

***Azione 1.1.5 “Sostegno all’avanzamento tecnologico delle imprese attraverso il finanziamento di linee pilota e azioni di valutazioni su larga scala”
PO FESR Sicilia 2014-2020***

**Progetto di ricerca
“Nuovi prodotti dalla trasformazione agroindustriale di
frutti da colture mediterranee e gestione sostenibile dei
sottoprodotti - MedFruit”**



Università di Catania



Allegato 19:

“Prove sperimentali per la produzione del mangime modello arricchito di polifenoli estratti dal residuo solido dei depolpati”

- Citrofood snc
- In4Tech Bioprocess

TECHNICAL REPORT

AZIONE 1.1.5 PO FESR SICILIA 2014-2020

Progetto "Nuovi prodotti dalla trasformazione agroindustriale di frutti da colture mediterranee e Gestione sostenibile dei sottoprodotti (MedFruit)" - cod. CUP: G18I18001700007

Relazione dell'incarico svolto dalla In4Tech Bioprocess Srl come da contratto n. B738A20 del 06/04/2020 con la Citrofood Srl: attività svolta dalla In4Tech Bioprocess Srl durante il periodo 01/10/2020 - 30/01/2021.

Giugliano in Campania 08/03/2021

Prove sperimentali

Premesse

I tragici eventi connessi alla pandemia Covid-19 hanno pesantemente influito sull'intera gestione del progetto; le restrizioni sanitarie imposte nel periodo in oggetto hanno infatti limitato, se non bloccato, gli spostamenti sia tra regioni che interregionali, rendendo estremamente difficoltose tutte le attività non strettamente necessarie.

Si è dovuto pertanto riorganizzare le attività previste, per rispettare il programma atteso e per non perdere la stagione agrumaria, in pieno svolgimento proprio nei mesi in questione.

Nonostante le difficoltà i risultati sono stati estremamente positivi: l'estratto risulta migliore, in termini di potere antiossidante, dei più pregiati prodotti commerciali con la medesima destinazione d'uso: migliorare il benessere animale grazie al potere antiossidante dei polifenoli d'agrumi contenuti nell'estratto.

Protocollo sperimentale

Per quanto in premessa, la difficoltà maggiore è stata l'individuazione di un allevamento idoneo all'esecuzione dei test, in un periodo di grande difficoltà.

Si è pertanto optato per una collaborazione con la Fattoria Sociale "Sirio Lupo Celeste" di Fratta Polesine (RO), gestita da imprenditori laureati in Agraria e pertanto sia competenti per l'esecuzione dei test sia disponibili ed interessati agli stessi, tanto da partecipare attivamente alle sessioni di training in remoto ed alla condivisione attiva dei dati.

La Fattoria si occupa di addestramento cinofilo, di didattica per infanzia e prima infanzia e di servizi sociali per disabili (pet therapy); a tale scopo dispone di diverse specie animali, asini, capre, pecore nane e conigli, espressamente allevati per interagire con gli utenti.

Per l'esecuzione dei test è stato scelto un gruppo di otto coniglietti cincillà nati ad ottobre 2020 e che alla data di avvio del test avevano circa 50 giorni.

I conigli cincillà sono allevati come animali da affezione, che vivono in media circa otto anni. Hanno una crescita meno

In4Tech Bioprocess s.r.l

rapida di altre specie di conigli, quindi presentano più a lungo l'aspetto tipico del coniglio cucciolo.

La prova sperimentale si è basata sulla verifica del tasso di crescita di un gruppo di quattro conigli (tre maschi ed una femmina) contro un gruppo di controllo equivalente. Per l'esecuzione dei test si è utilizzato come base un protocollo sperimentale gentilmente fornito dalla Facoltà di Veterinaria dell'Università di Bologna.

I conigli sono stati alimentati allo stesso modo, con una miscela di erba medica secca, cruschetto e farina di soia avente un contenuto medio di protidi grezzi al 18 - 20%, fibra (ADF - Van Soest) al 20 - 25% ed umidità max. al 12%, salvo l'utilizzo sporadico di erba di sfalcio prodotta direttamente in fattoria.

L'unica differenza nell'alimentazione dei due gruppi è stato l'utilizzo o meno del prodotto in esame, somministrato nell'acqua che i conigli potevano bere a piacere.

Per la definizione del prodotto si è fatto riferimento ad uno dei migliori prodotti disponibili in commercio: il citrobex della Vetoquinol.

Il citrobex è un prodotto commerciale registrato come modulatore digestivo, il cui ingrediente principale è l'estratto di *Citrus aurantium*, la cui attività antiossidante è riconosciuta accrescere la risposta immunitaria a livello della mucosa intestinale.

Il prodotto è piuttosto diluito (15% di estratto) pertanto è additivato con glicerina, saccarosio, acido lattico 1% ed acido citrico 1%. Qui di seguito l'etichetta.

COMPOSIZIONE:

- Umidità 86,5%
- Proteina grezza 1,10%
- Lipidi grezzi 0, 0%
- Fibra grezza 0,1%
- Ceneri solforiche 0,1%

Le indicazioni d'uso di Citrobex prevedono di diluirlo 1:1000 in acqua e ne caso dei conigli di somministrarlo per 5-7 giorni al mese per tutta la vita degli animali a partire dal 20^{mo} giorno di vita

Preparazione del nuovo prodotto oggetto della sperimentazione

Il prodotto oggetto della sperimentazione è stato realizzato secondo quanto indicato nelle relazioni precedenti; la purea di decanter fornita da Citrofood è stata estratta con etanolo e la soluzione risultante è stata concentrata fino ad ottenere una soluzione con le seguenti caratteristiche:

Parametro	U.M	Valore	LoQ
Descrizione	Polifenoli estratti B738/021		
Umidità <i>Rapporti ISTISAN 1996/34 pag 7 Met B</i>	% su TQ	49,3	0,1
Ceneri <i>Rapporti ISTISAN 1996/34 pag 77</i>	% su TQ	2,7	0,01
Polifenoli <i>Vd. metodo relazione del 29/05/20</i>	% su TQ	5,1	0,1
Potere antiossidante <i>Vd. metodo sotto</i>	Umol/Osost.secca	14,4	0,3

Per la determinazione dell'attività antiossidante su campioni di estratti vegetali si è utilizzato un metodo basato sulla capacità di molecole antiossidanti di varia natura (polifenoli, carotenoidi) di trasformare la specie radicalica ABTS^{•+} di colore verde-blu in soluzione acquosa, nella sua forma ridotta incolore: la differenza di assorbanza riscontrata tra prima e dopo la reazione è direttamente proporzionale alla quantità di antiossidanti presenti.

La curva di calibrazione è realizzata con il Trolox, un reattivo fenolico che funge da antiossidante di

riferimento ed il risultato è espresso come pmoli di Trolox su massa di estratto vegetale.

Citrobex, analizzato con lo stesso metodo, ha dato un potere antiossidante di 1,3 pmol per mg da cui si è dedotto che il nuovo prodotto, oggetto della sperimentazione, non soltanto sia più concentrato di

quasi tre volte (e pertanto non necessita di additivi e conservanti, perché stabile), ma sia anche quasi sei volte più attivo dei migliori prodotti commerciali.

Sulla base di quanto sopra, si è deciso di utilizzare il nuovo prodotto mettendone due gocce per litro d'acqua, una metodologia ritenuta comoda e facilmente gestibile dagli agronomi che hanno eseguito il test.

Dati sperimentali

La prova è durata per sette settimane, durante le quali i conigli sono stati pesati una volta alla settimana (accanto alle date il numero di giorni di vita dei conigli).

	Coniglio(*)	Peggy	Gigio	Tommy	Lea	Redy	Macchia	Bas	Gigia
Data	(giorni)	M	M	M	F	M	M	M	F
02/12/2020	50	1203	1195	1207	1101	1220	1197	1181	1099
09/12/2020	57	1475	1450	1472	1316	1446	1423	1408	1294
16/12/2020	64	1715	1704	1742	1522	1675	1654	1624	1484
23/12/2020	71	1973	1964	1999	1730	1903	1877	1853	1670
30/12/2020	78	2214	2214	2258	1939	2124	2098	2079	1867
07/01/2021	86	2512	2495	2560	2184	2380	2364	2348	2095
13/01/2021	92	2718	2705	2779	2362	2574	2560	2549	2257
20/01/2021	99	2955	2949	3041	2564	2814	2793	2775	2442

(*) i nomi dei conigli, scelti da una scolaresca in visita alla fattoria, sono stati utilizzati anche come identificativi nella sperimentazione.

Il peso medio dei conigli in esame (prime quattro colonne della tabella precedente) all'inizio della prova era di 1.176,5 gr contro il valore di 1.174,3 gr del gruppo di controllo. I due gruppi pertanto erano perfettamente equivalenti e composti entrambi da tre maschi ed una femmina.

Il peso medio finale è stato di 2.877,3 gr contro i 2.706,0 gr del gruppo di controllo: una crescita ponderale maggiore del 6%, un dato statisticamente significativo.

Considerando i soli maschi (che crescono maggiormente delle femmine), all'inizio della prova presentavano mediamente lo stesso peso (1.201,7 gr contro 1.199,3 gr) ed alla fine i conigli allevati con il prodotto in esame pesavano mediamente 2.981,7 gr contro i 2.794,0 gr del gruppo di controllo: un incremento del 6,3%.

L'aumento ponderale medio giornaliero è stato di 34 gr per i conigli allevati con il prodotto in esame (35,6 gr considerando i soli maschi) contro i 30,6 gr (31,9 gr i maschi) del gruppo di controllo.

Il protocollo originario avrebbe previsto la macellazione ed una verifica ponderale della massa grassa e magra dell'animale, ma trattandosi di animali da affezione non si è voluto procedere in tal senso.

Nota: Per la prova è stato deciso di utilizzare il prodotto ogni giorno su acqua fresca e di gettare l'acqua non utilizzata; evidentemente l'idea di sprecare il prodotto non piaceva e visto che in fattoria è presente anche un allevamento domestico di polli, a questi è stata data l'acqua rimasta del giorno precedente. Al termine della prova è stato riferito che le galline ovaiole hanno prodotto uova più grandi e più rosse per tutta la durata del test.

Visto che questa affermazione non è suffragata da evidenze (non c'è stato un protocollo di prova e/o analisi a conferma), questa affermazione rientra certamente nella categoria di aneddoto, tuttavia fornisce una prova della palabilità del prodotto in avicoltura.

Test di conservabilità

Nel corso della prova è stato sollevato il problema dell'eventuale produzione di estratto idroalcolico in agrumaria.

L'impianto descritto nella relazione di ottobre 2020 prevede infatti l'uso di etanolo e la conseguente realizzazione di un'area idonea alle produzioni in atmosfere potenzialmente esplosive (Aree ATEX).

L'alternativa sarebbe di spostare la purea di decanter e/o il pastazzo in un sito idoneo, il che implica una qualche operazione di conservazione. A tale proposito è stato suggerito di aggiungere 2 g/Kg di metabisolfito di sodio come conservante.

Per verificare questa ipotesi è stato avviato un test di conservazione su tre matrici di agrumi (due di arance ed una di limone), conservate in vasi di vetro non sterili in doppio campione: uno trattato con metabisolfito ed uno utilizzato come riferimento ("insilato").

Campione ACR2020-11-06B (pastazzo)

Qui di seguito i dati di avvio del test.

Umidità	84,3%
Ceneri	0,38%
Protidi	1,10%
NDF	1,20%
ADF	8,00%
ADL	4,70%
Polifenoli Potere	1,30%
antioss.	2,1 µmol/g ss.

Conclusioni

Il prodotto oggetto dello studio è stato definito in modo univoco e tale da essere originale nel settore dei prodotti omologhi in campo zootecnico.

**Campione ACR2020-11-06P
(purea)**

Umidità	86,4%
Ceneri	0,34%
Protidi	0,94%
NDF	9,60%
ADF	7,10%
ADL	5,40%
Polifenoli	1,40%
Potere antioss.	2,3 $\mu\text{mol/g ss.}$

Pur nei limiti sopra evidenziati, il test di appetibilità in campo avicunicolo è stato positivo ed il prodotto ha evidenziato una efficacia statisticamente rilevante, dimostrando di contribuire attivamente al benessere degli animali e, di conseguenza, favorirne la crescita e lo sviluppo.

**Campione AGL2020-11-06A
(limone)**

Umidità	83,7%
Ceneri	0,39%
Protidi	1,10%
NDF	6,70%
ADF	3,70%
ADL	1,50%
Polifenoli	1,15%
Potere antioss.	2,0 $\mu\text{mol/g ss.}$

Nel confronto con prodotti commerciali già esistenti, il prodotto si è dimostrato superiore ai migliori prodotti disponibili, per l'elevata concentrazione, che rende inutile l'uso di additivi sintetici e per il potere antiossidante significativamente superiore anche tenendo conto della diversa concentrazione.

L'uso della purea di decanter per questo scopo appare tecnologicamente ottimale, a tale proposito è stato avviato un test di conservabilità volto a superare eventuali difficoltà di tipo impiantistico.