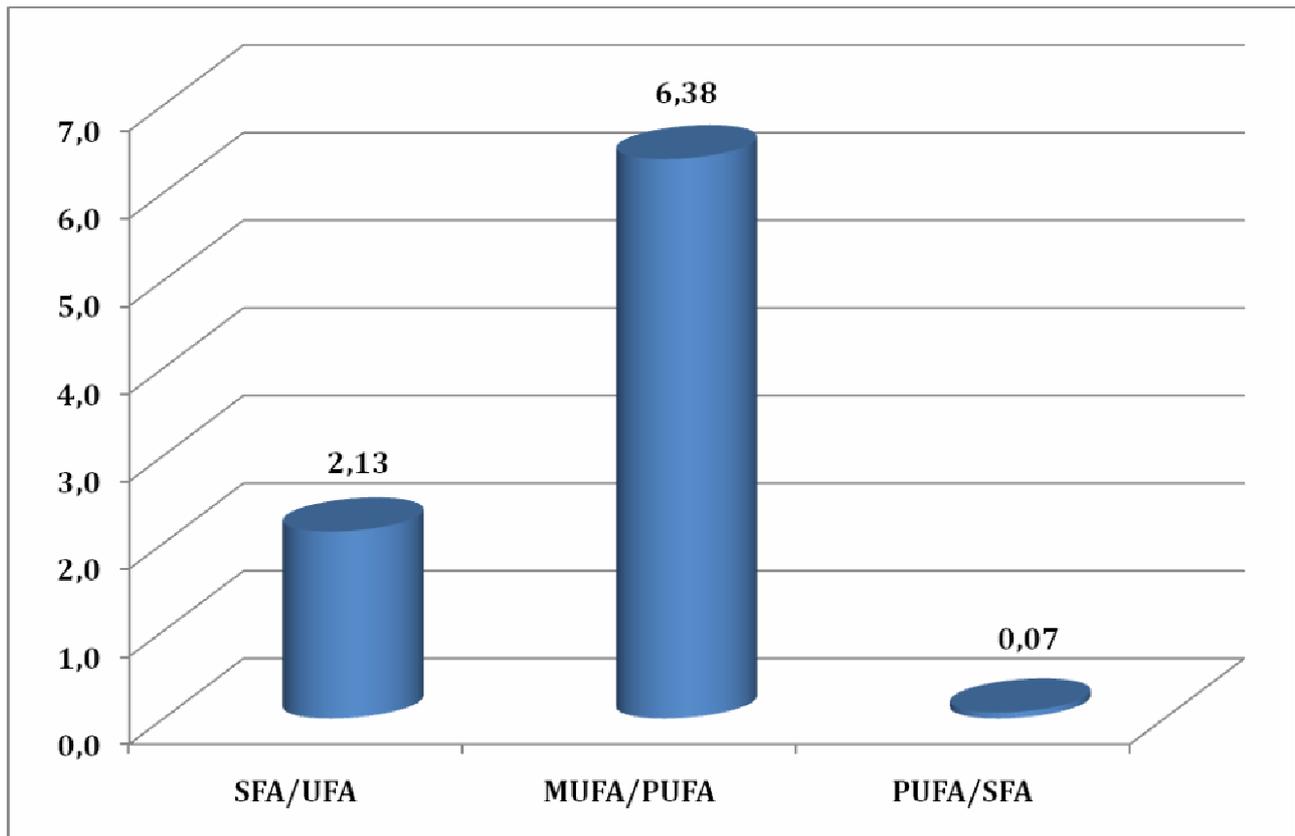


Grafico AG5. Rapporto tra gli acidi grassi saturi, monoinsaturi e polinsaturi

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

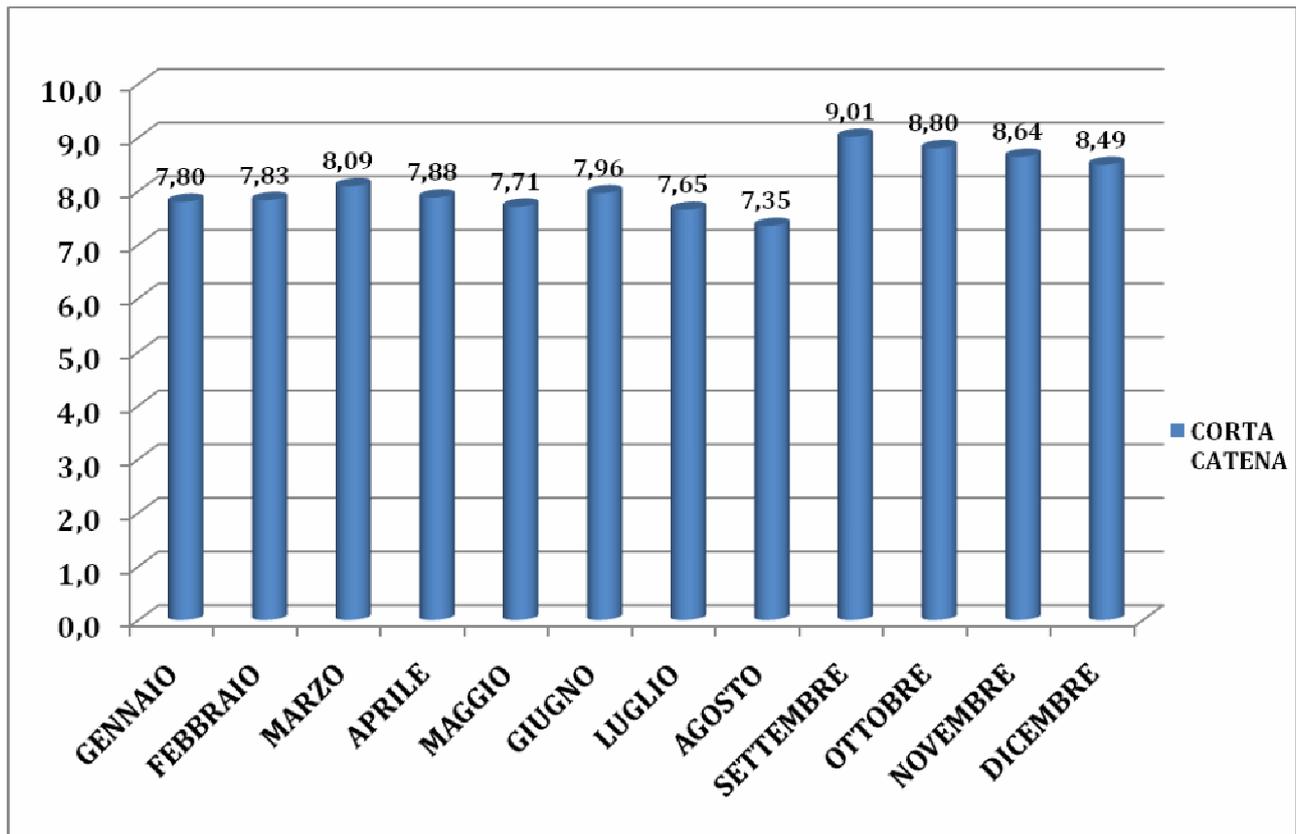


Grafico AG6. Contenuto medio degli acidi grassi a corta catena nell'anno

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

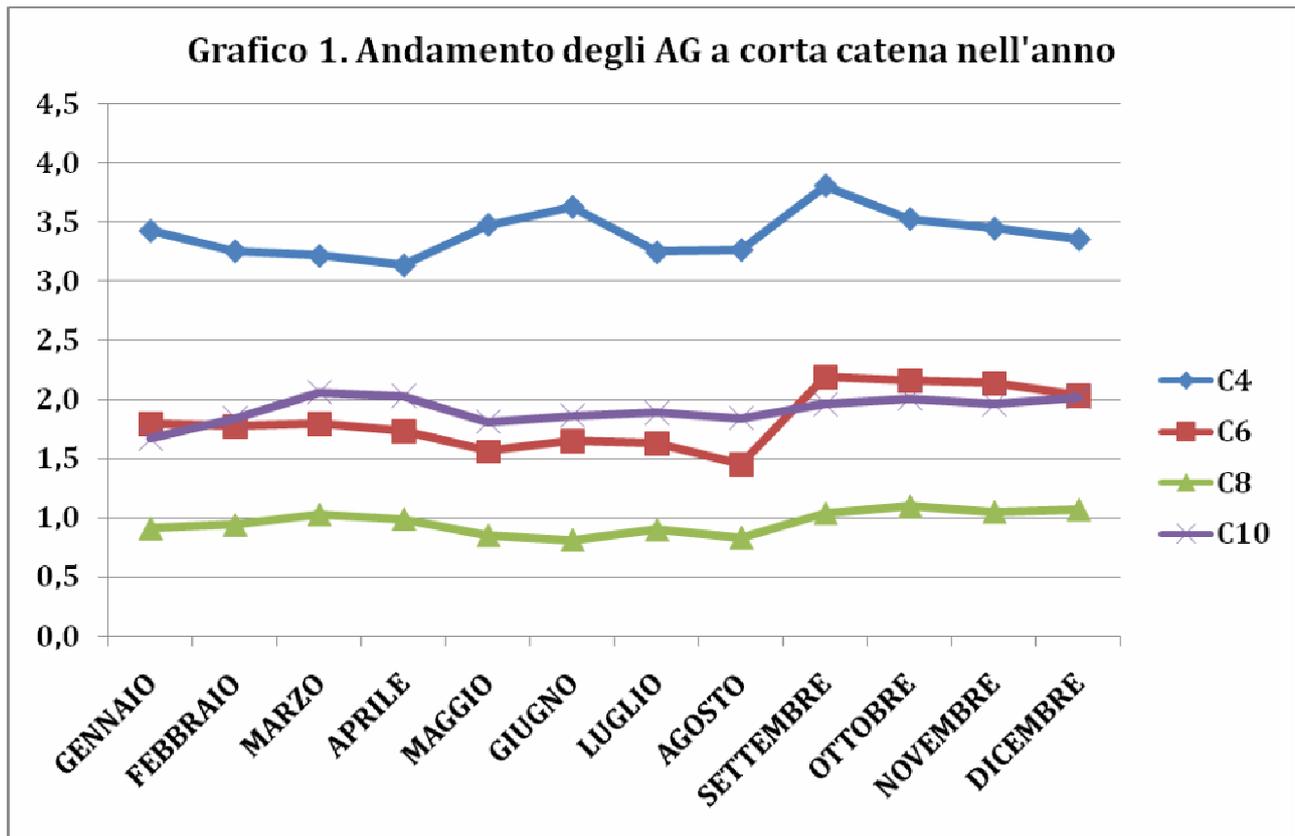


Grafico AG7. Andamento degli acidi grassi a corta catena nell'anno

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

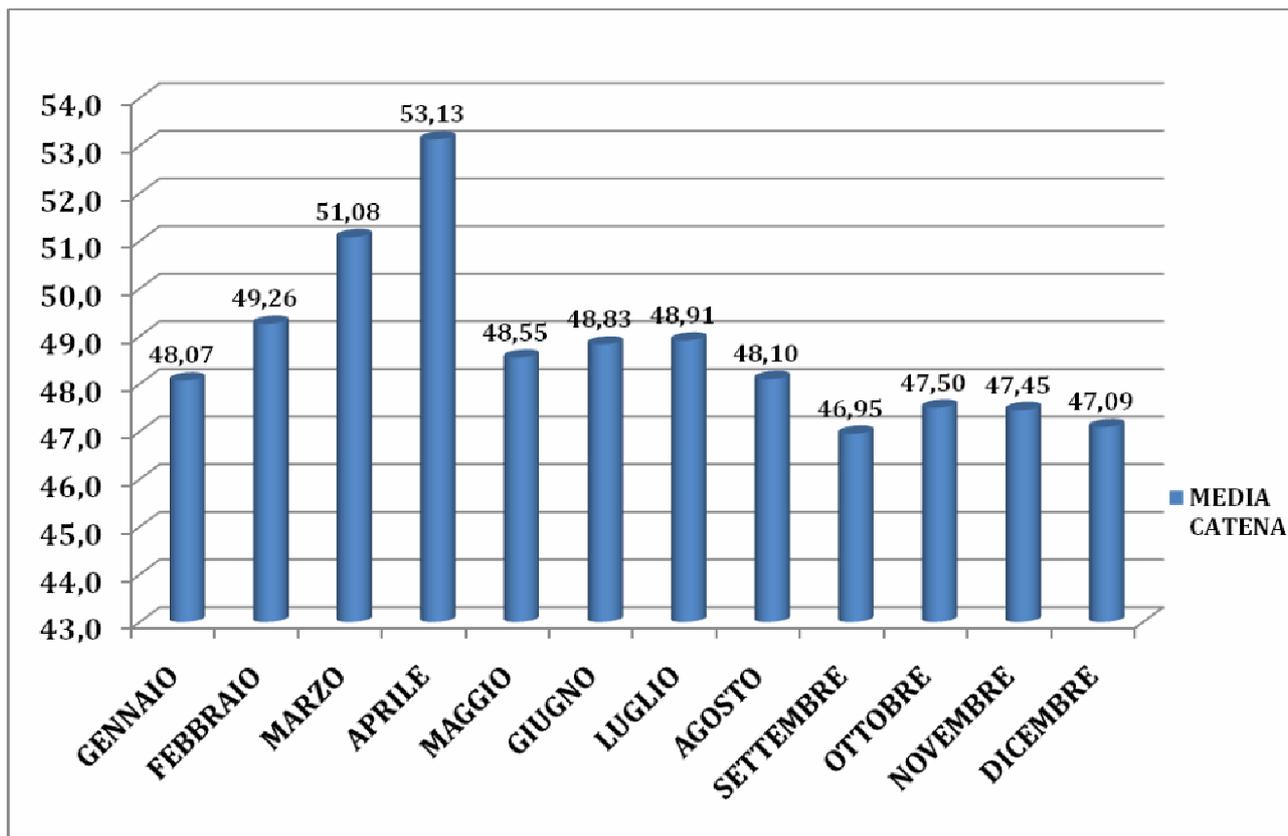


Grafico AG8. Contenuto medio in acidi grassi a media catena nell'anno

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

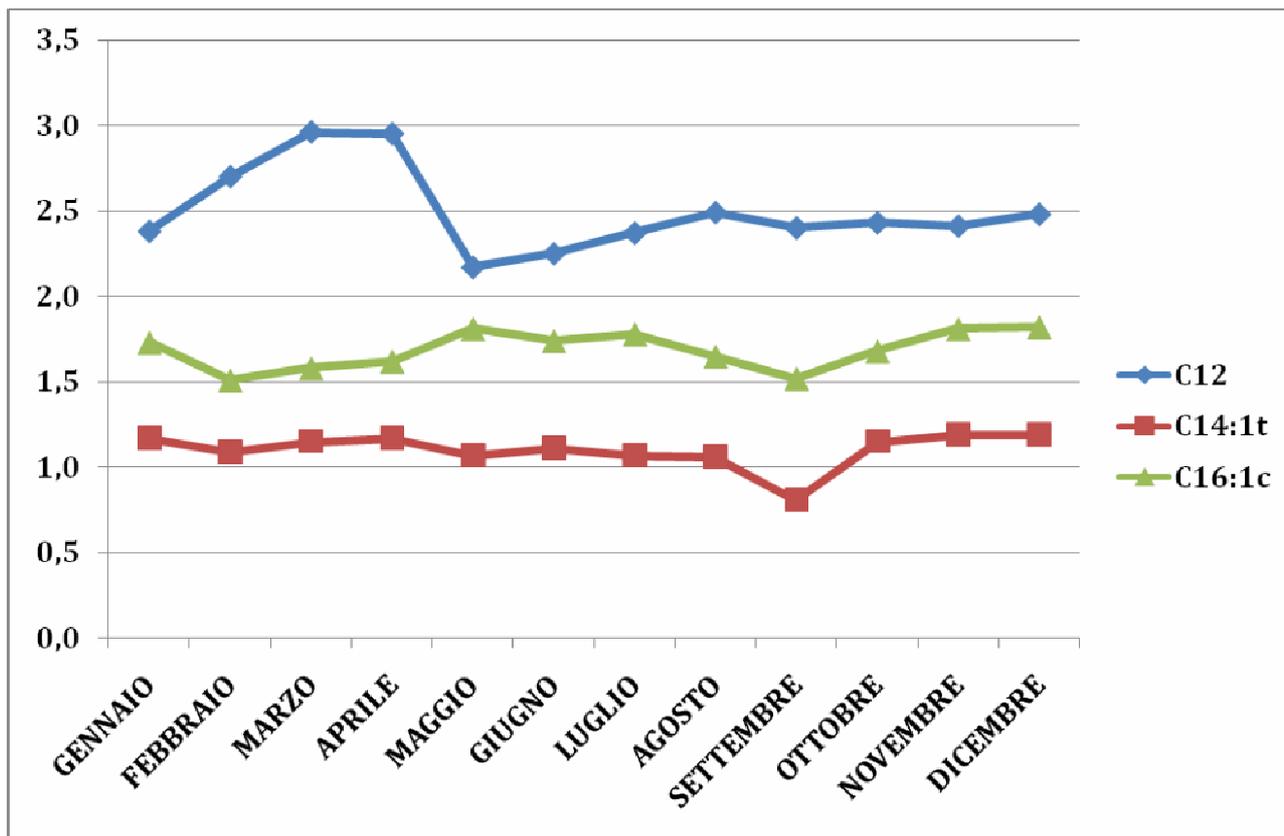


Grafico AG9. Andamento degli acidi grassi a media catena nell'anno

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

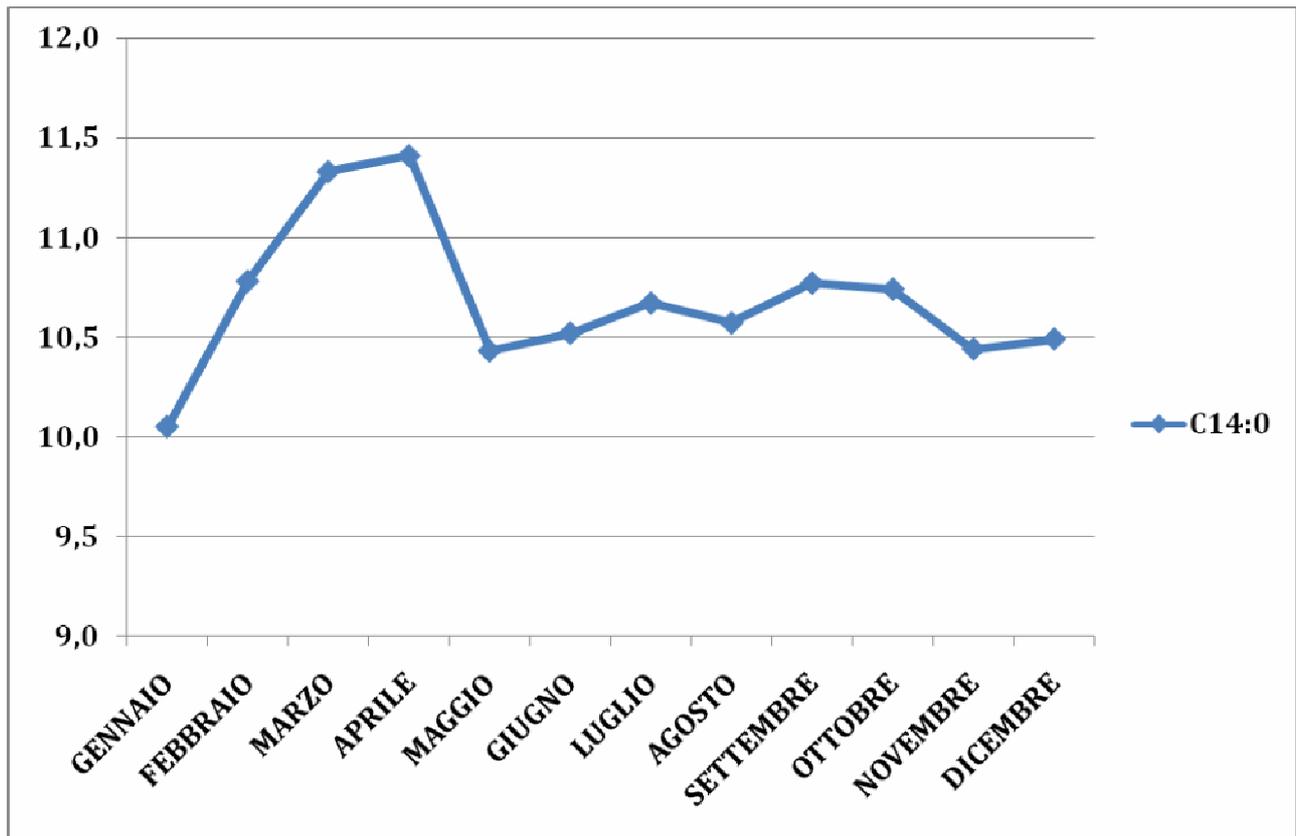


Grafico AG10. Andamento degli acidi grassi a media catena nell'anno

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

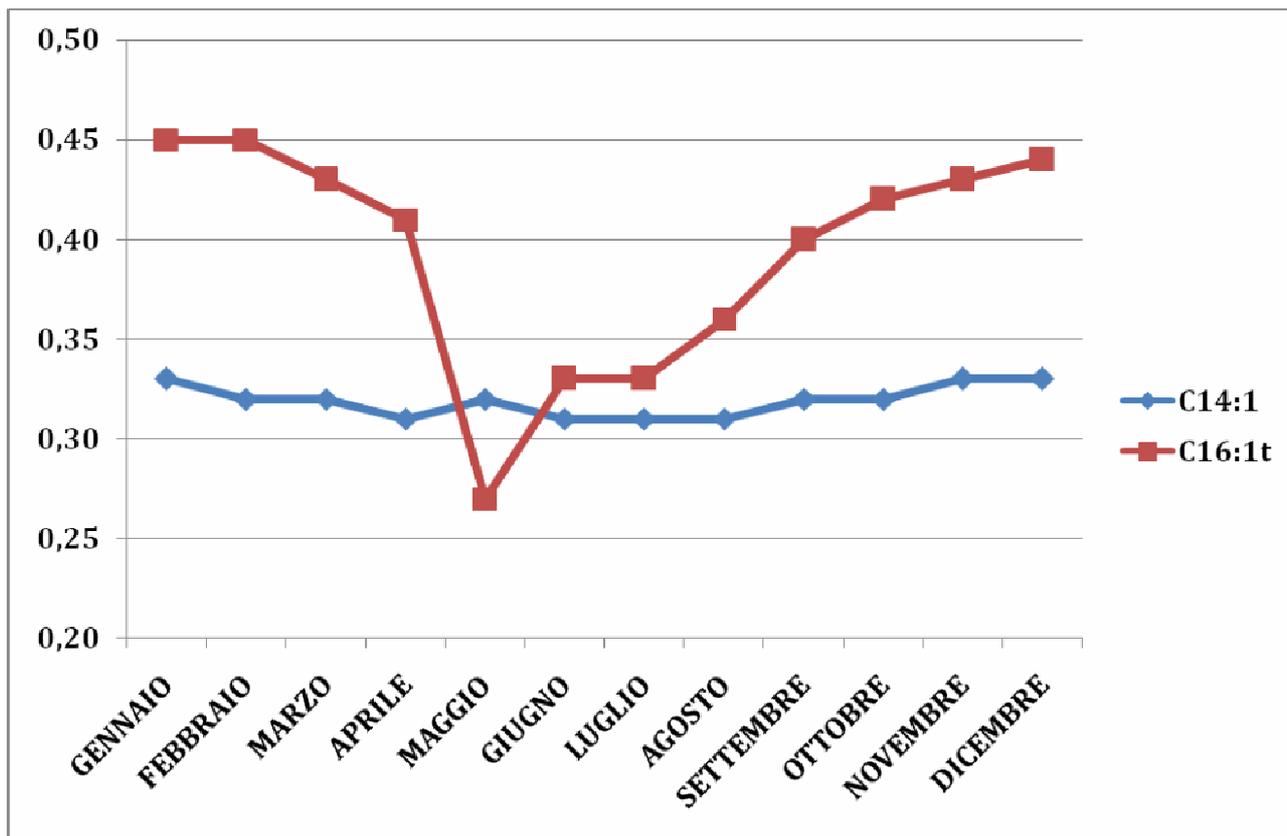


Grafico AG11. Andamento degli acidi grassi a media catena nell'anno

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

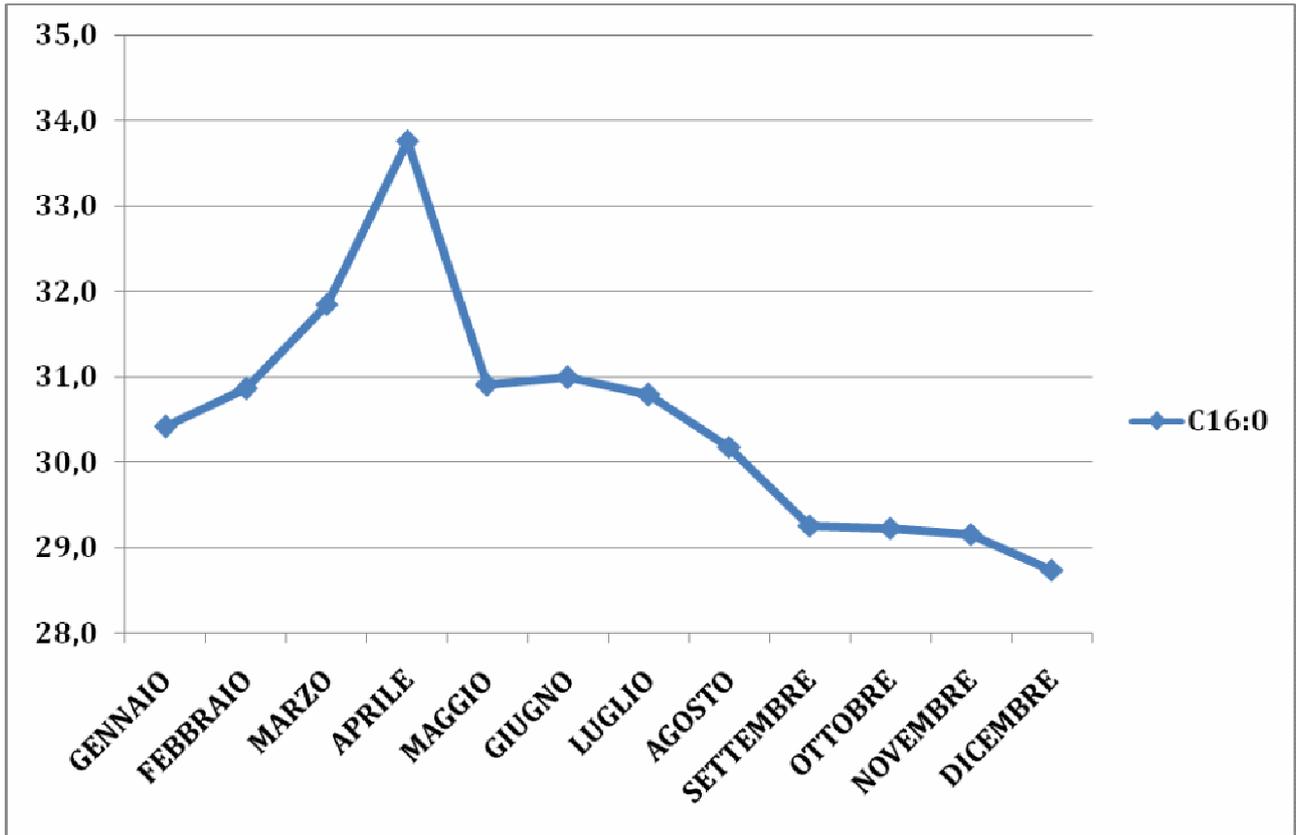


Grafico AG12. Andamento degli acidi grassi a media catena nell'anno

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

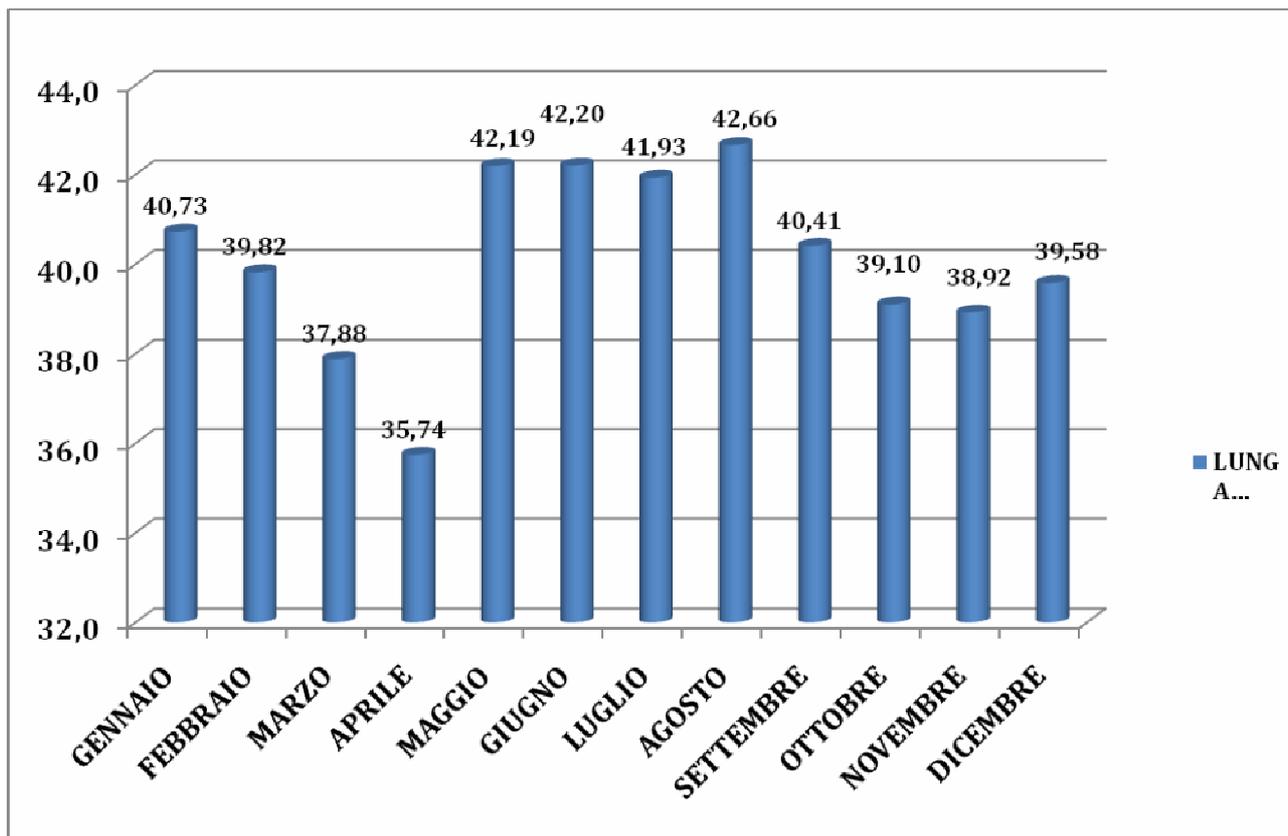


Grafico AG13. Contenuto medio in acidi grassi a media catena nell'anno

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

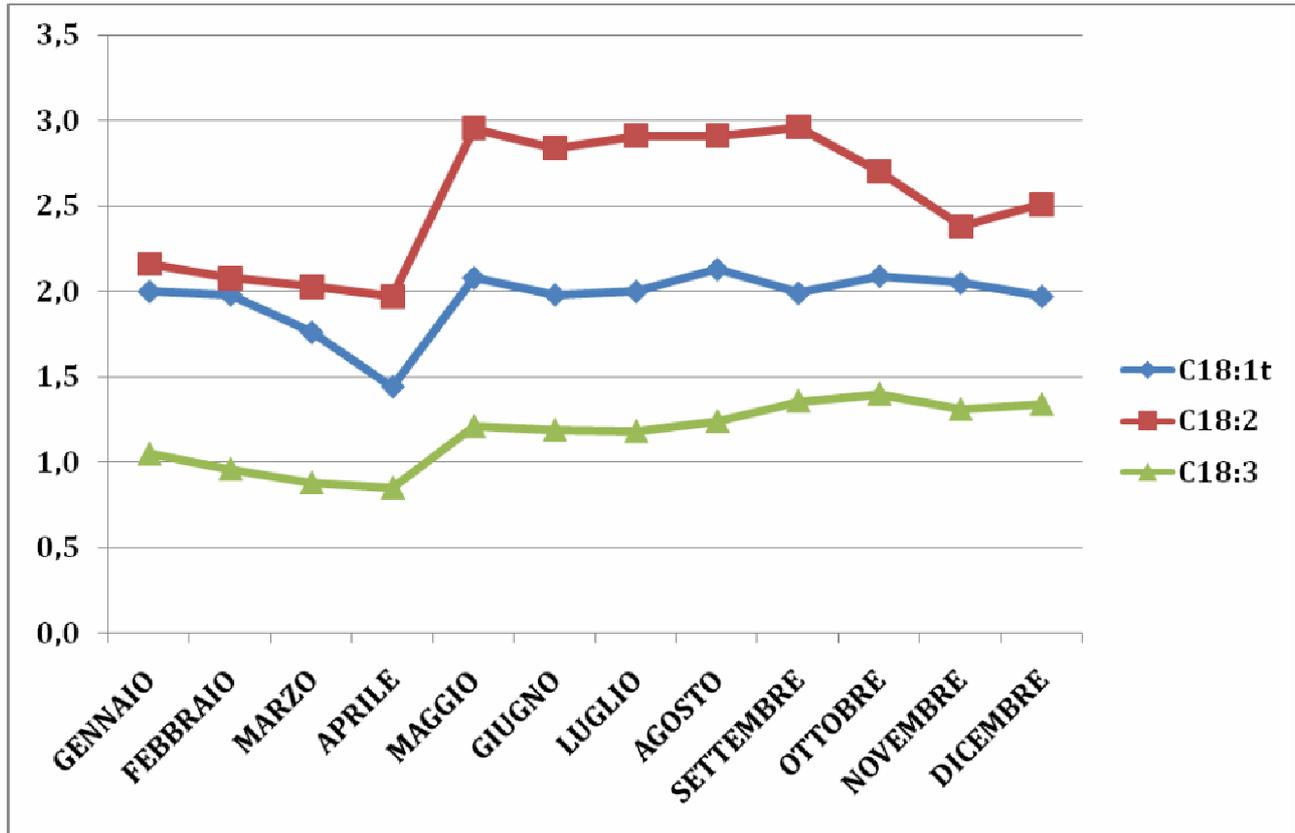


Grafico AG14. Andamento degli acidi grassi a lunga catena nell'anno

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

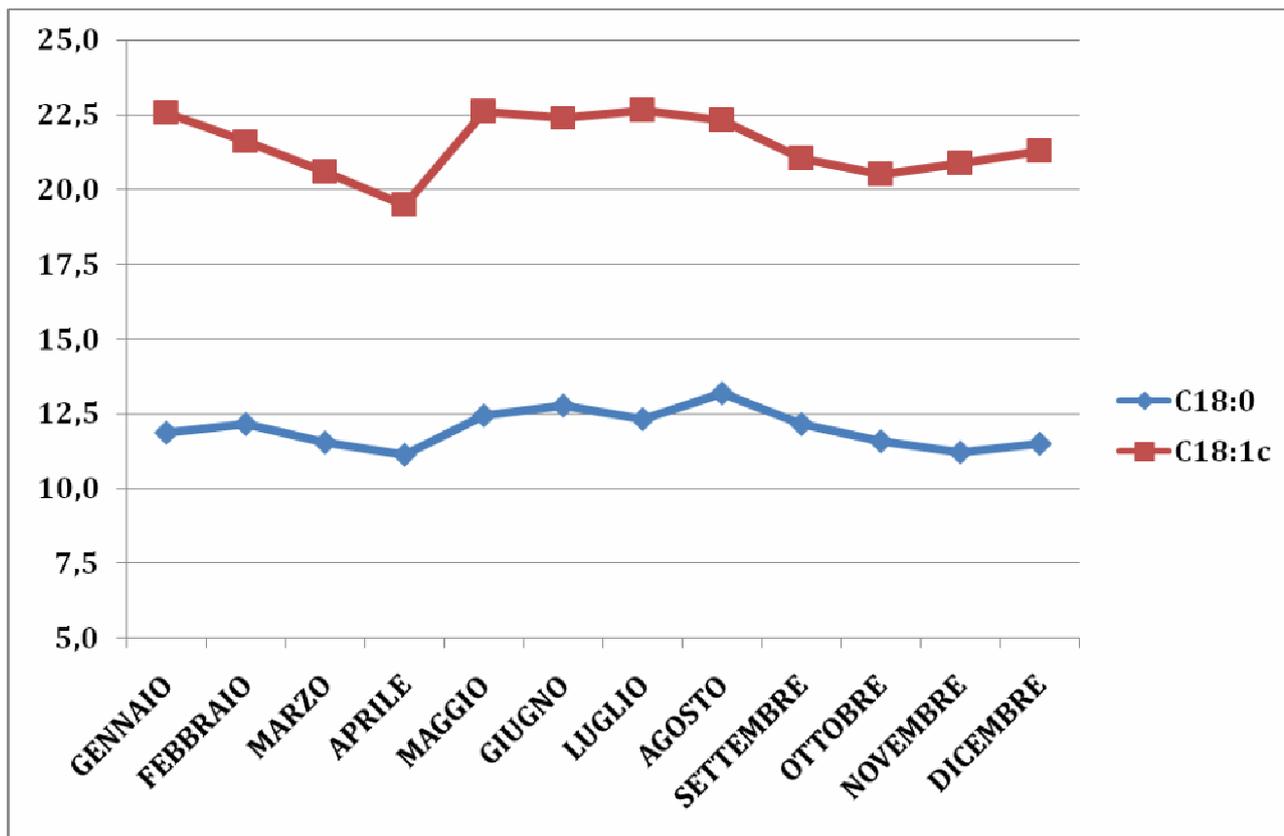


Grafico AG15. Andamento degli acidi grassi a lunga catena nell'anno

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

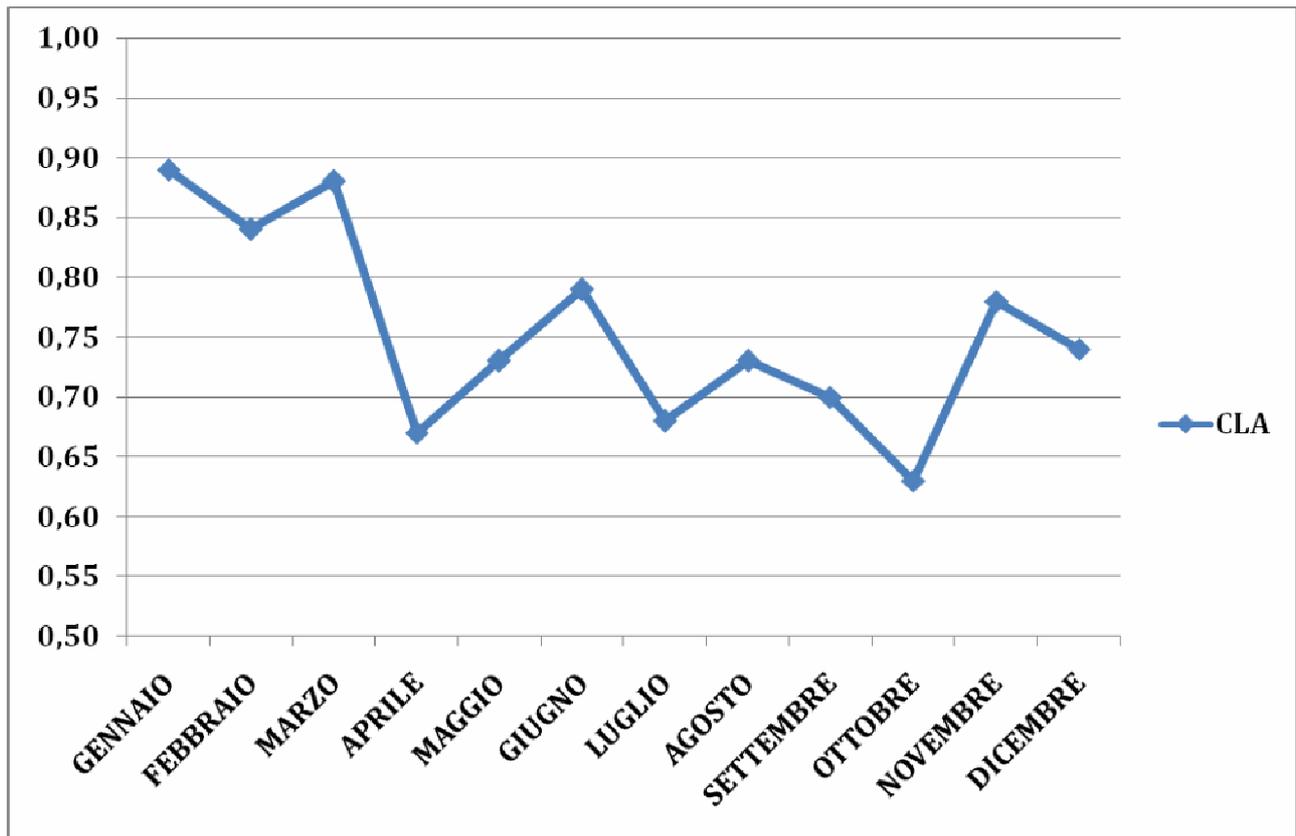


Grafico AG16. Variazione del contenuto in CLA nell'anno

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

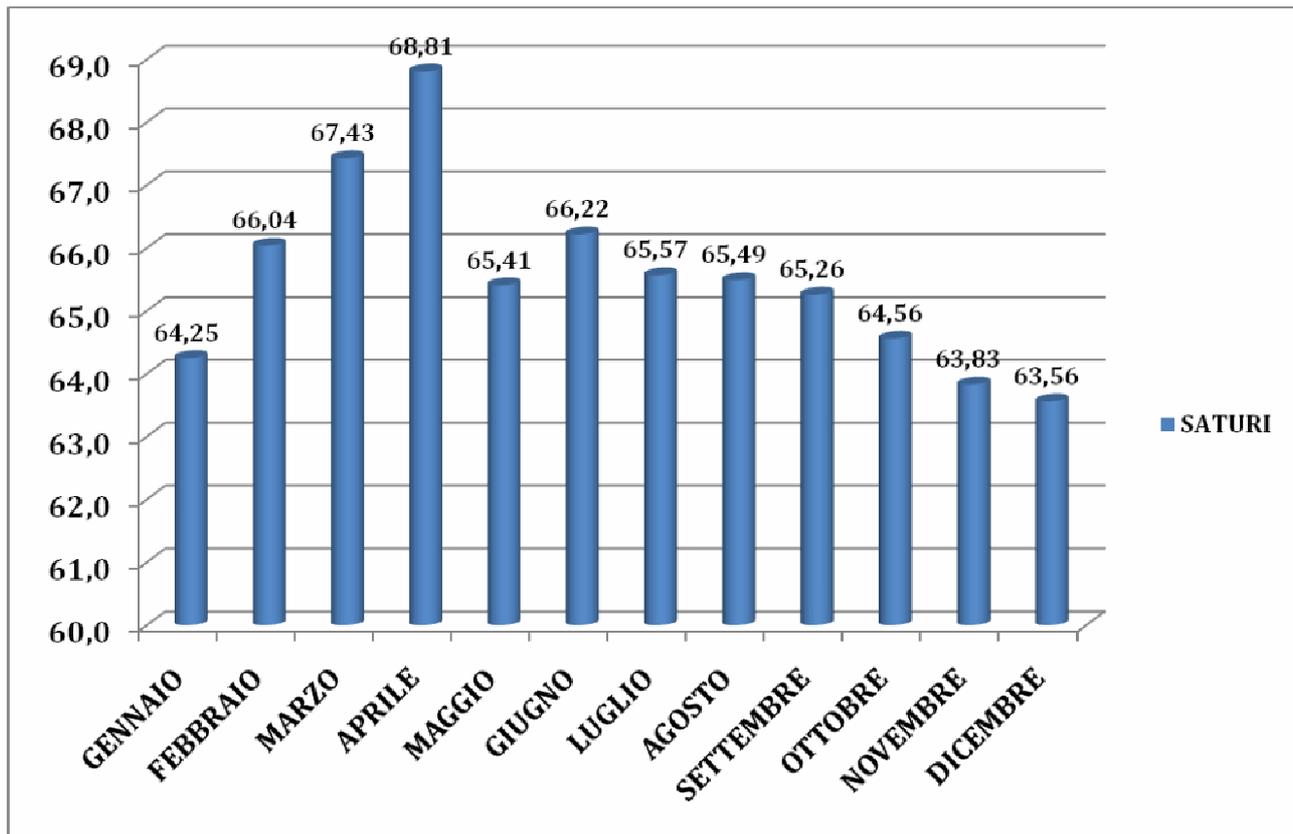


Grafico AG17. Contenuto medio in acidi grassi saturi nell'anno

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

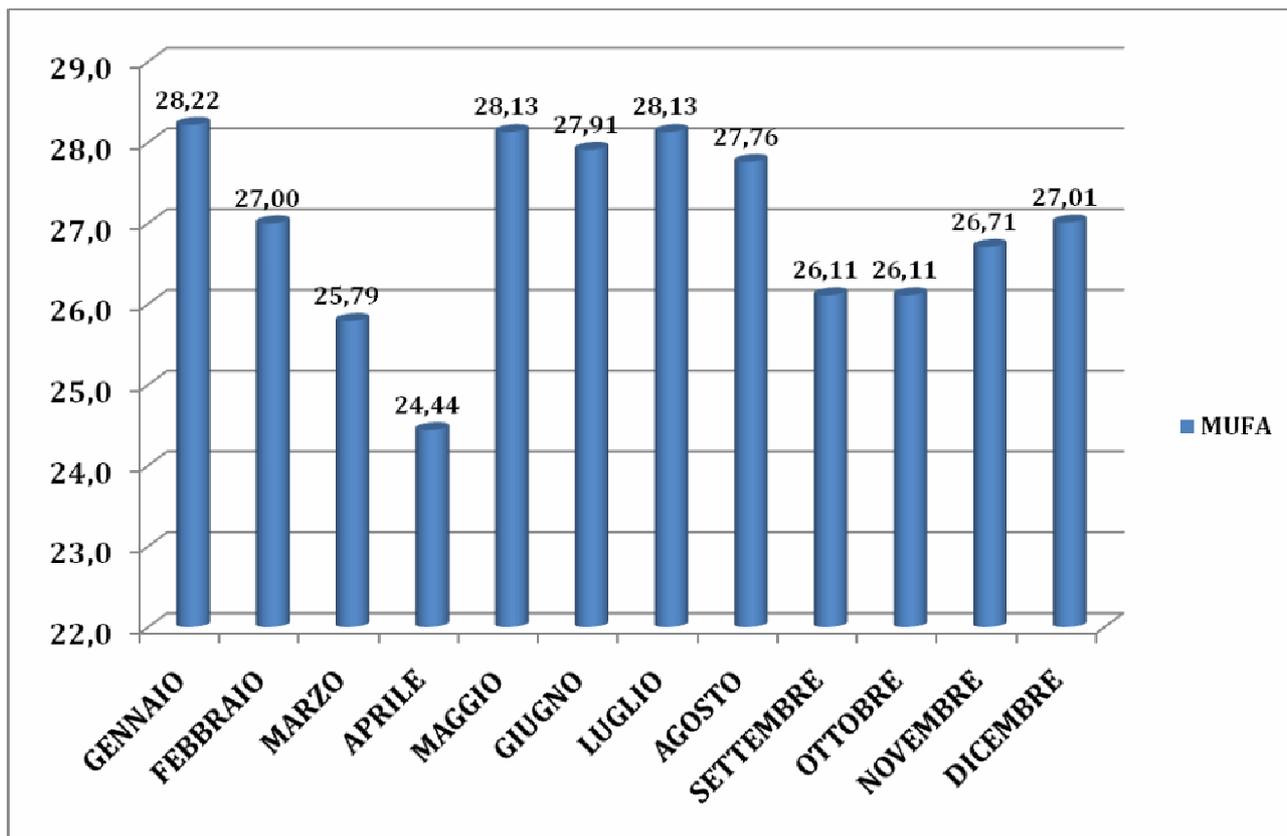


Grafico AG18. Contenuto medio in acidi grassi monoinsaturi nell'anno

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

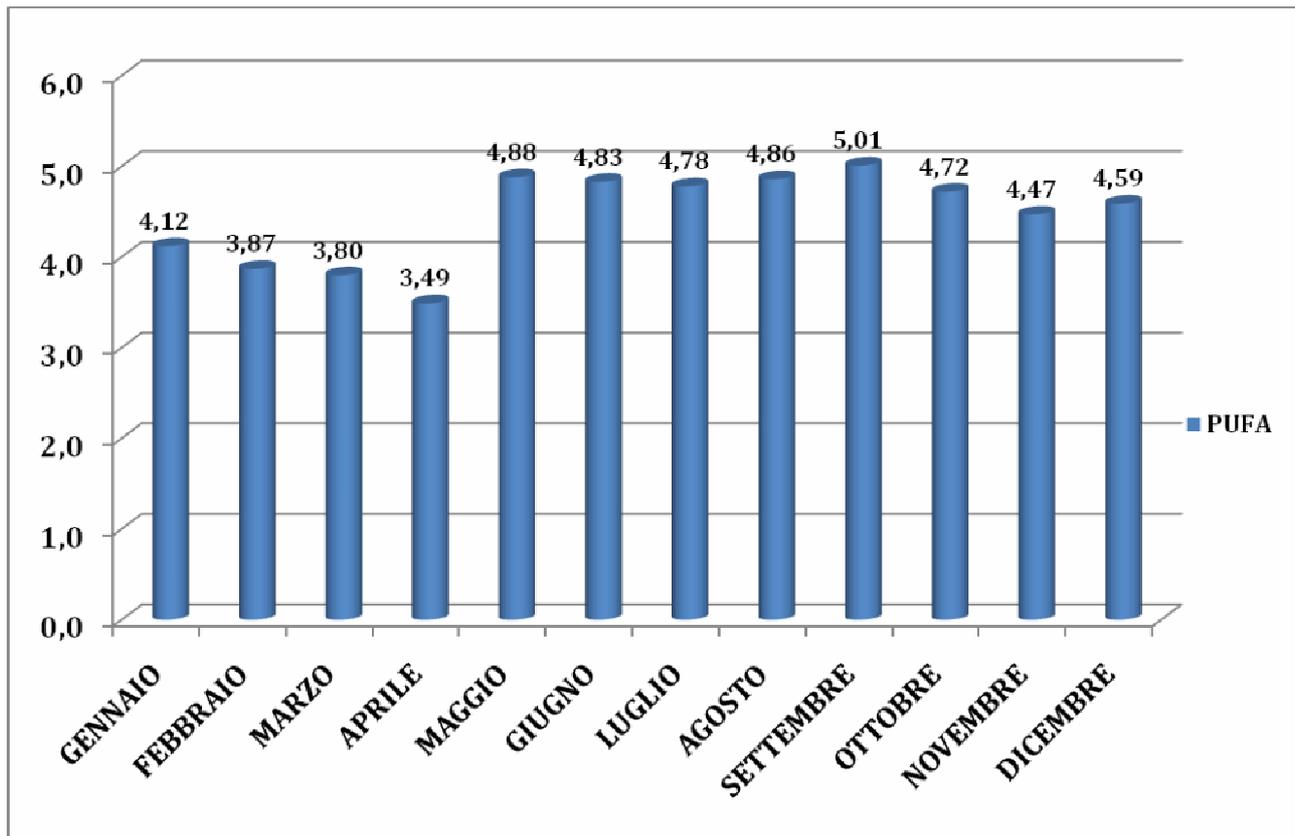


Grafico AG19. Contenuto medio in acidi grassi polinsaturi nell'anno

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

8. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- A.A.V.V. 2002. Modello di regolamento per la gestione igienica ed alimentare dell'allevamento bufalino in relazione alla produzione della mozzarella di bufala campana DOP. Consorzio per la tutela del formaggio mozzarella di bufala campana.
- Ackman R.G., Fatty acid composition of fish oils, in: Barlow S.M., Stansby M.E. 1982 Nutritional Evaluation of Long-Chain Fatty Acids in Fish Oil, Acad. Press. London. (Eds.), pp. 25–88.
- Addeo F., Kuzdzal-Savoie S. 1980. *Le Lait.*, 61, 14-26.
- Addeo F., Kuzdzal-Savoie S. Chianese L., Malori A., Sepe C. 1981. *Le Lait.*, 61, 187-212.
- Agenäs S., Akerlind M., Burstedt E., Effect of turn out to pasture and dietary fat supplementation on milk fat composition and milk conjugated linoleic acid concentration in cows selected for high or low milk fat percentage, *S. Afr. J. Anim. Sci.* 29 (1999) 288–291.
- Alais C. 2001. *Scienza del latte : principi di tecnologia del latte e derivati. Tecniche nuove.*
- Albonico F., Mincione B., Addeo F., Ameno M. 1969. *Industrie Agrarie.*, 7, 210.
- Albonico F., Mincione B., Casillo R. 1968. *Produzioni Animali*, 7, 269-278.
- Antongiovanni M., Buccioni A. Petcchi F., Secchiari P., Mele M., Serra A. 2003. Upgrading the lipid fraction of food of animal origin by dietary means: rumen activity and presence of trans fatty acids and CLA in milk and meat. *Ital. J. Anim. Sci.*, 2, 3-28
- Antongiovanni M., Gualtieri M. 1998. *Nutrizione e alimentazione animale. Edagricole, Bologna*, 332 pp.
- AOAC, 1995. 16th ed., Washington, DC.
- Ashes J.R., Gulati S.K., Cook L.J., Scott T.W., Donnelly J.B. 1979. Assessing the biological effectiveness of protected lipid supplements for ruminants, *JAOCS* 56: 522–527.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- Ashes J.R., Siebert B.D., Gulati S.K., Cuthbertson A.Z., Scott T.W. 1992. Incorporation of n-3 fatty acids of fish oil into tissue and serum lipids of ruminants, *Lipids* 27: 629–631.
- ASPA, 1999. Guida all'interpretazione dei profili metabolici, Centro Stampa Univ. Perugia, II-135.
- Babayan, V.K., 1987. Medium-chain triglycerides and structured lipids. *Lipids* 22, 417–420.
- Babayan, V.K., Rosenau, J.R., 1991. Medium-chain triglyceride cheese. *Food Technol.* 45, 111–114.
- Bach, A.C., Babayan, V.K., 1982. Medium-chain triglycerides: an update. *Am. J. Clin. Nutr.* 36, 950–962.
- Baker L. D., Ferguson J.D., Chalupa W. 1995. Responses in urea and true protein of milk to different protein feeding schemes for dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 78, 2424 - 2434.
- Baldwin R.L., Smith N.E., Taylor J., Sharp M. 1980 Manipulating metabolic parameters to improve growth rate and milk secretion, *J. Anim. Sci.* 51: 1416–1428.
- Banks W., Clapperton J.L., Girdler A.K. 1990. Effect of dietary unsaturated fatty acids in various forms on the de novo synthesis of fatty acids in the bovine mammary gland, *J. Dairy Res.* 57: 179–185.
- Banks W., Clapperton J.L., Girdler A.K., Steele W. 1984. Effect of inclusion of different forms of dietary fatty acids on the yield and composition of cow's milk, *J. Dairy Res.* 51: 387–395.
- Banks W., Clapperton J.L., Kelly M.E., Wilson A.G., Crawford R.J.M. 1980. The yield, fatty acid composition and physical properties of milk fat obtained by feeding soya oil to dairy cows, *J. Sci. Food Agric.* 31: 368–374.
- Banks, W., J. L. Clapperton, D. D. Muir, and A. K. Girdler. 1989. Whipping properties of cream in relation to milk composition. *J. Dairy Res.* 56:97–105.
- Banni S., Angioni E., Carta G., Murru E., Spada S., Melis M.P. 2001. Proceeding of 1st International Conference on Conjugated Linoleic Acid. June 10-13, Alesund-Norway. 22.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- Banni S., Angioni S., Carta G., Casu V., Murru M.E., Melis M.P., Dessi' M.A., Vargiolu S., Corongiu F.P. 1999. *Progress in Nutrition* 1, 3-4: 38 - 48.
- Barber M.C., Clegg R.A., Travers M.T., Vernon R.G. 1997. Lipid metabolism in the lactating mammary gland. *Biochim. Biophys. Acta.* 1347:101 – 126.
- Bas P., Chilliard Y., Morand-Fehr P., Rouzeau A., Mandran N. 1987. Composition des principaux tissus adipeux de la chèvre Alpine en fin de lactation, *Ann. Zootech.* 36: 361–374.
- Batajoo K.K., Terada F., Chen Y.J., Purnomoadi A., Ueda K., Nishida K., Kurihara M., Amari M., Shimada K., Hayashi T., Abe A. 1998. Comparison of dietary protein source on lactational performance in dairy cows. *Proceedings of the 94th Japanese Society of Zootechnical Science, Kobe University, Kobe, Japan*, 75.
- Bauchart D., Legay-Carmier F., Doreau M., Gaillard B. 1990. Lipid metabolism of liquid-associated and solid-adherent bacteria in rumen contents of dairy cows offered lipid-supplemented diets, *Br. J. Nutr.* 63: 563–578.
- Bauchart D., Vérité R., Rémond B. 1984. Long-chain fatty acid digestion in lactating cows fed fresh grass from spring to autumn, *Can. J. Anim. Sci.* 64 (Suppl.) 330–331.
- Bauman D. E., Davis C. L. 1974. Biosynthesis of milk fat. In *Lactation vol. II. Biosynthesis and secretion of milk/diseases* B. L. Larson and V.R. Smith, ed. Academic Press, New York, NY. pp. 31–75.
- Bauman D.E., Baumgard L.H., Corl B.A., Griinari J.M. 2000. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. *Proceedings of American Society of Animal Science* 1999.
- Bauman D.E., Griinari J.M. 2001. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. *Livestock Production Science*, 70, 15-29.
- Bauman DE, Baumgard LH, Corl BA, Griinari JM. 1999. *Proceedings of the American Society of Animal Science.*

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- Bauman DE, Lock AL, Corl BA, Ip C., Salter AM, Parodi PW. 2006. In: Ruminant physiology. Sejrsen K., Hvelplund T., Nielsen MO (ed.) Wageningen Academic Publishers. Pp. 529-551.
- Baumgard L.H., Corl B.A., Dwyer D.A., Saebo A., Bauman D.E., 2000. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278. R179–R184.
- Bergamo P., Fedele E., Iannibelli L., Marzillo G., 2003. Fat-soluble vitamin contents and fatty acid composition in organic and conventional Italian dairy products. *Food Chem.* 82: 625-631.
- Berra B., Bellia G., Montoefano G. 2004. *Progress in Nutrition* 149-159.
- Bertilsson J., Emanuelsson M., Murphy M. 1994. Manipulation of milk and body composition in dairy cows. *Proceedings of the 45th EAAP*, Edinburgh, UK.
- Bertoni G., Piccioli Cappelli F. 1994. *L'informatore Agrario.* 18, 29-33.
- Bertoni G., Trevisi E. 1999. *Progress in Nutrition* 1, 3-4: 19-29.
- Bessa R.J.B., Santos-Silviaj Ribiero J.M.R., Portugal A.V. 2000. *Liv. Prod. Sci.* 63 (3): 201 - 211.
- Bickerstaffe R., Annison E.F., Linzell J.L., 1974. The metabolism of glucose, acetate, lipids and amino acids in lactating dairy cows, *J. Agric. Sci. (Camb.)* 82: 71–85.
- Bickerstaffe R., Noakes D.E., Annison E.F. 1972. Quantitative aspects of fatty acid biohydrogenation, absorption and transfer into milk fat in the lactating goat, with special reference to the cis and trans-isomers of octadecenoate and linoleate, *Biochem. J.* 130: 607–617.
- Blasi F., Montesano D., De Angelis M., Maurizi A., Ventura F., Cossignani L., Simonetti M.S., Damiani P. 2008. Results of stereospecific analysis of triacylglycerol fraction from donkey, cow, ewe, goat and buffalo milk *Journal of Food Composition and Analysis* 21: 1–7.

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- Bracco U., Dalgo J.H., Bohren H. 1972. Lipid composition of the fat soluble membrane of human and bovine milk. *J. Dairy Sci.* 55: 165.
- Breda Mulvihill. 2001. *Brithish Nutrition Foundation Bulletin.* 26: 295 - 299.
- Bretillon L., Chardigny J.M., Grégoire S., Berdeaux O., Sébédio J.L. 1999. Conjugated linoleic acid isomers effects on the in vitro hepatic microsomal desaturation activities, *Lipids* 34: 965–969.
- Broudiscou L., Pochet S., Poncet C. 1994. Effect of linseed oil supplementation on feed degradation and microbial synthesis in the rumen of ciliate- free and refaunated sheep, *Anim. Feed Sci. Technol.* 49: 189–202.
- Brunschwig Ph., Morel d'Arleux F., Colin G., Evrard J. 1996. Effets de l'apport de tourteau de lin sur les performances de vaches laitières à l'ensilage de maïs, *Rencontres Recherches Ruminants* 3: 285–288.
- Brzoska F., Gasiór R., Sala K., Zyzak W. 1999. Effect of linseed oil fatty acid salts and vitamin E on milk yield and composition. *J. Anim. Feed. Sci.* 8 (3): 367 – 378.
- Buccioni A, Petacchi F, Antongiovanni M. 2002. Firenze Accademia dei Georgofili Quaderni I pp. 97-128
- Buccioni A. 2002. Evoluzione del contenuto dei principali isomeri geometrici e posizionali dell'acido linoleico coniugato (CL) nel liquido ruminale durante i processi fermentativi in vitro. Ph. D. Diss. Università di Firenze, Italy.
- Calabro' S., Bovera F., Cutrignelli M.I., Marchiello M., Piccolo V., Infascelli F. 2002. Some variability factors in milk and blood urea of the Italian Mediterranean Buffalo. *Asian-Australian Journal of Animal Sciences.* In c.d.s.
- Cannella C., Giusti A.M. 2000. *Ital. J. Food Sci.*, 12, 36-55.
- Castrillo M. 2003. Una specie che resiste alla globalizzazione. *L'Allevatore.*, 10.
- Cavaliere A., Solimene R., Intrieri F. 1994. *Industrie Alimentari*, XXXIII, 1105 - 1106.
- Chilliard Y. 1993. Dietary fat and adipose tissue metabolism in ruminants, pigs, and rodents: a review, *J. Dairy Sci.* 76: 3897–3931.

Dott. Maria Luisa Varricchio

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- Chilliard Y., 1997. Caractéristiques biochimiques des lipides du lait de chèvre – Comparaison avec les laits de vache et humain. Journée Scientifique et Technique du Lait de Chèvre, ITPLC, Niort, 7 Novembre 1996, in: INRA (Ed.), Paris, Intérêts Nutritionnel et Diététique du lait de Chèvre, Les Colloques, n 81. pp. 51–65.
- Chilliard Y., Delouis C., Smith M.C., Sauvant D., Morand-Fehr P., 1986a. Mammary metabolism in the goat during normal or hormonally-induced lactation, *Reprod. Nutr. Dev.* 26: 607–615.
- Chilliard Y., Doreau M., Gagliostro G., Elmeddah Y. 1993. Addition de lipides protégés (encapsulés ou savons de calcium) à la ration de vaches laitières. Effets sur les performances et la composition du lait, *INRA Prod. Anim.* 6: 139–150.
- Chilliard Y., Ferlay A., Doureau M. 2001. Effect of different types of forage, animal fat or marine oil in cow's milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acid. *Livestock Prod. Sci.*, 70,-31-48.
- Chilliard Y., Ferlay A., Mansbridge R.M., Doreau M. 2000. Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. *Ann. Zootech.* 49: 181–205
- Chilliard Y., Morand-Fehr P., Sauvant D., Bas P., 1986b. Utilisation métabolique des lipides par le ruminant en lactation, *Bull. Tech. CRZV Theix, INRA* 63: 81–91.
- Chilliard Y., Robelin J., Rémond B., 1984. In vivo estimation of body lipid mobilization and reconstitution in dairy cattle, *Can. J. Anim. Sci.* 64: 236–237.
- Chouinard P.Y., Corneau L., Kelly M.L., Griinari J.M., Bauman D.E. 1998. Effect of dietary manipulation on milk conjugated linoleic acid concentrations, *J. Anim. Sci.* 76 (Suppl. 1) 233.
- Chouinard P.Y., Corneau L., Saebo A., Bauman D.E. 1999b. Milk yield and composition during abomasal infusion of conjugated linoleic acids in dairy cows, *J. Dairy Sci.* 82 2737–2745.

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- Chourinard P.Y., Corneau L., Barbano D.M., Metzger L.E., Bauman D.E. 1999a. Conjugated linoleic acids alter milk fatty acid composition and inhibit milk fat secretion in dairy cows. *J. Nutr.* 129, 1579 – 1584.
- Christensen R.A., Drackley J.K., La Count D. W., Clarck J. H.1994. Dietary fat and adipose tissue metabolism in ruminants, pigs and rodents. A review. *J. Dairy Sci.* 77,1052.
- Christensen R.A., Drackley J.K., LaCount D.W., Clark J.H. 1994. Infusion of four long-chain fatty acid mixtures into the abomasum of lactating dairy cows, *J. Dairy Sci.* 77: 1052–1069.
- Cocchi M., Turchetto E. 1999. Acidi grassi polinsaturi e sviluppo perinatale. *Progr. Nutr.*, 1(1), 3-27.
- Collomb M., Butikofe U., Sieber R., Rosset J. O., Jeangros B. 2001. Conjugated linoleic acid and fatty acid composition of cow's milk fat produced in lowlands and highlands. *J. Dairy Res.* 68,519-523.
- Commissione Tecnico-Scientifica Del Consorzio Per La Tutela Del Formaggio Mozzarella Di Bufala Campana (2002). Modello di regolamento per la gestione igienica ed alimentare dell'allevamento bufalino in relazione alla produzione della Mozzarella di Bufala Campana DOP. - Tipolitografia Incisivo, Salerno 63 pp.
- Contarini G. 1997. Applicazione del metodo ufficiale della UE per la valutazione della genuinità del grasso di latte: esperienze e suggerimenti. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse.* 74
- Contarini G., Leardi R., Pezzi C., Toppino P.M. 1993. *Riv. Ital. Sostanze Grasse.* 70, 491-499.
- Contato R. 2004. *Ingredienti Alimentari III*, dicembre 2004, 68 - 70.
- Correale E. 1987. *Informatore Zootecnico*, 9, 52-55.
- Davis C.L., Brown R.E., Low-fat milk syndrome, in: Phillipson A.T. (Ed.), *Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant*, Oriol Press, Newcastle, UK, 1970, pp. 545–565.

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- De Peters E. J., Ferguson J. D. 1992 Nutritional factors influencing the nitrogen composition of bovine milk: a review. *J. Dairy Sci.* 75:2043.
- De Peters E. J., Ferguson J. D. 1992. Non protein nitrogen distribution and conception rate: in the milk of cows. *J. Dairy Sci.* 3192 - 3209.
- Decaen C., Adda J., 1970. Evolution de la secretion des acides gras des matières grasses du lait au cours de la lactation de la vache, *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 10: 659–677.
- Decaen C., Ghadaki M.B. 1970. Variation de la secretion des acides gras des matières grasses du lait de vache à la mise à l'herbe et au cours des six premières semaines d'exploitation du fourrage vert, *Ann. Zootech.* 19: 399–411.
- Demeyer D., Doreau M. 1999. Targets and means for altering meat and milk lipids, *Proc. Nutr. Soc.* 58: 593–607.
- Demeyer D., Van Nevel C., Fiems L. 1995 Nutritional engineering of beef fat composition: motive, target and approach, in: Lundström K., Hansson I., Wiklund E. (Eds.), *Composition of meat in relation to processing, nutritional and sensory quality*, ECCEAMST Utrecht, pp. 15 – 36.
- DePeters, E. J., German, J. B., Taylor, S. J., Essex, S. T., Perez-Monti H., 2001. Fatty Acid and Triglyceride Composition of Milk Fat from Lactating Holstein Cows in Response to Supplemental Canola Oil *J Dairy Sci* 84: 929-936)
- Devendra C. Lewis D. 1975. The interaction between dietary lipids and fibre in the sheep. *Anim. Prod.* 19, 67-76.
- Dewhurst R. J., Scollan N.D., Youell S.J., Tweed J. K. S., Humphreys M.O. 2001. Influences of species, cutting date and cutting interval on the fatty acid composition of grasses. *Grass and Farage Sci.* 56, 68-74
- Dhiman T.R., Anand G.R., Satter L.D., Pariza M. 1996. Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets, *J. Dairy Sci.* 79 (Suppl. 1) 137.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- Dhiman T.R., Helmink E.D., McMahon D.J., Fife R.L., Pariza M.W. 1999. Conjugated linoleic acid content of milk and cheese from cows fed extruded oilseeds, *J. Dairy Sci.* 82: 412–419.
- Dhiman T.R., Satter L.D., Pariza M.W., Galli M.P., Albright K. 1997. Conjugated linoleic acid (CLA) content of milk from cows offered diets rich in linoleic and linolenic acid, *J. Dairy Sci.* 80 (Suppl. 1) 184.
- Dhiman, T. R., Anand, G. R., Satter, L. D., & Pariza, M. W. 1999. *Journal Of Dairy Sci.*, 82, 2146-2156.
- Doreau M., Chilliard Y. 1997. Digestion and metabolism of dietary fat in farm animals, *Br. J. Nutr.* 78 (Suppl. 1) S15–S35.
- Doreau M., Chilliard Y. 1997. Effects of ruminal or postruminal fish oil supplementation on intake and digestion in dairy cows, *Reprod. Nutr. Dev.* 37. 113–124.
- Doreau M., Chilliard Y., Rulquin H., Demeyer D.I. 1999. Manipulation of milk fat in dairy cows, in: Garnsworthy P.C., Wiseman J. (Eds.), *Recent Advances in Animal Nutrition*, Nottingham Univ. Press, Nottingham. pp. 81–109.
- Doreau M., Ferlay A. 1994. Digestion and utilization of fatty acids by ruminants, *Anim. Feed Sci. Technol.* 45: 379-396.
- Doreau M., Ferlay A. 1995. Effect of dietary lipids on nitrogen metabolism in the rumen: a review, *Livest. Prod. Sci.* 43: 97–110.
- Drackley J.K., Klusmeyer T.H., Trusk A.M., Clark J.H. 1992. Infusion of long-chain fatty acids varying in saturation and chain length into the abomasum of lactating dairy cows, *J. Dairy Sci.* 75 1517–1526.
- Eicher R., Bouchard E., Bigras-Poulin M. 1998. Factors affecting milk urea nitrogen and protein concentrations in Quebec dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine*, 39, 53 – 63.
- Emanuelson M., Bertilsson J. 1995. The effect of feeding on milk fat content and fatty acid composition. In: Mantere – Alhonen S., Maijala k., (Eds.), *Milk in nutrition effects of*
- Dott. Maria Luisa Varricchio

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

production and processing factors. Processing of NJF/NMR seminar NO. 252, Turku, Finland.

Enjalbert F., Nicot M.C., Bayourthe C., Moncoulon R. 1998. Duodenal infusions of palmitic, stearic or oleic acids differently affect mammary gland metabolism of fatty acids in lactating dairy cows, *J. Nutr.* 128: 1525–1532.

Enjalbert F., Nicot M.C., Bayourthe C., Vernay M., Moncoulon R. 1997. Effects of dietary calcium soaps of unsaturated fatty acids on digestion, milk composition and physical properties of butter, *J. Dairy Res.* 64: 181–195.

Fellner V., Sauer F.D., Kramer J.K.G., 1997 Effects of nigericin, monensin and tetronasin on biohydrogenation, *J. Dairy Sci.* 80: 921–928.

Ferguson J.D., Gallian D.T., Blanchard T. (1991): "Blood urea nitrogen and conception rate: The usefulness of test informatio". *J. Dairy Sci.* 74 (supplement 1) 242.

Ferlay A., Chabrot J., Elmeddah Y., Doreau M., Ruminal lipid balance and intestinal digestion by dairy cows fed calcium salts of rapeseed oil fatty acids or rapeseed oil, *J. Anim. Sci.* 71 (1993) 2237–2245.

Ferlay A., Chilliard Y., Doreau M., Effects of calcium salts differing in fatty acid composition on duodenal and milk fatty acid profiles in dairy cows, *J. Sci. Food Agric.* 60 (1992) 31–37.

Focant M., Mignolet E., Marique M., Clabots F., Breyne T., Dalemans D., Larondelle Y., The effect of vitamin E supplementation of cow diets containing rapeseed and linseed on the prevention of milk fat oxidation, *J. Dairy Sci.* 81 (1998) 1095–1101.

Fotouhi N., Jenkis T. C. (1992): Ruminal biohydrogenation of linoleyl methionine and calcium linoleate in sheep. *J. Anim. Sci.* 70, 3607-3617.

Fritsche S. & Fritsche J. (1998). *Journal Of The American Oil Chemists Society* 75(10):1449-51.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- Gagliostro G., Chilliard Y., Davicco M.J., Duodenal rapeseed oil infusion in early and midlactation cows. 3. Plasma hormones and mammary apparent uptake of metabolites, *J. Dairy Sci.* 74 (1991) 1893–1903.
- Gaynor P.J., Erdman R.A., Teter B.B., Sampugna J., Capuco A.V., Waldo D.R., Hamosh M., Milk fat yield and composition during abomasal infusion of cis or trans octadecenoates in Holsteincows, *J. Dairy Sci.* 77 (1994) 157–165.
- Gaynor P.J., Waldo D.R., Capuco A.V., Erdman R.A., Douglass L.W., Teter B.B., Milk fat depression, the glucogenic theory and trans- C18:1 fatty acids, *J. Dairy Sci.* 78 (1995) 2008–2015.
- Geay Y., Bauchart D., Hocquette J.F., Culioli J., Effect of ruminant nutrition on dietetic value and sensorial qualities of meat, *Reprod. Nutr. Dev.* (2000) in press.
- Gerson E King (1985)
- Givens D.I., Cottrill B.R., Davies M., Lee P., Mansbridge R., Moss A.R., Sources of n-3 polyunsaturated fatty acids additional to fish oil for livestock diets, A review, *Nutr. Abstr. Rev. Ser. B* 70 (2000) 1–19.
- Godden S.M., Kelton D.F., Lissemore K.D., Walton J.S., Leslie K.E., Lumsden J.H. (2001a): Milk urea testing as a tool to monitor reproductive performance in Ontario dairy herds. *J. Dairy Sci.*, 84 (6), 1397 – 1406.
- Godden S.M., Lissemore K.D., Kelton D.F., Leslie K.E., Walton J.S., Lumsden J.H. (2001b): Relationship between milk urea concentrations and nutritional management, production, and economic variables in Ontario dairy herds. *J. Dairy Sci.*, 84 (5), 1128 – 1139.
- Goodridge J., Ingalls J.R., Transfer of omega-3 linolenic acid from flaxseed to milkfat, *J. Anim. Sci.* 76 (Suppl. 1) (1998) 353.
- Gresti J., Bugaut M., Maniongui C., Bezard J. 1993. Composition of Molecular Species of Triacylglycerols in Bovine Milk Fat. *J. Dairy Sci.* 76:185-1869.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- Griinari J.M., Bauman D.E., Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants, in: Yurawecz M.P., Mossoba M.M., Kramer J.K.G., Pariza M.W., Nelson G.J. (Eds.), *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*, Vol. 1, Champaign, Illinois: AOCS Press, 1999, pp. 180–200.
- Griinari J.M., Dwyer D.A., Mcguire M.A., Bauman D.E., Palmquist D.L., Nurmela K.V.V. (1998): Trans-octadecanoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*,81,1251-1261.
- Griinari M. J.(2001)ù. Development of animal feeding strategies for the production of high CLA milk fat. Page 25 in Proc.1th Int. Conf. On Conjugated> Linoleic Acid, Alesund, Norway.
- Griinari M., Dietary influences on bovine milk fat CLA, in: *CLA What's going on*, Ed. Cerin, Paris, France, No. 4, 2000, p. 2.
- Grummer R.R., Effect of feed on the composition of milk fat, *J. Dairy Sci.* 74 (1991) 3244–3257.
- Gulati S.K., Ashes J.R., Scott T.W., Hydrogenation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids and their incorporation into milk fat, *Anim. Feed Sci. Technol.* 79 (1999) 57–64.
- Gulati S.K., Byers E.B., Byers Y.G., Ashes J.R., Scott T.W., Effect of feeding different fat supplements on the fatty acid composition of goat milk, *Anim. Feed Sci. Technol.* 66 (1997) 159–164.
- Gurr, 1995
- Hagemeister H., Kaufmann W., Remarks on fat metabolism in ruminants, 35th Annual Meeting of the EAAP, Commission on Animal Nutrition Session 1, 1984, 20 p.
- Harfoot C.G., Hazelwod G.P. (1988): Lipid metabolism in the rumen. In: Hobson P.B. (Ed.), *The rumen Microbial Ecosystem*. Elsevier, Amsterdam, pp.285-322

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- Harfoot C.G., Hazlewood G.P., Lipid metabolism in the rumen, in: Hobson P.N., Stewart C.S. (Eds.), *The rumen microbial ecosystem*, Blackie Acad. Prof., London, 1997, pp. 382–426.
- Harfoot C.G., Nobkle R.C., Moore J.H. (1973). Factors influencing the extent of biohydrogenation of linoleic acid by rumen microorganism in vitro. *J. Food Agric.* 24, 961-970.
- Harfoot C.G. (1978). Lipid metabolism in the rumen. *Progr. Lipid Res.* 17, 21-54.
- Hawke J.,C., Silcock R.W. (1969): Lipolysis and hydrogenation in the rumen. *Biochem. J.* 112-131.
- Hawke J.,C., Silcock R.W. (1970): The in vitro rates of lipolysis and hydrogenation in rumen contents. *Biochim. Biophys. Acta* 201-218.
- Hawke, J. C., and M. W. Taylor. 1995. Influence of nutritional factors on the yield, composition and physical properties of milk fat. Pages 37–88 in *Advanced Dairy Chemistry. 2. Lipids.* 2nd ed.
- Hawke, J.C., and Taylor M.W. (1982). Influence of nutritional factor on the yield, composition and Physical properties of milk fat. In: P.F. Fox (Editor), *Developments in Dairy Chemistry. Lipids.* Applied Science, New York, 114-132.
- Heinemann FS., Ozols J. (2003). Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 68 pp. 123-133
- Hurtaud C., Rulquin H., Vérité R., Effects of level and type of energy source (volatile fatty acids or glucose) on milk yield, composition and coagulating properties in dairy cows, *Reprod. Nutr. Dev.* 38 (1998) 315–330.
- Ikwuegbu O.A., Sutton J.D.(1982): the effect of varying the amount of linseed oil supplementation on rumen metabolism in sheep. *Brit. J. Nutr.* 48, 365-375.
- Ip C., Jiang C., Thompson H.J. and Scimeca A.J. (1997). *Carcinogenesis* 18:755-759
- Jahreis G., Fritsche J., Mockel P., Schone F., Moller U., and Steinhart H. (1999). *Nutr. Res.* 19(10):1541– 1549.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Jahreis G., Fritsche J., Steinhart H., Conjugated linoleic acid in milk fat: high variation depending on production system, *Nutr. Res.* 9 (1997) 1479–1484.

Jenkins e Palmquist, 1984

Jenkins T.C. (1993). Lipid metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.* 76,3851-3863.

Jenkins T.C., Bateman H.G., Block S.M., Butylsoyamide increases unsaturation of fatty acids in plasma and milk of lactating dairy cows, *J. Dairy Sci.* 79 (1996) 585–590.

Jenkins T.C., Butylsoyamide protects soybean oil from ruminal biohydrogenation: effects of butylsoyamide on plasma fatty acids and nutrient digestion in sheep, *J. Anim. Sci.* 73 (1995) 818–823.

Jenkins T.C., Fatty acid composition of milk from Holstein cows fed oleamide or canola oil, *J. Dairy Sci.* 81 (1998) 794–800.

Jenkins T.C., Palmquist D.L. (1984): Effect of fatty acids and calcium soaps an rumen and totyal nutrient digestibility of dairy rations. *J. Dairy Sci.* 67, 978-986.

Jensen R.G., Clark R.M., (1988). Page 171 In *Fundamentals Of Dairy Chemistry*.3rd Ed.

Jensen R.G., Ferris A.M., Lammi-Keefe C.J. (1991): Symposium: Milk fat composition, function and potential for change. *J. Dairy Sci.* 74,3228

Jensen R.G., Ferris A.M., Lammi-Keefe C.J., The composition of milk-fat, *J. Dairy Sci.* 74 (1991) 3228–3243.

Jensen R.G., Lipids in human milk, *Lipids* 34 (1999) 1243–1271.

Jensen, R. G. 2002. The Composition of Bovine Milk Lipids: January 1995 to December 2000. *J Dairy Sci* 85: 295-350.

Jensen, R. G., e D. S. Newberg. 1995. Bovine milk lipids. Pages 543–575 in *Handbook of Milk Composition*. R. G. Jensen, ed. Academic Press, San Diego, CA.

Jiang J., Bjoerck L., Fonden R., Emanuelson M., Occurrence of conjugated cis-9, trans-11-octadecadienoic acid in bovine milk: effects of feed and dietary regimen, *J. Dairy Sci.* 79 (1996) 438–445.

Jiang J., Wolk A., Vessby B. (1999). *Am J. Clin. Nutr.* 70: 21.

Dott. Maria Luisa Varricchio

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- Jimenez-Flores, R. 1997. Trends in research for alternate uses of milk fat. *J. Dairy Sci.* 80:2644–2650.
- Jones D.F., Weiss W.P., Palmquist D.L., Jenkins T.C., Dietary fish oil effects on milk fatty acid composition, *J. Anim. Sci.* 76 (Suppl. 1) (1998) 232.
- Jouany J.P., Michalet-Doreau B., Doreau M., Manipulation of the rumen ecosystem to support high-performance beef cattle, *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 13 (2000) 96–114.
- Journet M., Huntington G., Peyraud J.L., Le bilan des produits terminaux de la digestion, in: Jarrige R., Ruckebusch Y., Demarquilly C., Farce M.H., Journet M. (Eds.), *Nutrition des ruminants domestiques*, INRA Editions, Paris, 1995, pp. 671–720.
- Kalscheur K.F., Teter B.B., Piperova L.S., Erdman R.A., Effect of dietary forage concentration and buffer addition on duodenal flow of trans-C18:1 fatty acids and milk fat production in dairy cows, *J. Dairy Sci.* 80 (1997) 2104–2114.
- Kalscheur K.F., Teter B.B., Piperova L.S., Erdman R.A., Effect of fat source on duodenal flow of trans-C18:1, fatty acids and milk fat production in dairy cows, *J. Dairy Sci.* 80 (1997) 2115–2126.
- Kaylegian, K. E., and R. C. Lindsay. 1995. Milk fat usage and modification. Pages 1-18 in *Handbook of Milkfat Fractionation Technology and Application*. Am. Oil Chem. Soc. Press, Champaign, IL
- Keele J.W., Roffler R.E., Beyers K.Z. (1989). Rumen metabolism non lactating cows fed whole cottonseed or extruded soybeans. *J. Anim. Sci.* 67, 1612-1622.
- Keenan, T. W., and S. Patton. 1995. The milk fat globule membrane. Pages 5–49 in *Handbook of Milk Composition*. R. G. Jensen, ed. Academic Press, San Diego, CA.
- Keeney M., Katz L., Allison M.J. (1962). On the probable origin of some milk fat acids in rumen microbial lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 39,198.
- Keeney M., Lipid metabolism in the rumen, in: Phillipson A.T. (Ed.), *Physiology of digestion and metabolism in the ruminant*, Oriel Press, Newcastle Upon Tyne, 1970, pp. 489–503.

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- Kelly M.L., Berry J.R., Dwyer D.A., Griinari J.M., Chouinard P.Y., Van Amburgh M.E., Bauman D.E., Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating dairy cows, *J. Nutr.* 128 (1998) 881–885.
- Kelly M.L., Kolver E.S., Bauman D.E. Van Amburgh M.E. (1998): Effect of intake of pasture on concentrations of conjugated linoleic acid in milk of lactating cows. *J. Dairy Sci.* 81,1630-1636.
- Kemp P., Lander D.J., Hydrogenation in vitro of α -linolenic acid to stearic acid by mixed cultures of pure strains of rumen bacteria, *J. Gen. Microbiol.* 130 (1984) 527–533.
- Kemp P., White W., Lander D.J. (1975). The hydrogenation of unsaturated fatty acids by five bacterial isolates from sheep rumen, including a new species. *J. Gen. Microbiol.* 90,100.
- Kennelly J.J. (1996): The fatty acid composition of milk fat as influenced by feeding oilseeds. *Animal Feed Science Technology*, 60, 137-152.
- Kennelly J.J. Khorasani R.G. (1992): influence of flaxseed feeding on the fatty acid composition of cow's milk. In J.F. Carter (Editor). *Proceedings of the 54th Flax Institute Conference*. North Dakota State University, Fargo, ND, pp.99-105
- Kepler C. R. e Tove S. B. 1967. *Journal of Biological Chemistry*. 242: 5686 - 5692.
- Kepler CR., Tucker WP, Tove SB (1966) *Journal of Biol. Chem.* 241 pp. 1350-1354
- Kepler, C. R., K.P. Hiron, J.J. McNeill, and S.B. Tove.(1966). Intermediates and products of the bihydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem.*, 241,6,1350.
- Khanal RC., Dhiman TR .(2004). *Pakistan Journal of Nutrition* 3 pp. 72-81
- Khorasani G.R., Robinson P., Deboer G., Kennelly J.J.(1991): influence of canola fat on yield, fat percentage, fatty acid profile, and nitrogen fractions in Holstein milk. *J. Dairy Sci.* 74,1904.
- King N. 1955. *Commonwealth Agr. Bureaux-Fahan*.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- Kinsella J., Lokesh B., Stone R.A., Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and amelioration of cardiovascular disease: possible mechanisms, *Am. J. Clin. Nutr.* 52 (1990) 1–28.
- Kinsella J.E., Stearyl CoA as a precursor of oleic acid and glycerolipids in mammary microsomes from lactating bovine: possible regulatory step in milk triglyceride synthesis, *Lipids* 7 (1972) 349–355.
- Klusmeyer T.H., Clarck J.H. (1991): Effects of dietary fat and protein on fatty acid flow to the duodenum and milk produced by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 74, 3005-3067.
- Knudsen J., Grunnet I., Transacylation as a chain-termination mechanism in fatty acid synthesis by mammalian fatty acid synthetase, *Biochem. J.* 202 (1982) 139–143.
- Kowalski Z.M., Pisulewski P.M., Spanghero M., Effects of calcium soaps of rapeseed fatty acids and protected methionine on milk yield and composition in dairy cows, *J. Dairy Res.* 66 (1999) 475–487.
- Kuzdzal-Savoie S., Kuzdzal W., Iltchenko M., Accroissement du taux d'acide linoléique dans le lait de vache, *Lait* 545 (1975) 257–268.
- Lacasse P., Kennelly J.J., Ahnadi C.E., Feeding protected and unprotected fish oil to dairy cows: II Effect on milk fat composition, *J. Anim. Sci.* 76 (1998) (Suppl. 1) 231.
- Lacount D.W., Drackley J.K., Laesch S.O., Clark J.H., Secretion of oleic acid in milk fat in response to abomasal infusions of canola or high oleic sunflower fatty acids, *J. Dairy Sci.* 77 (1994) 1372–1385.
- Lawless F., Murphy J.J., Harrington D., Devery R., Stanton C., Elevation of conjugated cis-9, trans-11-octadecadienoic acid in bovine milk because of dietary supplementation, *J. Dairy Sci.* 81 (1998) 3259–3267.
- Lawless F., Stanton C., L'Escop P., Devery R., Dillon P., Murphy J.J., Influence of breed on bovine milk cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid content, *Livest. Prod. Sci.* 62 (1999) 43–49.
- Lock AL., Garnsworthy PC. (2003) *Livestock Production Science* 769 pp.47-59

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- Loor J.J., Herbein J.H., Exogenous conjugated linoleic acid isomers reduce bovine milk fat concentration and yield by inhibiting de novo fatty acid synthesis, *J. Nutr.* 128 (1998) 2411–2419.
- M.A., Vargiolu S., Corongiu F.P., (1999). *Progress In Nutrition* 1, 3-4: 38-48
- MacGibbon, 1994;
- Mansbridge R.J., Blake J.S., Collins C., The effect of feeding high levels of fish oil and additional vitamin E on intake, milk yield, composition and fatty acid content in high yielding dairy cows, *Proc. Br. Soc. Anim. Sci.* (1998) 221.
- Mansbridge R.J., Blake J.S., Collins C.A., The effect of whole linseed or xylose treated whole linseed on dairy cow performance and level of the fatty acids C18:3, C20:5 and C22:6 in milk fat, in: Agnew R.E., Agnew K.W., Fearon A.M. (Eds.), *Milk Composition*, BSAS Occasional Publication No. 25, British Society of Animal Production, Penicuik, UK, 2000.
- Mansbridge R.J., Blake J.S., Nutritional factors affecting the fatty acid composition of bovine milk, *Br. J. Nutr.* 78 (Suppl. 1) (1997) S37–S47.
- Massart-Leën A.M., Roets E., Verbeke R., Peeters G., Incorporation of [1-14C] myristic acid in milk components by the isolated perfused udder, *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 14 (1974) 459–469.
- Masucci F., Di Francia A., Romano R., Maresca Di Serracapriola M.T., Lambiase G., Varricchio M.L., Proto V. (2006). Effect of *Lupinus albus* as protein supplement on yield, constituents, clotting properties and fatty acid composition in ewes' milk. *Small Rumin Res.* 65: 251 - 259.
- Mattos W., Palmquist D.L., Increased polyunsaturated fatty acid yields in milk of cows fed protected fat, *J. Dairy Sci.* 57 (1974) 1050–1054.
- McDonald I.W., Scott T.W., Foods of ruminant origin with elevated content of polyunsaturated fatty acids, *World Rev. Nutr. Diet.* 26 (1977) 144–207.

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- McGuire M.A., McGuire M.K. (1999): Conjugated linoleic acid (CLA): a ruminant fatty acid with beneficial effects on human health. *J. Dairy Sci.* 77, (suppl. 1) 118-125.
- Mcperson A.V. Kitchen B.J. (1983). *J. Dairy Res.*, 50, 107-115.
- Mir Z., Goonewardene L.A., Okine E., Jaegar S., Scheer H.D., Effect of feeding canola oil on constituents, conjugated linoleic acid (CLA) and long chain fatty acids in goats milk, *Small Ruminant Res.* 33 (1999) 137–143.
- Molkentin J., 2000. Occurrence and biochemical characteristics of natural bioactive substances in bovine milk lipids. *Br. J. Nutr.* 84 (Suppl. 1):47–53.
- Molkentin J., Bioactive lipids naturally occurring in bovine milk, *Nahrung* 43 (1999) 185–189.
- Moore J. H., Noble R. C., Steele W., Czerkawski J. W. (1969). Difference in the metabolism of esterified linoleic acid by rumen microorganism. *Brit. J. Nutr.* 23, 869-878.
- Moore J.H., Christie W.W., Lipid metabolism in the mammary gland of ruminant animals, in: Christie W.W. (Ed.), *Lipid metabolism in ruminant animals*, Pergamon Press, 1981, pp. 227–277.
- Moretti V.M., Maggi G.L., Polidori P., Valfré F. (1993) – Isomeri di acidi grassi insaturi nel latte. *Atti Congresso Nazionale ASPA*, 10, 235-240.
- Murphy J. J., Uden P., Palmquist D.L., Wiktorsson H. (1987): Rumen and total diet digestibilities in lactating cows fed diets containing full fat rapeseed. *J. Dairy Sci* 84, 2751-2759.
- Ney D.M., Potential for enhancing the nutrition properties of milk fat, *J. Dairy Sci.* 74 (1991) 4002–4012.
- Noble R.C., Moore J.H., Harfoot C.G., Observations on the pattern on biohydrogenation of esterified and unesterified linoleic acid in the rumen, *Br. J. Nutr.* 31 (1974) 99–108.
- Nozière P., Martin C., Rémond D., Kristensen N.B., Bernard R., Doreau M., Effect of composition of ruminally infused short-chain fatty acids on net fluxes of nutrients across portaldrained viscera in underfed ewes, *Br. J. Nutr.* 83 (2000) in press.

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Ntambi J.M., Miyazaki M. (2004). Progress in Lipid Research 43 pp. 91-104

O' Donnel J. A. (1989): Milk fat technologies and markets: a summary of the Wisconsin Milk Marketing Board 1988 Milk Fat Roundtable, J. Dairy Sci. 72, 3109.

O'Donnell J.A. 1993. Future of milk fat modification by production or processing: integration of nutrition, food science, and animal science, J. Dairy Sci. 76: 1797 – 1801.

Offer N.W., Marsden M., Dixon J., Speake B.K., Thacker F.E., Effect of dietary fat supplements on levels of n-3 poly-unsaturated fatty acids, trans acids and conjugated linoleic acid in bovine milk, Anim. Sci. 69 (1999) 613–625.

Onetti S. G., Shaver R. D., McGuire M.A., Grummer R.R. (2001): Effect of type and level of dietary fat on rumen fermentation and performance of dairy cows fed corn silage-based diets. J. Dairy Sci. 84, 2751-2759.

Osservatorio Latte-Ismea; Il Rapporto Del Latte 2003.

Ottou J.F., Doreau M., Chilliard Y., Duodenal infusion of rapeseed oil in midlactation cows. 6. Interaction with niacin on dairy performance and nutritional balance, J. Dairy Sci. 78 (1995) 1345–1352.

P. F. Fox, ed. Chapman and Hall, New York, NY. Walstra, P. 1995. Physical chemistry of milk fat globules. Pages 131–178 in Advanced Dairy Chemistry. 2. Lipids. 2nd ed. P. F. Fox, ed. Chapman and Hall, New York, NY.

Palmquist D.L., Beaulieu A.D., Barbano D.M. 1993. Feed and animal factors influencing milk fat composition, J. Dairy Sci. 76: 1753 – 1771.

Palmquist D.L., Conrad H.R. (1978). J. Dairy Sci. 61, 890-901.

Palmquist D.L., Davis C.L., Brown R.E., Sachan D.S.(1969) Availability and metabolism of various substrates in ruminants. V. Entry rate into the body and incorporation into milk fat of D (-) – hydroxybutyrate. J. Dairy Sci. 61, 1-14.

Palmquist D.L., Jenkins T.C., Fat in lactation rations for dairy: a review, J. Dairy Sci. 63 (1980) 1–14.

Dott. Maria Luisa Varricchio

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

Palmquist D.L., The role of dietary fats in efficiency of ruminants, *J. Nutr.* 124 (1994) 1377S–1382S.

Pariza M., Park Y., Cook M.E., (1999). *P.S.E.B.M.*, 223, 8-13.

Pariza M.W., Park Y., Cook M.E. (2001). *Prog. Lipid Res.* 40: 283.

Parodi P.W. (1983): Position distribution of fatty acids in triglycerides from prepartum mammary gland secretion and early postpartum milk. *J. Dairy Sci.*, 66, 912.

Parodi P.W., Conjugated linoleic acid and other anticarcinogenic agents of bovine milk fat, *J. Dairy Sci.* 82 (1999) 1339–1349.

Parody P.W. (2003). In Sébédio L., Christie W.W., Adlof R.O. ed. Vol II, pp. 101-122, AOCS press, Champaign, IL.

Piva G., Masoero F., Prandini A., Fusconi G. (1989). *Scienze E Tecnologie Lattiero Casearia*, 40, 253-275.

Polidori F., Sgoifo Rossi C.A., Senatore E.M., Savoini G., Dell'Orto V., 1997. Effect of recombinant bovine somatotropin and calcium salts of long-chain fatty acids on milk from Italian buffalo. *J. Dairy Sci.* 80: 2137-2142.

Precht D., Molckentin J., Effect of feeding on conjugated cis-9, trans-11 octadecadienoic acid and other isomers of linoleic acid in bovine milk fats, *Nahrung* 41 (1997) 330–335.

Precht, D. 1991. Detection of adulterated milk fat by fatty acid and triglyceride analysis. *Fat Sci. Technol.* 93:538–544.

Proto V. 1995. Guida all'alimentazione dei ruminanti da latte. Istituto Nazionale di Economia Agraria (I.N.E.A.), Roma. Quaderni metodologici INEA, Collana Zootecnia n.9.

R.D 9/5/29 N° 994

Rémond B., Journet M., Alimentation des vaches laitières avec des rations à forte proportion d'aliments concentrés. I. – Quantités ingérées et production laitière, *Ann. Zootech.* 20 (1971) 169–184.

Dott. Maria Luisa Varricchio

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- Renaud J. 1996. Buffalo milk products in the Mediterranean area. EAAP Publication. 82:45 – 57.
- Romano R., Lambiase G., Scalzone E. 2003. Analisi quali – quantitativa della variabilità del grasso del latte di bufala. Tesi sperimentale. Facoltà di Agraria, Università degli Studi di Napoli Federico II.
- Romo G.A., Casper D.P., Erdman R.A., Teter B.B., Abomasal infusion of cis or trans fatty acid isomers and energy metabolism of lactating dairy cows, J. Dairy Sci. 79 (1996) 2005–2015.
- Salvadori Del Prato O. 1998. Trattato di tecnologia casearia. Edagricole.
- Samah S. M. Allam 2003. La rivista delle Sostanze Grasse, Vol. LXXX Marzo/Aprile.
- Santora J.E., Palmquist D.L., Roehrig K.L., Trans-vaccenic acid is desaturated to conjugated linoleic acid in mice, J. Nutr. 130 (2000) 208–215.
- Sauer F.D., Fellner V., Kinsman R., Kramer J.K.G., Jackson H.A., Lee A.J., Chen S., Methane output and lactation response in Holstein cattle with monensin or unsaturated fat added to the diet, J. Anim. Sci. 76 (1998) 906–914.
- Sauvant D., Fehr P.M., Rodolphe F., Tomassone R., Delage J., Étude des interrelations entre les critères de production et de composition lipidique du lait de chèvre par deux méthodes d'analyse factorielle, Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys. 13 (1973) 107–129.
- Schingoethe D.J., Stewart G.D., Ludens F.C., Dried whey-fat blend product as a feed for lactating dairy cows, J. Dairy Sci. 66 (1983) 2515–2520.
- Sciancalepore, 1998. Industrie agrarie;
- Scollan N.D., Fisher W.J., Davies D.W.R., Fisher A.V., Enser M., Wood J.D., Manipulating the fatty acid composition of muscle in beef cattle, Proc. Br. Soc. Anim. Sci. (1997) 20.
- Secchiari P., Serra A., Mele M. (2005). Il latte in Alimenti e Salute. A cura di Cocchi M. e Mordenti A. CLUEB, Bologna 347-398.
- Sehat N., Yurawecz M.P., Roach J.A.G., Mossoba M.M., Kramer J.K.G, Ku K. (1998). Lipids, 33, 217-221.

Dott. Maria Luisa Varricchio

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- Selner D.R., Schultz L.H., Effects of feeding oleic acid or hydrogenated vegetable oils to lactating cows, *J. Dairy Sci.* 63 (1980) 1235–1241.
- Sessler A.M., Ntambi J.M., Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression, *J. Nutr.* 128 (1998) 923–926.
- Stanton C., Lawless F., Kjellmer G., Harrington D., Devery R., Connolly J.F., Murphy J., Dietary influences on bovine milk cis-9, trans-11- conjugated linoleic acid content, *J. Food Sci.* 62 (1997) 1083–1086.
- Steele W., Noble R.C., Moore J.H., The effects of 2 methods of incorporating soybean oil into the diet on milk yield and composition in the cow, *J. Dairy Sci.* 38 (1971) 43–48.
- Stegeman G.A., Baer R.J., Bath D.L., Dunkley W. L., Franke A.A. (1981): Composition and flavor of milk and butter from cows fed unsaturated dietary fat and receiving somatotropin. *J. Dairy Sci.*, 75, 962-970.
- Stenberg B.H., Patton S. 1981. *J. Dairy Sci.*, 64, 422-429.
- Storry J.E., Brumby P.E., Dunkley W.L., Influence of nutritional factors on the yield and content of milk fat: protected non-polyunsaturated fat in the diet, *Int. Dairy Fed. Bull.* 125 (1980) 105–125.
- Sutton J.D. (1989). *J. Dairy Sci.* 72, 2801-2820.
- Terramoccia S., Bartocci S., Tripaldi C., Danese V. 2001. Difficoltà alla coagulazione del latte di bufala: caratteristiche chimico – fisiche e sanitarie. Atti I Congresso Nazionale sull'Allevamento del Bufalo. Eboli (SA), 3 – 5 ottobre 2001. p 256 - 259.
- Tesfa A.T., Tuori M., Syrjälä-Qvist L., High rapeseed oil feeding to lactating cows and its effects on milk yield and composition, *Finn. J. Dairy Sci.* 49 (1991) 65–81.
- the goat during normal or hormonally-induced lactation, *Reprod. Nutr. Dev.* 26: 607–615.
- Thompson G.E., Christie W.W., Extraction of plasma triacylglycerols by the mammary gland of the lactating cow, *J. Dairy Res.* 58 (1991) 251–255.
- Timmen H., Patton S. (1983). *Lipids*, 23, 685-699.

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- Timmen H., Patton S.(1988): Milk fat globules fatty acid composition, size and vivo regulation of fat liquidity. *Lipids*, 23, 7, 685-699.
- Tocher D.R., Leaver M.J., Hodgson P.A., Recent advances in the biochemistry and molecular biology of fatty acyl desaturases, *Prog. Lipid. Res.* 37 (1998) 73–117.
- Tripaldi C., Catillo G., Martillotti F. And Angeluci M. (1997). *Buffalo J.* 1, 1-13.
- Troisi R., Willet Wc & Weiss St (1992). *Am. J. Clinique Nutrition*, 56, 1019-1024.
- Van Nevel C.J., Demeyer D.I., Influence of pH on lipolysis and biohydrogenation of soybean oil by rumen contents in vitro, *Reprod. Nutr. Dev.* 36 (1996) 53–63.
- Vérité R., Journet M., Utilisation de quantités élevées de betteraves par les vaches laitières : étude de l'ingestion, de la digestion et des effets sur la production, *Ann. Zootech.* 22 (1973) 219–235.
- Viviani R. (1970). Metabolism of long chain fatty acids in the rumen. *Adv. Lipid Res.*, 8, 267-346.
- W., Clapperton J. L. 1982. Structures of the triglycerides of cow's milk, fortified milks (including infant formulae), and human milk. *J- Soc. Dairy Technol.*, 35, 22.
- Wagner K., Flachowsky G., Lebzien P., Aulrich K., Transfer of duodenally infused unsaturated fatty acids into milk fat of dairy cows, *S. Afr. J. Anim. Sci.* 29 (1999) 258–259.
- Walstra, P., T. von Vliet, and W. Klock. 1995, Crystallization and rheological properties of milk fat spreads. Pages 179–212 in *Advanced Dairy Chemistry. 2. Lipids.* 2nd ed., P. F. Fox, ed. Chapman and Hall, New York, NY.
- Ward R.J., Travers M.T., Richards S.E., Vernon R.G., Salter A.M., Buttery P.J., Barber M.C., Stearoyl-CoA desaturase mRNA is transcribed from a single gene in the ovine genome, *Biochem. Biophys. Acta* 1391 (1998) 145–156.
- White B. G., Ingalls J. R., Sharma H.R., Mckirdy J.A.(1987). The effect of whole sunflower seeds on the flow of fat and fatty acid through the gastrointestinal tract of cannuled holstein steers. *Canad. J., Anim. Sci.* 67, 447-459.

Dott. Maria Luisa Varricchio

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

- White S.L., Bertrand J.A., Wade M.R., Washburn S.P., Green J.T., Jenkins T.C. (2001).
Journal Of Dairy Sci. 84, 2295-2301.
- Willett W.C., Stampfer M.J., Manson J.E., Colditz G.A., Speizer F.E., Rosner B.A., Sampson L.A., Hennekens C.H., Intake of trans fatty acids and risk of coronary heart disease among women, Lancet 341 (1993) 581–585.
- Wolff R.L., Content and distribution of trans- 18:1 acids in ruminant milk and meat fats. Their importance in European diets and their effect on human milk, JAOCS 72 (1995) 259–272.
- Wonsil B.J., Herbein J.H., Watkins B.A., Dietary and ruminally derived trans-18:1 fatty acids alter bovine milk lipids, J. Nutr. 124 (1994) 556–565.
- Wood J.D., Enser M., Fisher A.V., Nute G.R. Richardson R.I., Sheard P.R., Manipulating meat quality and composition, Proc. Nutr. Soc. 58 (1999) 363–370.
- Wu Z., Huber J.T., Chan S.C., Simas J.M., Chen K.H., Varela J.G., Santos F., Fontes C. Jr., Yu P., Effect of source and amount of supplemental fat on lactation and digestion in cows, J. Dairy Sci. 77 (1994) 1644–1651.
- Wu Z., Ohajulukaka O. A., Palmquist D. L.(1991). Ruminant biohydrogenation and digestibility of fatty acid by dairy cows. J. Dairy Sci. 74, 3025-30334.
- Wu Z., Palmquist D. L., (1991). Biohydrogenation and biohydrogenation by ruminal microorganism in vitro. J. Dairy Sci.74, 3035-3046.
- Yang A., Larsen T.W., Smith S.B., Tume R.K., Delta-9 desaturase activity in bovine subcutaneous adipose tissue of different fatty acid composition, Lipids 34 (1999) 971–978.
- Yurawecz M.P., Roach J.A.G., Sehat N., Mossoba M.M., Kramer J.K.G., Fritsche J., Steinhart H., Ku Y., A new conjugated linoleic acid isomer, 7 trans, 9 cis-octadecadienoic acid, in cow milk, cheese, beef and human milk and adipose tissue, Lipids 33 (1998) 803–809.
- Zicarelli L. 2001. Atti I Congresso Nazionale sull'Allevamento del Bufalo. Eboli (SA). 1 - 19.

Dott. Maria Luisa Varricchio

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

INDICE

1.	LO SVEZZAMENTO	4
1.1.	PREMESSA	4
1.2.	SVILUPPO ANATOMICO DELL'APPARATO DIGERENTE	5
1.3.	CENNI DI FISIOLOGIA DIGESTIVA	9
1.3.1.	SVILUPPO DELLE FUNZIONI DIGESTIVE	9
1.4.	ASPETTI SANITARI DELL'ALLEVAMENTO DEL VITELLO	17
1.4.1.	CAUSE INFETTIVE	19
1.4.2.	CAUSE NON INFETTIVE	20
1.4.3.	IL COLOSTRO	21
2.	RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	26
3.	PROBIOTICI	34
3.1.	MECCANISMO DI AZIONE DEI PROBIOTICI	42
3.1.1.	CAPACITÀ DI ADESIONE ALLA MUCOSA INTESTINALE	43
3.1.2.	ADESIONE ED ESCLUSIONE COMPETITIVA	45
3.2.	IMPIEGO DEI PROBIOTICI IN CAMPO UMANO	49
3.3.	USO DEI PROBIOTICI IN CAMPO ZOOTECNICO	53
3.3.1.	APPLICAZIONE DEI PROBIOTICI NEL VITELLO	60
4.	MICROORGANISMI SPERIMENTATI	62
4.1.	ENTEROCOCCUS FAECIUM	62
4.2.	SACCHAROMYCES CEREVISIAE	67
4.3.	ASPERGILLUS ORYZAE	73
5.	SCOPO DELL'INDAGINE	79
6.	UTILIZZO DELL'ENTEROCOCCUS FAECIUM (SF 68 – NCIMB 10415)	80
6.1.	ESAME DELLA LETTERATURA	80
6.2.	MATERIALI E METODI	83
6.2.1.	DIETE E ANIMALI	83
6.2.2.	MISURE SPERIMENTALI	84

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

6.2.3.	<i>PROVE DI DIGERIBILITÀ</i>	85
6.2.4.	<i>DETERMINAZIONI ANALITICHE</i>	86
6.2.5.	<i>ELABORAZIONE STATISTICA</i>	86
6.3.	<i>RISULTATI</i>	88
6.3.1.	<i>MORTALITÀ E MORBILITÀ</i>	88
6.3.2.	<i>FAECAL SCORE</i>	88
6.3.3.	<i>INGESTIONE DI SOSTANZA SECCA</i>	88
6.3.4.	<i>INCREMENTI PONDERALI</i>	89
6.3.5.	<i>DIGERIBILITÀ IN VIVO</i>	89
6.4.	<i>DISCUSSIONE</i>	91
6.5.	<i>CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE</i>	96
7.	UTILIZZO DELL'ESTRATTO SECCO DI ASPERGILLUS ORYZAE E DI SACCHAROMYCES CEREVISIAE 105	
7.1.	<i>ESAME DELLA LETTERATURA</i>	105
7.2.	<i>MATERIALI E METODI</i>	108
7.2.1.	<i>DIETE E ANIMALI</i>	108
7.2.2.	<i>MISURE SPERIMENTALI</i>	109
7.2.3.	<i>PROVE DI DIGERIBILITÀ</i>	110
7.2.4.	<i>DETERMINAZIONI ANALITICHE</i>	110
7.2.5.	<i>ELABORAZIONI STATISTICHE</i>	111
7.3.	<i>RISULTATI</i>	113
7.3.1.	<i>FAECAL SCORE</i>	113
7.3.2.	<i>INGESTIONE DI ALIMENTO</i>	114
7.3.3.	<i>INCREMENTI PONDERALI</i>	114
7.3.4.	<i>DIGERIBILITÀ IN VIVO</i>	115
7.4.	<i>DISCUSSIONE</i>	116
7.5.	<i>CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE</i>	120
8.	CONCLUSIONI	121
9.	RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	131
	COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE	159

Dott. Maria Luisa Varricchio

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA
- COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE

1. INTRODUZIONE.....	160
1.1. IL LATTE DI BUFALA	160
1.2. LA FRAZIONE LIPIDICA DEL LATTE DI BUFALA	163
1.2.1. I TRIGLICERIDI (TG)	165
1.2.2. GLI ACIDI GRASSI (AG).....	166
1.3. ORIGINE DEGLI ACIDI GRASSI NEL LATTE	170
1.3.1. BIOSINTESI DEI CLA NEI RUMINANTI	172
1.3.2. METABOLISMO MICROBICO DEI LIPIDI NEL RUMINE	173
1.3.3. LIPOLISI	175
1.3.4. BIOIDROGENAZIONE	175
1.3.5. SINTESI MICROBICA DEGLI ACIDI GRASSI	176
1.3.6. EFFETTO DEI LIPIDI SULLE FERMENTAZIONI RUMINALI	178
1.3.7. IL PROFILO ACIDICO IDEALE DEL GRASSO DEL LATTE.....	179
2. IL CONTENUTO LIPIDICO DEGLI ALIMENTI PER IL BESTIAME	181
3. ESAME DELLA LETTERATURA.....	183
4. SCOPO DELL'INDAGINE	189
5. MATERIALI E METODI.....	192
5.1. ANALISI CHIMICHE	192
5.1.1. DETERMINAZIONE DEGLI ACIDI GRASSI	192
5.1.2. ANALISI DEI TRIGLICERIDI.....	194
5.1.3. ELABORAZIONE STATISTICA	194
6. RISULTATI E DISCUSSIONE	195
6.1. CARATTERISTICHE DEL PROFILO ACIDICO DEL GRASSO DEL LATTE DI BUFALA.....	196
6.2. VARIAZIONE DELLA COMPOSIZIONE ACIDICA NEL CORSO DELL'ANNO.....	204
6.3. VARIAZIONE DELLA COMPOSIZIONE ACIDICA NELLE QUATTRO AZIENDE	206
7. CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE	211
8. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....	256

L'ALIMENTAZIONE DELLA SPECIE BUFALINA

- **UTILIZZO DI INTEGRATORI MICROBICI DURANTE LA FASE DI ALIMENTAZIONE LATTEA**
- **COMPOSIZIONE ACIDICA DEL GRASSO DEL LATTE**