

# CONFRONTO TRA METODO KJELDHAL E NIR PER LA DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI PROTEINE GREZZE IN FOGLIE DI GELSO.

G.M. Colonna\*, S. Gropelli\*, S. Faragò\*, S. Cappellozza\*\*, M. Ferri\*\*\*

\*Stazione Sperimentale per la Seta – Milano/Como

\*\*ISZA-Sez. Spec. Per la Bachicoltura - Padova

\*\*\*BÜCHI Italia S.r.L., Assago (Mi)

## Riassunto

Il gelso, secondo classificazione botanica una dicotiledone appartenente alla sottoclasse delle *amamelidae*, ordine delle *urticales*, famiglia delle *moracae*, è generalmente associato alla sericoltura cioè alla produzione di seta dall'allevamento del baco *Bombyx mori*.

La coltivazione del gelso per tale scopo risale in Cina a parecchie migliaia di anni fa ma solo in epoca più recente si è avuta un'ampia diffusione in altri paesi. La produzione di seta è attualmente dominata da Cina ed India.

La selezione di specie e varietà di gelso è da sempre stata condotta ricercando le migliori caratteristiche nutrizionali, con la produzione di elevate quantità di foglia della migliore qualità, della quale il contenuto di proteine grezze è il più utilizzato tra i parametri di controllo.

Nel presente lavoro sono state prese in considerazione alcune varietà di gelso, le italiane Florio e Morettina e le giapponesi Kayrio, Kokusò 20 e 27, coltivate presso l'Istituto di Zoologia Agraria Sezione Specializzata per la Bachicoltura di Padova. E' stata determinata la variazione del contenuto di protidi grezzi durante la stagione di crescita da maggio a settembre, tenendo presente che le foglie di fine agosto e settembre sono foglie nuove cresciute dopo lo sfalcio di luglio.

Per ogni prelievo sono stati preparati tre campioni che sono stati essiccati, macinati e analizzati sia secondo il tradizionale metodo Kjeldahl che per spettroscopia in riflettanza nel vicino infrarosso. Sono stati analizzati circa cento campioni parte dei quali è servita per la costruzione di una curva di calibrazione nel range 9 - 25 % di contenuto proteico.

Confrontando i risultati ottenuti si è osservato che approssimativamente nel 50 % dei casi la differenza tra i valori ottenuti sui singoli campioni con i due metodi è inferiore all'incertezza del metodo Kjeldahl calcolata nel nostro laboratorio su un campione di media concentrazione.

La differenza tra i valori medi per prelievo non superano il 5 % e le variazioni stagionali rilevate sono confermate per tutte le razze di gelso considerate.

## Introduzione

La coltivazione del gelso sta assumendo sempre più importanza in agricoltura e si va diffondendo anche in regioni non tradizionalmente interessate. Ciò è in relazione alla resistenza di tale pianta e al suo possibile impiego per scopi diversi dalla bachicoltura. Sono noti, anche se poco diffusi, utilizzi in medicina come fonte di vitamine e polifenoli, nell'industria alimentare per i frutti, negli interventi di risanamento ambientale per piantumazione e nell'artigianato della lavorazione del legno. Una quantità notevole di foglia è utilizzata nella alimentazione sia di animali da fattoria che di specie ittiche erbivore e questa applicazione sembra così promettente da meritare studi specifici da parte della FAO. Una prima conferenza elettronica è stata lanciata in maggio-agosto 2000 e gli interventi sono stati raccolti nel volume 147 della serie FAO Animal Production and Health Paper dal titolo Mulberry for animal production.

Il nostro studio, che è partito con l'obiettivo di investigare la composizione delle foglie del gelso per la preparazione di mangime artificiale per il baco da seta, potrà evolversi e trovare applicazione anche nel miglioramento dell'utilizzo del gelso in altri campi.

In questo articolo sono presentati i dati di contenuto di proteine grezze che sono stati determinati anche mediante spettroscopia in riflettanza nel vicino infrarosso ma gli stessi campioni sono stati caratterizzati in quanto ai valori di vitamina C, zuccheri, macro e microelementi e di alcuni polifenoli. I risultati saranno oggetto di future pubblicazioni.

## Materiali e metodi

*Preparazione di campioni di foglia di gelso in polvere.*

Campioni di foglie di gelso delle varietà Florio, Morettiana, Kayrio, Kokusò 27 e 20, coltivati presso l'ISZA – Padova, sono stati prelevati durante la stagione di crescita da maggio a settembre. Per ogni prelievo e per ogni varietà sono stati raccolti tre campioni, ognuno del peso di circa 15 grammi, che sono stati essiccati in stufa a 60°C per 24 ore e quindi macinati in mulino a biglie su griglia da 1 mm. Alcuni campioni denominati “Tesi A” e “Tesi B” sono stati coltivati in differenti condizioni di irrigazione.

*Determinazione delle proteine grezze secondo il metodo Kjeldahl.*

E' stata seguita la metodica classica come pubblicata in CNR-IPRA Quaderni metodologici n.8 utilizzando come catalizzatore ossido di rame, come digestore Büchi 425 Digestor, come distillatore Büchi 320 N<sub>2</sub> Distillator Unit e per la determinazione dell'ammoniaca un titolatore automatico Mettler DL40GP Memotitrator.

*Determinazione delle proteine grezze mediante spettroscopia NIR.*

Le analisi sono state effettuate con uno spettrofotometro FT-NIR Büchi modello NIRLab N-200 con cella di misurazione MCS 100 e relativo software di elaborazione statistica.

6,6 grammi dei campioni di gelso in polvere, mantenuti in essiccatore, sono stati omogeneamente distribuiti in una piastra Petri standard in vetro che viene alloggiata sulla cella di misurazione dotata di un porta campione rotante.

Gli spettri sono stati registrati tra 4000 e 10000 cm<sup>-1</sup> ed elaborati mediante il software NIRCAL.

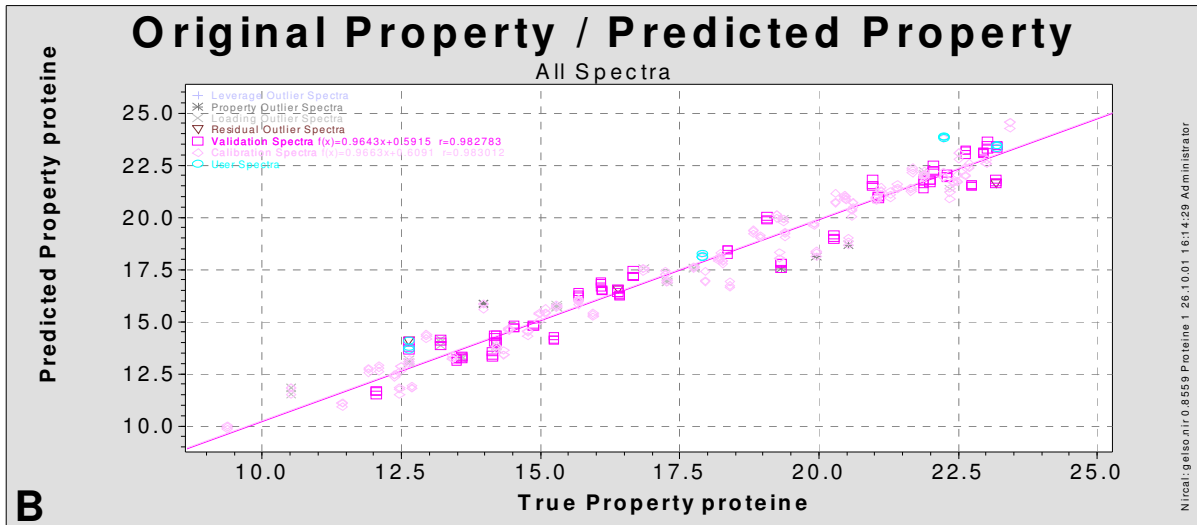
## Risultati e discussione

Per il confronto tra i risultati della metodologia tradizionale secondo Kjeldahl con il metodo strumentale basato sulla spettroscopia nel vicino infrarosso (NIR) si è proceduto alla determinazione dell'incertezza del metodo Kjeldahl eseguito nel nostro laboratorio. Sono state effettuate dodici determinazioni del contenuto di protidi grezzi di un campione di foglia di media composizione e i valori ottenuti sono stati sottoposti ad elaborazione statistica come riportato in tabella:

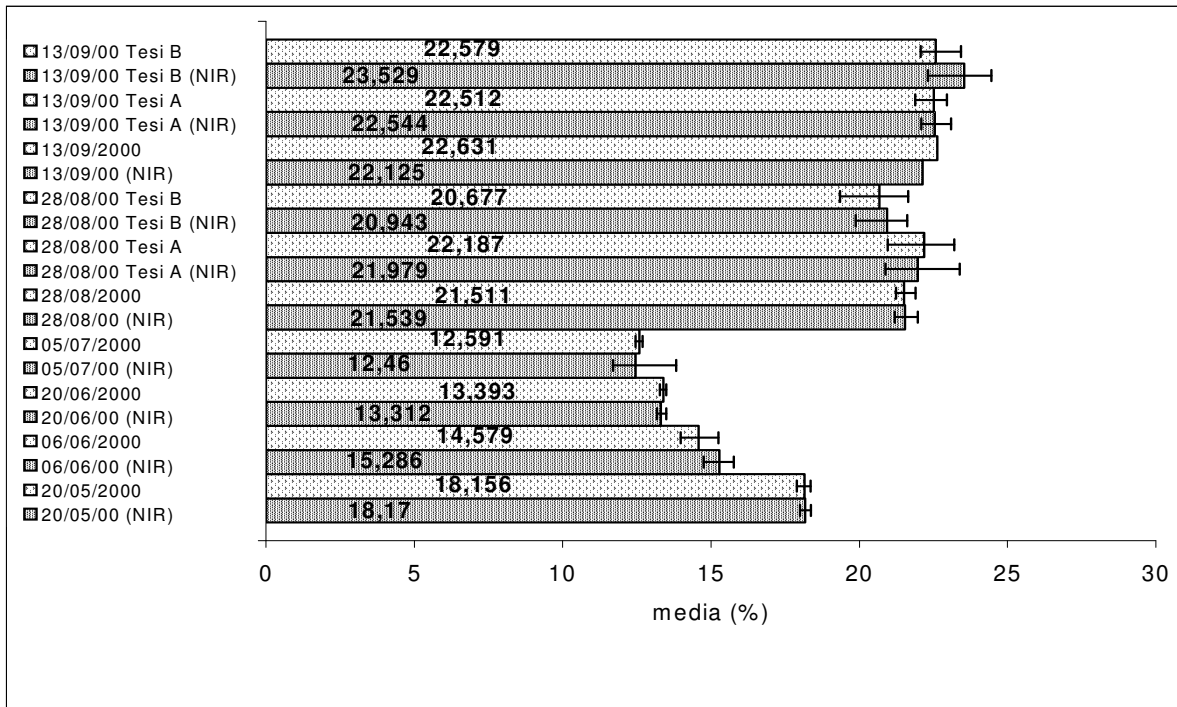
Valori delle prove ripetute (12)			
16,35; 16,89; 16,70; 16,91; 16,63; 16,79; 16,84; 16,98; 16,97; 16,71; 16,91; 16,61			
Media : 16,78	Varianza: 0,033	Scarto tipo (s): 0,183	
	CV%: 1,09	Min. 16,35	Max. 16,98
	Range: 0,638	Mediana 16,81	
Limite di ripetibilità:	0,67		
Limite i. di tolleranza:	16,41		
Limite s. di tolleranza:	17,13		
Limite i. di fiducia:	16,64		
Limite s. di fiducia:	16,91		

Per la valutazione quantitativa con il metodo NIR, utilizzando 100 campioni di foglie sui quali era stato precedentemente misurato il contenuto di proteine grezze secondo Kjeldahl, si è costruita la curva di calibrazione, di seguito riportata, in un range tra il 9 e il 25% di contenuto proteico.

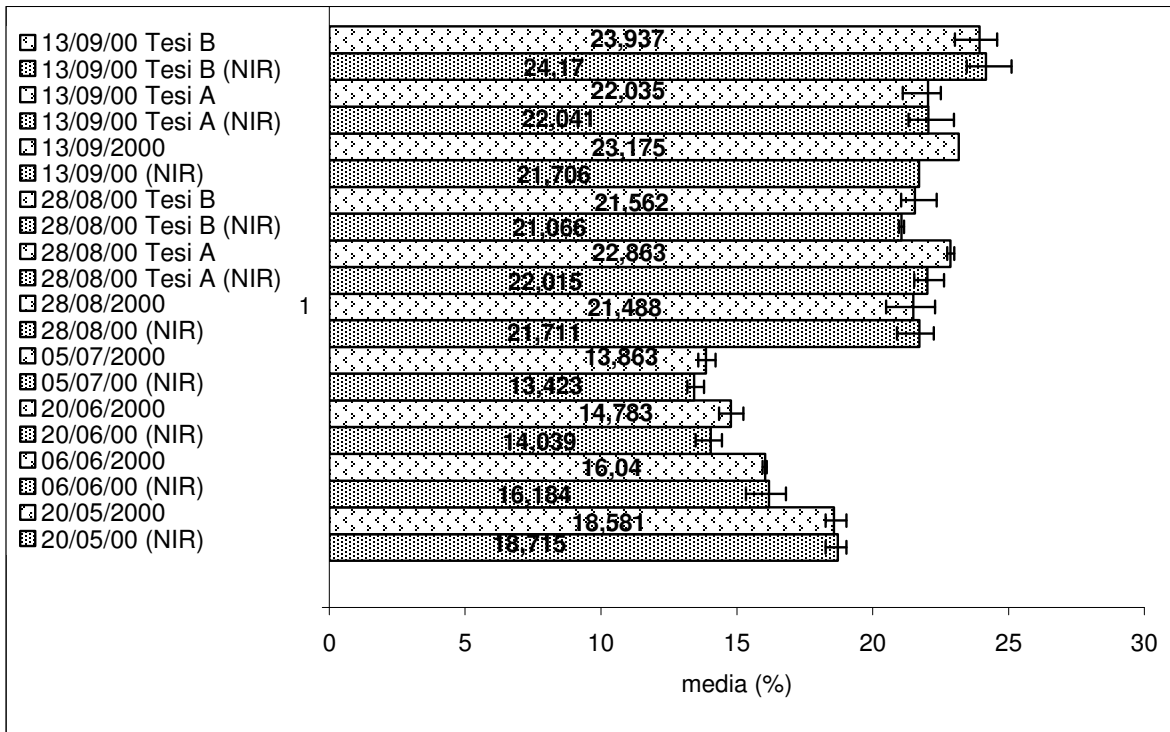
Sessantasette campioni sono stati utilizzati per la calibrazione e trentatre per la validazione; metodo PCR; pretrattamenti spettrali Smooth Average 3 Points, Normalization by Closure, First Derivative BCAP; regressione set di calibrazione 0,98; regressione set di validazione 0,98; SEE 0,71; SEP 0,69.



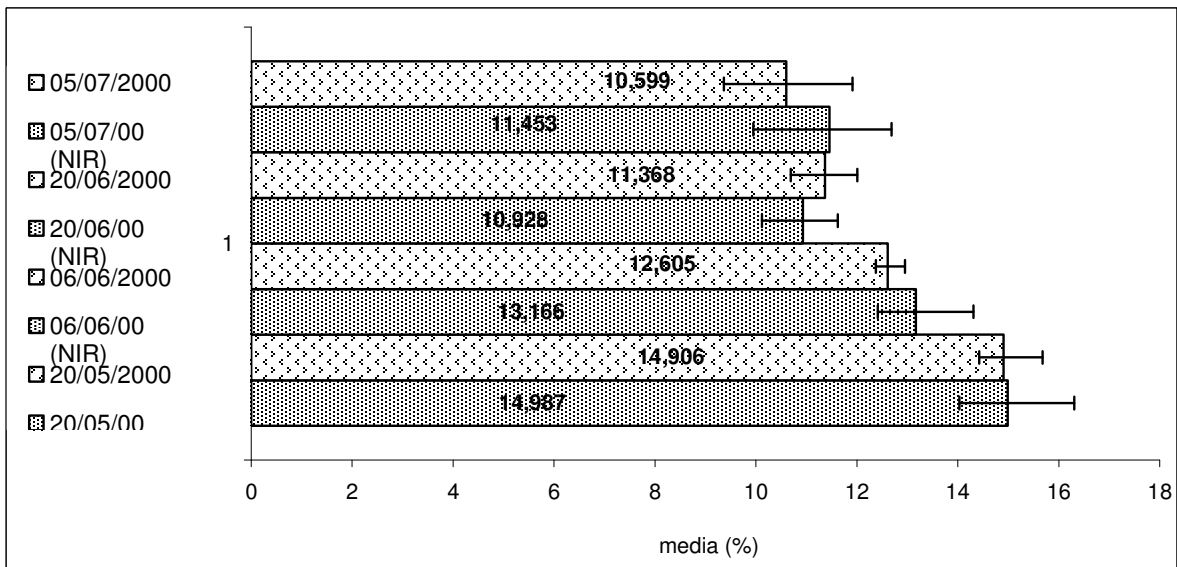
Nei grafici seguenti sono riportati tutti i valori ottenuti, riuniti per varietà e in ordine stagionale di raccolta, come media dei campionamenti effettuati per ogni prelievo e le colonne affiancate negli istogrammi sono i valori ottenuti sugli stessi campioni con i due metodi utilizzati.



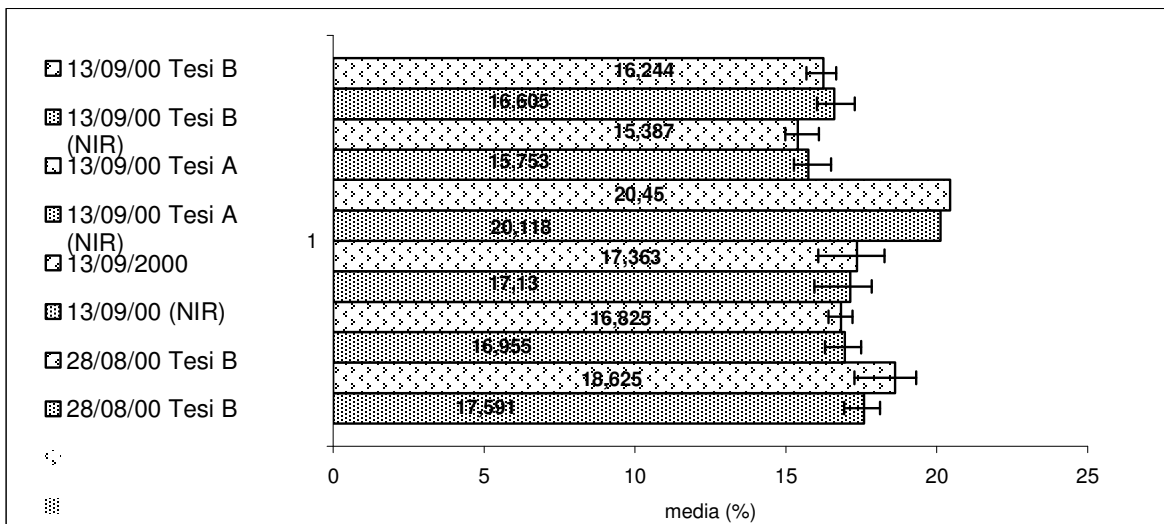
**Grafico 1: variazione stagionale del contenuto di proteine grezze nelle foglie di gelso varietà Florio misurato utilizzando i metodi Kjeldahl e NIR.**



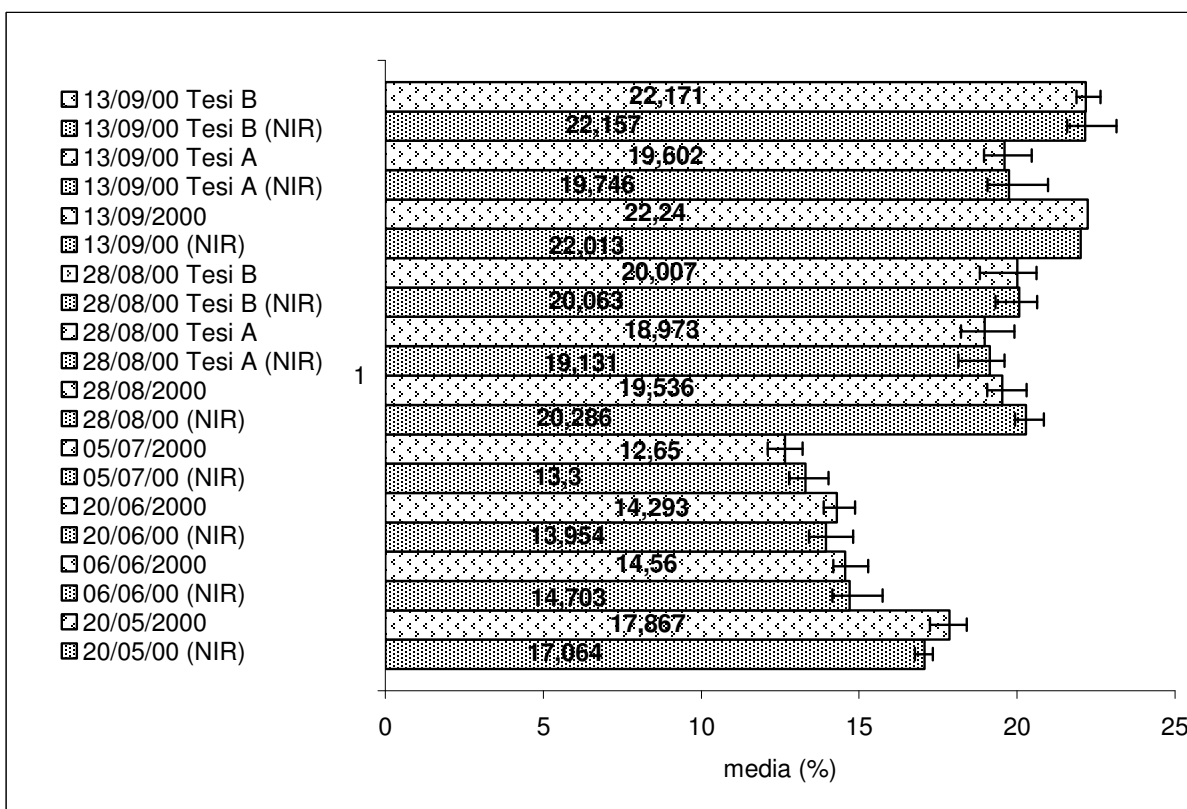
**Grafico 2: variazione stagionale del contenuto di proteine grezze nelle foglie di gelso varietà Morettiana misurato utilizzando i metodi Kjeldahl e NIR.**



**Grafico 3: variazione stagionale del contenuto di proteine grezze nelle foglie di gelso varietà Kayrio misurato utilizzando i metodi Kjeldahl e NIR.**



**Grafico 4: variazione stagionale del contenuto di proteine grezze nelle foglie di gelso varietà Kokusò 27 misurato utilizzando i metodi Kjeldahl e NIR.**



**Grafico 5: variazione stagionale del contenuto di proteine grezze nelle foglie di gelso varietà Kokusò 20 misurato utilizzando i metodi Kjeldahl e NIR.**

I risultati delineano un andamento regolare dell'evoluzione delle proteine grezze nel corso della maturazione, sia nella stessa varietà che in varietà differenti. Lo sfalcio normalmente effettuato nel mese di luglio giustifica il notevole incremento di contenuto di proteine grezze osservato nel prelievo di fine agosto. Le varietà Kokusò 27, tardiva, e Kayrio, precoce, sono state caratterizzate con un ridotto periodo di campionamento.

Per quanto riguarda il confronto tra i valori ottenuti sui singoli campioni con i due metodi, si può osservare che circa nel 50% dei casi la differenza è inferiore all'incertezza del metodo Kjeldhal mentre la differenza tra i valori medi per prelievo non superano il 5% del valore misurato.

L'utilizzo della spettroscopia NIR può quindi sostituire il convenzionale metodo Kjeldahl con un notevole risparmio di tempo, data la rapidità della determinazione una volta validata la curva di taratura.

Il presente lavoro è stato finanziato dal Ministero delle Attività Agricole nell'ambito del Progetto Finalizzato DM 272/7240/98 : "Produzione di nuove tecnologie per il rilancio della gelsibachicoltura nazionale".

### **Bibliografia**

F. Martillotti, M. Antongiovanni, L. Rizzi, E. Santi, G. Bittante (1987) *Metodo di analisi per la valutazione degli alimenti d'impiego zootecnico*, CNR-IPRA

D. Undersander, D.R. Mertens, N. Thiex (1993) *Forage Analyses Procedures 3.4 Crude Protein by NIR*, NFTA National Forage Testing Association

AAVV (2002) *Mulberry for animal production*, FAO Animal Production and Health Paper, 147, Rome