

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "Federico II"

Dottorato di Ricerca in
Scienze dell'Alimentazione e della Nutrizione
XXV Ciclo

**Impiego di foraggi e fonti proteiche alternative
nell'allevamento bufalino:
influenza sulle caratteristiche dietetico-nutrizionali del
latte e della carne**

Tutor

Chiar.mo Prof.
Federico Infascelli

Candidata

Dott.ssa
Micaela Grossi

Coordinatore

Chiar.mo Prof.
Franco Contaldo

Aprile 2013

INDICE

Introduzione generale.....	3
<i>L'evoluzione dell'allevamento bufalino in Italia.....</i>	<i>9</i>
<i>Problematiche inerenti l'alimentazione.....</i>	<i>14</i>
Scopo della tesi.....	17
1° Contributo sperimentale.....	27
<i>Sostituzione dell'insilato di mais con insilato di orzo nella dieta di bufale in lattazione: effetti sulla produzione quanti-qualitativa di latte</i>	
Introduzione.....	28
Materiale e Metodi prova in vitro n. 1.....	33
Risultati prova in vitro n. 1.....	40
Materiale e Metodi prova in vitro n. 2.....	51
Risultati prova in vitro n. 2.....	56
Materiale e Metodi prova in vivo	67
Risultati prova in vivo.....	72
Conclusioni.....	79
2° Contributo sperimentale.....	80
<i>Impiego della fava in alternativa alla soia nella dieta di vitelloni bufalini in accrescimento: effetti sulla qualità della carne</i>	
Introduzione.....	81
Materiale Metodi prova in vitro.....	97
Risultati prova in vitro.....	101
Materiale Metodi prova in vivo.....	110
Risultati prova in vivo.....	126
Conclusioni.....	141
Bibliografia.....	145

INTRODUZIONE

La popolazione bufalina mondiale ammonta, secondo le più recenti stime, a circa 190 milioni di capi presenti in larghissima parte in Asia (96.4%, concentrati soprattutto in India, Cina e Pakistan); il 2.9% è presente in Africa (particolarmente in Egitto) e il resto in Europa (Italia, Romania, Georgia, Bulgaria e Turchia) e America Latina (Brasile, Venezuela, Colombia e Argentina). Negli ultimi 10 anni, il numero di capi è aumentato di 20 milioni con un tasso di crescita pari al 12.5% (FAO, 2010). In tabella 1 viene riportato il numero di capi bufalini stimati dalla FAO nei diversi Paesi, nonché di quelli in cui è certa la presenza di tale specie animale anche se non esiste ancora un data base della FAO. Ai fini zootecnici la specie bufalina viene oggi considerata a duplice attitudine, sebbene la produzione del latte rivesta carattere sicuramente prevalente rispetto a quella della carne. Per la sua forza, rusticità e resistenza alla fatica, in alcuni ambienti ad agricoltura meno avanzata, viene ancora impiegata anche quale animale da lavoro (traino di carri per trasporto di derrate, lavori nelle risaie, ecc.). Nel 2008, la specie bufalina ha prodotto nel

mondo 89.2 milioni di tonnellate di latte e 3.5 milioni di tonnellate di carne, con un incremento negli ultimi dieci anni, rispettivamente del 43.47% e del 16.32% (Tabella 2).

Il "Water buffalo" prende le sue origini dal bufalo asiatico che filogeneticamente viene differenziato da quello africano (*Syncerus caffer*). Il bufalo asiatico comprendeva in origine tre diverse specie selvatiche: l'Anoa di Sulawesi, il Tamarao di Mindoro e l'Arni o bufalo selvatico indiano. Intorno al 2000 a.c. iniziò l'addomesticamento dell'Arni (*Bubalus arnee*) che attraverso i secoli ha dato origine al "Water buffalo" (*Bubalus bubalis*). Nell'ambito di quest'ultimo, Macgregor (1939) riconosce due gruppi con diverso numero di cromosomi: 48 per lo "swamp", presente nei Paesi del sud-est asiatico (peso vivo dei soggetti adulti: 350 e 650 kg nelle femmine e nei maschi, rispettivamente) e 50 per il "river", di maggiori dimensioni (peso vivo dei soggetti adulti: 500 kg nelle femmine e 1000 kg nei maschi), allevato in India e nei paesi occidentali. Le diverse condizioni di allevamento (ispirato a criteri sempre più razionali per il river, tendenzialmente arcaici per lo swamp) hanno contribuito alle differenze in termini produttivi tra i due gruppi: la bufala river oggi, mediamente, raggiunge dai 2000 ai 3000 kg per

lattazione; la swamp, invece, si attesta su quantità molto più basse (da 200 a 900 kg per lattazione). Diversa risulta anche la capacità di utilizzazione degli alimenti per l'accrescimento; come riportato da Moran (1986), infatti, a parità di razione alimentare, l'incremento di peso dei giovani soggetti swamp non supera i 700 grammi/die, laddove in quelli river è possibile andare oltre i 900 grammi/die..

Tabella 1. Distribuzione della popolazione bufalina nel mondo al 2008.

Paese	n. capi	Paese	n. capi
Afghanistan	-	Malaysia	131.000
Albania	120	Mauritius	25
Argentina	-	Mexico	-
Islamic Rep Iran	630.000	Micronesia	140
Australia	-	Myanmar	2.923.568
Austria	-	Nepal	4.496.507
Azerbaijan	298.975	New Zealand	-
Bangladesh	1.260.000	Nigeria	-
Bhutan	2.000	Pakistan	29.000.000
Bosnia Erzegovina	13.000	Paraguay	-
Brazil	1.146.798	Philippines	3.338.570
Brunei	4.580	Portugal	-
Bulgaria	8.968	Republic of Korea	-
Cambodia	746.207	Romania	-
Canada	-	Russian Federation	14.363
China	23.271.909	Saudi Arabia	-
Colombia	-	South Africa	-
Korea	-	Rep.Macedonia	640
Egypt	4.052.649	Suriname	1.000
France	-	Syrian Arab Republic	6.000
Georgia	17.200	Tajikistan	15.000
Germany	-	Thailand	1.699.469
Greece	1.643	Sri Lanka	318.530
Guam	70	Timor-Leste	102.216
Hungary	-	Trinidad and Tobago	5.700
India	105.127.000	Tunisia	-
Indonesia	1.930.716	Turkey	84.705
Armenia	497	Ukraine	-

Iraq	285.537	United Arab Emirates	-
Israel	-	United Kingdom	-
Italy	294.000	USA	-
Japan	-	Uruguay	-
Lao People's Democratic Republic	1.155.000	Venezuela (Bolivarian Republic of)	-
Kazakhstan	10.000	Viet Nam	2.897.700
Jordan	100	TOTALE	185.292.102

Fonte: FAOSTAT, FAO Statistics division (2010).

Tabella 2. Numero di bufali (N) al mattatoio e percentuale di incremento annuo (PI) per continente (milioni).

		1961/1970	1971/1980	1981/1990	1991/2000	2001/2009
Asia	N	7.167/ 8.885	9.140/ 11.007	11.338/ 15.040	15.506/ 18.897	19.42 1/ 22.41 4
	PI, %	23.97	20.42	32.65	21.86%	15.41
AFRICA (only Egypt)	N	496/ 695	731/ 934	956/ 1.215	1.250/ 1.640	1.073 / 1.550
	PI, %	40.12	27.77	27.09	31.2	44.45
Europe	N	80/ 45	0.041/ 29	25/ 10	11/ 9	6/ 11
	PI, %	-43.75	-29.26	-60	-18.18	83.33
World	N	7.744/ 9.626	9.912/ 11.971	12.32/ 16.265	16.767/ 20.547	20.50 1/ 23.97 6
	PI, %	24.30	20.77	32.02	22.54	16.95
Meat	tons	1.071/ 1.313	1.341/ 1.605	1.680/ 2.266	2.336/ 2.834	2.792 / 3.307
	PI, %	22.59	19.68	34.88	21.31	18.44

Fonte: FAOSTAT, FAO Statistics division (2010).

L'evoluzione dell'allevamento bufalino in Italia

La specie bufalina si caratterizza per una spiccata capacità di adattamento all'ambiente. La elevata resistenza agli ecto e agli endoparassiti, nonché la capacità di migliorare l'efficienza di utilizzazione degli alimenti in condizioni di carenza foraggiera hanno fatto sì che in passato, grazie all'allevamento di questa specie animale, si potesse creare una economia in territori paludosi, caratterizzati da produzioni foraggere grossolane e in cui predominava la malaria, dove ogni altro tipo di allevamento e/o attività agricola risultava impossibile.

Fino al secolo scorso, le paludi hanno caratterizzato le principali zone di allevamento bufalino in Campania, nel Lazio e nella Capitanata di Foggia, aree nelle quali il bufalo era impiegato anche come mezzo di trasporto in quanto esso, soprattutto nei periodi più piovosi, era l'unico animale in grado di percorrere e trainare carri in terreni paludosi (Zicarelli e Campanile, 2001). La capacità di sviluppare una così forte forza motrice in terreni pesanti faceva sì che i bufali venissero impiegati anche per trainare a secco le reti da pesca lungo il Sele, il Volturno ed il Garigliano, nonché per dragare i letti dei "regi laghi" e per rimuovere il materiale alluvionale.

I bufali venivano utilizzati altresì per il traino a guado dei fiumi e per lo spurgo periodico di canali e fossi, perché nuotando a frotte, se le acque erano alte, oppure camminando sul fondo, riuscivano ad avviluppare agli arti la vegetazione acquatica estirpandola; inoltre, smuovendo la fanghiglia, la rendevano più facilmente asportabile dall'acqua. In merito Maymone (1937) riporta quanto segue:

“Tipico è stato questo impiego dei bufali nelle paludi Pontine prima che la Bonifica avesse trasformata la secolare palude magna in centri abitati ed in una fitta rete di strade e di poderi, dove fino a pochi anni fa, 1930, circa 200 bufali suddivisi in gruppi di una cinquantina di capi ciascuno, provvedevano allo spurgo di una rete di circa 130 km di canali, alcuni dei quali navigabili”.

D'altro canto, la creazione da parte dei Borboni di un caseificio sperimentale nella tenuta reale di Carditello, in provincia di Caserta, dimostra come i governanti dell'epoca apprezzassero questo tipo di allevamento e i prodotti che ne derivavano (Zicarelli, 2001). L'esistenza in epoca borbonica di una realtà produttiva e di un commercio di latte e prodotti caseari bufalini tali da indurre sia ricerca di tecniche di miglioramento sia provvedimenti di tutela, dimostra

quanto il Regno delle Due Sicilie non fosse affatto arretrato in tema di politica agricola e di sviluppo.

Ponendo a confronto le condizioni dell'allevamento riportate nel breve excursus storico descritto con l'attuale indirizzo produttivo di una azienda bufalina, è possibile evincere la versatilità e le potenzialità di questa specie animale che si è saputa egregiamente adattare alle esigenze del mercato. Oggi, infatti, l'attività principale dell'allevamento bufalino è rappresentato dalla produzione del latte da destinare alla trasformazione casearia, essendo ormai totalmente superato l'impiego del bufalo come animale da lavoro, alla luce del progresso nella meccanizzazione agricola. Ciò si è verificato soprattutto grazie alla lungimiranza degli allevatori bufalini, i quali hanno continuato a credere nelle potenzialità di questo animale e non hanno intrapreso l'allevamento di altre specie, pur contro tutte le aspettative di molti analisti del passato i quali ne paventavano una drastica diminuzione dopo la bonifica dei territori paludosi.

Al contrario, il patrimonio bufalino nei decenni successivi alle bonifiche si è talmente incrementato che, con i suoi 370 mila capi, l'Italia rappresenta il Paese che alleva più bufale in Europa.

Stime non ufficiali, infatti, riportano che agli inizi del 900 il numero di capi bufalini si aggirava tra i 20.000 e i 15.000 capi circa, per ridursi a 12. 000 nel secondo dopoguerra, decimati dai tedeschi in ritirata dopo lo sbarco a Salerno.

La trasformazione della nostra civiltà da agricola, con elevato tasso di auto approvvigionamento ed auto consumo, ad industriale, consumatrice e non più produttrice di beni alimentari avvenuta negli anni della ripresa economica e del grande esodo delle popolazioni rurali verso una occupazione stabile nella nascente industria, fece considerare, a quell'epoca, la bufala come un futuro animale a rischio di estinzione, in quanto non sussistevano più le condizioni ambientali tali da giustificare la razionalità economica dell'allevamento del bufalo.

Per garantire l'approvvigionamento alimentare ed il soddisfacimento della domanda alimentare si dovettero adottare politiche di sovvenzione e finanziamento di una agricoltura intensiva a basso impiego di mano d'opera (diventata sempre più di difficile reperimento), che potesse anche garantire la competitività sui nostri mercati. Si mirava quindi ad una industrializzazione dell'agricoltura, fenomeno già avvenuto negli altri Paesi Europei nei confronti dei

quali, per la nascente Unione Europea, non si poteva intraprendere alcun tipo di politica protezionistica nell'ambito della PAC.

Mentre nel resto d'Italia, al fine di garantirsi una minima competitività dei propri prodotti, taluni allevatori hanno introdotto razze più produttive a discapito della qualità e distruggendo un patrimonio zootecnico di inestimabile valore, nel comparto bufalino tale fenomeno non è avvenuto. In pochi decenni il bufalo da animale da impiegare per l'utilizzazione dei territori marginali si è trasformato in un animale ad elevata produzione specialistica; tale trasformazione è avvenuta in un lasso generazionale molto breve se confrontato all'evoluzione di altre realtà zootecniche italiane. Con ciò possiamo affermare con certezza che si tratta di una specie dalle elevate potenzialità produttive e dotata, inoltre, di grande versatilità e diversificazione. Se da una parte i nostri allevatori sono stati lungimiranti nel continuare ad allevare il bufalo dall'altra parte sono stati molto miopi nel settorializzarsi nella sola produzione di latte, anche se si tratta di una produzione molto redditizia. La valorizzazione della carne può essere vista come una valida alternativa alla sola produzione di latte per la caseificazione. Utilizzando maschi e manze non idonei alla riproduzione ed alla rimonta si crea, con la

produzione della carne, una attività in grado di garantire un reddito aggiuntivo di volume non trascurabile.

Problematiche inerenti l'alimentazione

Negli ultimi anni, la crescente domanda dei consumatori nei riguardi dei prodotti dell'allevamento bufalino ha comportato l'adozione, anche in questo comparto zootecnico, di piani alimentari di tipo intensivo in grado di garantire elevate produzioni. Allo scopo, notevole risulta l'impiego dell'insilato di mais e della soia.

Il mais, raccolto a maturazione cerosa della granella è la foraggera capace di fornire l'unità nutritiva al più basso costo (12.000 - 14.000 unità foraggere per ettaro). Dal punto di vista dell'impatto ambientale delle attività agro-zootecniche, tuttavia, va considerato che il mais consuma elevate quantità di acqua: per una produzione di 100 q/ha di granella si considera mediamente un consumo di 500 m³ d'acqua (Piccioni *et al.*, 1989).

Altro non trascurabile problema è rappresentato dal fatto che, in caso di riduzione idrica associata ad una concimazione inadeguata, oppure per alte temperature ambientali o ancora per danni di ordine

fitosanitario (*Diarborica virgifera virgifera* e *Ostrinia nubilalis*), la pianta del mais subisce fenomeni di stress con conseguente vulnerabilità alle infestazioni parassitarie (*Aspergillus flavus* e *parasiticus*) e possibile sviluppo di aflatossine e fumonisine (Colombo *et al.*, 2007).

L'aflatossina B1, presente in maggiore quantità, ha un'elevata tossicità acuta e cronica, sia per l'animale che per l'uomo. La contaminazione del mais da parte di questi parassiti ha inizio nel campo e si mantiene durante le fasi di coltivazione e raccolta, può poi proseguire e peggiorare durante la conservazione. Le aflatossine introdotte con gli alimenti dai ruminanti vengono rapidamente assorbite e metabolizzate a livello epatico; i suoi metaboliti, tra cui le aflatossine M1 e M2, sono secreti per via biliare, urinaria, ma soprattutto per via mammaria e quindi sono presenti nel latte e nei suoi derivati.

Per quanto concerne la soia, essa è diventata la fonte proteica più utilizzata nei sistemi di allevamento intensivo da quando, nel 2001 la Commissione Europea ha vietato l'uso di farine di carne e ossa e loro derivati nelle diete per animali d'allevamento (direttiva CE 999/2001) al fine di assicurare la sicurezza dei consumatori sui

prodotti animali. Anche se in Europa la maggior parte della soia è importata, essa rappresenta la fonte di proteine meno costosa per il suo alto contenuto di proteina grezza (44-50% nel caso della farina di estrazione). Tuttavia i costi e la disponibilità di questo sottoprodotto sono fortemente correlati con l'andamento dei prezzi dei prodotti agricoli sul mercato mondiale (Jezierny *et al.*, 2010). Inoltre, altro importantissimo fattore da valutare è che larga parte della soia presente sul mercato risulta geneticamente modificata (GM); in merito, nonostante per diversi anni non vi è stata alcuna prova diretta che ciò possa rappresentare un potenziale pericolo per la salute, recentemente una serie di lavori sono stati pubblicati con risultati controversi (Tudisco *et al.* 2006; Tudisco *et al.* 2010).

Alla luce di quanto riportato e tenendo presente che le favorevoli condizioni in cui si trova l'allevamento bufalino sono strettamente legate alla qualità del prodotto da esso fornito, nonché alla sua specificità territoriale, notevole interesse suscita l'utilizzazione di cereali raccolti precocemente come base foraggera delle razioni, in alternativa all'insilato di mais. Ugualmente avvertita è la necessità di ricorrere all'impiego, quali fonti proteiche, di quelle leguminose da granella (favino, pisello, lupino, cece), la cui

produzione, fortemente compressa a causa dell'impiego generalizzato della farina di estrazione di soia, soltanto negli ultimi anni ha mostrato segni di ripresa, in linea con gli obiettivi fissati dall'Unione Europea. Queste colture mostrano notevole importanza agronomica in quanto migliorano la fertilità dei terreni e riducono la necessità di ricorrere alle concimazioni azotate, contribuendo in tal modo a diminuire l'impatto ambientale delle attività agro-zootecniche.

Scopo della progetto di ricerca

Scopo del presente progetto di ricerca è stato pertanto quello di verificare la possibilità della sostituzione dell'insilato di mais e della soia nella dieta, rispettivamente di bufale in lattazione e di vitelloni bufalini in accrescimento allevati per la produzione di carne. In entrambi i casi si è voluto porre attenzione soprattutto alle caratteristiche dietetico-nutrizionali delle derrate ottenute attraverso tali piani alimentari alternativi, con particolare riguardo al profilo acidico dei grassi e al contenuto in CLA del latte e della carne, requisiti di qualità questi ultimi tra quelli maggiormente richiesti

attualmente dal consumatore, per le ripercussioni che eserciterebbero sulla salute umana.

In merito alla relazione tra grassi alimentari e salute, i principali risultati emersi, nel 1984 dalla relazione della Committee on Medical Aspects of Food Policy (COMA) e discussi da Ulbricht *et al.* (1989), sono stati:

1. le diete ricche di C18:0, acido stearico, non determinano aumento del colesterolo serico;
2. gli AGS a corta catena (\leq C10), allo stesso modo, non comportano aumento del colesterolo nel sangue, mentre gli AGS a lunga catena, C12:0 (laurico), C14:0 (miristico) e C16:0 (palmitico) sono aterogenici, come già osservato da Keys nel 1965.

Molti studi hanno, poi, dimostrato che gli AGS a lunga catena, C14:0 (miristico) e C16:0 (palmitico) e C18:0 (stearico) sono anche trombogenici. L'acido miristico è il principale aterogenico poiché ha un potere ipercolesterolemico quattro volte superiore rispetto a quello dell'acido palmitico (Hegsted, 1965).

Gli acidi grassi monoinsaturi (MUFA), costituiti essenzialmente da acido palmitoleico ed oleico, sono contenuti negli oli d'oliva, di colza e di avocado.

È stata ampiamente esaminata la correlazione fra l'uso di acidi grassi monoinsaturi e la riduzione della predisposizione all'ossidazione delle LDL. Studi sperimentali sul coniglio mostrano che le lipoproteine a bassa densità ricche di acido oleico, il principale acido grasso dell'olio di oliva, sono molto resistenti all'ossidazione. I risultati ottenuti suggeriscono che l'assunzione di acidi grassi monoinsaturi può, quindi, associare i vantaggi derivanti dalla riduzione del colesterolo con la diminuzione delle lipoproteine a bassa densità e l'inibizione dell'ossidazione cellulare (Parthasarathy *et al.*, 1990).

Per quanto riguarda gli acidi grassi polinsaturi, infine, alcuni di essi sono chiamati "essenziali" (AGE) perché non sono sintetizzabili dall'organismo e devono necessariamente essere introdotti con la dieta, pena l'insorgenza di carenze. Gli AGE sono generalmente suddivisi in due classi ω -3 ed ω -6, a seconda della posizione del loro primo doppio legame a partire dal metile terminale della molecola.

Gli acidi grassi polinsaturi (PUFA) della serie ω -6 hanno quale progenitore l'acido linoleico (C18:2 ω -6) che si trova comunemente negli oli vegetali.

I PUFA della serie ω -3 hanno quale precursore l'acido alfa-linolenico (C18:3) che si trova comunemente nei vegetali a foglia verde, nei legumi, nella frutta secca, in alcuni oli come quelli di lino e soia. Altri PUFA della serie ω -3 sono contenuti soprattutto nei grassi del pesce (salmone, sgombri, acciughe ecc.) e nell'olio di fegato di pesce; i più importanti sono l'acido eicosapentanoico (EPA), C20:5, precursore delle prostaglandine della serie tre e l'acido docosaesanoico (DHA), C22:6, fondamentale per la composizione dei lipidi del cervello e dei fosfolipidi delle membrane sinaptiche, implicate nella trasmissione dell'impulso nervoso; essi sono non essenziali perché sintetizzati da altri acidi grassi.

L'interesse per gli effetti favorevoli degli acidi grassi ω -3 sullo stato di salute, soprattutto in rapporto alle patologie cardiovascolari, è nato verso la fine degli anni '70, in seguito alla osservazione che nelle popolazioni Eschimesi della Groenlandia, che consumano grandi quantità di pesce, particolarmente ricco in tali acidi grassi, l'incidenza della mortalità cardiaca per cause tromboemboliche, era molto più

bassa rispetto a quella registrata nelle altre popolazioni. Questo fenomeno è denominato “paradosso degli Eschimesi” in quanto le popolazioni della Groenlandia, pur consumando una dieta ricca di grassi, presentavano una bassa incidenza di malattie cardiovascolari (Bang, 1973).

Recenti studi clinici hanno mostrato che gli acidi grassi polinsaturi della famiglia ω -6 determinano principalmente una riduzione della colesterolemia (sia lipoproteine ad alta densità, HDL, sia LDL) per cui svolgono un'importante funzione anti-aterogenetica. Gli acidi grassi polinsaturi della famiglia ω -3, invece, hanno un'attività anti-trombogenetica particolarmente evidente, in quanto riducono l'aggregazione piastrinica (Bertoni, 1999).

L'acido linoleico è il più importante precursore alimentare delle prostaglandine. Una piccola aliquota di questo acido è trasformata nel fegato per allungamento e desaturazione in acido arachidonico ed in parte anche in acido diomo- γ -linoleico (DHLA). Il DHLA (C20:3) è il precursore della prostaglandina E_1 (PGE_1), un agente antiaggregante; mentre l'acido arachidonico (C20:4) è il precursore del trombossano A_2 (TXA_2), un potente agente aggregante, e della prostaglandina I_2 (PGI_2), anch'essa caratterizzata da potere antiaggregante, anche se

molto meno forte (Gibney, 1993; Miles and Calder, 1998). Gli acidi grassi polinsaturi della famiglia ω -3 agiscono come antiaggreganti attraverso:

1. l'acido eicosapentaenoico (tipo ω -3), precursore del trombossano A_3 (TXA_3), un debole agente aggregante e della prostaglandina I_3 (PGI_3), un potente antiaggregante. Quindi una sostituzione nella dieta di acidi grassi polinsaturi della famiglia ω -6 con quelli del tipo ω -3 come precursori di prostaglandine e trombossani indurrebbe uno squilibrio tra agenti aggreganti/agenti antiaggreganti facendo prevalere questi ultimi;
2. l'inibizione della conversione dell'acido arachidonico in TXA_2 nelle piastrine.

Alla luce di tutte queste considerazioni, il solo rapporto acidi grassi polinsaturi/saturi (P/S) non viene più considerato un valido indice per la stima dell'aterogenicità e/o della trombogenicità di una dieta o di un alimento, in quanto tale teoria partiva dall'assunto che tutti gli acidi grassi saturi fossero dannosi per la salute umana. Attualmente, come suggerito da Ulbricht e Southgate (1991), vengono, invece, presi in

considerazione anche gli acidi grassi monoinsaturi e le potenzialità aterogenetiche e trombogenetiche vengono espresse con i seguenti indici:

Indice di Aterogenicità (IA):

$$IA = \frac{C12:0 + (4 \times C14:0) + C16:0}{\omega-3 + \omega-6 + MUFA}$$

Indice di Trombogenicità (IT):

$$IT = \frac{C14:0 + C16:0 + C18:0}{(0,5 \times C18:1) + (0,5 \times \text{altri MUFA}) + 0,5(\omega-6) + 3(\omega-3) + \omega-3/\omega-6}$$

Più di recente, notevole interesse suscita nella comunità scientifica internazionale lo studio dei coniugati dell'acido linoleico (CLA), cui vengono attribuiti attività anti-cancerogena, effetti positivi su pazienti affetti da diabete e sui sistemi immunitario e cardiovascolare.

I CLA del latte e della carne dei ruminanti (Figura 1) riconoscono due origini (Griinari e Bauman, 1999): 1) ruminale, attraverso la bioidrogenazione di alcuni acidi grassi insaturi; 2) endogena, a partire dall'acido trans-vaccenico, intermediario della suddetta bioidrogenazione ruminale che giunge a livello tissutale per via ematica.

In merito alla prima, è da ricordare che i lipidi di origine alimentare subiscono due importanti trasformazioni nel rumine (Dawson *et al.*, 1977). La prima è l'idrolisi dei legami esteri catalizzata dalle lipasi microbiche, che porta alla produzione di acidi grassi liberi; la seconda è la bioidrogenazione degli acidi grassi insaturi nel rumine, da parte dei microrganismi cellulosolitici (*Butyrivibrio fibrisolvens*). La bioidrogenazione dell'acido linoleico (cis-9, cis-12 C18:2) inizia con l'isomerizzazione del doppio legame dalla posizione 12 a quella 11, per formare il cis-9, trans-11 CLA. L'enzima responsabile della formazione di doppi legami coniugati a partire da quelli cis-9, cis-12 dell'acido linoleico e degli acidi α - e γ -linolenico è la linoleate isomerasi (Kemp *et al.*, 1984). L'isomerizzazione è seguita da una rapida idrogenazione del legame cis-9, ad opera di una reductasi che porta alla conversione del cis-9,

trans-11 CLA in trans-11 C18:1 (acido trans-vaccenico, TVA) (Kepler et al., 1966; Bauman et al., 2003; Lock and Garnsworthy, 2003; Khanal et al., 2004).

Per la seconda origine dei CLA, è da sottolineare che la trasformazione dell'acido transvaccenico a livello tissutale avviene ad opera di una Delta 9-desaturasi denominata Stearoyl CoA Desaturasi (SCD) la cui attività è stata individuata nella ghiandola mammaria e nel grasso di infiltrazione muscolare. Secondo la gran parte degli esperti che hanno indagato sulla SCD, inoltre, la dieta degli animali rappresenterebbe uno dei principali fattori in grado di influenzarne l'attività.

Figura 1 . Origine dei CLA nei prodotti dei ruminanti

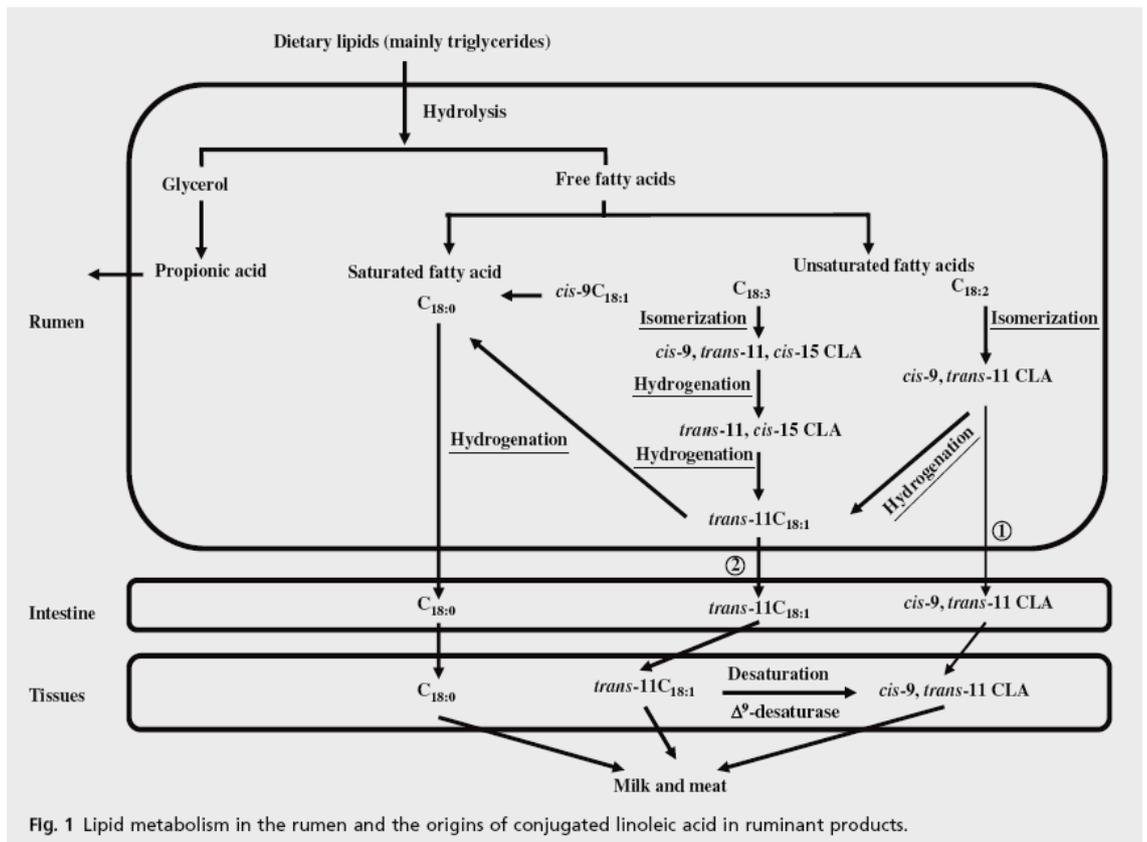


Fig. 1 Lipid metabolism in the rumen and the origins of conjugated linoleic acid in ruminant products.

1° contributo sperimentale

*Sostituzione dell'insilato di mais con insilato di orzo
nella dieta di bufale in lattazione: effetti sulla produzione
quanti-qualitativa di latte*

Introduzione

Nella presente indagine sperimentale è stata valutata l'influenza della sostituzione dell'insilato di mais con quello di orzo nella dieta di bufale in lattazione sulla produzione quanti-qualitativa di latte.

L'insilato di mais è ingrediente molto comune nella razione delle bufale da latte, in quanto è un foraggio molto energetico (0.80-0.85 Unità Foraggiere Latte/q di sostanza secca), caratterizzato da elevata appetibilità e buona digeribilità dei principi nutritivi. La coltivazione del mais per la produzione di insilati è particolarmente diffusa nelle zone della pianura padana, fertili e ricche di acqua; in aree asciutte e calde, invece, il mais non riesce ad esprimere al massimo la sua potenzialità produttiva, a meno che non ci sia una cospicua irrigazione, con un conseguente notevole dispendio energetico ed economico e forte impatto ambientale. Alla luce di ciò, si rende sempre più urgente, anche a causa del progressivo peggioramento delle condizioni di siccità di alcune zone del Sud Italia, la sostituzione del mais con un'essenza più adatta a tale ambiente.

Risulta, tuttavia, evidente che al fine di garantire la copertura dei fabbisogni energetici degli animali, è necessario disporre di risorse foraggiere di elevato valore nutritivo. A tal riguardo un notevole contributo è rappresentato in particolare dall'orzo, per il quale altamente favorevole si è dimostrata l'utilizzazione della pianta intera a maturazione latteo-cerosa per la produzione di trinciato integrale. Le rese raggiungibili in sostanza secca sono, negli ambienti meridionali, di 10,5-12,5 t/ha. A questa capacità produttiva si associa un buon valore qualitativo della biomassa prodotta. Questa particolare destinazione si presta, inoltre, a rendere ancora più efficiente il sistema colturale che prevede di massimizzare le produzioni per unità di superficie mediante lo sviluppo delle doppie colture (cereale invernale trinciato + mais o sorgo trinciato). L'anticipo della raccolta della pianta intera rispetto alla coltura da granella consente, infatti, di sfruttare un periodo più lungo per la seconda coltura. Tale sistema produttivo appare di grande attualità perché consente l'ottimizzazione delle risorse terreno e idriche. Il valore nutritivo del foraggio è tuttavia fortemente condizionato da diversi fattori quali: tipo di terreno, disponibilità idrica, andamento climatico, concimazione minerale e stadio di maturazione. Quest'ultimo appare comunque il fattore

preponderante; infatti, l'umidità alla raccolta condiziona tutti i parametri qualitativi e le caratteristiche fisiche del trinciato, che lo rendono idoneo al compattamento in trincea. E' noto, infatti, che lo stadio di inizio-fioritura corrisponde di norma al momento di massima concentrazione di proteine e zuccheri solubili, mentre a maturazione lattea, e più ancora a maturazione cerosa si osserva già il declino di queste componenti a favore delle sostanze amilacee depositate nel seme e, in corrispondenza, un graduale aumento delle componenti fibrose nel resto della pianta, ma con un livello produttivo di biomassa decisamente più favorevole. E' evidente quindi che intorno a queste fasi, con un tenore di sostanza secca compreso tra il 30 e il 35%, la trinciatura e l'insilamento possono assicurare un buon prodotto finale. Infatti allo stadio di maturazione latteo-cerosa (tenore di sostanza secca di 32-34%) la produzione di sostanza secca per unità di superficie ha raggiunto, di norma, il livello massimo, con valore energetico costante per effetto del bilanciamento tra le componenti depositate nel seme e le componenti fibrose del resto della pianta e una buona insilabilità del trinciato. Il termine di qualità foraggero-zootecnica è inteso come quantità di foraggio prodotto e come valore nutritivo dello stesso. Per massimizzare tale risultato occorre

identificare le varietà più idonee, la tecnica colturale più rispondente, le epoche di raccolta e le modalità di insilamento. Il foraggio prodotto andrà inoltre valutato qualitativamente allo scopo di fornire agli allevatori la migliore alternativa, in termini di specie e di varietà, oltre alle relative modalità di coltivazione, raccolta e conservazione.

Da quanto sopra, appare rilevante la necessità innanzitutto di approfondire le conoscenze delle caratteristiche chimico-nutrizionali dei foraggi da destinare all'alimentazione degli animali. A tal fine si è fatto ricorso alla tecnica *in vitro* della produzione cumulativa di gas (Theodoru et al., 1994), impiegata da più di due lustri e con ottimi risultati presso la Cattedra di Nutrizione e Alimentazione animale del Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali dell'Università di Napoli Federico II (Calabrò et al., 2001; Infascelli, 2002; Calabrò et al., 2003; Calabrò et al., 2004). Con tale metodica vengono studiate le cinetiche di fermentazione ruminale dei carboidrati, il che consente di formulare razioni costituite da alimenti tra loro complementari, ovvero caratterizzati da diversa velocità di utilizzazione, in modo da ottimizzare l'attività degradativa prima, e di sintesi poi, delle diverse specie microbiche presenti nel rumine.

Sono state pertanto effettuate due prove *in vitro*, la prima su alcuni alimenti normalmente impiegati quali ingredienti della dieta per bufale in lattazione e la seconda su insilati di orzo ottenuti da diverse cultivar.

Sulla base dei risultati delle valutazioni *in vitro* sono quindi stati formulati piani alimentari per bufale in lattazione e valutata, mediante una prova *in vivo*, la risposta produttiva di latte, in termini quantitativi. In particolare, al fine di verificare l'influenza della dieta sulle caratteristiche dietetico-nutrizionali del latte, si è voluto porre l'attenzione sul profilo acido del grasso e sul contenuto in CLA, gruppo di isomeri di posizione e geometrici degli acidi grassi derivati dell'acido otadecadienoico, con riconosciute proprietà immunomodulanti, antitumorali e antiaterosclerotiche, di cui il latte e la carne sono la principale fonte alimentare (Parodi, 1999).

Materiale e Metodi prova in vitro n. 1

La sperimentazione è stata effettuata presso l'Azienda agro-zootecnica Barchiesi sita nel Comune di Cassino (FR), dove vengono allevate bufale da latte di razza Mediterranea Italiana.

Al fine di formulare diete in grado di soddisfare nella maniera più equilibrata possibile i fabbisogni nutritivi degli animali, in una prima fase è stata effettuata la valutazione chimico-nutrizionale sugli alimenti comunemente impiegati in azienda: insilato di mais (SM), fieno di medica (FM), fieno di loietto (FL), insilato di loietto (SL), granella d'orzo (GO), granella di mais (GM), polpe di barbabietola (PB), Soia f.e (SFE).

In tabella 3 è riportata la composizione chimica (AOAC, 2000; Van Soest et al., 1991) degli alimenti testati. In tutti i casi i valori ottenuti rientrano in quelli tabulati. Per meglio discutere i risultati ottenuti *in vitro*, è utile distinguere gli alimenti più ricchi in fibra (fieno di loietto e di medica, insilato di loietto e di mais, polpe di barbabietola), che presentano un contenuto medio di NDF pari a 44.4 % s.s., dai concentrati (orzo, mais e soia f.e.), in cui i carboidrati

strutturali risultano mediamente pari a 18.6 % s.s. Tuttavia, è importante sottolineare che, a differenza degli altri foraggi, alla parete cellulare delle polpe contribuiscono in buona parte (38 % dell'NDF) le emicellulose.

Tabella 3. Composizione chimica(% s.s.) degli otto substrati testati

	PG	LG	FG	Ceneri	ADF	ADL	NDF	NSC
SM	7.43	2.84	15.0	3.51	24.4	2.95	34.6	51.7
FM	13.1	1.31	30.4	7.48	44.5	9.81	47.6	30.5
FL	6.21	1.35	27.1	7.07	37.9	3.85	52.5	32.8
SL	6.48	2.47	20.7	10.5	32.4	3.56	43.6	36.9
GO	8.46	1.39	3.32	2.50	7.09	0.55	16.9	70.8
GM	6.96	3.27	0.83	1.26	3.96	0.50	15.4	73.2
PB	8.32	0.95	15.6	5.19	26.7	3.82	43.7	41.8
SFE	41.3	1.36	4.71	6.00	11.4	0.40	22.2	29.2

NSC: carboidrati non strutturali (= 100 – NDF – PG – LG – ceneri).

SM: insilato di mais, FM: fieno di medica, FL: fieno di loietto, SL: insilato di loietto,

GO: granella d'orzo, GM: granella di mais; PB: polpe di barbabietola; SFE: Soia f.e.

Per la valutazione nutrizionale mediante la tecnica della gas production (Theodorou et al., 1994), circa 1.0 g di sostanza di ciascun alimento è stato pesato in bottiglie da siero da 120 ml (3 replicazioni/substrato) dove sono stati aggiunti un *medium*, un agente riducente e l'inoculo. Sono stati impiegati due inoculi: liquido ruminale di bufalo e di bovino, quest'ultimo impiegato come riferimento. Tutte le bottiglie (totale 48 = 8 substrati x 3 replicazioni x 2 inoculi) sono state, quindi, poste in un termostato a 39°C.

Per misurare la pressione ed il volume del gas prodotto durante la fermentazione è stato usato un sistema manuale costituito da un trasduttore di pressione connesso, tramite una valvola, ad un dispositivo a tre uscite.

Nella prima uscita è inserito il trasduttore di pressione, nella seconda un ago ipodermico che serve a collegare la bottiglia al misuratore di pressione, nella terza è inserita una siringa graduata in accordo con la quantità di gas da misurare. Il trasduttore, collegato ad un voltmetro con scala modificata a lettura digitale, misura la pressione riportata sul display direttamente in PSI (pound/square inch). Con l'ago inserito nel tappo di gomma della bottiglia il sistema permette di misurare la pressione interna, mentre rilasciando lo

stantuffo della siringa graduata, in modo da svuotare il sistema fino ad equilibrare la pressione interna con quella atmosferica, indicato dalla lettura zero sul display del voltmetro, si misura il corrispondente volume di gas sviluppato.

La produzione di gas è stata misurata 22 volte nell'arco di 120 ore di fermentazione e precisamente ai seguenti intervalli di tempo: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 17, 20, 22, 24, 27, 29, 31, 36, 44, 48, 53, 59, 72, 96 e 120 ore. Le letture sono state effettuate più frequentemente durante le prime 48 ore, poiché le pressioni interne aumentano rapidamente, durante l'ultima fase della fermentazione, invece, le quantità di gas risultano più contenute.

Determinazioni alla fine dell'incubazione

Dopo 120 ore di incubazione sono state aperte le bottiglie per determinare il pH tramite pHmetro e gli acidi grassi volatili (AGV) mediante gascromatografo.

Per la determinazione delle sostanze secca e organica residue, si è proceduto filtrando il contenuto di ciascuna bottiglia attraverso crogioli di vetro a setto poroso, che sono stati posti per una notte in

una stufa a 103°C e successivamente per 3 ore in muffola a 550°C; la sostanza organica degradata (dSO, %) è stata calcolata per differenza tra quella incubata e quella residua.

Modello matematico

Per ogni bottiglia i volumi cumulativi di gas ottenuti a ciascun tempo di incubazione (ml/g di sostanza organica incubata) sono stati elaborati con il modello di Michaelis-Menten proposto da Groot e coll. (1996):

$$G = A / (1 + (C/t)^B)$$

dove $G(t)$ = volume di gas cumulativo ottenuto al tempo t ; A (ml/g) = quantità di gas potenzialmente ottenibile (asintoto della curva); B (h) = tempo in cui si sviluppa una quantità di gas pari ad $A/2$; C = costante che definisce la forma della curva.

Il programma NLREG è stato utilizzato per ottenere i parametri della regressione non lineare.

Impiegando i parametri A , B e C del modello, è stato inoltre possibile stimare la velocità massima di sviluppo del gas di fermentazione (R_{max} , ml/h) ed il tempo in cui tale velocità viene raggiunta (T_{max} , h) con le seguenti formule:

$$R_{\max} = [A * C^B * B * (T_{\max}^{-(B-1)})] / [1 + C^B * (T_{\max}^{-B})]^2$$

$$T_{\max} = C * \{[(B - 1) / (B + 1)]^{1/B}\}$$

Elaborazione statistica

Tutti i parametri stimati dal modello (A, B, C, R_{max} e T_{max}), nonché il volume cumulativo di gas rapportato alla sostanza organica incubata (VCSO, ml/g) e degradata (Yield, ml/g), la degradabilità della sostanza organica (dSO,%), il pH e gli AGV sono stati elaborati mediante analisi della varianza (Procedura GLM, del pacchetto statistico SAS, 2000), secondo il seguente modello:

$$y_{ijk} = \mu + S_i + I_j + S*I_{ij} \varepsilon_{ijk}$$

dove y rappresenta ogni caratteristica di fermentazione, μ rappresenta la media, S è l'effetto substrato (i = 1-8), I è l'effetto inoculo (j = 1,2), S*I rappresenta l'interazione di primo ordine ed ε l'errore.

RISULTATI prova in vitro n. 1

Caratteristiche di fermentazione (tabella 4)

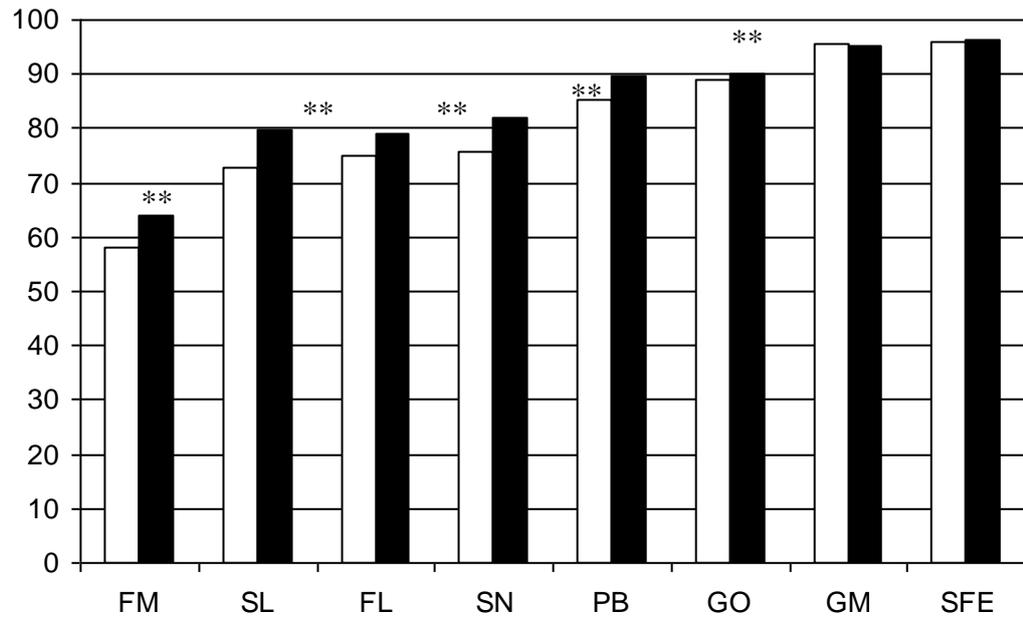
Tutti i parametri sono risultati significativamente ($P < 0.001$) influenzati dai due effetti principali, specie animale donatrice del liquido ruminale e, come era da attendersi, substrato.

La digeribilità a 120 h per il liquido ruminale di bufalo è stata consistentemente più alta ($P < 0.001$) confrontata con il liquido ruminale di bovino per tutti i foraggi (polpe di barbabietola incluse); per i concentrati, invece, tale parametro è risultato pressoché sovrapponibile nei due inoculi (figura 2).

La produzione di gas reale (VCSO), invece, è stata sempre più bassa nel bufalo rispetto al bovino (299 vs. 334 ml/g, $P < 0.001$), in particolare le differenze sono risultate statisticamente significative per tutti i substrati, esclusi la granella di mais e il fieno di medica (figura 3). Comunque, i due liquidi ruminali classificano i substrati testati nello stesso ordine, sia per quanto riguarda la degradabilità della SO, (SFE > GM > GO > PB > SM > FL > SL > FM) sia per la produzione di gas (PB > GO > GM > SM > SFE > SL > FL > FM).

Figura 2

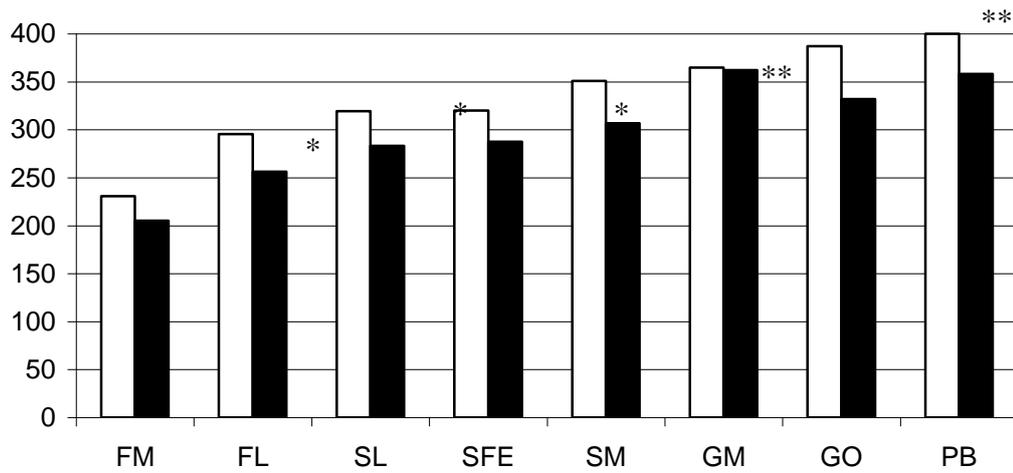
Sostanza organica degradata (%) negli otto substrati incubati con l'inoculo di bufalo (■) e di bovino (□)



FM: fieno di medica, SL: insilato di loietto, FL: fieno di loietto, SM: insilato di mais, PB: polpe di barbabietola, GO: granella d'orzo, GM: granella di mais; SFE: Soia f.e.

Figura 3.

Produzione reale di gas (ml/g) negli otto substrati incubati con l'inoculo di bufalo (■) e di bovino (□)



FM: fieno di medica, FL: fieno di loietto, SL: insilato di loietto, SFE: Soia f.e., SM: insilato di mais, GM: granella di mais, GO: granella d'orzo, PB: polpe di barbabietola,

Tabella 4. Caratteristiche di fermentazione in vitro degli otto substrati testati con i due inoculi

	dSO %	VCSO ml/g	A ml/g	B h	t_{max} h	R_{max} ml/h
Bufalo						
SM	82.0	307	312	17.6	3.50	12.6
FM	63.9	205	215	16.8	6.14	7.80
FL	79.0	256	293	24.5	4.61	8.32
SL	79.7	283	309	24.2	8.78	11.0
GO	90.1	332	324	12.8	8.68	11.4
GM	95.3	362	366	18.4	11.9	10.4
PB	89.7	358	380	23.7	13.5	12.0
SFE	96.2	287	306	16.4	5.61	11.4
Bovino						
SM	78.52	351	363	19.1	9.83	9.08
FM	58.11	231	265	19.7	2.72	18.6
FL	73.05	296	368	29.2	1.94	13.7
SL	72.64	319	348	25.8	8.47	7.76
GO	88.91	387	387	12.6	6.78	19.6
GM	95.44	365	411	20.8	13.7	18.0
PB	85.12	400	438	23.5	10.4	9.53
SFE	95.89	320	350	17.2	4.99	7.81
Var. err.	1.52	277	76.2	0.45	0.50	0.24
Sub	***	***	***	***	***	***
Inoc	***	***	***	***	***	***
Inoc*Sub	***	N.S.	N.S.	***	***	N.S.

SM: insilato di mais, FM: fieno di medica, FL: fieno di loietto, SL: insilato di loietto, GO: granella d'orzo, GM: granella di mais; PB: polpe di barbabietola; SFE: Soia f.e.

dSO: degradabilità della sostanza organica; VCSO: Produzione cumulativa di gas rapportata alla SO; A: produzione potenziale di gas; B: tempo a cui si sviluppa una quantità di gas pari ad A/2; t_{max}: tempo a cui si raggiunge la velocità massima di degradazione; R_{max}: velocità relativa massima di fermentazione.

***: P < 0.001; N.S.: non significative.

V. E.: varianza dell'errore.

Cinetiche di fermentazione

Per meglio comprendere la cinetica di fermentazione, nelle figure 4 e 5 sono stati rappresentati gli andamenti della produzione di gas e della velocità di fermentazione nell'arco delle 120 ore di incubazione degli otto substrati testati (foraggi e concentrati, grafici 3 e 4, rispettivamente). Dal confronto bufalo bovino emergono poche differenze nella cinetica di fermentazione per ciascun substrato. Tuttavia, come riportato in tabella 5, la velocità di fermentazione è stata significativamente ($P < 0.01$) più elevata (R_{\max} : 12.0 vs. 11.0 ml/h) e raggiunta in tempi più brevi (t_{\max} : 7.33 vs. 8.46 h; $P < 0.01$) nel bovino rispetto al bufalo (dati medi non riportati in tabella). Inoltre, il parametro B è stato, ad eccezione dell'orzo e delle polpe, sempre più basso con il liquido ruminale di bufalo rispetto al bovino, ad indicare che la fermentazione inizia prima nel bufalo.

I valori di pH registrati al termine delle 120 h di incubazione risultano tutti al di sopra di 6.4 valore limite per una buona attività dei cellulolitici. Inoltre, tali valori confermano l'efficienza del sistema tampone adottato *in vitro*.

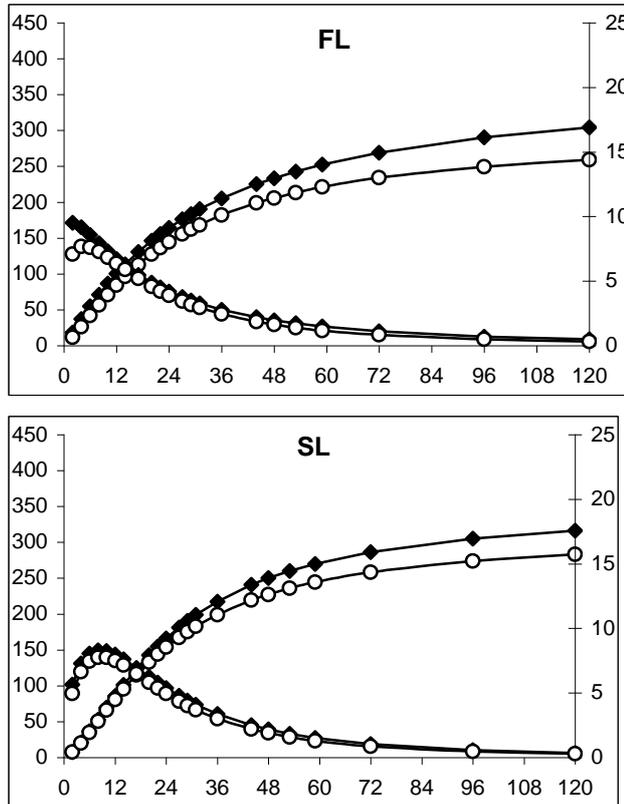
Per tutti i substrati, il liquido ruminale bovino ha prodotto in proporzione più propionato e meno acetato rispetto al liquido ruminale

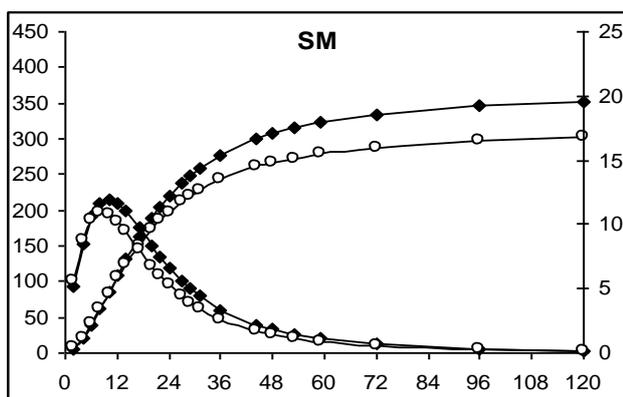
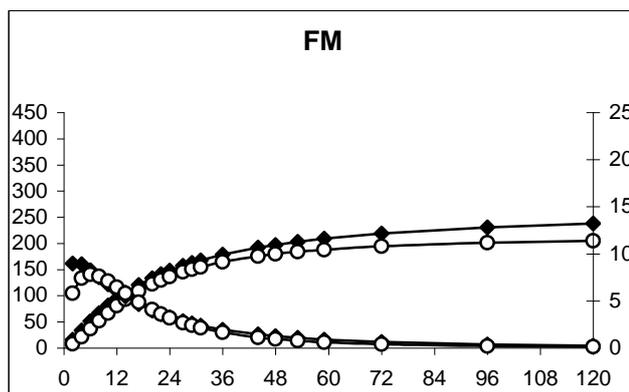
bufalino, in linea con la maggiore capacità della popolazione ruminale del bufalo a degradare gli alimenti fibrosi.

Le differenze emerse nel confronto bufalo bovino sulle caratteristiche di fermentazione possono essere spiegate con una diversa attività microbica delle due specie, dovuta sia ad una diversa numerosità della popolazione microbica e sia ad una popolazione costituita da specie diverse di batteri e protozoi.

Figura 4

Andamento della produzione di gas e della velocità di fermentazione dei quattro foraggi incubati con l'inoculo di bufalo (■) e di bovino (□)

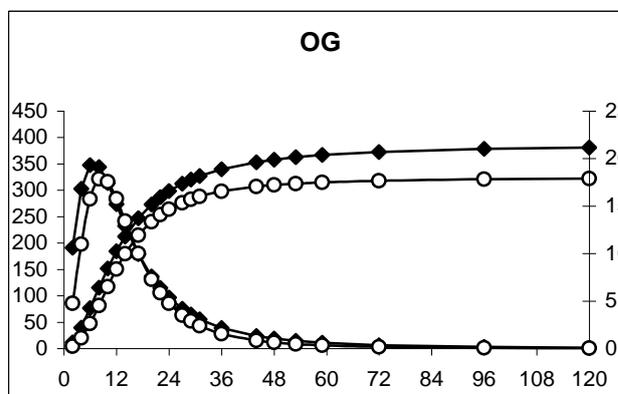
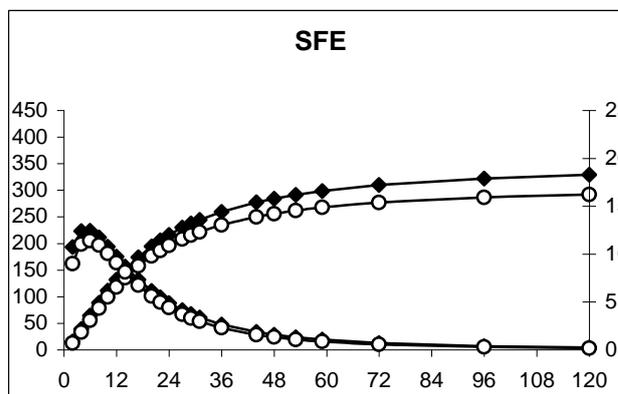
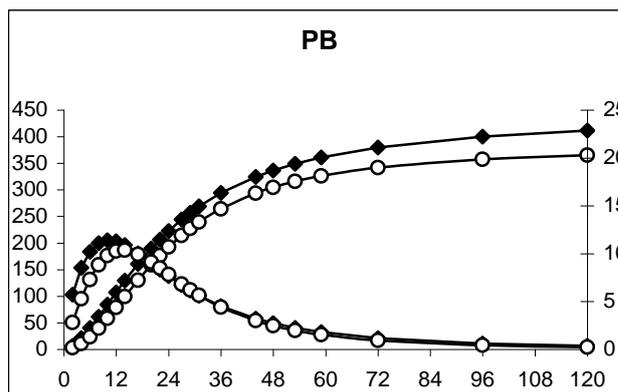


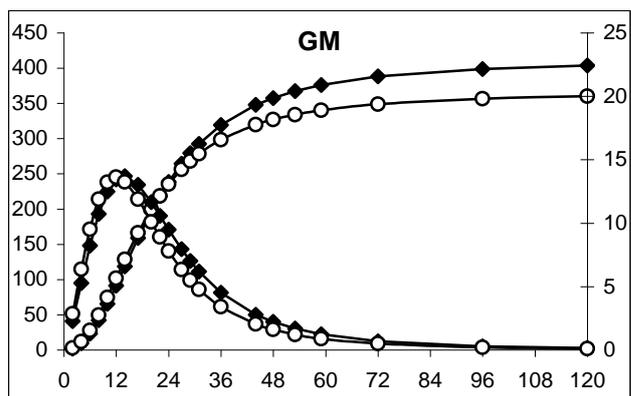


FL: fieno di loietto, SL: insilato di loietto, FM: fieno di medica, SM: insilato di mais.

Figura 5.

Andamento della produzione di gas e della velocità di fermentazione dei quattro concentrati incubati con l'inoculo di bufalo (■) e di bovino (□)





PB: polpe di barbabietola SFE: Soia f.e., GO: granella d'orzo, GM: granella di mais

Tabella 5. Caratteristiche di fermentazione in vitro degli otto substrati testati con i due inoculi

	pH	Acetico %AGV	Propionico	Butirrico
Bufalo				
SM	6.36	72.4	20.1	5.61
FM	6.73	75.9	15.6	4.35
FL	6.51	70.9	19.3	6.68
SL	6.49	65.5	22.7	8.12
GO	6.40	63.8	19.3	13.6
GM	6.20	65.5	23.6	8.65
PB	6.33	75.4	17.9	4.55
SFE	6.76	73.4	15.5	5.46
Bovino				
SM	6.52	56.9	27.7	9.20
FM	6.79	69.2	21.8	3.58
FL	6.59	65.2	26.0	4.83
SL	6.60	59.7	29.4	6.86
GO	6.44	56.1	28.5	12.7
GM	6.35	52.7	29.1	13.2
PB	6.44	62.2	28.5	5.66
SFE	6.86	60.6	22.9	6.20
Var. errore	0.0008	4.42	4.65	1.08
Sub	***	***	***	***
Inoc	***	***	***	***
Inoc*Sub	*	N.S.	***	***

SM: insilato di mais, FM: fieno di medica, FL: fieno di loietto, SL: insilato di loietto, GO: granella d'orzo, GM: granella di mais; PB: polpe di barbabietola; SFE: Soia f.e.

***: $P < 0.001$; N.S.: non significative.

Materiale e Metodi prova in vitro n. 2

Presso la stessa Azienda agro-zootecnica sopra descritta, dieci cultivar di orzo sono state seminate in aree di 10 m² ciascuna e raccolte a maturazione latteo-cerosa della granella.

Il foraggio è stato quindi trinciato mediante cutter per ottenere particelle di 2 cm e ben pressato in microsilos. Dopo 2 mesi di insilamento, 3 campioni rappresentativi sono stati prelevati da ciascun microsilo. Sui campioni essiccati a 60°C per 48 ore e macinati con griglia 1,1 mm è stata determinata la composizione chimica, secondo lo schema Weende (AOAC, 2000); il frazionamento dei carboidrati strutturali è stato effettuato come indicato da Van Soest *et al.* (1991) ed il pH misurato mediante tecnica potenziometrica.

Per la valutazione nutrizionale mediante la tecnica della gas production il liquido ruminale è stato prelevato da due bufale in asciutta, alimentate con una dieta equilibrata a base di foraggio (NDF 43.5 and CP 12% DM). In laboratorio, il *pool* di liquido ruminale è stato filtrato attraverso sei strati di garza e raccolto in un contenitore insufflato con CO₂ ; il residuo raccolto sulla garza è stato poi omogeneizzato in un frullatore per 60 secondi, dopo l'aggiunta di una

quantità di medium pari al volume del filtrato. Dopo la filtrazione il liquido è stato aggiunto al precedente, ottenendo così l'inoculo.

A ciascuna bottiglia, contenente 1 g di substrato e 76ml di medium, sono stati addizionati 10 ml di inoculo. Al termine dell'inoculazione si è proceduto ad equilibrare la pressione interna della bottiglia con quella atmosferica allontanando l'eventuale eccedenza di gas con un ago, quindi tutte le bottiglie sono state chiuse con tappi di gomma e ghiere di alluminio e poste in un termostato a 39°C. Per ogni campione sono state effettuate 6 replicazioni (Calabrò *et al.*, 2005).

Dopo 120 ore di incubazione sono state aperte le bottiglie per determinare il pH tramite pHmetro (Alessandrini Instrument glass electrode, Jenway, Dunmow, UK; model 3030). Per la determinazione delle sostanze secca e organica residue, si procede filtrando il contenuto di ciascuna bottiglia attraverso crogioli di vetro a setto poroso (Scott Duran, #2) prepesati sciacquando con acqua distillata calda. Alcuni crogioli sono posti per una notte in una stufa a 103°C e successivamente per 3 ore in muffola a 550°C, per determinare rispettivamente le sostanze secca e organica residue. La sostanza

organica degradata (dSO, %) è stata calcolata per differenza tra quella incubata e quella residua.

Sono stati, infine, misurati mediante gas-cromatografia (GC) gli AGV prodotti dopo 120 h di incubazione. In particolare, quando la fermentazione è stata stoppata (ponendo le bottiglie a 4°C), da ogni bottiglia si è prelevato un campione (5ml) che è stato centrifugato due volte a 12000 g per 10 minuti a 4°C; 1 ml di supernatante è stato addizionato con 1 ml di acido ossalico 0.06 M. La misurazione mediante GC è stata effettuata includendo come standards esterni i seguenti acidi: acetato, propionato, butirrato, iso-butirrato, valerianico e iso-valerianico.

Elaborazione dati

I volumi di gas ottenuti a ciascun tempo di incubazione sono stati elaborati secondo il modello monofasico di Groot *et al.* (1996) già descritto in precedenza.

Ammettendo una relazione lineare tra produzione di gas e fermentazione del substrato è possibile, mediante opportune equazioni

calcolare la velocità relativa massima di fermentazione (R_{\max} , ml/h) e il tempo a cui essa si raggiunge (T_{\max} , h) (Bauer *et al.*, 2001):

Il valore nutritivo del foraggio, espresso come energia netta per lattazione, è stato calcolato come riportato da Menke e Staingass (1988) impiegando parametri di composizione chimica e dati ottenuti *in vitro* con la IVGPT, in particolare è stata impiegata la seguente equazione specificatamente suggerita dagli autori per foraggi umidi:

$$\text{ENI} = 0.54 + 0.0959 \cdot \text{GP} + 0.038 \cdot \text{PG} + 0.01733 \cdot \text{PG}^2$$

dove:

ENI = energia netta per la lattazione ((MJ/kg s.s.)

GP = produzione di gas a 24 ore (ml/200 mg s.s.)

CP = contenuto in proteine grezze dei foraggi (g/kg s.s.)

Per valutare l'influenza della cultivar sulle caratteristiche *in vitro* le medie sono state confrontate con il Tukey test impiegando la Procedura GLM del pacchetto statistico SAS (2000), secondo il modello:

$$y_{ijk} = \mu + F_i + \varepsilon_{ijk}$$

dove:

μ = media generale relativa ai diversi parametri studiati;

F = effetto cultivar ($i = 1, \dots, 10$);

ε = errore.

Risultati prova in vitro n. 2

La composizione chimica e il valore nutritivo degli insilati di orzo ottenuti con le dieci diverse cultivar oggetto della presente sperimentazione, sono illustrati in tabella 6.

L'esame di quest'ultima consente di evidenziare che la percentuale di sostanza secca è ricaduta in un range compreso tra 24.3% e 28.4%, valori di poco inferiori a quelli riportati da Manninen et al. (2005) che avevano effettuato una indagine volta a confrontare l'insilato di orzo con quello di avena. Questi autori, inoltre, registrarono per i campioni di insilato di orzo integrale, percentuali di proteine grezze (11.0% s.s.) e di NDF (46.5% s.s.), rispettivamente superiori ed inferiori rispetto a quelli da noi rilevati (PG% s.s. tra 8.2 e 9.8; NDF% s.s. tra 62.1 e 69.1). Tali differenze sono probabilmente da ascrivere ad una più precoce epoca di raccolta della pianta nell'indagine degli autori succitati.

Impiegando la equazione formulata da Menke e Staingass (1988) che prende in considerazione il contenuto in protidi grezzi e il dato della produzione di gas in vitro dopo 24 h di fermentazione, è stato calcolato per le dieci cultivar in esame, il valore nutritivo espresso come energia netta per la lattazione (ENI).

Quest'ultimo è risultato compreso in un range tra 3.58 e 4.25 MJ/kg s.s., con un valore medio di 4.16 MJ/kg s.s..

Tale risultato appare molto interessante; è, infatti, da sottolineare che esso è perfettamente sovrapponibile al valore nutritivo (4.14 MJ/kg s.s.) calcolato per l'insilato di mais ottenuto dalla pianta coltivata nella stessa azienda in prove precedenti (Calabro et al., 2007).

L'impiego dell'insilato di orzo nella formulazione di razioni per bufale in lattazione in eventuale sostituzione dell'insilato di mais, pertanto, almeno nel comprensorio nel quale è stata effettuata la nostra ricerca, non comporterebbe la necessità di integrare le diete con altre fonti energetiche.

In tabella 4 vengono riportate le caratteristiche di fermentazione in vitro degli insilati ottenuti con le dieci cultivar di orzo prese in esame.

A testimonianza del buon andamento delle fermentazioni, è da registrare che il valore del pH è risultato in ogni caso più elevato di 6.4. Quest'ultimo viene considerato il limite utile a garantire l'attività dei microrganismi cellulolitici del rumine (Doane et al., 1997).

Per quanto concerne la degradabilità della sostanza organica (dSO), tutti gli insilati oggetto della sperimentazione hanno fatto registrare valori più che soddisfacenti e sovrapponibili a quelli ottenuti con insilati di avena (Calabrò et al., 2005), di sorgo e di mais (Calabrò et al., 2007).

Gli insilati di orzo, infatti, hanno mostrato una degradabilità della sostanza organica media pari al 63%, contro il 64.1% dell'insilato di mais, il 65.5% di quello di sorgo e il 60% dell'insilato di avena.

Analogamente, comparabili con i quelli riportati in letteratura, sono risultati i valori relativi al tempo cui la massima velocità di fermentazione viene raggiunta (t_{max})

Al contrario, rispetto alle precedenti sperimentazioni i valori di R_{max} (velocità massima di fermentazione) sono risultati in ogni caso inferiori.

Relativamente all'andamento di tutti i parametri della fermentazione in vitro, nella presente sperimentazione le dieci cultivar prese in esame hanno fornito risultati simili tra loro.

Ha fatto eccezione per alcuni di essi la sola cultivar "Boreale" (tabella 7 e figura 6). Quest'ultima, infatti ha mostrato valori

significativamente ($P < 0.01$) più elevati di degradabilità della sostanza organica (dSO) e della produzione cumulativa di gas (OMCV), nonché una più veloce fermentazione (R_{max}).

Tali differenze sono probabilmente da ascrivere al minore contenuto in lignina che nel caso della cultivar Boreale è risultata pari a 4.1% s.s., mentre per le altre si sono registrati valori compresi tra 4.7% e 6.7% s.s. (vedi tabella 6).

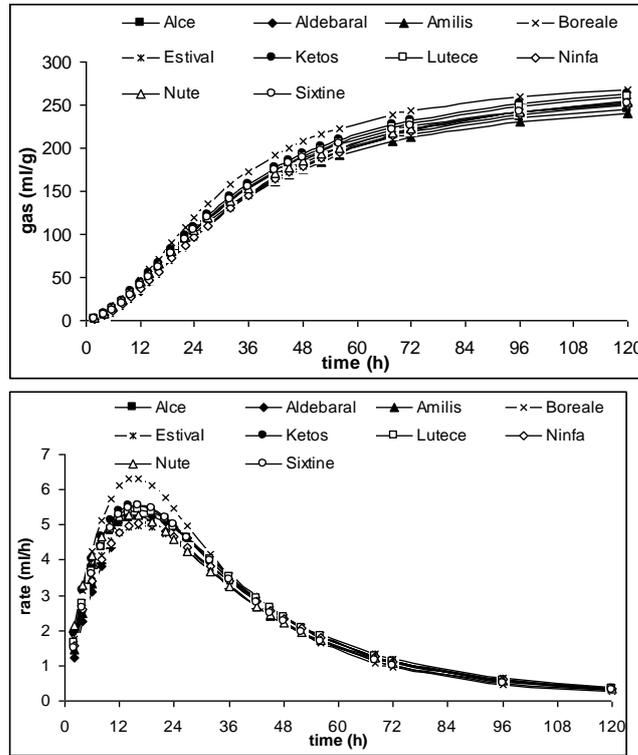
Tabella 6. *Composizione chimica, pH e valore nutritivo degli insilati di orzo.*

Cultivar	SS	PG	NDF	ADF	ADL	pH	ENII
		<i>% DM</i>					<i>MJ/kg ss</i>
Alce	26.5	9.6	65.7	40.2	6.0	5.13	3.91
Aldebaran	27.3	9.8	65.1	45.7	5.6	5.36	4.06
Amilis	25.5	8.2	69.1	43.7	6.7	5.42	3.67
Boreale	25.6	9.0	66.1	41.2	4.1	5.26	4.33
Estival	28.4	8.5	67.5	45.3	5.3	4.58	3.58
Ketos	27.0	8.2	69.4	46.8	5.8	5.19	3.89
Lutece	27.7	9.0	65.2	44.5	6.0	5.33	4.14
Ninfa	24.3	9.5	68.5	42.5	5.7	5.07	4.03
Nute	24.6	9.7	62.1	43.0	5.2	4.77	4.18
Sixtine	24.9	9.5	67.6	44.6	4.7	5.08	4.25

Tabella 7 Caratteristiche di fermentazione degli insilati di orzo.

Cultivar	pH	dSO	OMCV	A	B	tmax	Rmax
		<i>%</i>	<i>ml/g</i>	<i>ml/g</i>	<i>h</i>	<i>h</i>	<i>ml/h</i>
Alce	6.64	63.7B	228CD	271B	32.6B	15.2	5.15B
Aldebaral	6.65	61.3C	236BC	273B	33.1A	17.9	5.25C
Amilis	6.68	60.7C	223D	261B	32.2B	16.5	5.10B
Boreale	6.65	67.1A	250A	285A	28.6C	15.3	6.35A
Estival	6.69	63.6B	236BC	286A	35.3A	16.0	5.01C
Ketos	6.67	63.5C	245AB	289A	32.2B	15.3	5.56B
Lutece	6.69	61.5C	242BC	284A	32.6B	16.4	5.44B
Ninfa	6.65	63.8B	231CD	276A	34.0A	16.6	5.07C
Nute	6.65	61.3C	234C	281A	32.6B	14.3	5.30B
Sixtine	6.73	63.0BC	237BC	271B	30.9B	16.3	5.56
MSE	0.0035	0.785	16.34	33.02	0.909	1.47	0.0376

Figura 6. Produzione di gas e cinetica di fermentazione degli insilati.



La produzione di AGV è riportata in tabella 8. In accordo con le più elevate produzione di gas e degradabilità della sostanza organica, la cultivar Boreale ha fatto registrare le maggiori produzioni ($P < 0.01$) di acido acetico (67.23 mM/g) e butirrico (7.137 mM/g). Essa inoltre ha mostrato la più elevata produzione totale di AGV (109.2 mM/g), anche se tale valore non è risultato statisticamente diverso da quelli forniti dalle cultivar Amilis, Ninfa e Sixtine. La Lutece ha fatto registrare la minore (26.13 mM/g) produzione di AGV.

Nel grafico 7 si riportano i prodotti finali della fermentazione. Mediamente i rapporti AGV/dSO (*mM/mg*) e gas/AGV (*mM/mM*) sono risultati pari a 0.090 ± 0.0040 e 1.963 ± 1.015 , rispettivamente, in accordo con quanto rilevato per altri foraggi insilati.

I risultati ottenuti con la presente indagine volta alla valutazione in vitro delle caratteristiche di fermentazione dell'insilato ottenuto dalla pianta intera di orzo, consentono di affermare quanto segue che l'insilato di orzo sembra rappresentare una interessante alternativa nelle razioni per bufale e bovine in lattazione. In termini di composizione chimica e in particolare di valore nutritivo, infatti, sono

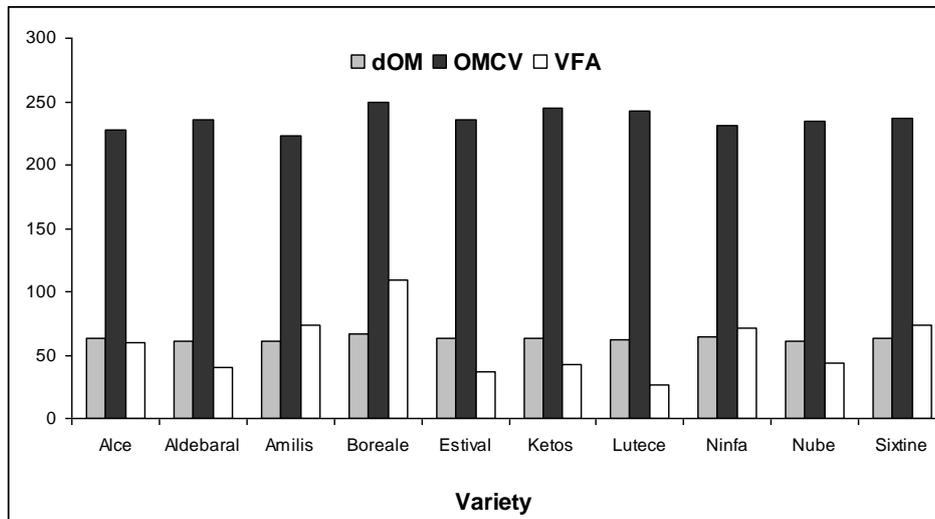
stati registrati valori sovrapponibili a quelli forniti dall'insilato di mais.

Tabella 8. Produzione in vitro di AGV (mM/g) dei dieci insilati di orzo..

Cultivar	Acetic	Propionic	Iso-butir	Butir	Iso-valer.	Valer.	tAGV
Alce	34.00 ^B	19.41	0.730	4.762 ^A	0.656	0.431	59.99 ^B
Aldebaral	55.93	30.13	0.924	2.750	0.587	0.355	40.17 ^B
Amilis	45.27 ^B	21.14	0.916	5.504 ^A	0.700	0.459	73.95 ^A
Boreale	67.23 ^A	30.83	2.452	7.137 ^A	1.006 ^A	0.503	109.2 ^A
Estival	50.31	22.98	0.985	0.972 ^B	0.192 ^B	0.175	36.29 ^B
Ketos	58.61	26.27	0.962	2.659	0.690	0.183	42.25 ^B
Lutee	34.73 ^B	16.94	1.015	2.027	0.372	0.274	26.13 ^B
Ninfa	43.49	20.60	0.893	4.885 ^A	0.678	0.502	71.05 ^A
Nube	56.01	25.02	1.009	3.418	0.816 ^A	0.391	43.41 ^B
Sixtine	46.22	20.99	0.782	4.744 ^A	0.625	0.515	73.87 ^A
MSE	141	34.4	0.674	2.33	0.049	0.028	222

tAGV: totale acidi grassi volatili; A,B: P < 0.01; MSE: mean square error

Figura 7. Fermentazione *In vitro* dei dieci insilati di orzo



dOM: degradabilità sostanza organica (%); OMCV (ml/g): gas prodotto dopo 120 h di fermentazione.

VFA (mM/g): acidi grassi volatili.

MATERIALE E METODI prova in vivo

L'insieme dei dati ottenuti sulla performance delle dieci varietà di orzo considerate ha permesso di individuare la Lutece come la migliore per diversi aspetti agronomici, produttivi e qualitativi.

Per l'indagine, effettuata presso l'azienda Barchiesi, e della durata di 150 giorni, sono state impiegate 40 bufale pluripare (PV: kg 650 ± 12) che subito dopo il parto sono stati suddivisi equamente in due gruppi in funzione dell'ordine di parto e della produzione latteata ottenuta nella precedente lattazione.

I due gruppi hanno ricevuto per tutta la durata della prova (150 d) I due gruppi hanno ricevuto due diete isoenergetiche e isoproteiche (ENI: 6.39 MJ/kg SS; 15.4 PG %SS), costituite da 18 kg t.q./capo di insilato di mais (gruppo M) o insilato di orzo cultivar Lutece (gruppo O), mangime concentrato (7 kg t.q./capo; PG 22%) formulato a partire da materie prime presenti in azienda, fieno di erba medica (4 kg t.q./capo) e supplemento vitaminico-minerale.

A cadenza mensile, campioni degli alimenti sono stati sottoposti ad analisi chimica (AOAC 2000; Van Soest et al., 1991).

Per gli insilati si è proceduto anche alla incubazione in vitro per la valutazione della produzione cumulativa di gas (Theodorou et al.

1994) e ne è stato calcolato il valore nutritivo (Menke and Steingass, 1988) impiegando l'equazione:

$$\text{ENI (MJ/kg SS)} = 0.54 + 0.0959 \text{ GP} + 0.0038 \text{ PG} + 0.0001733 \text{ PG}^2$$

dove GP rappresenta la produzione di gas a 24 h di incubazione (ml/200 mg SS) e PG il contenuto in protidi grezzi del substrato (g/kg SS).

Di tutti i soggetti in prova è stata registrata la produzione giornaliera di latte e, a cadenza mensile, campioni individuali di latte, ottenuti ponderando le quantità ottenute dalle due mungiture giornaliere, sono stati raccolti e analizzati, con metodo all'infrarosso (Milko Scan 133B, Foss Matic, Hillerod, Denmark) per il contenuto in grasso, proteine e lattosio.

Si è provveduto, inoltre a determinare il profilo acidico del grasso dei due insilati e del latte. L'estrazione del grasso dagli insilati è stata effettuata con una soluzione di cloroformio/metanolo (2/1 v/v) come indicato da Folch et al. (1957). Mentre per determinare il profilo acidico del latte la separazione è stata effettuata, utilizzando una miscela di esano-isopropanolo (3/2 v/v) come descritto da Hara & Radin (1978). In entrambi i casi gli acidi grassi estratti sono stati *trans*

metilati mediante la procedura base-catalizzata descritta da Christie (1982) e modificata da Chouinard *et al.* (1999).

Gli esteri metilici degli acidi grassi sono stati quantificati usando un gas cromatografo delle serie FOCUS, fornito di detector a ionizzazione di fiamma (ThermoElectron Corporation, Rodano - Milano- Italia) attraverso una colonna capillare (CP-SIL 88 fused silica capillary column, 100 m x 0.25 mm di diametro interno con 0.2- μ m di spessore del film; Varian, Inc. Walnut Creek, CA). L'analisi è stata effettuata con la seguente rampa di temperatura: 75°C per 2 min \rightarrow 5°C/min \rightarrow 170°C per 40 min \rightarrow 5°C/min \rightarrow 220°C per 24 min. Le temperature di iniettore e detector sono state impostate a 270°C. La pressione del gas di trasporto (elio) è stato di 180 kPa.

I flussi degli altri gas sono riportati di seguito:

- idrogeno 30 ml/min;
- aria 350 ml/min;
- gas make-up (azoto) 45 ml/min.

I picchi degli acidi grassi sono stati identificati mediante il confronto con una miscela standard di esteri metilici di acidi grassi (Larodan Fine Chemicals, AB, Limhamnsgårdens Malmö, Sweden), così composta: C4:0 (butirrico), C6:0 (caproico), C8:0 (caprilico), C10:0

(caprico), C11:0 (undecanoico), C12:0 (laurico), C13:0 (tridecanoico), C:14:0 (miristica), C14:1 (miristoleico), C15:0 (pentadecanoico), C15:1 (pentadecanoico *cis*-10), C16:0 (palmitico), C16:1 (palmitoleico), C17:0 (eptadecanoico), C17:1 (eptadecanoico *cis*-10), C18:0 (stearico), C18:1 n-9 *trans* (elaidico), C18:1 n-9 *cis* (oleico), C18:2 n-6 *trans* (linolelaidico), C18:2 n-6 *cis* (linoleico), C20:0 (arachidonico), C18:3 n-6 (γ -linolenico), C20:1 (eicosanoico), C18:3 n-3 (linolenico), C21:0 (eneicosanoico), C20:2 (eicosadienoico), C22:0 (beenico), C20:3 n-6 (eicosatrienoico), C22:1 n-9 (erucico), C20:3 n-3 (eicosatrienoico), C20:4 n-6 (eicosatetraenoico), C23:0 (tricosanoico), C22:2 *cis*-13 (docosadienoico), C24:0 (lignocerico), C20:5 n-3 (eicosapentanoico), C24:1 (nervonico), C22:6 n-6 (docosaesapentanoico).

L'identificazione dei diversi isomeri del CLA del latte è stata effettuata confrontando i cromatogrammi dei campioni con quelli di singoli isomeri purificati (CLA *cis*-9, *trans*-11; CLA *trans*-10, *cis*-12; CLA *cis*-9, *trans*-11; CLA *trans*-9, *trans*-11), (Larodan Fine Chemicals, AB, Limhamnsgårdens Malmö, Sweden).

Analisi statistica

I dati quanti-qualitativi della produzione latte sono stati sottoposti ad analisi della varianza usando la procedura GLM (General Linear Model) del SAS (2000). Il confronto fra le medie è stato effettuato mediante Tukey test (SAS, 2000).

RISULTATI prova in vivo

La composizione chimica dell'insilato di mais (tabella 9) è risultata sovrapponibile a quella riscontrata in precedenti prove effettuate dal nostro gruppo di ricerca nella stessa area di indagine (Calabrò et al., 2007).

L'insilato di orzo ha fatto registrare contenuti in sostanza secca e in protidi grezzi simili a quelli dell'insilato di mais, mentre superiori sono risultati i valori delle frazioni fibrose. Tuttavia, probabilmente a causa di un maggior contenuto in emicellulose (NDF-ADF) nell'insilato di orzo (22.0 vs 16.9%), il valore nutritivo dei due insilati è risultato di poco differente.

In tabella 10 vengono riportati, per entrambi gli insilati oggetto della prova, soltanto gli acidi grassi più rappresentativi, espressi come percentuale del totale degli acidi grassi. I valori di tutti gli acidi grassi considerati, pur appartenendo a diverse classi di saturazione, sono risultati quasi sovrapponibili tra i due insilati.

I valori da noi rilevati per entrambi gli insilati non si discostano da quanto riportato da altri autori (Morand-Fehr et al, 2001 INRA Prod. Anim., 14,5, 285-30; Mir et al., 2000).

La produzione media di latte (tabella 11) è risultata sovrapponibile nei due gruppi a confronto (7.94 vs 8.09 kg/d, per i gruppi M e O, rispettivamente), così come il suo contenuto in lattosio (5.01 vs 5.0%), mentre gli animali alimentati con insilato di orzo hanno fatto registrare contenuti significativamente superiori di grasso (8.39 vs 9.06%; $P < 0.01$) e di proteine (4.41 vs 4.60%; $P < 0.01$).

In merito al maggior contenuto in grasso, è probabile che abbia contribuito a tale risultato la maggiore digeribilità dell'NDF dell'insilato di orzo che, tra l'altro ha fatto registrare valori superiori di emicellulose.

Ipotesi simile è stata suggerita da altri autori (Miron et al., 2007) che avevano riscontrato una maggiore digeribilità dell'NDF dell'insilato di sorgo rispetto quello del mais, a parità di contenuto in lignina. Essi giustificarono il risultato attribuendo alla maggior presenza di granella del mais una azione inibitoria dell'attività dei batteri cellulosolitici del rumine. In prove precedenti effettuate dal nostro gruppo di ricerca (Infascelli et al., 2012), che avevano previsto l'impiego dell'insilato di sorgo in alternativa a quello di mais, era stata registrata una produzione media di latte significativamente maggiore per il gruppo di bufale alimentate con insilato di sorgo (kg/d 9.9 vs

9.0; $P < 0.05$). Anche le percentuali di grasso e di proteine risultarono più elevate nel gruppo Sorgo, ma in questo caso le differenze non raggiungevano la significatività statistica. In quel caso fu ipotizzato che la maggiore produzione di latte rilevata per il gruppo Sorgo, potesse essere ascritta alla minore percentuale di lignina presente nell'insilato di sorgo, con riflessi positivi sulla digeribilità dell'NDF.

Per quanto concerne il profilo acidico del grasso del latte in funzione del tipo di foraggio impiegato nell'alimentazione delle bufale, non sono state rilevate differenze significative tra i gruppi. In merito è da sottolineare che tale risultato è linea con quanto riportato in precedenza per la composizione acidica dei due insilati oggetto della prova.

Analoghi risultati sono stati riportati recentemente da Bilik et al. (2012) che in una indagine condotta su bovine frisone alimentate nella seconda fase di lattazione con insilato di mais vs insilato di orzo non rilevarono alcuna differenza significativa sulla produzione di latte né sulla sua composizione chimica, sul profilo acidico del grasso e sulle sue proprietà tecnologiche.

In ogni caso è da sottolineare, dal punto di vista delle qualità dietetico-nutrizionali del latte di bufala, la più che soddisfacente

concentrazione di CLA rilevato nel presente studio in entrambi i gruppi di animali, come già riportato da Secchiari et al. (2005) in prove effettuate su bufale allevate al pascolo e da Cutrignelli et al. (2005) che impiegarono nella dieta delle bufale in lattazione i semi di lino, materia prima ricca in acido linoleico.

Tabella 9. Composizione chimica (% ss) e valore nutritivo (ENI, MJ/kg ss) degli insilati di mais (M) e orzo (O)

	SS (%)	PG	NDF	ADF	ADL	ENI
M	28.2	8.2	53.1	36.2	4.3	4.16
O	27.7	9	62.2	40.2	4.2	4.14

Tabella 10 Composizione acidica (% acidi grassi totali) degli insilati

	Mais	Orzo
C16:0	21.7	21.5
C18:0	2.4	2.5
C18:1	28.4	24.8
C18:2	34.6	33.9
C18:3	5.0	4.8

Tabella 11. Produzione quanti-qualitativa di latte dei due gruppi alimentati con insilato di mais (M) o insilato di orzo (O)

	M	O
Produzione kg/d	7.94 ± 0.8	8.09 ± 1.0
Grasso %	8.39 ± 0.3 B	9.06 ± 0.4 A
Proteine %	4.41 ± 0.3 B	4.60 ± 0.6 A
Lattosio %	5.10 ± 0.2	5.00 ± 0.2

Profilo acidico (% AG totali)

C4:0	4.03 ± 0.3	4.11 ± 0.2
C6:0	1.92 ± 0.1	1.89 ± 0.2
C8:0	0.93 ± 0.01	0.94 ± 0.06
C10:0	2.10 ± 0.4	1.99 ± 0.4
C12:0	2.50 ± 0.3	2.60 ± 0.3
C14:0	12.0 ± 2.0	11.9 ± 1.8
C16:0	32.4 ± 4.0	32.7 ± 4.2
C16:1	1.42 ± 0.1	1.40 ± 0.2
C18:0	13.0 ± 2.4	13.4 ± 2.2
C18:1	24.0 ± 3.0	23.9 ± 3.0
C18:2	2.58 ± 0.2	2.61 ± 0.2
C18:3 n6	0.58 ± 0.01	0.61 ± 0.02
C18:3 n3	0.09 ± 0.001	0.09 ± 0.002
CLA c9t11	0.771 ± 0.01	0.781 ± 0.01
CLA t10c12	0.060 ± 0.001	0.06 ± 0.001
CLA c9c11	0.040 ± 0.001	0.04 ± 0.001
CLA t9t11	0.010 ± 0.001	0.01 ± 0.001
tot CLA	0.881 ± 0.01	0.090 ± 0.01

A, B: P < 0.01;

CONCLUSIONI

La sostituzione dell'insilato di mais con quello integrale di orzo nella dieta per bufale in lattazione ha fornito risultati incoraggianti.

Infatti, mentre la produzione quantitativa non è stata influenzata dalla dieta, il latte fornito dai soggetti alimentati con l'insilato di orzo ha mostrato contenuti significativamente superiori di grasso e di proteine. Caratteristiche queste ultime che, alla luce della esclusiva destinazione alla trasformazione casearia del latte di bufala, rappresenta un risultato di indubbio interesse.

In conclusione, i risultati della presente indagine assumono importanza in aree dove, per gli elevati costi di irrigazione la coltura del mais risulta economicamente poco vantaggiosa.

In particolare nelle regioni meridionali caratterizzate da aree con climi semi- aridi, l'impiego di insilato di orzo appare molto interessante e di tutta attualità, anche dal punto di vista ambientale. Infatti, l'anticipo della raccolta della pianta intera rispetto alla coltura da granella, consente di sfruttare un periodo più lungo per la seconda coltura. Tale sistema produttivo consente l'ottimizzazione delle risorse terreno e idriche.

2° contributo sperimentale

Impiego della fava in alternativa alla soia nella dieta di vitelloni bufalini in accrescimento: effetti sulla qualità della carne

Introduzione

L'allevamento del bufalo da carne in passato veniva effettuato dai latifondisti, che utilizzavano i terreni marginali per i vitelli che venivano abbattuti ad oltre due anni di età. La carne di questi animali non sempre è stata apprezzata dal consumatore, in quanto quella derivante da soggetti in buono stato di nutrizione veniva venduta come bovina mentre quella di qualità scadente veniva proposta ai consumatori come carne di bufalo. Ciò non ha incentivato i consumi di tale derrata, in special modo nelle zone tradizionali di allevamento. Già in passato esistevano pareri discordanti circa le caratteristiche qualitative e di sapidità della carne, probabilmente legate alla tipologia di allevamento dei soggetti destinati al macello (Campanile et al., 2001b). Secondo Vito Antonio Ascolesi (1852) *“la carne del bufalo è dura e disgustosa al palato, e ripugnante all’odorato, anche quando l’animale è giovine”* mentre per Almerico Cristin (1862) *“quando il bufalo è giovane è men cattiva; anzi la carne del bufalino di un anno, detto annutolo, è eccellente, né distinguersi affatto da quello del vitello.....; e c’è chi dice preferirsi quella a questa per aroma e squisitezza”*, dello stesso parere è Giuseppe Santini (1903) “

quella dei bufalotti è assai pregiata e, mangiata inconsciamente, può senza dubbio passare per carne di bovino..... La carne di bufala vien mangiata in Italia anche affumicata e salata, e come tale, se ne può ritrarre anche un prezzo molto maggiore, giacchè si mantiene per mesi senza alterarsi”.

L’interesse nel valorizzare il bufalo anche come produttore di carne non è di sicuro una esigenza dei nostri tempi, ma ha radici che se pur molto lontane nel tempo sono vicine alla nostra tradizione e cultura alimentare. Risale al 1874 uno studio dello Zoccoli dal titolo *"Sulle carni bovine e bufaline e su quelle degli altri animali da macello"*, indagine dalla quale si evince già da quegli anni una volontà di approfondire l’interesse nei confronti delle carni di questo animale. L’autore condusse le sue ricerche presso il macello di Napoli e calcolò in bufale adulte una resa in peso morto variabile fra il 44% ed il 53%. Una ulteriore convalida di un remoto utilizzo del bufalo come produttore di carne viene fornita da Stazi (1910), il quale riporta in una sua analisi statistica sulle macellazioni tra il 1900 ed il 1910, un totale di 17.674 capi bufalini mattati tra Roma e Napoli.

L'allevamento del bufalo da carne, attività vicina alle radici storiche della nostra comunità, oltre che ricca in termini culturali, può fornire un prodotto con standard qualitativi che garantiscono ai consumatori elevati livelli di sicurezza.

Campanile Castaldo (1960), in una sua analisi storica afferma che la carne di bufalo era addirittura conosciuta già in epoca romana e riporta che *“i giudei della colonia ebraica erano soliti consumare questa carne nel primo giorno del loro anno accompagnandola con cavoli”* secondo una loro tradizionale usanza.

Da altre fonti viene riportato testualmente che ebrei residenti a Napoli e a Roma erano consumatori abituali di carne di bufalo, sia di animali adulti che di bufalotti. La prima presentava talvolta un sapore disgustoso definito “muschiatico”, la seconda era “assai pregiata e, mangiata inconsciamente, può senza dubbio passare per carne di bovino”. Veniva venduta sia fresca che affumicata e salata. (Zicarelli, 1990). Tale differenza di qualità e di giudizio tra la carne di un animale giovane e quella di un animale adulto è sicuramente da imputare al fatto che gli adulti macellati erano senz'altro animali a fine carriera, vecchi che avevano vissuto a lungo allo stato brado.

Per evitare che queste frodi possano perpetuarsi nel tempo e per iniziare un'opera di valorizzazione della carne bufalina è stata proposta la creazione di un disciplinare che preveda la commercializzazione soltanto di soggetti il cui accrescimento non ha superato o non è risultato al di sotto di incrementi ponderali fisiologici, al fine di fornire al consumatore quelle garanzie di sicurezza che da anni richiede. L'anagrafe bestiame, che permette di risalire alla data di nascita, potrebbe essere uno strumento validissimo per verificare se il peso alla macellazione è in accordo con i suddetti accrescimenti. Questo rappresenta un target davvero indispensabile per il decollo del settore (Campanile et al., 2001b). A tal proposito è fondamentale considerare che, negli ultimi anni, si è registrata una disaffezione del consumatore nei riguardi delle carni storicamente utilizzate nell'alimentazione. In particolare per quella bovina hanno giocato un ruolo sfavorevole le modalità di allevamento, le notizie di accrescimenti ottenuti con sostanze potenzialmente dannose per la salute umana e le non remote vicissitudini relative alla BSE.

E' pertanto venuto progressivamente ad affermarsi, soprattutto in fasce elitarie del mercato, il consumo di carni alternative non

tradizionali. Ciò ha fatto tornare di attualità le ricerche condotte sin dai primi anni '60 presso il Dipartimento di Scienze Zootecniche e Ispezione degli alimenti, della Facoltà di Medicina Veterinaria di Napoli, ed i successivi contributi degli studiosi dell'Istituto Sperimentale per la Zootecnia di Roma e dell'ex Istituto di Produzione Animale - Facoltà di Agraria - sulle attitudini alla produzione carnea del bufalo mediterraneo allevato in Italia.

Il patrimonio bufalino italiano, infatti, ammonta a circa 370 mila capi. Anche prevedendo un suo costante incremento negli anni a venire, esso comunque potrà fornire quantità di carne che contribuiranno in maniera marginale alla copertura dei consumi. Pertanto, è possibile ipotizzare una sua commercializzazione esclusivamente come carne a qualità garantita, intendendo per tale non solo le caratteristiche nutrizionali ed organolettiche, ma anche l'osservanza, in ogni fase della filiera produttiva, di rigorose norme a tutela della salute del consumatore e del benessere animale.

In merito alle qualità dietetico-nutrizionali, come già riportato in precedenza, particolare attenzione viene rivolta dal consumatore al profilo acidico dei grassi alimentari nonché al contenuto in CLA delle derrate.

I CLA, acronimo dell'acido linoleico coniugato, sono un gruppo di isomeri di posizione e geometrici degli acidi grassi derivati dell'acido ottadecadienoico, con riconosciute proprietà immunomodulanti, antitumorali e antiaterosclerotiche, di cui il latte e la carne sono la principale fonte alimentare (Parodi, 1999).

L'isomero principale dei CLA è l'acido cis-9, trans-11 o acido rumenico, che rappresenta fino all' 80% dei CLA totali.

I CLA nei prodotti dei ruminanti originano da due fonti: 1. Bioidrogenazione ruminale ; 2: sintesi endogena nella ghiandola mammaria e nel tessuto adiposo ad opera dell'enzima Stearoil-CoA desaturasi (SCD) sul trans-11 C18: 1 (TVA, acido transvaccenico), prodotto intermedio della bioidrogenazione ruminale di alcuni acidi grassi polinsaturi (PUFA) (Griinari et al., 2000).

Lo Stearoil-CoA desaturasi (SCD) è un complesso multienzimatico che include NADH- citocromo b5-reduttasi, citocromo b5, acil -CoA sintetasi e Δ 9-desaturasi.

Il gene SCD codifica per una proteina di 359 residui di aminoacidi e si trova nel reticolo endoplasmatico e catalizza l'inserzione di un doppio legame cis tra il carbonio 9 e 10 su diversi acidi grassi, soprattutto dal C14 al C19. I prodotti di questa reazione sono componenti importanti dei fosfolipidi e dei trigliceridi, principalmente coinvolti nella fluidità della membrana cellulare.

L'espressione dell'SCD è influenzata dalla specie animale, dal tipo di tessuto, dalla dieta, dall'età dell'animale nonché dalla somministrazione di CLA (Choi et al., 2000). Alcuni PUFA si pensa possano inibire l'attività dell'SCD attraverso la regolazione dell'espressione del suo gene (Yang et al., 1999).

Nei ruminanti il gene SCD (Bernard et al., 2001), genera un trascritto di 5 kb che è stato caratterizzato negli ovini (Ward et al., 1998), nei bovini (Chung et al., 2000) e nei caprini (Bernard et al., 2001). E' organizzato in 6 esoni e 5 introni.

Nelle capre, la sequenza 3' UTR deriva da un singolo esone ed è insolitamente lunga (3,8 Kb), così come nell'uomo (Zhang et al., 1999). Inoltre la sequenza 3'-UTR è caratterizzata dalla presenza di numerosi elementi adenina-uracile, che rendono l'mRNA instabile, e

presenta un polimorfismo con la presenza o l'assenza di una tripletta di nucleotidi (TGT) in posizione 3178-3180 (GenBank AF325499).

Negli ovini, immediatamente dopo il parto vi è un aumento di m-RNA che codifica per SCD. Nelle capre in lattazione, il gene SCD è altamente espresso nella ghiandola mammaria e nel tessuto adiposo sottocutaneo (Bernard et al., 2001).

Nella ghiandola mammaria durante la lattazione, il palmitoleoyl-CoA e l'oleico-CoA sono sintetizzati a partire da palmitoil-CoA e stearoil-CoA tramite l'azione dell'enzima SCD.

Inoltre, nella ghiandola mammaria dei bovini, l'SCD è responsabile della sintesi della maggior parte degli isomeri del CLA cis-9, trans-11, trans-7 e cis-9.

La regione promotorice del gene SCD del bovino è stata recentemente caratterizzato, e una regione di importanza critica, designata alla trascrizione di stearoil-CoA desaturasi come elemento trascrizionale (STE) e contenente tre complessi vincolante, è stata identificata nelle cellule MAC-T. Inoltre, questa regione STE ha dimostrato di giocare un ruolo chiave nella effetto inibitorio sulla trascrizione del gene SCD del CLA cis 12 trans 10 e, in misura minore, di CLA cis-9, trans-11.

Nei bovini, sono stati identificati 8 SNP (polimorfismi a singolo nucleotide), di cui 3 all' esone 5. I primi due sono mutazioni silenziose, mentre la terza causa un cambiamento della valina con alanina al nucleotide 293. Ciò determina la presenza di due aplotipi che potrebbe avere un'attività diversa a causa del fatto che il cambiamento di aminoacido si verifica nella regione catalizzante.

Medrano et al. (1999) hanno dimostrato l'influenza del gene SCD nel profilo degli acidi grassi della carne. Infatti, l'aplotipo con alanina causa un più alto contenuto di acidi grassi monoinsaturi (MUFA) di quello contenente valina.

Il gene SCD del bufalo presenta una estensione di circa 15,5 kb (EMBL Acc. No. AM600640). Anche in questa specie il polimorfismo del gene SCD sembra influenzare la sua espressione nella ghiandola mammaria (Moioli *et al.*, 2005) e nel muscolo (Pauciullo *et al.*, 2007). Questi ultimi autori (Pauciullo *et al.*, 2010) hanno studiato nel bufalo Mediterraneo il gene SCD, e dimostrato la presenza di 15 siti polimorfici, uno dei quali realizzato al 231° nucleotide dell'esone 5, responsabile di uno scambio di aminoacidi ($GCG^{Ala} \rightarrow GTG^{Val}$). Similmente a quanto osservato nel bovino, a

questa transizione potrebbe essere ascrivito un diverso contenuto di grassi monoinsaturi nel latte e nella carne bufalina.

Nei roditori la regolazione dell'espressione genica SCD da parte di fattori dietetici quali gli acidi grassi è stata largamente studiata nel tessuto epatico e adiposo (Ntambi, 1999) e in misura minore nella ghiandola mammaria (Singh *et al.*, 2004). In queste specie, l'SCD si basa su diversi geni la cui espressione è tessuto-specifica così come la loro down - regulation attraverso i PUFA. Al contrario, negli ovini (Ward *et al.*, 1998) e nei caprini (Bernard *et al.*, 2001) esiste un solo gene SCD, e, in accordo con Bernard *et al.* (2005) è possibile che nei ruminanti la ghiandola mammaria dei ruminanti in lattazione e il tessuto adiposo siano meno sensibili alla manipolazione dietetica da PUFA.

Attualmente, le strategie di alimentazione degli animali sono orientati sia in ruminanti sia nei monogastrici verso la riduzione nei prodotti animali degli acidi grassi saturi e il contemporaneo aumento di quelli insaturi, soprattutto della serie omega-3, così come dell'acido linoleico coniugato (Wood *et al.*, 2008; Woods and Fearon, 2009).

Nonostante la capacità dei microrganismi del ruminante a idrogenare parzialmente gli acidi grassi polinsaturi, aumentando gli acidi grassi saturi nei tessuti animali, attraverso la dieta sarebbe possibile modificare il profilo acidico dei grassi (Wood and Enser, 1997; Wood *et al.*, 1999; Priolo *et al.*, 2001).

In alimentazione animale, la ricerca di fonti proteiche alternative ha portato ad un crescente interesse per l'uso di legumi da granella, in quanto forniscono una importante fonte di proteine vegetali.

Dal 2001 la Commissione europea ha vietato l'uso di farine di carne e ossa e loro derivati nelle diete per animali d'allevamento (direttiva CE 999/2001) al fine di assicurare la sicurezza dei consumatori sui prodotti animali. Di conseguenza la soia è diventata la fonte proteica più utilizzata nei sistemi di allevamento intensivo.

La farina di estrazione di soia (soia s.e.) rappresenta un sottoprodotto dell'industria olearia, in quanto i semi di soia sono trattati con solventi organici (esano, ad esempio) e, successivamente, con alte temperature. Per questo motivo la soia s.e. è stata vietata nella zootecnia biologica (direttiva CE 2092/1991; direttiva CE 834/2007).

Anche se in Europa la maggior parte della soia è importata, la soia f.e. rappresenta la fonte di proteine meno costosa per il suo alto contenuto di proteina grezza (44-50%).

Tuttavia i costi e la disponibilità di questo sottoprodotto sono fortemente correlati con l'andamento dei prezzi dei prodotti agricoli sul mercato mondiale (Jezierny *et al.*, 2010).

I fattori che possono influenzare i prezzi sul mercato mondiale includono variazioni della popolazione e la crescita economica, i cambiamenti nelle preferenze dei prodotti da parte dei consumatori e dalle condizioni climatiche (Gill, 1997; Trostle, 2008).

Infine, un altro fattore da valutare è che larga parte della soia presente sul mercato risulta geneticamente modificata (GM); in merito, nonostante per diversi anni non vi è stata alcuna prova diretta che ciò possa rappresentare un potenziale pericolo per la salute, recentemente una serie di lavori sono stati pubblicati con risultati controversi.

Le leguminose da granella appartengono alla famiglia botanica delle *Fabaceae* o *zas Leguminosae*. Sono coltivate principalmente per i loro semi, ricchi di proteine ed energia e impiegati sia in

alimentazione animale che umana. In particolare, fagioli, lenticchie e ceci sono utilizzati esclusivamente per quest'ultima.

In Italia la coltivazione di legumi è progressivamente aumentata grazie alla presenza di nuove cultivar più resistenti e produttive, selezionate principalmente in Francia e caratterizzate da minori esigenze idriche e con maggiore resistenza alle infestazioni parassitarie alle condizioni ambientali avverse.

In generale, i legumi sono caratterizzati dalla loro capacità di utilizzare l'azoto atmosferico, grazie alla simbiosi con batteri azotofissatori della specie *Rhizobium* (Sprent and Thomas, 1984). Pertanto, le colture di leguminose hanno minore necessità di fertilizzanti azotati per una crescita ottimale, e l'uso di legumi in sistemi di rotazione delle colture riduce la necessità di fertilizzanti azotati nelle colture successive (López-Bellido *et al.*, 2005). Il beneficio del sistema di rotazione leguminose-cereali è stato attribuito non solo al trasferimento di azoto biologicamente fissato, ma anche a una più bassa mobilizzazione di nitrati nel suolo durante la decomposizione dei legumi rispetto ai cereali (Díaz-Ambrona and Mínguez, 2001). Inoltre, la rotazione delle colture e la consociazione con altri legumi possono fornire strategie di successo per la soppressione delle

infestanti (Bulson *et al.*, 1997). Infatti, la crescita di erbe infestanti e il loro sviluppo può essere interrotto attraverso l'impiego di diverse colture impedendo così il dominio di solo un paio di specie infestanti (Liebman and Janke, 1990).

Proprio per questi effetti la coltivazione di leguminose da granella è elemento fondamentale della rotazione delle colture, in particolare in agricoltura biologica (Badgley *et al.*, 2007).

In alimentazione animale le leguminose da granella sono principalmente utilizzate come fonti proteiche, ma anche energetiche, per il loro elevato contenuto in amido (fava, piselli) e lipidi (lupini)(Salgado *et al.*, 2002).

Tuttavia, il loro impiego può venire limitato a causa di concentrazioni piuttosto elevate di metaboliti secondari delle piante, noti anche come fattori antinutrizionali (ANFs), tra cui vanno menzionati i seguenti: tannini condensati, inibitori della proteasi, alcaloidi, lectine, saponine e glucosidi pirimidinici. Possibili effetti negativi di questi metaboliti secondari sono rappresentati da diminuzione della palatabilità (tannini, alcaloidi), ridotta digeribilità dei nutrienti (tannini, inibitori della proteasi, lectine), o addirittura effetti tossici (alcaloidi. (Huisman and Tolman, 2001).

Al contrario, un aumento di C18:2, C18:3 *n*-6, C18:2 CLA, C22:5 *n*-3 del totale degli *n*-3 è stato trovato nel profilo degli acidi grassi della carne di agnelli alimentati con ceci in sostituzione totale o parziale di farina di soia (Priolo *et al.*, 2003).

Per quanto è a nostra conoscenza, sono disponibili pochi dati sugli effetti dell'utilizzo di fava nella e composizione intramuscolare in acidi grassi.

Cutrignelli *et al* (2008 a, b), confrontando il profilo degli acidi grassi della carne di vitelloni di razza Marchigiana alimentati con fave vs soia trovarono livelli significativamente più elevati ($P < 0,01$) di acido stearico nei primi senza che ciò influenzasse in maniera rilevante la concentrazione totale di acidi grassi saturi, o gli indici di aterogenicità e di trombogenicità.

Recentemente Scerra *et al.* (2011) hanno rilevato un aumento del contenuto di acidi grassi polinsaturi *n*-3 nel grasso intramuscolare di agnelli alimentati con una dieta con piselli e fave (24% per entrambi i semi di leguminose) in sostituzione totale e parziale di farina di estrazione di soia, rispettivamente.

Allo scopo di apportare un ulteriore contributo a questa tematica, abbiamo effettuato lo studio di cui si riportano in questa sede

i risultati volto a studiare l'effetto della sostituzione totale della soia con leguminose da granella nella dieta del bufalo in accrescimento sulla composizione chimica e sul profilo acidico delle carni, sul suo contenuto in CLA nonché sull'espressione del gene SCD a livello del tessuto adiposo intramuscolare.

Anche in questa indagine è stata effettuata prima una prova *in vitro*, mediante la tecnica della produzione cumulativa di gas descritta in precedenza, nella quale sono stati poste a confronto granelle di leguminose (lupino, pisello e fava). Sulla scorta dei risultati di tale prova sono quindi stati formulati piani alimentari per i vitelloni bufalini da sottoporre alla prova *in vivo*.

Materiale e metodi prova in vitro

Si è provveduto ad effettuare la determinazione chimica (AOAC, 2000; Vam soest et al., 1991) e quella nutrizionale mediante la tecnica della produzione cumulativa di gas *in vitro* (IVGPT, Theodorou et al., 1994), delle seguenti granelle di leguminose: lupino dolce (*Lupinus* spp.) varietà Lublanc, Luteur e Multitalia; favino (*Vicia faba* L.) varietà Chiaro di Torre Lama, Irena, Lady, ProtHABAT69, Scuro di Torre Lama e Sicania; pisello proteico (*Pisum sativum*) varietà Alembo, Alliance, Attika, Corallo, Iceberg, Ideal e Spirale.

In particolare, per la IVGPT, per ciascuna granelle da testare, le singole *cultivar*, nonché un *pool* delle varie cultivar preparato in laboratorio, sono state pesate (1.0214 ± 0.0324 g) in bottiglie da siero in cui è stato aggiunto il tampone (79 ml) ed il liquido ruminale (10 ml) prelevato al momento della macellazione, da quattro bufali di circa 2 anni di età, di cui si conoscevano i regimi alimentari (fieno di graminacee a volontà e concentrato in quantità tale che la sostanza secca ingerita stimata presentasse un contenuto di PG pari al 12%). A questo punto le bottiglie sono state incubate a 39°C e in condizioni di anaerobiosi. Per ogni substrato sono state effettuate 3 replicazioni;

contestualmente sono state incubate 3 bottiglie di bianco che differiscono dalle altre soltanto per l'assenza dell'alimento e sono state utilizzate per correggere la produzione di gas e la degradabilità della sostanza organica.

Per misurare la pressione ed il volume del gas prodotto durante la fermentazione è stato usato il sistema manuale costituito da un trasduttore di pressione connesso, tramite una valvola, ad un dispositivo a tre uscite, descritto in precedenza.

Le letture di gas sono state effettuate ai seguenti tempi di incubazione: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 19, 22, 24, 27, 30, 33, 37, 44, 48, 53, 57, 72, 80 e 96 ore; le letture sono più frequenti durante le prime 48 ore di fermentazione, allorquando le pressioni interne aumentano rapidamente e richiedono una siringa più capiente per la misurazione del gas prodotto.

Modello matematico

Per ogni bottiglia i volumi cumulativi di gas (ml/g di sostanza organica incubata) ottenuti a ciascun tempo sono stati elaborati con il seguente modello (Groot *et al.*, 1996):

$$G(t) = A/[1+(B/t)^C]$$

dove G rappresenta la quantità di gas (ml/g) prodotta al tempo t; A la produzione potenziale di gas (ml/g); B il tempo (h) necessario per produrre una quantità di gas pari ad A/2; C una costante che definisce la forma della curva. Ammettendo l'esistenza di una relazione lineare tra produzione di gas e fermentazione del substrato, è possibile calcolare: la velocità massima di fermentazione R_{max} (ml/h) e il tempo a cui essa si raggiunge (T_{max} , h), mediante opportune equazioni (Bauer et al., 2001):

$$T_{max} = C * \{[(B - 1) / (B + 1)]^{1/B}\} R_M$$

$$R_{max} = [A * CB * B * (T_{max}(-B-1))] / [1 + CB * (T_{max}-B)]^2$$

Determinazioni alla fine dell'incubazione

Alla fine delle 96 ore di fermentazione, il contenuto di ciascuna bottiglia è stato filtrato attraverso crogioli a setto di vetro poroso (Schott-Duran, porosità #2) al fine di valutare la sostanza secca e organica residue determinate mediante essiccazione in stufa a 103°C ed incenerimento in muffola a 550°C; è stata, quindi, calcolata la sostanza organica degradata (dSO), per differenza tra quella incubata e quella residua. Inoltre, su 5 ml di filtrato di ciascuna bottiglia è stato

determinato il pH al fine di valutare il regolare svolgersi delle fermentazioni *in vitro*.

Elaborazione dei dati

Tutti i dati di fermentazione relativi ai parametri del modello (A, B, C, T_{\max} , R_{\max}), nonché al volume cumulativo di gas rapportato alla sostanza secca incubata (VCSO, ml/g), alla degradabilità della sostanza organica (dSO, %) e ai valori di pH sono stati elaborati mediante analisi della varianza (procedura GLM del pacchetto statistico SAS, 2000) secondo il modello: $y_{ij} = \mu + L_i + \varepsilon_{ij}$ dove: y rappresenta il singolo dato sperimentale, μ la media generale, L ($i = 1, 2, 3$) rappresenta l'effetto granella di Leguminosa (pool delle singole *cultivar*), e ε rappresenta l'effetto casuale dell'errore.

Risultati prova in vitro

In tabella 12 sono riportate le caratteristiche di composizione chimica delle singole varietà delle tre granelle di leguminose studiate.

In accordo con quanto riportato in bibliografia (Piccioni, 1989; Bovera et al., 2001) confrontando le tre diverse leguminose, il lupino mostra il più elevato contenuto in proteine grezze (36.3 ± 0.87 % s.s.) paragonabili a quelle della soia e lipidi grezzi (estratto etereo: 7.35 ± 1.97 % s.s.) rispetto al pisello (PG: 28.2 ± 1.86 % s.s. e EE: 0.73 ± 0.13 % s.s.) e al favino (PG: 26.3 ± 1.45 % s.s. e EE: 1.01 ± 0.07 % s.s.). Inoltre, la non trascurabile concentrazione in carboidrati di struttura del lupino (NDF: 29.91 ± 2.14 % s.s.) rende questa granella interessante come apporto di fibra strutturali nella razione dei poligastrici, dove, per soddisfare almeno parzialmente la richiesta in fibra effettiva, dovrebbe essere utilizzata intera o spezzata. La composizione chimica media del pisello proteico non appare molto diversa da quella del favino.

Per quanto riguarda le diverse *cultivar* nell'ambito di ciascuna leguminosa, complessivamente si evidenzia una minore variabilità nel lupino rispetto al favino e al pisello. In particolare, per il lupino la

varietà italiana Multitalia ha presentato il più alto contenuto in lipidi grezzi (9.54 % s.s.) rispetto alle due varietà francesi. Per favino e pisello il più elevato tenore in proteine è stato evidenziato nella varietà ProtHABAT69 (28.69 % s.s.) e Alembo (31.27 % s.s), rispettivamente.

In tabella 13 sono presentati i dati relativi alle caratteristiche di fermentazione *in vitro* delle singole varietà delle tre granelle di leguminose studiate e della soia. Per quest'ultima sono riportati i dati medi scaturiti da numerose indagini effettuate presso i nostri laboratori.

I valori di pH registrati alla fine delle 96 ore di incubazione ricadono in un intervallo compreso tra 6.35 e 6.72 e indicano che le fermentazioni *in vitro* hanno avuto un andamento normale; inoltre, risultano in linea con il contenuto proteico delle granelle (proteine grezze e pH: lupino > pisello > favino).

Considerando per ciascuna granella i pool delle varie cultivar la degradabilità della sostanza organica (dSO) risulta, come tutti i concentrati, molto elevata e statisticamente ($P < 0.05$) più bassa nel favino (90.9 % s.s.), rispetto a lupino e pisello (91.8 e 95.1 % s.s., rispettivamente) ed in ogni caso più bassa rispetto alla soia (96.5 %). La produzione di gas reale statisticamente ($P < 0.01$) più elevata è stata

osservata nel pisello (VCSO: 394 ml/g; $P < 0.01$), in linea con l'elevata degradabilità della sua sostanza organica. Nel lupino, invece, il gas prodotto risulta essere più basso (VCSO: 284 ml/g), probabilmente a causa dell'elevato contenuto in proteine grezze, che vengono degradate ma non contribuiscono alla produzione di gas.

Per quanto riguarda le singole varietà, nel lupino la Lublanc ha mostrato una produzione di gas significativamente ($P < 0.05$) più bassa (VCSO: 256 ml/g) ed una degradabilità maggiore (93.4 %) rispetto alle altre due varietà. Per il favino, la varietà Scuro di Torre Lama ha mostrato valori significativamente più bassi di dSO (87.8 %; $P < 0.01$) e VCSO (308 ml/g; $P < 0.05$) rispetto alle altre cinque cultivar. Per il pisello la varietà Spirale ha prodotto meno gas (VCSO: 344 ml/g) rispetto alle altre e la differenza è risultata statisticamente significativa ($P < 0.01$) con Alembo, Alliance e Attika mentre la degradabilità non ha mostrato differenze statisticamente significative.

Tabella 12. *Composizione chimica delle tre granelle di leguminose*

Cultivar	Sostanza secca	Proteine grezze	Fibra grezza % s.s.	Estratto etereo	NDF	ceneri
Lupino						
Lublanc	93.26	36.92	14.32	6.78	32.05	4.33
Lutteur	94.31	35.30	12.98	5.73	29.91	4.19
Multitalia	93.97	36.67	11.01	9.54	27.77	3.92
Favino						
Irena	89.22	25.62	7.96	1.05	20.94	3.99
Lady	88.48	25.17	6.37	1.02	25.82	4.21
Scuro di Torre Lama	90.55	26.91	6.33	0.90	21.75	4.32
Chiaro di Torre Lama	90.80	24.69	9.36	1.01	21.23	4.19
ProtHABAT69	90.60	28.69	6.47	1.10	18.21	4.51
Sicania	90.29	26.52	6.35	0.95	21.43	3.89
Pisello						
Alembo	88.49	31.27	5.99	0.73	21.60	3.94
Alliance	89.20	28.47	6.27	0.56	20.40	3.82
Attika	89.68	25.04	5.43	0.81	18.09	4.01
Corallo	88.80	28.50	4.61	0.80	21.82	3.69
Iceberg	90.08	27.30	5.80	0.78	22.75	4.12
Ideal	89.94	28.28	5.12	0.88	18.37	4.17
Spirale	93.00	28.74	5.11	0.55	19.05	4.30

Le cinetiche di fermentazione risultano di più facile comprensione se si osserva la figura 8, dove è rappresentata la produzione di gas e la velocità di fermentazione, in funzione del tempo dei *pool* delle tre leguminose studiate e della soia.

Dall'analisi dei grafici è evidente che il pisello è costituito da componenti caratterizzati da una maggiore fermentescibilità, sia in termini di entità che di velocità, infatti la sua produzione di gas nell'arco delle 96 ore di incubazione è sempre superiore rispetto alle altre due granelle, viene prodotta in minor tempo (B: 18.2 h; $P < 0.05$) e la velocità massima di fermentazione è statisticamente ($P < 0.05$) maggiore rispetto alle altre due granelle (R_{max} : 7.42, 10.06 e 12.60 ml/h per lupino, favino e pisello, rispettivamente). Una buona fermentescibilità del pisello è riportata anche da Buccioni et al. (2007) in uno studio *in vitro* su soia, favino e pisello; gli autori, sulla base dei loro risultati, concludono che il pisello presenta il migliore bilanciamento tra energia e azoto, grazie alla forma più regolare delle sue curve di produzione di gas.

Cinetiche di fermentazione più contenute potrebbero essere dovute al contenuto in polifenoli nel caso del favino; infatti, da quanto riportato in bibliografia (Piccioni, 1989; Bovera et al., 2001), il pisello ne

contiene una quantità inferiore rispetto al favino. La bassa fermentescibilità del lupino, invece, potrebbe essere dovuta al suo basso contenuto in amido (INRA, 1988).

Tabella 13. Caratteristiche di fermentazione *in vitro* delle granelle di leguminose e della soia.

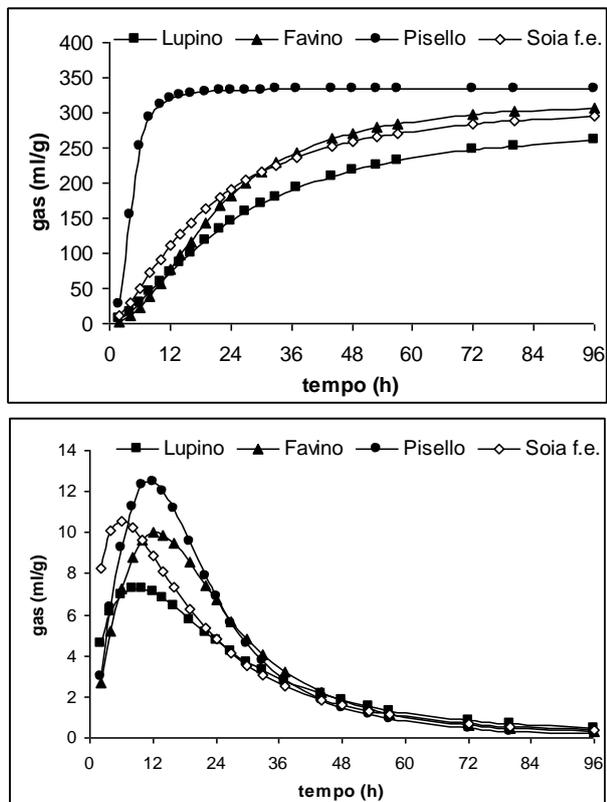
Cultivar	pH	dSO	VCSO	Yield	A	B	T _{max}	R _{max}
		%	ml/g	ml/g	ml/g	H	h	ml/h
Lupino								
Lublanc	6.63	93.4	256	279	283	26.1	10.25	6.73
Lutteur	6.69	92.4	275	298	309	25.6	5.58	7.83
Multitalia	6.72	91.2	273	297	303	27.0	8.48	7.08
MSD	0.219	5.40	26.6	91.5	13.9	45.8	15.6	4.74
Favino								
Irena	6.46	92.9	370	397	328	22.9	12.42	9.14
Lady	6.35	93.3	354	363	333	24.5	15.67	9.26
Scuro di Torre Lama	6.49	87.8	308	351	269	22.0	15.39	8.84
Chiaro di Torre Lama	6.41	91.8	348	379	310	23.1	13.20	8.69
ProtHABAT69	6.47	93.8	359	383	303	20.2	12.49	10.02
Sicania	6.40	92.9	324	349	299	21.0	12.83	9.71
MSD	0.135	3.19	60.1	49.3	60.1	3.90	3.65	*1.89
Pisello								
Alembo	6.57	99.0	406	410	361	20.6	12.52	11.73
Alliance	6.49	99.3	397	396	358	20.1	11.99	11.72
Attika	6.57	98.4	397	404	360	20.5	11.82	11.46
Corallo	6.53	98.9	393	394	365	22.3	11.42	10.38
Iceberg	6.55	98.8	381	385	347	21.0	12.45	10.86
Ideal	6.58	97.0	371	383	336	20.7	13.24	11.06
Spirale	6.58	98.8	344	343	310	17.1	10.66	12.14
MSD	0.188	2.81	52.5	53.5	3.68	74.1	5.22	2.47
Lupino ¹	6.64B	91.8ab	284C	309B	293b	24.4a	9.03	7.42B
Favino ¹	6.52Ab	90.9b	368B	405A	321a	21.1ab	12.4	10.0Ab
Pisello ¹	6.60a	95.1a	394A	413A	336a	18.2b	11.4	12.6Aa
Soia ²	6.73	96.5	295	306	323	18.7	6.01	10.67
Var. err.	0.001	2.31	56.2	30.5	101	4.40	2.99	0.56

dSO: degradabilità della sostanza organica (% di quella incubata); VCSO: volume cumulativo di gas rapportato alla sostanza organica incubata (ml/g); A: produzione potenziale di gas (ml/g); B: tempo necessario per la produzione di una quantità di gas pari ad A/2; R_{max}: velocità massima di fermentazione (h⁻¹); t_{max}: tempo a cui si raggiunge la velocità massima (h).

MSD: Differenza Minima Significativa per P<0.01. Var. err.: varianza dell'errore. Lungo la colonna: A,B,C: P<0.01; a,b,c: P<0.05.

¹Dati ottenuti dalle granelle di leguminose incubate *in vitro* come pool. ²Dati non elaborati statisticamente.

Figura 8. *Andamento della produzione di gas e della velocità di fermentazione in vitro nelle tre granelle di leguminose*



Le diverse proteaginose esaminate hanno mostrato alcune differenze fra loro in termini di contenuto proteico e di frazioni fibrose che hanno influenzato in modo anche statisticamente significativo alcuni parametri di fermentazione *in vitro* (degradabilità della sostanza organica, produzione di gas e velocità di fermentazione). Complessivamente il pisello è quello che ha mostrato i risultati migliori in termini di degradabilità e fermentescibilità. Dai dati ottenuti, possiamo concludere che le leguminose da granella testate pur mostrando alcune differenze rispetto alla soia (maggiore produzione di gas e minore degradabilità della SO) possono essere prese in considerazione per sostituire, in modo totale o parziale, la soia nella formulazione di diete per ruminanti. Tuttavia, alcune loro caratteristiche (presenza di fattori antinutrizionali, alta degradabilità ruminale delle proteine) devono essere tenute in considerazione.

MATERIALE E METODI prova in vivo

L'indagine è stata effettuata presso l'azienda agro-zootecnica Barchiesi sita nel comune di Cassino, provincia di Frosinone, dove 16 vitelloni bufalini a 45 giorni d'età, dopo l'assunzione del colostro, hanno ricevuto 6 l/capo/giorno di un sostitutivo del latte acidificato in 180 g/l di acqua. Successivamente, la concentrazione di quest'ultimo è stata gradualmente diminuita, somministrando comunque la stessa quantità. Fieno di avena e mangime svezzamento sono stati somministrati a partire dalla quinta settimana di età.

Dopo lo svezzamento (63 giorni), i bufali ricevevano fieno ad libitum e un mangime concentrato del commercio (max 2 kg/capo/giorno); l'insilato di mais è stato somministrato ad libitum partendo da 120 giorni.

Raggiunti i 6 mesi di età, gli animali sono stati suddivisi in due gruppi omogenei (F e S) ed alimentati (100 g ss/kg di peso metabolico) con 2 diete isoenergetiche (0.85 Unità Foraggiere Carne/kg sostanza secca) e isoproteiche (Proteine grezze/sostanza secca: 14.1%) costituite da insilato di mais, fieno di avena e un mangime concentrato diverso per i due gruppi per fonte proteica: Fava

(Gruppo F; 50% di concentrato) vs Soia (Gruppo S; 25% di concentrato).

La fava è stata scelta quale granella di leguminosa da confrontare con la soia in base alle maggiori similarità delle cinetiche di fermentazione come evidenziato dai risultati della prova in vitro.

In particolare per la presente indagine si è impiegata la varietà Lady.

Su campioni di tutti gli ingredienti della dieta è stata effettuata l'analisi chimica (AOAC, 2000; Van Soest et al., 1991).

L'estrazione del grasso dalla fava e dalla soia è stata effettuata con una soluzione di cloroformio/metanolo (2/1 v/v) come indicato da Folch et al. (1957). Gli acidi grassi estratti sono stati *trans* metilati mediante la procedura base-catalizzata descritta da Christie (1982) e modificata da Chouinard et al. (1999).

Gli esteri metilici degli acidi grassi sono stati quantificati usando un gas cromatografo delle serie FOCUS, fornito di detector a ionizzazione di fiamma (ThermoElectron Corporation, Rodano - Milano- Italia) attraverso una colonna capillare (CP-SIL 88 fused silica capillary column, 100 m x 0.25 mm di diametro interno con 0.2-

µm di spessore del film; Varian, Inc. Walnut Creek, CA). L'analisi è stata effettuata con la seguente rampa di temperatura: 75°C per 2 min → 5°C/min → 170°C per 40 min → 5°C/min → 220°C per 24 min. Le temperature di iniettore e detector sono state impostate a 270°C. La pressione del gas di trasporto (elio) è stato di 180 kPa.

I flussi degli altri gas sono riportati di seguito:

- idrogeno 30 ml/min;
- aria 350 ml/min;
- gas make-up (azoto) 45 ml/min.

I picchi degli acidi grassi sono stati identificati mediante il confronto con una miscela standard di esteri metilici di acidi grassi (Larodan Fine Chemicals, AB, Limhamnsgårdens Malmö, Sweden) ed espressi in mg di acidi grassi/g sostanza secca di alimento, così composta: C4:0 (butirrico), C6:0 (caproico), C8:0 (caprilico), C10:0 (caprico), C11:0 (undecanoico), C12:0 (laurico), C13:0 (tridecanoico), C:14:0 (miristica), C14:1 (miristoleico), C15:0 (pentadecanoico), C15:1 (pentadecanoico *cis*-10), C16:0 (palmitico), C16:1 (palmitoleico), C17:0 (eptadecanoico), C17:1 (eptadecanoico *cis*-10), C18:0 (stearico), C18:1 n-9 *trans* (elaidico), C18:1 n-9 *cis* (oleico),

C18:2 n-6 *trans* (linolelaidico), C18:2 n-6 *cis* (linoleico), C20:0 (arachidonico), C18:3 n-6 (γ -linolenico), C20:1 (eicosanoico), C18:3 n-3 (linolenico), C21:0 (eneicosanoico), C20:2 (eicosadienoico), C22:0 (beenico), C20:3 n-6 (eicosatrienoico), C22:1 n-9 (erucico), C20:3 n-3 (eicosatrienoico), C20:4 n-6 (eicosatetraenoico), C23:0 (tricosanoico), C22:2 *cis*-13 (docosadienoico), C24:0 (lignocerico), C20:5 n-3 (eicosapentanoico), C24:1 (nervonico), C22:6 n-6 (docosaesapentanoico).

Gli animali sono stati sacrificati al raggiungimento del peso vivo di circa 400 kg. Dopo 11 giorni refrigerazione alla temperatura di $4 \pm 1^\circ\text{C}$, seguendo le indicazioni di Lanari (1973), è stato prelevato da ciascuna mezzena destra un taglio campione corrispondente alla X costa toracica. Una porzione di *Longissimus dorsi* prelevata posteriormente al taglio campione è stata utilizzata per determinare, previa omogeneizzazione, la composizione chimica (Commissione “Valutazione della produzione quanti-qualitativa della carne” dell’A.S.P.A, 1995). Il contenuto in proteine è stato determinato per differenza.

Su campioni di grasso ottenuti dal taglio campione è stata determinata, mediante gascromatografo, la composizione acidica dei

grassi previa estrazione (Folch et al., 1957) e successiva metilazione (Christies, 1989) modificata da Chouinard et al. (1999). Gli esteri metilici degli acidi grassi saranno quantificati usando un gas cromatografo delle serie FOCUS, fornito di detector a ionizzazione di fiamma (ThermoElectron Corporation, Rodano -Milano- Italia) attraverso una colonna capillare (CP-SIL 88 fused silica capillary column, 100 m x 0.25 mm di diametro interno con 0.2- μ m di spessore del film; Varian, Inc. Walnut Creek, CA). L'analisi è stata effettuata con la seguente rampa di temperatura: 75°C per 2 min \rightarrow 5°C/min \rightarrow 170°C per 40 min \rightarrow 5°C/min \rightarrow 220°C per 24 min. Le temperature di iniettore e detector sono state impostate a 270°C. La pressione del gas di trasporto (elio) è stata pari a 180 kPa. I picchi degli acidi grassi (come mostrato in precedenza) sono stati identificati mediante il confronto con una miscela standard di esteri metilici di acidi grassi (Larodan Fine Chemicals, AB, Limhamnsgårdens Malmö, Sweden). Infine, da questi ultimi risultati, sono stati calcolati gli indici di aterogenicità e trombogenicità usando le formule suggerite da Ulbricht e Southgate (1991).

Estrazione dell'RNA totale dal tessuto adiposo sottocutaneo

Dopo la macellazione, campioni di tessuto adiposo sottocutaneo sono stati prelevati ed immediatamente immersi nel contenitore da trasporto di azoto liquido e successivamente conservato a -80°C per le successive analisi.

I livelli di espressione del gene SCD sono stati analizzati attraverso estrazione dell'RNA totale dal tessuto adiposo sottocutaneo usando il kit RNeasy Mini Kit (QIAGEN), con alcune modifiche. 200 mg di tessuto sono stati pesati direttamente in una microprovetta sterile da 2 mL contenente 1 biglia da 5 mm di diametro. 600 μl di Buffer RLT (buffer di lisi) sono stati aggiunti al campione e successivamente mescolati. I tubi con i campioni sono stati posti nel TissueLyser Adapter Set 2 x 24, omogeneizzati per 2 min a 20 Hz (fase ripetuta due volte) ed infine centrifugati per 3 min a temperatura ambiente a 10,000 rpm. 500 μl di sovrantante (recuperato il pellet) sono stati recuperati e trasferiti in un nuovo tubo sterile dove sono stati aggiunti 500 μl di etanolo al 70% e miscelati. I primi 500 μl della miscela sono stati caricati sulle colonne "RNeasy spin" e centrifugati per 30 s a 10,000 rpm; successivamente il restante campione è stato caricato sulla colonna e centrifugato per 30 s a 10,000 rpm.

L'estrazione del pellet è stata eseguita con 350 µl di Buffer RLT, miscelati e centrifugati per 3 min a 10,000 rpm. 300 µl di sovrinatante sono stati recuperati e 300 µl di etanolo al 70% sono stati aggiunti e trasferiti nelle stesse colonne utilizzate in precedenza e quindi centrifugati per 30 s a 10,000 rpm. 700 µl di Buffer RW1 sono stati aggiunti alla colonna e centrifugati per 30 s a 10,000 rpm per lavare la colonna. 500 µl di Buffer RPE sono stati aggiunti alla colonna e centrifugati per 30 s a 10,000 rpm per lavare la colonna. Ulteriori 500 µl di Buffer RPE sono stati aggiunti e centrifugati per 2 min a 10,000 rpm. Le colonne sono state infine centrifugate alla massima velocità per 1 min.

Le colonne "RNeasy spin" sono state poste su nuovi tubi sterili da 1.5 ml e 50 µl di RNase-free water sono stati aggiunti direttamente sulla membrane della colonna e centrifugate per 1 min a 10,000 rpm al fine di eluire l'RNA.

Quantificazione e purezza dell' RNA

La concentrazione dell'RNA totale è stata determinata mediante analisi dell'assorbanza a 260 nm mediante biofotometro (Eppendorf,

Hamburg, Germany). La purezza in termini di contaminazione da proteine è stata stimata attraverso il rapporto 260/280 nm.

La qualità dell'RNA è stata valutata anche attraverso corsa elettroforetica (5 µg di RNA totale separato su un gel di agarosio all'1% peso/volume contenente etidio bromide); un campione di RNA di ottima qualità deve presentare alla lettura ai raggi UV 2 bande corrispondenti alle unità ribosomiali 28s e 18s.

Integrità dell' RNA

L'integrità e la distribuzione dell'RNA totale purificato con il kit RNeasy è stata valutata anche mediante una elettroforesi capillare eseguita con l'Agilent 2100 bioanalyzer instrument (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Con questa tecnologia è possibile esprimere l'integrità mediante un software in grado di generare un "Numero di Integrità dell'RNA" (RIN).

Trattamento con DNAsi e Trascrizione inverse per ottenere il cDNA

Il trattamento con l'enzima DNAsi viene usato per eliminare ogni contaminazione da DNA genomico (gDNA) che potrebbe interferire sui successive passaggi. È una fase molto delicata in quanto potrebbe andare a danneggiare anche l'RNA.

La reazione prevede i seguenti reagenti :

- 1µg di RNA totale;
- 2µl di gDNA Wipeout Buffer 7x (QIAGEN) , per digerire il gDNA;
- H₂O DEPC per portare il volume a 14µl.

Il processo di degradazione del gDNA prevede il raggiungimento di 42°C per 2 min dopo i quali i campioni vengono posti a 4°C.

Il cDNA a singola elica ottenuto viene retro-trascritto usando il Quantiscript Reverse transcriptase (Qiagen). La miscela di reazione è la seguente:

- 4µl di Quantiscript RT Buffer 5X;
- 1µl di Quantiscript Reverse Transcriptase, per proteggere l'RNA dall'azione dell'RNAsi ;
- 1µl di RT primer mix RNAsi Out (Invitrogen);
- 14µl di RNA ottenuti dal trattamento con DNasi.

Il processo prevede il raggiungimento di 42°C per 15 min e successivamente 95°C per 3 min al fine di disattivare l'enzima. Il cDNA ottenuto viene conservato a -20°C.

PCR end point

Al fine di verificare la buona riuscita della trascrizione inverse, il cDNA ottenuto viene amplificato con una coppia di primer (PRIMM, Milano) disegnata mediante Primer3 software su una regione di giunzione introne/esone (esone 1-introne 1-esone 2) del gene SCD di bufalo (EMBL Acc. No. AM600640). Le sequenze utilizzate per la PCR end-point e Real Time sono riportate in Tabella 1. I primers sono stati diluiti per ottenere una concentrazione finale di 100 picomoles/ μ l e valutati prima mediante PCR end-point. I campioni di cDNA per la PCR end-point (2400, Applied Biosystem, Foster City, CA) sono stati diluiti 1:2 (25 ng/ μ l) ed analizzati in triplicato.

Per ogni campione la miscela è stata preparata come segue:

- 2,5 μ l di Buffer 2x (100 mM Tris HCL, 500 mM Kcl, Invitrogen);
- 0,75 μ l di 1,5 nM MgCl₂;

- 0,62µl di dNTP (10 mM);
- 0,13µl di Primer (Forward, F) (0,5 µM);
- 0,13µl di Primer (Reverse, R) (0,5 µM);
- 0,25µl di Taq (Taq polymerase 5 U/µl, Invitrogen);
- 2,0µl di cDNA;
- H₂O per un volume totale di 25 µl.

Le amplificazioni sono state eseguite attraverso i seguenti passaggi termici:

- 5 minuti a 94°C;
- 40 cicli costituiti da:
 - 30 secondi a 94°C;
 - 30 secondi a 60°C;
 - 1 minuto a 72°C;
- 3 minuti a 72°C.

Tabella 14. Coppie di primers utilizzate per PCR-end point e Real-Time

	Sequenza (5'->3')	Tm (°C)	Lunghezza prodotto
Actin-F	TTCCGCTGCCCTGAGGCTCT	60	143
Actin-R	CCGCCGGACAGCACTGTGTT		
SCD F	GTGTCCTAGAGGCCAGATGC	60	100
SCD R	GAAGGAGGTGCTGTGATGGT		

Corsa elettroforetica

La specificità dell'amplificazione ottenuta mediante PCR end point è stata verificata mediante elettroforesi su gel di agarosio 2% in TBE 1x, applicando un voltaggio di 100 volts per circa 1 ora. I campioni sono stati caricati nel seguente modo:

- 2µl loading buffer (TrackIt Cyan/orange Loading Buffer, Invitrogen) + 10µl campione.

- Ladder: 2µl loading buffer + 8.5µl H₂O + 1.5µl ladder (1Kb plus DNA ladder, Invitrogen).

PCR Real time

Le amplificazioni sono state effettuate con lo strumento ABI 5700 (Applied Biosystem, Foster City, CA), dotato di un software per gestire i dati (PE Biosystems 5700 software) e per l'amplificazione è stato usato il kit SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystem). Ogni campione è stato analizzato in triplicato. In ogni PCR, è stato inserito un campione negativo (NTC) per assicurare la riproducibilità e l'assenza di contaminanti.

Per ogni reazione:

- 12,5µl SYBR® Green PCR Master Mix (buffer di reazione, MgCl₂, SYBR Green I dye, dNTP mix, Applied Biosystem)
- 0,5µM primer F
- 0,5µM primer R
- 30 ng cDNA (diluito 1:5)
- H₂O-DEPC per un volume totale di 25 µl

I primers usati sono già stati testati in una precedente PCR. Tutti i campioni sono stati preparati in triplicato usando tubi da reazione MicroAmp® Optical da 0,2 ml dotati di idonei tappi (MicroAmp® Optical, Applied Biosystems).

Lo strumento è stato programmato per effettuare i seguenti passaggi termici:

- 5 minuti a 50°C;
- 10 minuti a 94°C;
- 40 cicli costituiti da:

- 20 secondi a 95°C;

- 1 minuto a 60°C.

Inoltre, tutte le reazioni sono state sottoposte ad un protocollo di dissociazione come previsto dal software per analizzare le curve di melting.

Analisi dell'RNA

I livelli relativi dei vari trascritti nel latte del gruppo B sono stati espressi, dopo normalizzazione rispetto all'espressione di un gene housekeeping (Ciclofillina), rispetto a quelli corrispondenti del gruppo S. L'espressione del gene SCD è stata calcolata attraverso l'analisi dei cicli soglia (CT) in relazione al gene housekeeping Astina mediante la formula $2^{-(\Delta CT_{SCD} - \Delta CT_{actin})}$.

L'incremento o il decremento dell'espressione del gene bersaglio viene valutato mediante il gene "reference" o housekeeping (β -Actin), nello stesso campione. L'analisi relativa dei dati ottenuti mediante RT-PCR è come segue:

- Calcolo del Ct medio del gene housekeeping (ΔCT , β -actin) per i gruppi F e S;

- Calcolo del Ct medio del gene bersaglio (ΔCT , SCD) per i gruppi F e S e confronto tra i ΔCT_{SCD} and $\Delta CT_{\beta\text{-actin}}$.

Il modello matematico usato per l'analisi di espressione è il seguente

$$2^{-(DCT,scd - DCT, \beta\text{-actin})} = 2^{-DDCT}$$

I valori del gene SCD sono espressi con una unità arbitraria (AU) e determinati in funzione della quantità relativa del gene β -actin.

Analisi statistica

L'analisi dei dati è stata effettuata mediante procedura GLM del SAS (2000). Per il confronto tra le medie è stato impiegato il Tukey test.

RISULTATI prova in vivo

Dall'esame della tabella 15, dove viene riportato il profilo acidico della soia e della fava, è possibile evincere che nella prima sono risultate concentrazioni più elevate di acido miristico (C14: 0), palmitico (C16: 0), oleico (C18: 1 n-9) e linoleico (C18: 2 n-6), mentre nella fava sono risultati maggiori i livelli di acido linolenico (C18: 3 n-3) e stearico (C18:0).

I nostri risultati concordano con quelli riportati da Lanza et al. (2011), mentre Grela e Gunther (1995) trovarono concentrazioni minori di acido linoleico nella fava.

In linea generale, in letteratura i semi di leguminose mostrano una composizione in acidi grassi prevalentemente caratterizzata da elevati livelli di acido linoleico (C18: 2) tra i PUFA e di acido palmitico (C16:0) tra saturi, mentre il contenuto di C18:3 (acido linolenico) risulta basso anche se con estrema variabilità in funzione delle varietà colturali (Grela e Günther, 1995). Anche lavori più recenti riportano una non elevata concentrazione di acido linolenico nei piselli, nelle fave e nei ceci (3,8 - 9,3% acidi grassi totali per i

piselli, Yoshida et al, 2007, Ryan et al, 2007; 3,8-5,1% di acidi grassi totali per la fava, Yoshida et al, 2008;. 2,4-3,2% acidi grassi totali per i ceci, Priolo et al, 2003, Ryan et al, 2007).

Al contrario, i livelli di C18: 3 n-3 riscontrati per la fava nella presente sperimentazione, mentre risultano nettamente inferiori rispetto alle concentrazioni riportate per i semi di lino (Cooper et al, 2004), sono più elevati rispetto a quanto trovato da Priolo et al. (2003) nei ceci.

Tabella 15. Profilo acidico della soia e della fava (mg /g ss)

	SOIA	FAVA
C14:0	0.068	0.023
C16:0	3.987	2.874
C18:0	0.642	0.933
C18:1 <i>n-9</i>	4.754	2.376
C18:2 <i>n-6</i>	14.572	12.331
C18:3 <i>n-3</i>	1.628	2.145

Per quanto concerne l'analisi chimica delle carni (tabella 16), nel complesso sono stati confermati i dati riportati da Cutrignelli et al. (1996), anche se il contenuto in grasso nel presente studio è risultato particolarmente basso (valore medio: 1.90%). Il contenuto di colesterolo, sebbene sensibilmente superiore a quello riportato da Samoggia et al. (1993) nel muscolo gracile (mg 27,7) e nel diaframma (mg 31,4) è comunque risultato inferiore a quello ottenuto con Cutrignelli et al. (1996) nel Longissimus dorsi in giovani tori bufalini. I contenuti di colesterolo nella carne di bufalo riportati in letteratura risultano piuttosto disomogenei: Kesava et al. (1992) trovarono 83 g mg/100 nel Longissimus dorsi; Yadava e Singh (1974) hanno indicato un contenuto sensibilmente più basso (mg 32); Sinclair et al, (1982), infine, riportano 46 mg nel bufalo australiano.

Tabella 16. Composizione chimica (%) e contenuto in colesterolo (mg/100g) della carne

	Umidità	Grasso	Proteine	Colesterolo
FAVA	75.90	1.82 ^b	21.04 ^b	32.2 ^b
SOIA	75.73	1.98 ^a	21.28 ^a	33.7 ^a

a,b:P<0.05

Il profilo acidico del grasso del grasso intramuscolare è riportato, per entrambi i gruppi in esame, in tabella 17.

I valori medi di tutti gli acidi grassi, così come il contenuto di CLA e, di conseguenza, anche gli indici aterogenico e trombogenico, sono risultati sovrapponibili nei due trattamenti a confronto. Da sottolineare che anche la concentrazione degli acidi linoleico e linolenico nella carne è risultata simile, nonostante fossero state rilevate differenze in merito all'analisi acidica effettuata sulla soia e la fava.

In linea generale i nostri risultati concordano con quelli riportati da Lanza et al. (2011) che tuttavia, in uno studio effettuato sugli ovini, rilevarono livelli di C18: 3 n-3 più elevati ($P < 0,10$) nella carne degli animali alimentati con la fava rispetto a quelli alimentati con la soia. Cutrignelli et al (2008 a, b), confrontando il profilo degli acidi grassi della carne di vitelloni di razza Marchigiana alimentati con diete la cui fonte proteica era rappresentata dalla fava vs la soia, trovarono soltanto valori significativamente ($P < 0,01$) più elevati di acido stearico nelle carni degli animali del primo gruppo. Questo risultato,

tuttavia, non influenzò la concentrazione totale di acidi grassi saturi né gli indici di aterogenicità e trombogenicità.

Recentemente, Scerra et al. (2011) hanno trovato aumento del contenuto di acidi grassi polinsaturi n-3 nel grasso intramuscolare di agnelli alimentati con una dieta a base di piselli e fave (24% della dieta per entrambe le leguminose) in sostituzione totale e parziale di farina di soia. La composizione in acidi grassi del muscolo longissimus dorsi in parte riflette la composizione della dieta di acidi grassi.

Nei ruminanti, la bioidrogenazione che si verifica nel rumine (ovvero la saturazione degli acidi grassi insaturi) è responsabile delle variazioni nella composizione in acidi grassi intramuscolare (Harfoot e Hazlewood, 1988).

I principali acidi grassi saturi nella carne (acido miristico C14: 0, acido palmitico C16: 0 e acido stearico C18: 0) vengono associati a rischio di patologie cardiovascolari (Valsta *et al.*, 2005), sebbene andrebbe ricordato che l'assunzione di acido stearico (C18:0) influenza in modo minore il livello di colesterolo nell'uomo (Mensink *et al.*, 2003).

I livelli di questi acidi grassi sono risultati simili nella carne dei bufali di entrambi i gruppi sperimentali. Al contrario, Scerra et al. (2011) rilevarono concentrazioni maggiori di acidi grassi saturi e, in particolare di acido palmitico, nella carne di agnelli alimentati con farina di soia come fonte principale di proteine, ascrivendo tale risultato ai diversi livelli di tale acido nella dieta ingerita dagli animali dei gruppi a confronto. Nel nostro studio, invece, non sono state rilevate tali differenze.

Come previsto, l'acido grasso più rappresentato in entrambi i gruppi a confronto è risultato l'acido oleico. E' ben noto che questo acido grasso proviene dalla desaturazione, attraverso l'attività di SCD nel tessuto adiposo, dell'acido stearico provenienti dalla bioidrogenazione degli acidi linoleico e linolenico nel rumine (Woods and Fearon, 2009).

Nel complesso, nella letteratura internazionale viene riportata una notevole influenza della dieta dei ruminanti sui livelli di acido oleico nella carne; l'aumento di tale acido sarebbe ascrivibile a minori rapporti foraggio:concentrato sia nei bovini (Hidiroglu *et al.*, 1987; Mitchell *et al.*, 1991) che negli ovini (Rowe *et al.*, 1999) e sarebbe parzialmente dovuto all'incremento dell'attività di SCD.

Particolarmente interessante è risultato il calcolo dell'indice di aterogenicità, sensibilmente inferiore a quello riportato da Ulbricht e Southgate (1991) per le carni di bovino macinate e a quelli riportati da Badiani et al. (2002) per carni cotte e macinate (0,72 e 0,77, rispettivamente) ma in linea con quanto riportato da Infascelli et al (2004) per le carni bufaline.

Tabella 17. Profilo acidico del *Longissimus dorsi* (% acidi grassi totali).

	Trattamento	
	SOIA	FAVA
C14:0	1.25 ± 0.2	1.18 ± 0.1
C14:1	0.47 ± 0.07	0.47 ± 0.02
C16:0	20.9 ± 0.7	21.0 ± 0.9
C16:1	1.13 ± 0.17	1.17 ± 0.04
C18:0	25.1 ± 2.1	24.6 ± 1.9
C18:1 <i>trans</i> -11	1.32 ± 0.35	1.30 ± 0.05
C18:1 <i>cis</i> -9	30.55 ± 1.5	30.86 ± 0.6
C18:2 n-6	7.89 ± 0.9	7.92 ± 0.4
C18:3 n-3	0.59 ± 0.02	0.56 ± 0.02
SFA	50.6 ± 0.47	49.9 ± 0.57
MUFA	36.3 ± 1.3	36.5 ± 0.67
PUFA	12.8 ± 1.2	13.4 ± 0.48
PUFA/SFA	0.27 ± 0.03	0.28 ± 0.01
CLA	0.231 ± 0.01	0.212 ± 0.01
IT	1.36 ± 0.03	1.33 ± 0.09
IA	0.53 ± 0.01	0.53 ± 0.02

La qualità e la resa dell' RNA estratto da 200 mg di tessuto adiposo sottocutaneo con un mini kit modificato di RNAasi sono risultate accettabili per una Real Time PCR. Tutti i campioni di RNA hanno mostrato rapporti 260/280 superiori a 1.8 con una resa media di RNA di 30.5 µg/g di tessuto adiposo (range: 18.5-40.7 µg/g) per entrambi i gruppi.

La qualità dell' RNA isolato è stata confermata anche dalla visualizzazione di bande 18S e 28S ribosomiale di singoli campioni sottoposti ad elettroforesi in gel di agarosio 1,2% di entrambi i gruppi (Figura 9)

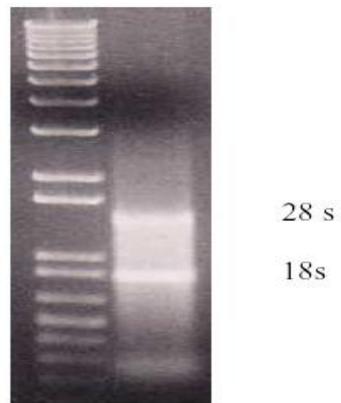


Figura 9: Analisi elettroforetica dell RNA estrattodal tessuto adiposo sottocutaneo

La media ottenuta per tutti i campioni estratti da entrambi i gruppi è stata pari a $7,1 \pm 0,9$. Questo valore è superiore a 6, valore soglia per l'RNA di alta o bassa qualità (Schroeder et al., 2006).

Per valutare l'avvenuta trascrizione inversa, cDNA (10 microlitri) prodotto con primer specifici attraverso PCR è stato controllato attraverso elettroforesi su gel. La stima della trascrizione inversa è stata effettuata mediante l'amplificazione del gene house-keeping β -actina e del SCD, in entrambi i gruppi.

Un esempio rappresentativo è riportato in figura 10, dove sono stati trovati in numerosi campioni bande di 143 bp e 100 bp relative ai geni β -actina e SCD rispettivamente, nel tessuto adiposo sottocutaneo degli animali di entrambi i gruppi.

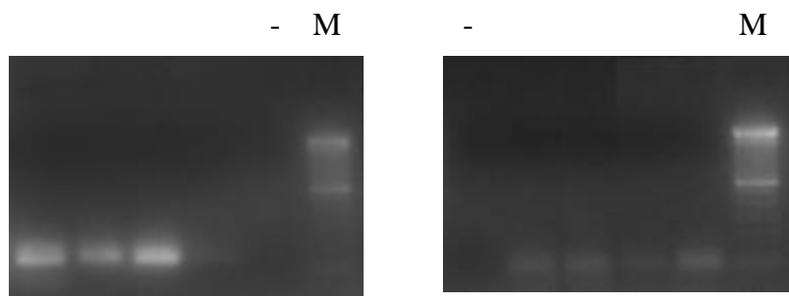


Figura 10: Analisi elettroforetica del cDNA mediante Actin-F/R primers (sinistra) e SCD F/R (destra).

- controllo;

M: 100bp Ladder

Il livello di espressione del gene SCD non è stato influenzato ($4,85 \pm 1,37$ vs $5,81 \pm 2,15$ UA) dal trattamento dietetico al pari di quanto avvenuto per la percentuale di grasso intramuscolare nonché per il profilo acidico dei grassi.

Questo risultato è in accordo con quanto riportato in letteratura circa il livello di espressione di SCD come indicatore dello sviluppo della quantità del grasso intramuscolare (Wang et al., 2009) e del profilo acido nei ruminanti e nei monogastrici, considerando l' SCD come chiave regolatrice del metabolismo muscolare, in grado di facilitare la biosintesi dei lipidi e la soppressione della degradazione degli acidi grassi.

Al contrario, Hiller et al. (2011) trovarono differenze nell'espressione genica di SCD in bovini alimentati con diete diverse, nonostante non risultasse significativa la differenza quantitativa del grasso intramuscolare.

CONCLUSIONI

Dal 2001 la Commissione europea ha vietato l'uso di farine di carne e ossa e dei loro derivati nelle diete per animali d'allevamento (direttiva CE 999/2001) al fine di assicurare la sicurezza dei consumatori sui prodotti animali e di conseguenza la farina di soia è diventata la fonte proteica più utilizzata nei sistemi di allevamento intensivo. Tuttavia, oltre a diversi fattori economici (la soia è in gran parte importata) è da valutare in fatto che la gran parte della soia risulta geneticamente modificata (GM). In merito, crescenti sono le preoccupazioni da parte del consumatore in quanto, nonostante in passato non esistesse alcuna prova diretta che gli alimenti GM possano rappresentare un possibile pericolo per la salute, recentemente sono stati pubblicati una serie di studi con risultati contrari.

Di conseguenza, la ricerca di fonti proteiche alternative per l'alimentazione degli animali ha portato ad un crescente interesse per le granelle di leguminose, in quanto esse rappresentano una importante fonte di proteine vegetali.

D'altra parte, le attuali strategie di alimentazione animale sono volte ad ottenere derrate alimentari, sia da ruminanti che da monogastrici, caratterizzate da ridotta presenza di acidi grassi saturi e quanto più possibile elevati livelli di acidi grassi polinsaturi, soprattutto della serie omega-3 e acido linoleico coniugato (CLA).

Scopo del presente studio è stato quello di studiare l'effetto della sostituzione totale della soia con la fava (*Vicia faba* var. *Minori*) nella dieta di bufali in accrescimento sul profilo degli acidi grassi e, in particolare, sul contenuto di CLA nel *Longissimus dorsi*. Inoltre, tenendo conto della doppia origine di CLA nei ruminanti (1. bioidrogenazione ruminale; 2. sintesi endogena della ghiandola mammaria e nel tessuto adiposo attraverso l'attività di Stearoil-CoA desaturasi (SCD) su trans-11 C18: 1 (TVA, acido transvascennico), prodotto intermedio di alcune bioidrogenazioni di acidi grassi polinsaturi) si è voluto adottare un approccio di genomica funzionale per mettere in relazione le modifiche del profilo degli acidi grassi con i livelli dell'SCD.

Mentre è noto che l'espressione di SCD è regolata dalla specie animale, dal tessuto, dalla dieta e da altri fattori come l'età, l'insulina, gli stessi CLA e i PUFA di origine alimentare, questi ultimi

sembrerebbero giocare un ruolo meno importante nei ruminanti rispetto ad altre specie. Per quanto concerne il bufalo, inoltre, scarsa risulta la letteratura a disposizione e la regolazione dell'espressione dell'SCD in questo animale necessita di ulteriori approfondimenti.

Nel nostro studio, l'impiego della fava come fonte proteica della dieta in sostituzione della soia non ha pregiudicato il profilo degli acidi grassi così come il livello di espressione dell'SCD. Esisterebbe pertanto una correlazione positiva tra i due parametri. Ciò in accordo con quanto riportato da Taniguchi et al. (2004) che riscontrarono elevati livelli di espressione di SCD e contemporanea modifica del profilo acidico, con maggiore incidenza dei monoinsaturi, nel bovino. Altri autori (Vasta et al., 2009), al contrario, non rilevarono alcuna correlazione tra l'espressione della proteina SCD e i suoi metaboliti nel tessuto muscolare degli ovini.

In generale, il fatto che non sempre sia possibile rilevare una correlazione funzionale assoluta tra l'espressione dei geni e i prodotti risultanti pone l'accento sulla necessità di effettuare ulteriori indagini sui meccanismi di sviluppo, di trascrizione, post trascrizionali, di traslazione e post-traslazionali.

In ogni caso, alla luce del fatto che il profilo acidico delle carni ottenute dal gruppo di animali alimentati con la dieta contenente la fava non è risultato meno favorevole rispetto a quello dell'altro gruppo, si confermerebbe la possibilità di impiegare le granelle di leguminose in alternativa alla soia, senza pregiudicare le caratteristiche dietetico-nutrizionali delle carni.

BIBLIOGRAFIA

A.S.P.A.1995. Valutazione della produzione quanti-qualitativa della carne. Ed. ISMEA, Roma.

AOAC 2000. Official Methods of Analysis, 17th edn. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.

Badgley, C., Moghtader, J., Quintero, E., Zakem, E., Chappell, M.J., Avilés-Vázquez, K., Samulon, A., Perfecto, I., 2007. Organic agriculture and the global food supply. *Renew. Agric. Food Sys.* 22, 86–108.

Badiani A., Stipa S., Bitossi F., Gatta P.P., Vignola G., Chizzolini R. 2002. Lipid composition, retention and oxidation in fresh and completely trimmed beef muscles as affected by common culinary practices. *Meat Sci.*, 60, 169-186.

Bang, H.O., Dyerberg, J. 1973. The composition of food consumed by Greenlandic Eskimo. *Acta Med. Scand.* 200, 69-73.

Bauer, E., Williams B.A., Voigt, C., Mosenthin, R., Verstegen, M.W.A., 2001. Microbial activities of faeces from unweaned and adult pigs, in relation to selected fermentable carbohydrates. *Anim. Sci.* 73: 313- 322.

Bauman, D.E., Griinari, J.M. 2003. Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annu. Rev. Nutr.* 23, 203-227.

Bernard L., Leroux C., Hayes H., Gautier M., Chilliard Y., Martin P. 2001. Characterization of the caprine stearoyl- CoA desaturase gene and its mRNA showing an unusually long 3'-UTR sequence arising from a single exon. *Gene*, **281**: 53-61.

Bernard, L., Rouel, J., Leroux, C., Ferlay, A., Faulconnier, Y., Legrand, P., Chilliard, Y. 2005. Mammary Lipid Metabolism and Milk Fatty Acid Secretion in Alpine Goats Fed Vegetable Lipids. *J. Dairy Sci.* (88) 1478–1489.

Bertoni, G., Trevisi, E. 1999. Acidi grassi polinsaturi ω -3 e nutrizione animale. *Progress in Nutrition* 1, 3-4, 19-29.

Bovera, F., Calabrò, S., Masucci, F. 2001. Caratterizzazione degli alimenti secondo il Cornell Net Carbohydrate and Protein System e utilizzazione di questo sistema nel razionamento dei ruminanti. In: T. Di Lella (ed.) *Caratterizzazione chimica dei principali alimenti utilizzati negli allevamenti bovini e ovicaprini dell'Appennino Dauno, Irpino e Lucano*. Vigilante srl Publ., Napoli, Italy, pp 15-65.

Bilik K. Niwinnska B., Lopuszanska M., Jerzyfijal R. 2012. Effect of type of roughage on chemical composition and technological value of milk from cows fed tnr diets *Ann. Anim. Sci.*, Vol. 12, No. 4 633–648.

Buccioni A., Minieri S., Petacchi F., Antongiovanni M. 2007. Il favino (*Vicia faba minor*) e il pisello proteico (*Pisum sativum*) in sostituzione della farina di estrazione di soia nell'alimentazione zootecnica. *Arsia, Toscana*

Bulson, H.A.J., Snaydon, R.W., Stopes, C.E., 1997. Effects of plant density on intercropped wheat and field beans in an organic farming system. *J. Agric. Sci.* 128, 59–71.

Calabrò S., Cutrignelli M.I., Bovera F., Piccolo G., Infascelli F. 2005. In vitro fermentation kinetics of carbohydrate fractions of fresh forage, silage and hay of *Avena sativa* *J. of Sci. of Food and Agric.*, 85:1838-1844.

Calabrò S., Infascelli F., Bovera F., Moniello G., Piccolo V. 2001. In vitro degradability of three forages: fermentation kinetics and gas production of NDF and neutral soluble fraction of forages *J. of the Science of Food and Agriculture*, 82, 222-229.

Calabrò S., Tudisco R., Grossi M., Bovera F., Cutrignelli M.I., Guglielmelli A., Piccolo V., Infascelli F. 2007. *In vitro* fermentation characteristics of corn and sorghum silages. *Italian J. Anim. Sci.*, 6 (Suppl. 2):559-562.

Calabrò S., Williams B.S., Piccolo V., Infascelli F., Tamminga S. 2004. A comparison between buffalo (*Bubalus bubalis*) and cow (*Bos taurus*) rumen fluids in terms of the *in vitro* fermentation characteristics of three fibrous feedstuffs. *J. the Science of Food and Agriculture*, 84, 645-652.

Calabrò S., Zicarelli F., Infascelli F., Piccolo V. 2003. Kinetics fermentation and gas production of the neutral detergent-soluble fraction of fresh forage, silage and hay of *Avena sativa*. *Italian Journal of Animal Science*, vol 2., suppl. 1., 201-203.

Campanile G., Infascelli F., Zicarelli L. 2001. Considerazioni sull'allevamento del vitellone bufalino da carne *AGRISOLE* suppl. 6, 39.

Choi, Y., Cheul, K.Y., Han, Y.B., Park, Y., Pariza, M.W., Ntambi, J.M. (2000). The trans-10, cis-12 Isomer of Conjugated Linoleic Acid Downregulates Stearoyl-CoA Desaturase 1 Gene Expression in 3T3-L1. Adipocytes. *J Nutr* (4) 1920-1924.

Christie, W. W., 1982: A simple procedure of rapid transmethylation of glycerolipids and cholesteryl esters. *Journal of Lipid Research* 23, 1072–1075.

Chung M., Ha S., Jeong S., Bok J., Cho K., Baik M., Choi Y. (2000). Cloning and characterization of bovine stearoyl CoA desaturase cDNA from adipose tissues. *Biosci. Biotechnol Biochem.*, 64:1526-30.

Colombo, D., Crovetto, G.M., Colombini, S., Galassi, G., Rapetti L., 2007. Nutritive value of different hybrids of sorghum forage determined *in vitro*. *Ita. J. Anim. Sci* vol. 6: 289-291.

Cooper, S.L., Sinclair, L.A., Wilkinson, R.G., Hallett, K.G., Enser, M., Wood, J.D., 2004. Manipulation of the n-3 polyunsaturated fatty acid content of muscle and adipose tissue in lambs. *J. Anim. Sci.* 82: 1461-1470.

Corl B. A., Baumgard L H., Griinari J. M., Delmonte P., Morehouse K. M., Yurawecz M. P., Bauman D. E. (2002). Trans-7,cis-9 CLA is synthesized endogenously by delta-9 desaturase in dairy cows. *Lipids*, 37, 681-688. 379.

Corl B.A., Baumgard L.H., Dwyer D.A., Griinari J.M., Phillips B.S., Bauman D.E. (2001). The role of $\Delta 9$ -desaturase in the production of cis-9, trans-11 CLA. *J Nutr Bioch* 12, 622–630.

Council Regulation (EC) No 834/2007 on organic production and labelling of organic products and repealing Regulation (EEC) No 2092/91 L 189/1- L 189/23.

Cristin A. 1862. Della produzione bovina nel Regno d'Italia – Della razza bufalina. Da: “Giornale delle razze degli animali utili e di medicina veterinaria. R. scuola superiore di medicina veterinaria. Anno secondo: 5-11.

Cutrignelli MI, Calabrò S., Bovera F., Tudisco R., D'Urso S., Marchiello M., Piccolo V., Infascelli F. (2008b) Effects of two protein sources and energy level of diet on the performance of young Marchigiana bulls. 2. Meat quality *Ital.J.Anim.Sci.* vol. 7, 271-285.

Cutrignelli MI, Piccolo G, Bovera F., Calabrò S., D'Urso S., Tudisco R., Infascelli F (2008a) Effects of two protein sources and energy level of diet on the performance of young Marchigiana bulls. 1. *Infra vitam* performance and carcass quality. *Ital.J.Anim.Sci.* vol. 7, 259-270

Dawson, R.M.C., Hemington, N., Hazlewood, G.P. 1977. On the role of higher plant and microbial lipases in the ruminal hydrolysis of grass lipids. *Br J Nutr* 38, 225-232.

Díaz -Ambrona CH., Mínguez MI 2001 Cereal-legume rotations in a Mediterranean environment: biomass and yield production. *Field Crops Research* 70 (2001) 139- 51

Doane, P.H., Schofield, P., Pell, A.N., 1997. Neutral detergent fiber disappearance and gas and volatile fatty acid production during the *in vitro* fermentation of six forages. *J. Anim. Sci.*, 75: 3342-3352.

FAO – FAOSTAT. 2010. <http://www.fao.org>

Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.H.S., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226:497-509.

Gibney M. J., 1993. Fish oils in human health. Recent advances in animal nutrition in Australia, Ed. D. J. Farrell. University of New England, Armidale, N. S. W., 2351.

Gill, C., 1997. World feed panorama. High cost of feedstuffs: global impact, response. *Feed Intern.* 18, 6–16.

Green, C.J., Blackmer, A.M., 1995. Residue decomposition effects on nitrogen availability to corn following corn or soybean. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 59, 1065–1070.

Grela, E.R., Günther, K.D., 1995. Fatty acid composition and tocopherol content of some legume seeds. *Anim. Feed Sci. Tech.* 52:325-331.

Griinari, J.M., Bauman, D.E. 1999. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. In: M. P. Yurawecz, M. M. Mossoba, J. K. G. Kramer, M. W. Griinari, J.M., Bauman, D.E. 1999. (Ed.) *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research* Vol. 1, pp 180-200. AOCS Press, Champaign, IL.

Griinari, J.M., Corl, B.A., Lacy, S.H., Chouinard, P.Y., Nurmela, K.V.V., Bauman, D.E., (2000). Conjugated Linoleic Acid Is Synthesized Endogenously in Lactating Dairy Cows by D9-Desaturase. *J. Nutr.* (130) 2285–2291.

Groot, J.C.J., Cone, J.W., Williams, B.A., Debersaques, F.M.A. 1996. Multiphasic analysis of gas production kinetics for *in vitro* fermentation of ruminant feedstuffs. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 64: 77-89.

Harfoot, C.G., Hazlewood, G.P., 1988. Lipid metabolism in the rumen. In: P.N. Hobson (ed.) *The rumen microbial ecosystem*. Elsevier Applied Science Publ., London, UK, pp 285-322.

Hegsted D.M., McGandy R.B., Stare F.J. 1965. Quantitative effects of dietary fat on serum cholesterol in man. *Am J Clin Nutr*, 17, 281-295.

Herridge, D.F., Macellos, H., Felton, W.L., Turner, G.L., Peoples, M.B., 1995. Chickpea increases soil-N fertility in cereal systems through nitrate sparing and N₂ fixation. *Soil Biol. Biochem.* 27, 545–551.

Hidiroglu, N., McDowell, L.R., Johnson, D.D., 1987. Effect of diet on animal performance, lipid composition of subcutaneous adipose tissue and liver tissue of beef cattle. *Meat Sci.* 20:195-210.

Hiller B , Andrea Herdmann and Karin Nuernberg. 2011. Dietary n-3 Fatty Acids Significantly Suppress Lipogenesis in Bovine Muscle and Adipose Tissue: A Functional Genomics Approach. *Lipids*, 46, 557-567.

Huisman, J., Tolman, G.H., 2001. Antinutritional factors in the plant proteins of diets for non-ruminants. In: Garnsworthy, P.C., Wiseman, J. (Eds.), *Recent Developments in Pig Nutrition*, vol. 3. Nottingham University Press, Nottingham, pp. 261–322.

Infascelli F. 2002. Cereal grains in animal nutrition. Proc. EUCARPIA, Cereal Section Meeting, Salsomaggiore, 21-25 novembre, 413-418.

Infascelli F., Tudisco R., Calabrò S., Grossi M., Cutrignelli MI. 2012. Alternative forages and protein sources for buffalo milk and meat production. Proc. 15th AAAP Animal Science Congress, November 26-30, Bangkok, Thailand, vol. 1, 221-234.

Infascelli F., Gigli S., Campanile G. 2004 Buffalo meat production: performance *infra vitam* and quality of meat. *Veterinary Research Communications*, 28, 143-148.

I.N.R.A. 1988. Alimentation des bovins, ovins et caprins. R., Jarrige (Eds.), Paris.

Jezierny D., Mosenthin R., Bauer E. 2010. The use of grain legumes as a protein source in pig nutrition: A review. *Anim. Feed Sci. Techn.*, 157, 111–128.

Keating A.F., Kennelly J.J., Zhao F.-Qi (2006). Characterization and regulation of the bovine stearoyl-CoA desaturase gene promoter. *Biochem.Biophys. Res. Comm.* 344, 233–240.

Kemp, P., Lander, D.J. 1984. Hydrogenation in vitro of α -linolenic acid to stearic acid by mixed cultures of pure strains of rumen bacteria. *J Gen Microbiol* 130, 527-533.

Kepler, C.R., Hirons, K.P., McNeill, J.J., Tove, S.B. 1966. Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J Biol Chem* 241, 1350-1354.

Khanal, R.C, Dhiman, T.R. 2004. Biosynthesis of conjugated linoleic acid (CLA): A review. *Pakistan J. Nutr.* 3 (2), 72-81.

Lanza M, Carla Fabro, Manuel Scerra, Marco Bella, Renato Pagano, Daniela Maria Rita Brogna, Pietro Pennini. 2011 Lanza Lamb meat quality and intramuscular fatty acid composition as affected by concentrates including different legume seeds. *Italian J. of Animal Sci*, 10, e4.

Liebman, M., Janke, R., 1990. Sustainable weed management practices. In: Francis, C.A., Flora, C.B., King, L.D. (Eds.), *Sustainable Agriculture in Temperate Zones*. John Wiley&Sons, New York, pp. 111–143.

Lock, A.L., Garnsworthy, P.C. 2003. Seasonal variation in milk conjugated linoleic acid and Δ^9 -desaturase activity in dairy cows. *Liv. Prod. Sci.* 79, 47-59.

Lock, A.L., Garnsworthy, P.C., 2002. Independent effects of dietary linoleic and linolenic fatty acids on the conjugated linoleic acid content of cow's milk. *Anim. Sci.* 74:163-176.

Lor J.J., Ferlay A., Ollier A., Ueda K., Doreau M., Chilliard Y. (2005) High-Concentrate Diets and Polyunsaturated Oils Alter Trans and Conjugated Isomers in Bovine Rumen, Blood, and Milk. *J. Dairy Sci.* 88:3986–3999.

López-Bellido, F.J., López-Bellido, L., López-Bellido, R.J., 2005. Competition, growth and yield of faba bean (*Vicia faba* L.). *Eur. J. Agron.* 23, 359–378.

Macgregor R. 1939. The domestic buffalo. Thesis, Royal College of Veterinary surgeons.

Manninen M., Virkajärvi P., Jauhiainen L. 2005. Effect of whole-crop barley and oat silages on the performance of mature suckler cows and their progeny in outdoor winter feeding. *Anim. Feed. Sci. Tech.*, 121:227-242.

Martin, G.S., Lunt, D.K., Britain, K.G., Smith, S.B. (1999) Postnatal development of stearoyl coenzyme A desaturase gene expression and adiposity in bovine subcutaneous adipose tissue. *J Anim Sci* 77, 630-636.

Maymone B. 1937. I bufali allevati in Italia. *Annali dell'Istituto Sperimentale Zootecnico di Roma*, 5.

Medrano J. F., Johnson A., DePeters E. J., Islas A. (1999). Genetic modification of the composition of milk fat: identification of polymorphisms within the bovine stearoyl-CoA desaturase gene. *J. Dairy Sci.* 82(Suppl. 1):71. (Abstr.).

Menke, K.H., Steingass H. 1988. Estimation the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Develop.*, 28: 7-55.

Mensink, R.P., Zock, P L., Kester, A.D M., Katan, M.B., 2003. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.* 77:1146-1155.

Miles E.A., Calder P.C. 1998. Modulation of immune function by dietary fatty acids. *Proc. Nutr. Sci.*, 57, 277-292.

Mir, Z., Paterson, L. J. and Mir, P. S 2000. Fatty acid composition and conjugated linoleic acid content of intramuscular fat in crossbred beef

cattle with and without Wagyu genetics fed a barley-based diet. *Can. J. Anim. Sci.* 80: 195–197.

Miron J., Zuckerman E, Adin G. et al. 2007. Comparison of two forage sorghum varieties with corn and the effect of feeding their silages on eating behaviour and lactation performance of dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 139, 23–39.

Mitchell, G.E., Reed, A.W., Rogers, S.A., 1991. Influence of feeding regime on the sensory qualities and fatty acid contents of beefsteaks. *J. Food Sci.* 56:1102-1103.

Moioli B., Orrù L., Catillo G., Congiu G.B., Napolitano F. (2005). Partial sequencing of Stearoyl-CoA desaturase gene in buffalo. *Italian J Anim Sci*, 4, 25-27.

Ntambi, J.M. 1999. Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *Journal of Lipid Research*, 40,1549-1558.

Parodi P.W. 1999. Conjugated linoleic acid and other anticarcinogenic agents of bovine milk fat. *J. Dairy Sci.*, 82, 1339–1349.

Parthasarathy S., Kloo J.C., Miller E, Barnett J., Witztum J. L., Steinberg D. 1990. Low density lipoprotein rich in oleic acid is protected against oxidative modification: implications for dietary prevention in atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 3894-98.

Pauciullo A., Cosenza G., D'Avino A., Colimoro L., Iorio C., Nicodemo D., Di Berardino D., Ramunno L. 2007. Preliminary analysis of Stearoyl Co-A Desaturase gene transcripts in River buffalo. *Italian J Anim Sci*, 6: 283-286.

Pauciullo A., G. Cosenza , A. D'Avino , L. Colimoro , D. Nicodemo , A. Coletta , M. Feligini , C. Marchitelli , D. Di Berardino , L. Ramunno 2010. Sequence analysis and genetic variability of stearoyl CoA desaturase (SCD) gene in the Italian Mediterranean river buffalo. *Molecular and Cellular Probes*, 24: 407-410.

Piccioni M., D. Cevolani, N. Rizzitelli, Dizionario per gli alimenti per il bestiame, ed. Edagricole, Bologna, 1989.

Priolo, A., Lanza, M., Galofaro, V., Fasone, V., Bella, M., 2003. Partially or totally replacing soybean meal and maize by chickpeas in lamb diets: intramuscular fatty acid composition. *Anim. Feed Sci. Tech.* 108:215-221.

Priolo, A., Micol, D., Agabriel, J., 2001. Effects of grass feeding on ruminant meat colour and flavour: a review. *Anim. Res.* 50:185-200.

Rowe, A., Macedo, F.A.F., Visentainer, J.V., Souza, N.E., Matsushita, M., 1999. Muscle composition and fatty acid profile in lambs fattened in dry lot or pasture. *Meat Sci.* 51:283-288.

Ryan, E., Galvin, K., O'Connor, T.P., Maguire, A.R., O'Brien, N.M., 2007. Phytosterol, squalene, tocopherol content and fatty acid profile of selected seeds, grains and legumes. *Plant Food. Hum. Nutr.* 62:85-91.

Salgado, P., Freire, J.P.B., Mourato, M., Cabral, F., Toullec, R., Lallès, J.P., 2002. Comparative effects of different legume protein sources in weaned piglets: nutrient digestibility, intestinal morphology and digestive enzymes. *Livest. Prod. Sci.* 74, 191–202.

SAS\STAT, 2000. User's Guide, Version 6.03. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

Scerra, M., Caparra, P., Foti, F., Cilione, C., Zappia, G., Motta, C., Scerra, V., 2011. Intramuscular fatty acid composition of lambs fed diets containing alternative protein sources. *Meat Sci.* 87:229-233.

Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M and Ragg T 2006. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology* 7, 3.

Sinclair A., Slattery W.J., O'Dea K. 1982. In: Kesava Rao et al. Effect of processing and storage on neutral lipids of buffalo meat. *Meat Sci.*, 1992, 31-25.

Singh, R.J., Chung, G.H., Nelson, R.L., 2007. Landmark research in legumes. *Genome* 50, 525–537.

Sprent, J.I., Thomas, R.J., 1984. Nitrogen nutrition of seedling grain legumes: some taxonomic, morphological and physiological constraints. *Plant Cell Environ.* 7, 637–645.

Stazi 1910. Il bestiame bufalino in Roma ed in Italia. *Boll. Quindicennale della Società degli Agricoltori Italiani*. Roma.

Taniguchi M., Utsugi T., Oyama K., Mannen H., Kobayashi M., Tanabe Y., Ogino A., Tsuji S. 2004. Genotype of stearoyl-CoA desaturase is associated with fatty acids composition in Japanese Black cattle. *Mammalian Genome*, 14, 142- 148.

Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B., France, J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 48: 185-197.

Trostle, R., 2008. Global agricultural supply and demand: Factors contributing to the recent increase in food commodity prices. A Report from the Economic Research Service. United States Department of Agriculture Economic Research Service, Washington, DC

Tudisco R., Lombardi P., Bovera F., d'Angelo D., Cutrignelli M.I., Mastellone V., Terzi V., Avallone L., Infascelli F. 2006. Genetically modified soybean in rabbit feeding: detection of DNA fragments and evaluation of metabolic effects by enzymatic analysis. *Animal Science*, 82, (2) 193-197.

Tudisco R., Mastellone V., Cutrignelli M.I., Lombardi P., Bovera F., Mirabella N., Piccolo G., Calabrò S., Avallone L., Infascelli F. 2010. Fate of transgenic DNA and evaluation of metabolic effects in goats fed genetically modified soybean and in their offsprings. *Animal*, 4, 1662-1671.

Ulbricht, T.L.V., Southgate, D.A.T., 1991. Coronary heart disease: seven dietary factors. *Lancet* 338:985-992.

Valsta, L.M., Tapanainen, H., Mannisto, S., 2005. Meat fats in nutrition – a review. *Meat Sci.* 70:525-530.

Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.*, 74: 473-481.

Vasta V, Priolo A, Scerra M, Hallett KG, Wood JD, Doran O. 2009. Δ^9 desaturase protein expression and fatty acid composition of longissimus muscle in lambs fed green herbage or concentrate with or without added tannins. *Meat Sci* 82:357–364.

Wang YH, Bower NI, Reverter A, Tan SH, De Jager N, Wang R, McWilliam SM, Café LM, Greenwood PL, Lehnert SA. 2009. Gene expression patterns during intramuscular fat development in cattle. *J Anim Sci* 87:119–130

Ward, R.J., Travers, M.T., Richards, S.E., Vernon, R.G., Salter, A.M., Buttery, P.J., Barber, M.C. 1998 Stearoyl-CoA desaturase mRNA is transcribed from a single gene in the ovine genome. *Biochim Biophys Acta* **1391**, 145-156.

Wood, J.D., Enser, M., 1997. Factors influencing fatty acids in meat and the role of antioxidants in improving meat quality. *Brit. J. Nutr.* 78:S49-S60.

Wood, J.D., Enser, M., Fisher, A.V., Nute, G.R., Richardson, R.I., Sheard, P.R., 1999. Manipulating meat quality and composition. *Proc. Nutr. Soc.* 58:363-370.

Woods, V.B., Fearon, E.A., 2009. Dietary sources of unsaturated fatty acids for animals and their transfer into meat, milk and eggs: a review. *Livest. Sci.* 126:1-20.

Yang, A., Larsen, T.W., Smith, S.B., Tume, R.K., 1999. D-9 desaturase activity in bovine subcutaneous fatty acid composition. *Lipids* (34) 971–978.

Yoshida, H., Saiki, M., Yoshida, N., Tomiyama, Y., Mizushina, Y., 2008. Fatty acid distribution in triacylglycerols and phospholipids of broad beans (*Vicia faba*). *Food Chem.* 112: 924-928.

Yoshida, H., Tomiyama, Y., Saiki, M., Mizushima, Y., 2007. Tocopherol content and fatty acid distribution of peas (*Pisum sativum* L.). *J. Am. Oil Chem. Soc.* 84:1031-1038.

Zhang L, Ge L, Parimoo S, Stenn K, Prouty SM. 1999. Human stearoyl-CoA desaturase: alternative transcripts generated from a single gene by usage of tandem polyadenylation sites. *Biochem J*,340:255-64.

Zicarelli L. 2001. Evoluzione dell'allevamento bufalino in Italia. Atti I Congresso Nazionale sull'allevamento del bufalo. Eboli (SA), 3-5 Ottobre: 1-19.

Zicarelli L., Campanile G. 2001. La storia del bufalo. *Mozzarelle di bufala*. Ed. Slow Food.