

● METODICHE E RISULTATI DELLE FERMENTAZIONI RUMINALI IN LABORATORIO

# Innovazioni nutrizionali dal «rumine *in vitro*»

Dalle analisi *in vitro* si possono ottenere dati nutrizionali utili e complementari alle analisi chimiche: fermentazioni in laboratorio di carboidrati (fibrosi e amilacei) e sostanze azotate potrebbero fornire informazioni avanzate e innovative su oltre il 75% della razione per le bovine da latte

di **Mauro Spanghero**

L'alimentazione delle bovine da latte ad alta produzione richiede la formulazione di diete sempre più perfezionate dal punto di vista nutrizionale per assicurare la copertura degli elevati fabbisogni a livello ruminale. Gli alimentaristi hanno quindi la necessità di disporre di parametri di valutazione aggiornati e accurati per una valutazione delle diete e degli ingredienti sotto i diversi aspetti nutrizionali. Sono al riguardo state messe a punto analisi

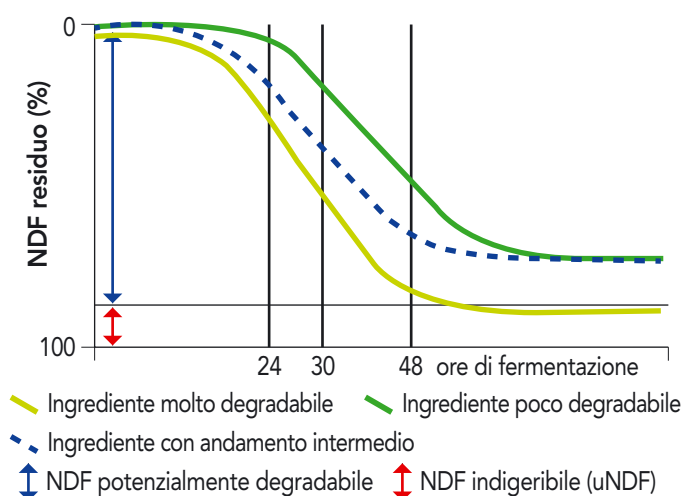
chimiche molto specifiche e innovative, ma, purtroppo, i processi nutrizionali, e in particolare quelli di digestione ruminale, sono molto complessi e non sempre il frazionamento chimico riesce a fornire indicazioni aderenti alla reale utilizzazione da parte dell'animale.

**Le tecniche di fermentazione ruminale *in vitro* simulano, in maniera semplificata, quanto avviene nel rumine e forniscono quindi dati nutrizionali integrativi e complementari alle analisi chimiche.** Si tratta di test di fermentazione di laboratorio che utilizzano ridotti quantitativi di alimenti

o diete (0,5-1 g di prodotto macinato ed essiccato), inseriti in beute o vasi contenenti microrganismi ruminali (inoculo) per una incubazione (a 39 °C in anaerobiosi) di breve durata (16, 24, 30 o 48 ore) e, se da un punto di vista fisiologico sono più corretti, al termine della quale si misura il residuo indigerito o i prodotti di fermentazione.

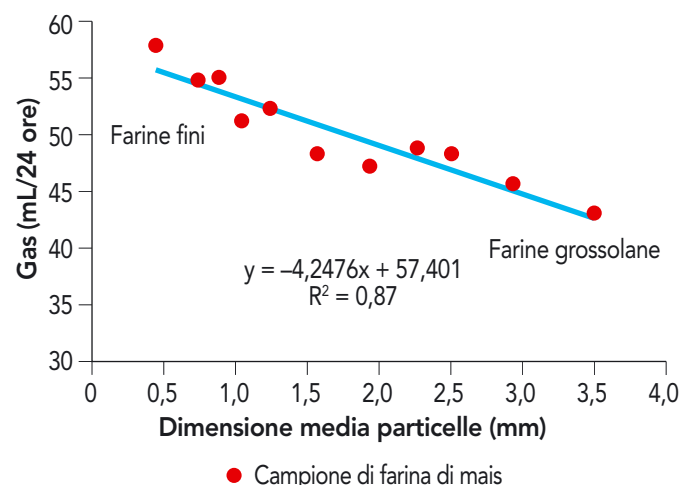
Sono disponibili numerose tecniche di fermentazione ruminale e una loro classificazione si basa sulla frazione alimentare per la quale sono state messe a punto. Le diete miste per bovine da latte sono principalmente composte da carboidrati fibrosi (30-33 % di sostanza secca) e amilacei (24-28% di sostanza secca) e da sostanze azotate (15-17% di sostanza secca): attualmente disponiamo di tecniche di fermentazione *in vitro* per tutte queste frazioni e quindi **la loro applicazione potrebbe consentire di fornire un'informazione nutrizionale avanzata e innovativa su oltre il 75% della razione per bovine da latte.**

**GRAFICO 1 - Cinetiche di degradazione ruminale dell'NDF di ingredienti diversi con partizione in frazioni (potenzialmente degradabile e indigeribile) e indicazione delle misure di digeribilità dell'NDF a tempi fissi**



La uNDF (NDF indigeribile) permette di stimare per differenza la frazione di NDF potenzialmente digeribile e quindi, adottando parametri di cinetica ruminale, consente di ottenere la quantità effettiva di NDF degradato.

**GRAFICO 2 - Produzione di gas da fermentazione ruminale *in vitro* di farine di mais a diversa granulometria**



Fonte: rielaborazione da dati di Gallo et al., 2016.

Come evidenziato nel grafico vi è una relazione lineare molto stretta tra produzione di gas (e quindi fermentescibilità ruminale) e granulometria delle farine mais.

## Degradabilità dell'NDF *in vitro*

La degradabilità *in vitro* della fibra NDF (denominata **NDFD**) ha da sempre ricevuto una grande attenzione poiché rappresenta una frazione parzialmente utilizzabile solo a livello ruminale e gli alimentaristi sono generalmente interessati a scegliere foraggi e soluzioni alimentari per aumentare la NDFD della dieta, che spesso è eccessivamente bassa: basti pensare che una recente raccolta di prove *in vivo* (Goesser, 2014) ha dimostrato che mediamente **le bovine da latte ad alta produzione digeriscono meno di metà della fibra che ingeriscono con la dieta (dal 39 al 44%)**.

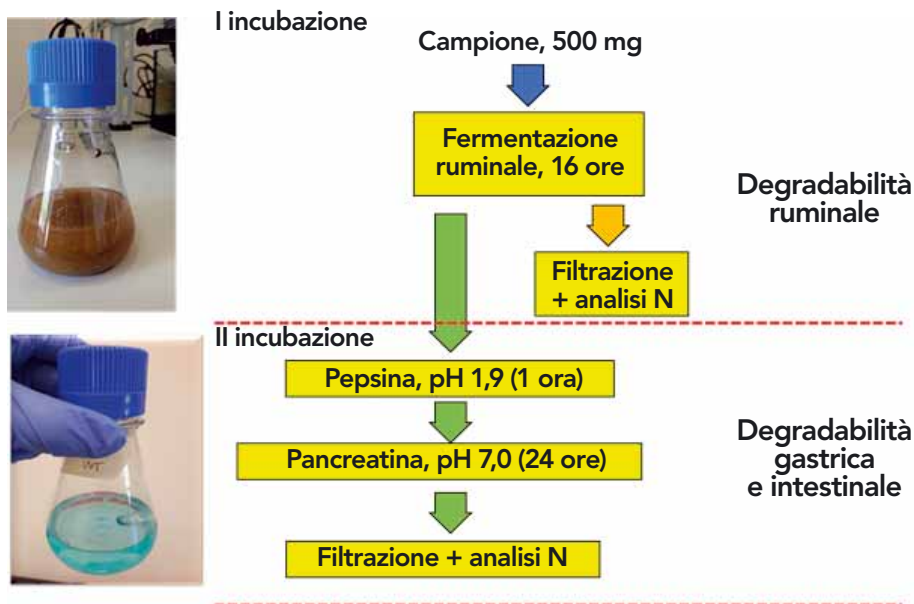
Ormai da qualche decennio si è consolidato l'impiego di una tecnica *in vitro* che utilizza un'apparecchiatura di incubazione dotata di 4 vasi in cui viene inserito l'inoculo e sacchetti di tessuto poroso riempiti con gli ingredienti (fermentatore Daisy della Ankom). Sono indubbi i vantaggi legati all'elevata capacità di lavoro della metodica (circa 30 campioni in triplicato per singola incubazione), ma esiste qualche remora per la ridotta dimensione dei pori, che potrebbe limitare l'accesso dei batteri al materiale interno ai sacchetti e pertanto alcuni gruppi di ricerca danno preferenza alla fermentazione in beute.

Un intenso dibattito ha da sempre riguardato il tempo più appropriato di durata della fermentazione (24, 30 o 48 ore) e se, da un punto di vista fisiologico, sono più corretti i tempi brevi, la precisione della metodica migliora con i tempi lunghi.

### Il valore dell'NDF indigeribile

I dati NDFD sono stati arricchiti più recentemente da una nuova misura che rappresenta la quantità di fibra NDF indigeribile nel rumine (**uNDF**), misurata dopo un tempo molto elevato (ad esempio 240 ore): questa misura esprime la fibra che permane a lungo nel rumine, determina un effetto di ingombro e quindi limita dell'ingestione alimentare. L'uNDF permette inoltre di stimare per differenza la frazione di NDF potenzialmente digeribile e quindi, adottando parametri di cinetica ruminale (velocità di degradazione e di passaggio ruminale), consente di ottenere la quantità effettiva di NDF degradato (grafico 1). Su questi aspetti è

**FIGURA 1 - Rappresentazione della metodica *in vitro* per la misura della degradabilità ruminale e gastro-intestinale della proteina**



Recentemente è stata proposta una procedura che prevede una tappa di fermentazione ruminale in beute, seguita da una seconda incubazione che, in una prima fase, simula il trattamento gastrico e poi, in una seconda fase, quello intestinale.

in atto un'importante attività di ricerca internazionale alla quale partecipano anche gruppi italiani (Palmonari et al., 2016 e 2017).

## Amido: ago della bilancia tra fermentazioni e pH

Il contenuto di amido della dieta per bovine da latte è un'informazione nutrizionale essenziale, ma altrettanto importante è fornire una misura della sua degradazione ruminale. Un'insufficiente disponibilità di amido degradabile limita la crescita microbica ruminale e quindi l'apporto di proteina di qualità a livello intestinale; inoltre, se si supera la capacità di digestione intestinale, **quantitativi elevati di amido possono raggiungere gli ultimi tratti del digerente e stimolare fermentazioni anomale e intense**. Al contrario, **un'eccessiva fermentescibilità ruminale dell'amido genera il rischio di un forte abbassamento del pH ruminale e l'instaurarsi di forme di acidosi**. Secondo la citata raccolta di dati *in vivo* di Goesser (2014) la **digestione ruminale dell'amido** negli unifeed è molto variabile, con un range stimato del **54-70%**.

È pertanto di grande utilità conoscere e comparare la fermentescibilità

dell'amido, che dipende però da molti fattori (specie botanica di origine, granulometria di macinazione, trattamenti idro-termomeccanici, conservazione per insilamento, durata dell'insilamento, ecc.). Pertanto, la digeribilità ruminale dell'amido è piuttosto difficile da prevedere a causa dei numerosi fattori che la condizionano ed è auspicabile disporre di una misura diretta di valutazione, come una tecnica *in vitro*.

### Come si misura

Esiste una metodica *in vitro* ad hoc specifica che misura la scomparsa specifica di amido dopo 7 ore di fermentazione ruminale in beute. Poiché è richiesta l'analisi dell'amido residuo la tecnica è giudicata laboriosa e anche di limitata precisione (Gallo et al., 2016; Ward, 2017). In alternativa, può essere usata una tecnica *in vitro* denominata «gas test» con la quale si misura in tempo reale il gas che si libera nel sistema di fermentazione senza la necessità di ulteriori analisi e che risulta proporzionale alla quantità di acidi grassi volatili liberati dalla fermentazione.

La metodica è molto veloce e a basso costo poiché non necessita di ulteriori analisi, ma ha il limite di misurare il gas di fermentazione che si origina



**Foto 1** Impianto sperimentale di fermentatori continui per la produzione di liquido di fermentazione ruminale

da tutto il materiale che fermenta e non specificatamente dall'amido e per questo motivo deve essere applicata a ingredienti con un medesimo contenuto di amido. Un interessante impiego recente della metodica ha riguardato la comparazione di farine di cereali a diversa granulometria: come si può osservare dal grafico 2, che riporta una rielaborazione dei dati originali prodotti dal gruppo di ricerca di Piacenza (Gallo et al., 2016), vi è una relazione lineare molto stretta tra produzione di gas (e quindi fermentescibilità ruminale) e granulometria delle farine mais.

La frazione proteica, similmente a quella amilacea, viene in parte degradata (RDP) e in parte supera il rumine indegradata (RUP) e viene poi digerita nei tratti gastrointestinali. La digeribilità intestinale della frazione RUP e la partizione tra RDP e RUP sono informazioni nutrizionali di grande rilevanza. **La proteina degradabile nel rumine assicura ammoniaca ai microrganismi ruminali per la crescita e la degradazione. Una sua carenza riduce l'efficienza di digestione ruminale e il rifornimento di proteina microbica.**

Al contrario, **l'eccesso di RDP è pericoloso per la bovina e ha effetti inquinanti sull'ambiente, in quanto l'ammoniaca ruminale assorbita è tossica** (in primis con effetti negativi sulla fertilità) e viene escreta come urea con le urine. Infine, **i trattamenti termici che vengono applicati con diverse motivazioni nutrizionali** (gelatinizza-

zione degli amidi, disattivazione dei fattori antinutrizionali, aumento del by pass ruminale, ecc.) **se troppo intensi, possono portare a una riduzione della digeribilità intestinale della frazione RUP.**

Negli anni '70 e '80 sono state condotte numerose prove di degradabilità, con l'incubazione diretta di sacchetti porosi nel rumine di animali cannulati (*in situ*). Successivamente, e fin dagli anni '90, sono state messe a punto procedure *in vitro* che si articolano in tappe successive di digestione (Calsamiglia e Stern, 1995; Gargallo et al., 2006). Recentemente è stata proposta una procedura (Ross et al., 2013) che prevede una tappa di fermentazione ruminale in beute, seguita da una seconda incubazione che, in una prima fase, simula il trattamento gastrico, e poi in una seconda fase quello intestinale (figura 1).

Nonostante l'evidente utilità di queste procedure per migliorare gli standard di consulenza alimentare per le bovine da latte, la loro diffusione pratica è stata fin ora molto limitata, principalmente per la difficoltà di disporre nei laboratori di inoculi ruminali. Il prelievo del liquido da animali *in vivo* (attraverso cannule ruminali o mediante sonde esofagee) deve essere autorizzato dalle autorità sanitarie. Inoltre, è necessario disporre di liquido da animali alimentati con diete di produzione (non sempre realizzabile con animali cannulati), campionare il liquido dall'intero rumine (non facile

da realizzare con le sonde) ed eseguire i campionamenti da un numero adeguato di animali per attenuare le variabilità individuali.

Il reperimento al macello del liquido (da animali macellati per motivi produttivi) può rappresentare una valida alternativa, ma rimane l'incognita dell'alimentazione ricevuta dagli animali e la difficoltà di organizzare continui rifornimenti da impianti di macellazione situati anche a elevata distanza dal laboratorio. Le tecniche spettrofotometriche (ad esempio, attrezzature NIR) vengono impiegate per stimare indirettamente i dati *in vitro*, ma non sempre sono risultate accurate e precise.

Un'alternativa agli inoculi ruminali provenienti dagli animali ancora in una fase sperimentale iniziale è la produzione di liquido di fermentazione ruminale con sistemi continui di fermentazione (rumini artificiali, foto 1). Ciò permetterà la fornitura di un inoculo senza il ricorso ad animali e con caratteristiche fisico-microbiologiche costanti (ad esempio, pH, densità, concentrazione batterica e protozoaria, contenuto di acidi grassi volatili, ecc.), per poter confidare che i risultati possano essere positivi e che le fermentazioni *in vitro* trovino un'adeguata diffusione nei laboratori agro-zootecnici a supporto degli alimentaristi che operano negli allevamenti (agronomi, veterinari, tecnici di ditte sementiere e mangimistiche, ecc.) per poter fornire una consulenza alimentare sempre più innovativa per la bovina da latte ad alta produzione.

**Mauro Spanghero**

Dipartimento di scienze  
agroalimentari, ambientali e animali  
Università di Udine

**V** Questo articolo è corredato di bibliografia/contenuti extra. Gli Abbonati potranno scaricare il contenuto completo dalla Banca Dati Articoli in formato PDF su: [www.informatoreagrario.it/bdo](http://www.informatoreagrario.it/bdo)

# Innovazioni nutrizionali dal «rumine *in vitro*»

**L'INFORMATORE  
AGRARIO**

## BIBLIOGRAFIA

- Calsamiglia S., Stern M.D. 1995. A three-step *in vitro* procedure for estimating intestinal digestion of protein in ruminants. *J Animal Sci.*, 73: 1459-1465.
- Gallo A., Giuberti G., Masoero F., 2016. Gas production and starch degradability of corn and barley meals differing in mean particle size. *Journal of Dairy Sci.* 99: 4347-4359.
- Gargallo S., Calsamiglia S., Ferret A., 2006. Technical note: A modified three step *in vitro* procedure to determine intestinal digestion of proteins. *J Animal Sci.*, 84: 1-5.
- Goeser J. 2014. What Do the Cows Have to Say About NDF and Starch Digestion? 4-State Dairy Nutrition and Management Conference, June 11-12, Dubuque, Iowa, USA.
- Ross D.A., Gutierrez-Botero M., Van Amburgh M.E., 2013. Development of an *in vitro* intestinal digestibility assay for ruminant feeds. *Proc. Cornell Nutrition Conference.* Syracuse, NY: 190-202.
- Palmonari A., Gallo, A, Fustini M., Canestrari G., Masoero F., Sniffen C.J., Formigoni A. 2016. Estimation of the indigestible fiber in different forage types, *Journal of Animal Sci.*, 94: 248-254.
- Palmonari A., Canestrari G., Bonfante E., Fustini M., Mammi L., Formigoni A. 2017. Technical note: *In vitro* digestibility of amylase-treated, ash-corrected neutral detergent fiber, with addition of sodium sulfite, at 240 hours with or without rumen fluid reinoculation. *Journal of Dairy Sci.*, 100: 1200-1202.
- Ward, 2017. Starch digestibility: how it's measured, reported and used. *Proc. Pennsylvania State University Conference*, 15-17 November.

# L'INFORMATORE AGRARIO

[www.informatoreagrario.it](http://www.informatoreagrario.it)



Edizioni L'Informatore Agrario

Tutti i diritti riservati, a norma della Legge sul Diritto d'Autore e le sue successive modificazioni. Ogni utilizzo di quest'opera per usi diversi da quello personale e privato è tassativamente vietato. Edizioni L'Informatore Agrario S.r.l. non potrà comunque essere ritenuta responsabile per eventuali malfunzionamenti e/o danni di qualsiasi natura connessi all'uso dell'opera.