

89. R. FALINI - F. DENTICE e S. BARCELLONA. — Studio sulla possibilità di impiego di nuove fonti azotate nella produzione di antibiotici. - I. Penicillina.

Riassunto. — Sono stati esaminati vari prodotti vegetali (farine di diversa provenienza e sostanze provenienti da scarti di lavorazione) come fonti di azoto per la produzione di penicillina, in fermentazioni in beute in coltura sommersa.

Si è potuto mettere in evidenza che, presa come controllo la farina di arachidi esausta, alcune farine di leguminose sono da prendere in considerazione quali eventuali fonti azotate economicamente convenienti. Non si può invece considerare tale la produzione con materiali di scarto, essendo questi non solo a basso contenuto di azoto, ma altresì inadatti a dare produzioni elevate.

Sono state inoltre eseguite esperienze usando come fonti di azoto proteine estratte da alcune delle sostanze sperimentate, allo scopo di studiare il rapporto esistente tra la produzione e il contenuto di azoto del terreno. Si è visto che per talune di esse potrebbe essere interessante una utilizzazione delle proteine alcalisolubili.

Résumé. — Différents produits végétaux (farines de différentes origines et substances provenant des résidus de moulins) ont été essayés comme source d'azote pour la production de pénicilline, en fermentation en flacons agités.

On a pu mettre en évidence que, si l'on prend comme contrôle la farine d'arachide exploitée, certaines farines de légumineuses peuvent être prises en considération comme sources éventuelles d'azote avantageuses du point de vue économique. Au contraire on ne peut pas considérer comme telle la production avec matériel résiduel, ceci ayant un taux en azote très bas et pas capable pourtant de donner des productions élevées.

On a en outre fait des expériences en se servant comme source d'azote, de protéines extraites de plusieurs des substances essayés, pour étudier le rapport existant entre la production et le contenu d'azote dans le milieu de culture. On a vu ainsi que certaines d'entre elles pourraient être intéressantes pour une utilisation des protéines alcali-solubles.

Summary. — A number of vegetable products such as flours of different origin and by products of various processes were used as sources

of nitrogen for the production of Penicillin, during fermentations in shake flasks.

It was shown that using the flour of the exhausted peanut as a control, various flours of the leguminosae may be considered as possible economic sources of nitrogen. However the by products were unsuitable for these purposes as they contained only small quantities of nitrogen and furthermore were unable to give large yields.

Other experiments are described in which proteins were extracted as sources of nitrogen from a number of the substances used in order to study the relationship between the production and nitrogen content of the medium. It was observed that for some of these substances it would be interesting to use some of their alkali soluble proteins.

Zusammenfassung. — Es wurden verschiedene pflanzliche Stoffe (diverse Mehlsorten und Ausschusssubstanzen aus der Verarbeitung) bei der Fermentation in geschüttelten Retorten darauf untersucht, ob sie als Stickstoffquellen für die Penicillinherstellung in Frage kommen.

Dabei konnte gezeigt werden, dass das Mehl einiger Leguminosen als wirtschaftliche Stickstoffquelle in Betracht gezogen werden kann. Eine Kontrolle dafür wurde mit entöltem Erdnussmehl durchgeführt. Von der Herstellung mit Ausschussmaterial hingegen muss abgesehen werden, da dieses nicht nur einen geringen Stickstoffgehalt aufweist, sondern sich auch nicht für eine gesteigerte Produktion eignet.

Es wurden ausserdem Versuche durchgeführt, bei denen als Stickstoffquelle Eiweisstoffe verwendet wurden, die aus den überprüften Substanzen gewonnen worden waren. Der Zweck der Versuche war, das Verhältnis zwischen Produktion und Stickstoffgehalt des Bodens zu finden. Es ergab sich, dass bei einigen dieser Substanzen die Verwendung der alkalisch löslichen Eiweisstoffe interessant sein könnte.

I costituenti principali di un normale terreno di cultura per la produzione di penicillina sono sostanzialmente una o più fonti di carbonio (zuccheri, olii) e una o più fonti di azoto.

Queste ultime possono a loro volta essere rappresentate sia da semplici sali di ammonio o da nitrati (come nel caso dei cosiddetti terreni sintetici) sia da sostanze naturali riconosciute atte, per via esclusivamente sperimentale, a dare produzioni economicamente convenienti.

Fin dall'inizio della fabbricazione su scala industriale della penicillina, la migliore fonte di azoto di origine naturale è stata rappresentata

dal cosiddetto « corn steep liquor » od acqua di macerazione del mais, per i suoi innegabili vantaggi sia dal punto di vista delle elevate produzioni ottenibili, sia per il suo facile impiego.

Gli svantaggi presentati dal corn steep sono, per contro, una certa incostanza di composizione, dovuta al fatto che esso è già di per se un prodotto di fermentazione e quindi difficilmente controllabile, ed un prezzo — riferito ad unità di azoto — piuttosto elevato.

Da vari anni quindi si è cercato di trovare sostanze naturali atte a sostituire il corn steep, e tali che, pur avendo le stesse proprietà di produzione ed impiego, avessero composizione costante e prezzo più basso, sempre riferito ad unità di azoto. Già nel 1949 PERLMAN ⁽¹⁾ aveva messo in evidenza la capacità di alcune farine vegetali di dare una buona produzione di penicillina; in questi ultimi tempi inoltre, è stata in taluni impianti introdotta, in sostituzione parziale o totale del corn steep, la farina esausta di arachidi.

Scopo del presente lavoro è pertanto quello di esaminare la produzione di penicillina partendo da terreni che utilizzano, quali fonti di azoto, diverse sostanze di origine vegetale, in vista soprattutto della possibilità di impiego di una o più di queste sostanze su scala industriale, a condizioni economicamente più convenienti del corn steep.

Inoltre, per cercare di chiarire meglio la correlazione esistente fra contenuto totale di azoto del terreno di cultura e produzione di penicillina, sono state eseguite alcune fermentazioni usando, come fonte azotata, le proteine alcalisolubili estratte da talune delle sostanze esaminate.

PARTE SPERIMENTALE

CEPPO.

Si è usato il *Penicillium chrysogenum* 5120 C, che è un ceppo selezionato in questo laboratorio da una cultura di 5120 Wis.

TERRENO DI SEMINA.

Il terreno di semina era costituito da corn steep liquor 8% e destina 6%; non si è aggiunto antischiuma.

TERRENI DI FERMENTAZIONE.

Il terreno di fermentazione era costituito da lattosio 6%, carbonato di calcio 1%, solfato di sodio 0,1% e quantità variabili di sostanze azota-

te, farine o proteine come verrà specificato di volta in volta nel corso del lavoro. Neanche qui è stato utilizzato antischiuma, nè inizialmente nè nel corso delle fermentazioni.

TECNICA DI FERMENTAZIONE.

Le fermentazioni furono eseguite in beute tipo Erlenmeyer da 750 cm³, contenenti 90 cm³ (2) di terreno di cultura, poste su agitatore rotatorio (3), in camera termostatica a 25°. Le beute contenenti il terreno completo venivano sterilizzate a 120° per 20'. La semina era effettuata con una sospensione di spore in acqua, contenente circa 100.000 spore per cm³. Le beute di fermentazione venivano inoculate ciascuna con 10 cm³ di brodocultura di 40 ore di età proveniente dalla beuta di semina. Come precursore fu usato il fenilacetato di sodio in ragione del 0,1% di acido fenilacetico ogni 24 ore a partire dalla 18^a ora di fermentazione.

ESTRAZIONE DELLE PROTEINE.

Nel corso di un altro lavoro di prossima pubblicazione, condotto in questo Istituto parallelamente al presente e diretto a ricercare, sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo i diversi aminoacidi che influenzano la fermentazione, si è visto che le proteine maggiormente interessate nella produzione della penicillina sono quelle alcalisolubili.

Pertanto, nel presente lavoro, le proteine utilizzate nel terzo gruppo di esperienze sono state estratte dalle varie sostanze con NaOH N/10, acidificando successivamente con acido acetico. Il precipitato veniva quindi separato per centrifugazione, lavato prima con acqua per allontanare i sali presenti, poi con acetone ed infine asciugato all'aria.

Nel corso del lavoro quindi, parlando di proteine, ci si riferirà sempre a quelle alcalisolubili.

METODI DI DOSAGGIO.

La penicillina nel brodo di fermentazione venne determinata per via iodometrica con il metodo di BELOFF-CHAIN e DENTICE DI ACCADIA (4).

Gli zuccheri riducenti furono determinati con il metodo di SOMOGYI (5) e l'azoto per distillazione secondo il metodo MARKHAM (6), dopo distruzione con il metodo micro-Kjeldahl.

ESPERIENZE.

Le esperienze sono state fatte con diversi materiali scelti come segue:

a) farine provenienti da leguminose: arachidi esauste, lupini, fave, fagioli, lenticchie, ecc.;

b) farine provenienti da altri vegetali: mais, carrube, castagne, ghiande;

c) sostanze provenienti da scarti di lavorazione: seme e farinetta di pomodoro, vinaccioli, polpa di mele, scarto di grano.

Detti materiali sono stati utilizzati così come sono normalmente reperibili in commercio, dato che qualsiasi eventuale trattamento di raffinazione avrebbe falsato lo scopo essenzialmente economico del presente lavoro.

La sperimentazione ha avuto le seguenti fasi distinte:

1) Sono state eseguite delle fermentazioni con terreni di cultura nei quali la fonte di azoto era volta a volta costituita da una delle suddette sostanze. Come controllo si è presa la farina di arachidi, già largamente sperimentata sia in scala di laboratorio che su scala industriale; poichè si era precedentemente visto che i migliori risultati si avevano con terreni contenenti il 3% di farina di arachidi (p/v), questa percentuale è stata adottata anche per tutte le sostanze da esaminare in questo primo gruppo di esperienze. Pertanto, in questa fase, non si è tenuto conto del contenuto in azoto delle sostanze usate.

I risultati sono esposti nelle figure da 1 a 14.

2) Alcune delle medesime sostanze sono state successivamente utilizzate per un'altra serie di fermentazioni, variando però questa volta le percentuali in peso, per avere terreni di cultura con uguali percentuali di azoto totale.

Anche in questo caso si è tenuta la farina di arachidi come controllo; siccome il contenuto totale di azoto di un terreno contenente il 3% (p/v) di detta farina risultava essere mediamente di 170 mg/100 cm³, si è fatto in modo che tutti i terreni di questo gruppo di esperienze avessero 170 mg/100 cm³ di azoto totale.

Le sostanze non sperimentate in questa fase del lavoro sono state quelle il cui contenuto in azoto era abbastanza vicino a quello della farina di arachidi (farina di lupini, fave, fagioli e seme di pomodoro) e per le quali, pertanto, si sarebbero in sostanza dovute ripetere le precedenti esperienze.

E' stato inoltre impossibile eseguire fermentazioni in beuta con quelle sostanze che, avendo un contenuto di azoto molto inferiore alla farina di arachidi, dovevano essere impiegate con percentuali in peso troppo elevate, rendendo praticamente nulla l'aerazione del terreno (farina di mais, di castagne, di ghiande; polpa di mele, scarto di grano, seme di pomodoro).

I risultati sono contenuti nelle figg. 5a, 6a, 8a, 9a e 15a.

3) I risultati ottenuti nelle prime due fasi del lavoro mettevano senz'altro in luce la capacità di diverse sostanze di dare buone produzioni di penicillina. Non appariva però, per talune di esse, una corrispondenza sufficientemente chiara fra contenuto in azoto e produzione e si pensava che il fattore limitante poteva essere rappresentato da sostanze, capaci di inibire la produzione, contenute nelle farine. Si è ritenuto perciò opportuno eseguire anche delle fermentazioni nelle quali la fonte di azoto fosse costituita dalle proteine alcalisolubili di alcune delle sostanze in esame; in tal modo, si venivano ad escludere, nei limiti della purezza raggiungibile, eventuali sostanze inibitrici.

I risultati sono contenuti nelle figg. da 16 a 23. Siccome questa volta si desiderava esaminare anche la farina di arachidi, come controllo è stato usato un terreno contenente il 5,5% di corn steep liquor, pari ad un contenuto in azoto totale di circa 210 mg/100 cm³. Pertanto le proteine sono state impiegate in quantità tali da dare terreni con circa 200-210 mg di azoto totale/100 cm³; in alcuni casi si è anche usato un livello più basso di azoto, intorno a 100 mg/100 cm³, ripetendo poi la sperimentazione con il livello di 200 mg.

RISULTATI

Nella tabella n. 1 vengono raccolte le produzioni massime di penicillina ottenute, nel primo gruppo di esperienze, dopo 96 ore di fermentazione.

Oltre alla produzione la tabella riporta, per ciascuna sostanza, la percentuale (p/v) con la quale è stata utilizzata, la corrispondente percentuale di azoto totale del terreno, ed il rapporto produzione massima/percentuale di azoto. Detto rapporto, essenziale ai fini del presente lavoro, viene ad essere espresso in u/mg azoto totale.

Dalla tabella appare evidente che numerose sostanze sono in grado di dare produzioni paragonabili alla farina di arachidi, superiori cioè alle 1000 unità per mgr. di azoto impiegato; tutto il gruppo delle leguminose fra l'altro, sembra atto alla produzione, come appare confermato anche

TABELLA 1.

Produzioni massime di penicillina a 96 ore (in u/cm³) ottenute usando varie sostanze come fonti di azoto (parte 1^a - % in peso costanti).

Fonte di azoto	% in peso nel terreno di cultura	mg azoto totale per 100 cm ³ di terreno di cultura	Produzione max (u/cm ³)	Rapporto produzione azoto (u/mg azoto)
Farina di arachidi (controllo)	3	170	1820	1070
» » lupini	3,2	170	1825	1073
» » fave	4,3	170	1390	818
» » fagioli	3,2	170	1 00	883
» » lenticchie	3	141	1500	1062
» » ceci	3	76,5	1435	1875
» » mais	3	38,7	545	1410
» » carrube	3	52	75	144
» » castagne	3	27	275	1020
» » ghiande	3	29	90	310
Seme di pomodoro	3	135	1340	1005
Farinetta di pomodoro	3	75	365	497
Vinaccioli	3	53,5	290	542
Polpa di mele	3	27	205	760
Scarto di grano	3	18	130	722

dall'andamento dell'utilizzazione degli zuccheri e del pH. Particolarmente interessanti apparivano le produzioni delle farine di lenticchie e ceci, per le quali si riteneva perciò opportuno ripetere le esperienze aumentando la percentuale in peso utilizzata fino ad avere un livello di azoto paragonabile alle altre leguminose.

Per contro, questa prima indagine non chiariva sufficientemente le basse produzioni unitarie ottenute con molte sostanze; con alcune di queste si eseguivano quindi altre fermentazioni con percentuali in peso aumentate, fino ad avere 170 mgr. di azoto totale/100 cm³.

I risultati di questo secondo gruppo di fermentazioni vengono riepilogati nella tabella n. 2, con le stesse modalità della tabella n. 1.

TABELLA 2.

Produzioni massime di penicillina a 96 ore (in u/cm³) ottenute usando varie sostanze come fonti di azoto (parte 2^a - % di azoto costante).

Fonte di azoto	% peso	mg azoto per 100 cm ³ di terreno	Produzione max	Rapporto prod/azoto
Farina di lenticchie	4,7	170	1770	1040
» » ceci	6,7	170	1060	624
Farinetta di pomodoro	6,8	170	480	282
Farina di carrube	10	170	140	82
» » vinaccioli	9,6	170	265	162

Da quanto esposto risulta che per la farina di lenticchie il rapporto produzione-azoto è restato praticamente costante, mentre ciò non si è verificato per la farina di ceci. Occorre però tener presente che il terreno ottenuto utilizzando questa farina al 6,7% è notevolmente denso, tale da far pensare che la scarsa aerazione possa aver rappresentato il fattore limitante della produzione. Del pari diminuito è risultato il rapporto per le altre sostanze comprese in questo gruppo di fermentazioni; poichè anche queste dovevano essere utilizzate con percentuali elevate, si riteneva opportuno procedere ad una nuova serie di esperienze, utilizzando questa volta come fonti azotate le proteine alcalisolubili di talune delle sostanze esaminate. In tal modo, oltre ad eliminare l'incertezza dovuta al fattore densità del terreno, si sarebbe anche potuta accertare l'eventuale presenza di sostanze inibitrici della produzione.

Le sostanze scelte per questo terzo gruppo di fermentazioni sono state: proteine estratte dalla farina di arachidi e lupini, che si erano rivelate, fra le leguminose del 1° gruppo di esperienze, fra le migliori produttrici; proteine da farina di ceci, di carrube e di vinaccioli fra quelle del 2° gruppo di esperienze; proteine di farina di mais e di castagne che erano le migliori produttrici fra le altre sostanze del 1° gruppo di esperienze.

I risultati vengono raccolti nella tabella n. 3, nella quale, accanto

TABELLA 3.

Produzioni massime di penicillina a 96 ore (in u/cm³) ottenute usando varie proteine come fonti di azoto.

Fonte di azoto	I GRUPPO DI ESPERIENZE			II GRUPPO DI ESPERIENZE		
	Prod. max u/cm ³	Azoto totale mg/ 100 cm ³	Rapporto prod/azoto u/mg	Prod. max u/cm ³	Azoto totale mg/100 cm ³	Rapporto prod/azoto u/mg
Corn steep liquor (controllo)	—	—	—	2260	210	1078
Proteine di arachidi	—	—	—	2510	210	1200
» » lupini	—	—	—	2000	203	985
» » ceci	—	—	—	2170	192	1130
» » mais	1325	121	1095	2350	210	1120
» » castagne	970	105	925	—	—	—
» » vinaccioli	720	129	568	1230	210	585
» » carrube	430	93	462	510	210	243

alle produzioni massime ottenute a 96 ore, si riportano le percentuali di azoto totale di ciascun terreno di cultura, ed il rapporto produzione-azoto.

Come si vede, tutte le proteine estratte da leguminose hanno prati-

camente conservato i medesimi valori già riportati nella tabella n. 1, mentre per la farina di ceci si è senz'altro provato che il fattore limitante era costituito dalla densità del terreno che, in beuta, riduceva fortemente l'aereazione. Parimenti elevato è rimasto il rapporto produzione max/azoto per la farina di mais. Per la farina di vinaccioli il rapporto è del pari risultato costante e del medesimo ordine di grandezza ottenuto con le prime esperienze; si è quindi portati a fare l'ipotesi che le proteine contenute in questa sostanza siano qualitativamente poco atte alla produzione. La farina di carrube, al contrario, contiene delle sostanze inibitrici della produzione (sostanze che non si è evidentemente riuscito a separare dalle proteine estratte), come è provato dal fatto che i massimi valori del rapporto produzione-azoto si hanno quando le quantità usate sono più basse; nè si può pensare al fattore limitante aereazione, poichè lo stesso andamento si è avuto utilizzando le proteine.

Ai fini di una più esatta valutazione di quanto esposto, si raccolgono in una unica tabella i rapporti produzione-azoto trovati nelle singole esperienze.

TABELLA 4.

Riepilogo delle produzioni unitarie massime di penicillina a 96 ore (riferite a mg di azoto per cm³ di terreno) ottenute nelle precedenti esperienze.

Fonte azotata	Esperimento con farine con ‰ in peso costante	Esperimento con farine con ‰ azoto costante	Esperimento con proteine a livello di azoto 100	Esperimento con proteine a livello di azoto 200
Farina di arachidi	1070	—	—	1200
» » lupini	1073	—	—	985
» » fave	818	—	—	—
» » fagioli	883	—	—	—
» » lenticchie	1062	1040	—	—
» » ceci	1875	624	—	1130
» » mais	1410	—	1095	1120
» » carrube	144	82	462	243
» » castagne	020	—	925	—
» » ghiande	310	—	—	—
Seme di pomodoro	1005	—	—	—
Farinetta di pomodoro	497	282	—	—
Farina di vinaccioli	542	162	568	585
Polpa di mele	760	—	—	—
Scarto di grano	722	—	—	—
Corn steep (controllo)	—	—	—	1078

CONCLUSIONI

1) Molte sostanze esaminate si sono rivelate capaci di produrre penicillina nelle medesime proporzioni dei controlli (corn steep e farina di arachidi) e talvolta anche in quantità superiore; fra tutte particolarmente atte ad essere prese in considerazione per un eventuale produzione economicamente conveniente possono essere le farine di lupini e lenticchie ed il seme di pomodoro.

2) Altre sostanze, pur rivelandosi buone produttrici, presentano tuttavia l'inconveniente di avere un contenuto di azoto troppo basso per poterle impiegare in percentuali che non disturbino il normale andamento delle fermentazioni: tra queste ottime appaiono le farine di ceci e quella di mais. Per queste ultime pertanto potrebbe essere interessante esaminare la possibilità pratica di estrarne le relative proteine alcalisolubili, al fine di utilizzarle in terreni che verrebbero praticamente ad essere semi-sintetici ad alta produzione, con tutti i ben noti vantaggi che ne derivano.

3) Non sembra che si possa invece considerare economicamente conveniente la produzione con materiali di scarto (eccetto il seme di pomodoro) essendo questi non solo a basso contenuto in azoto, ma altresì incapaci di dare produzioni elevate. La ragione di ciò potrebbe essere attribuita alla presenza, in questi materiali, di sostanze capaci di inibire la produzione; questa ipotesi si avvera di certo, ad esempio, per la farina di carrube, la cui produzione, riferita ad unità di azoto, decresce al crescere della concentrazione, sia quando la si utilizza « in toto » sia quando se ne usano le relative proteine. Quest'ultimo fatto pertanto ne esclude una pratica utilizzazione come previsto al punto 2) anche se il prezzo per unità dovesse essere estremamente ridotto.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Impianto Produzione Antibiotici.

BIBLIOGRAFIA

- (1) PERLMAN D. - Bull. Torrey Botan. Club, 76: 79 (1949).
- (2) CHAIN E. B. e GUALANDI G. - Rend. Ist. Sup. Sanità, 17 English Edition, p. 3 1954.
- (3) PALADINO S. - Rend. Ist. Sup. Sanità, 17: 1260 (1954).
- (4) BELOFF-CHAIN ANNE e DENTICE DI ACCADIA F. - Analyst, 77: 917-423 (1952).
- (5) SOMOGYI - J. Biol. Chem., 193: 10 (1952).
- (6) MARKHAM - Biochem. J., 36: 790 (1942).

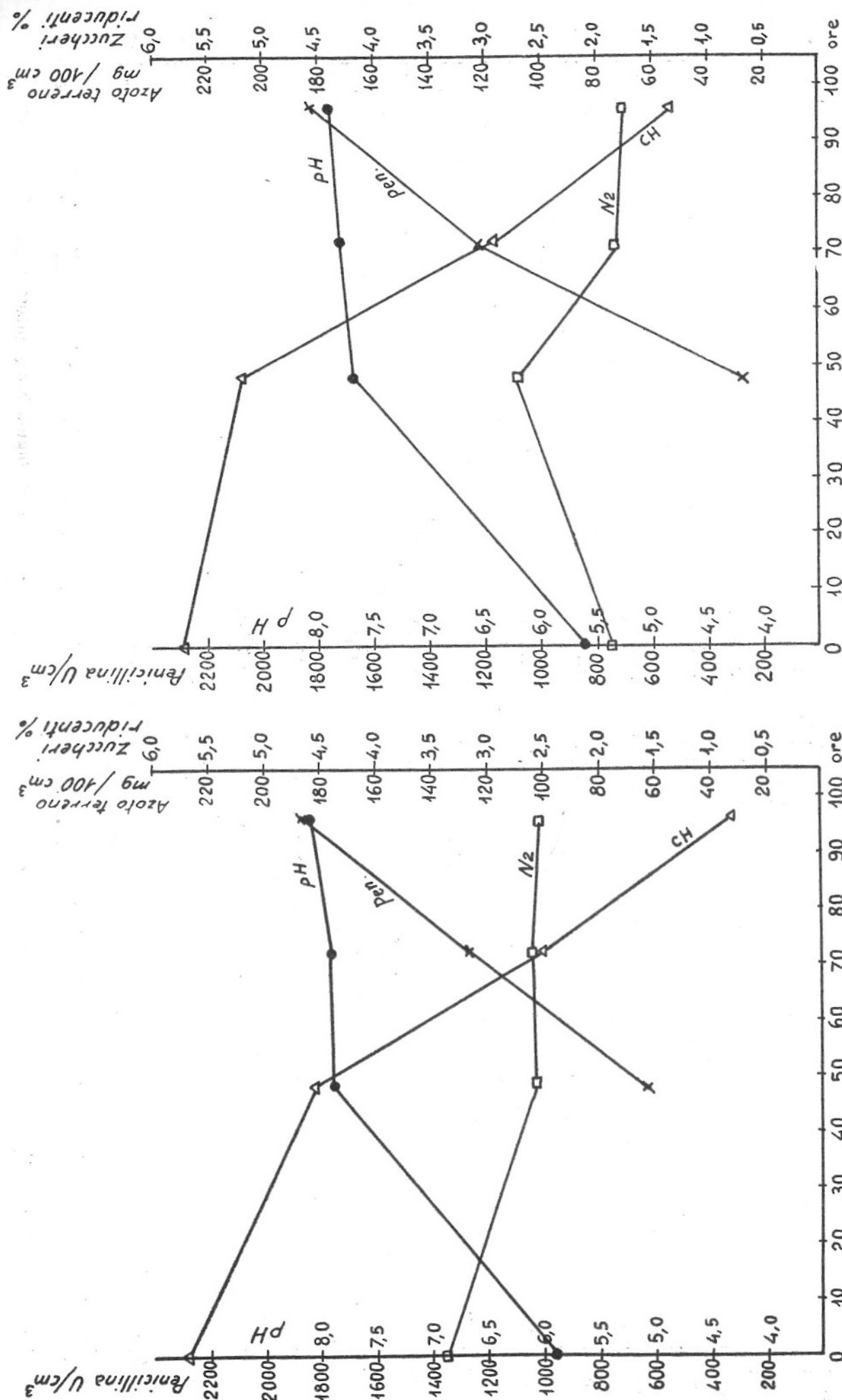


Fig. 1. - Farina di arachidi 3% (azoto totale 170 mg/100 cm³).

Fig. 2. - Farina di lupini 3,2% (azoto totale 170 mg/100 cm³).

I segni relativi alle curve indicano in tutte le figure: pH = pH; Pen = penicillina; N₂ = azoto, CH = zuccheri riducenti.

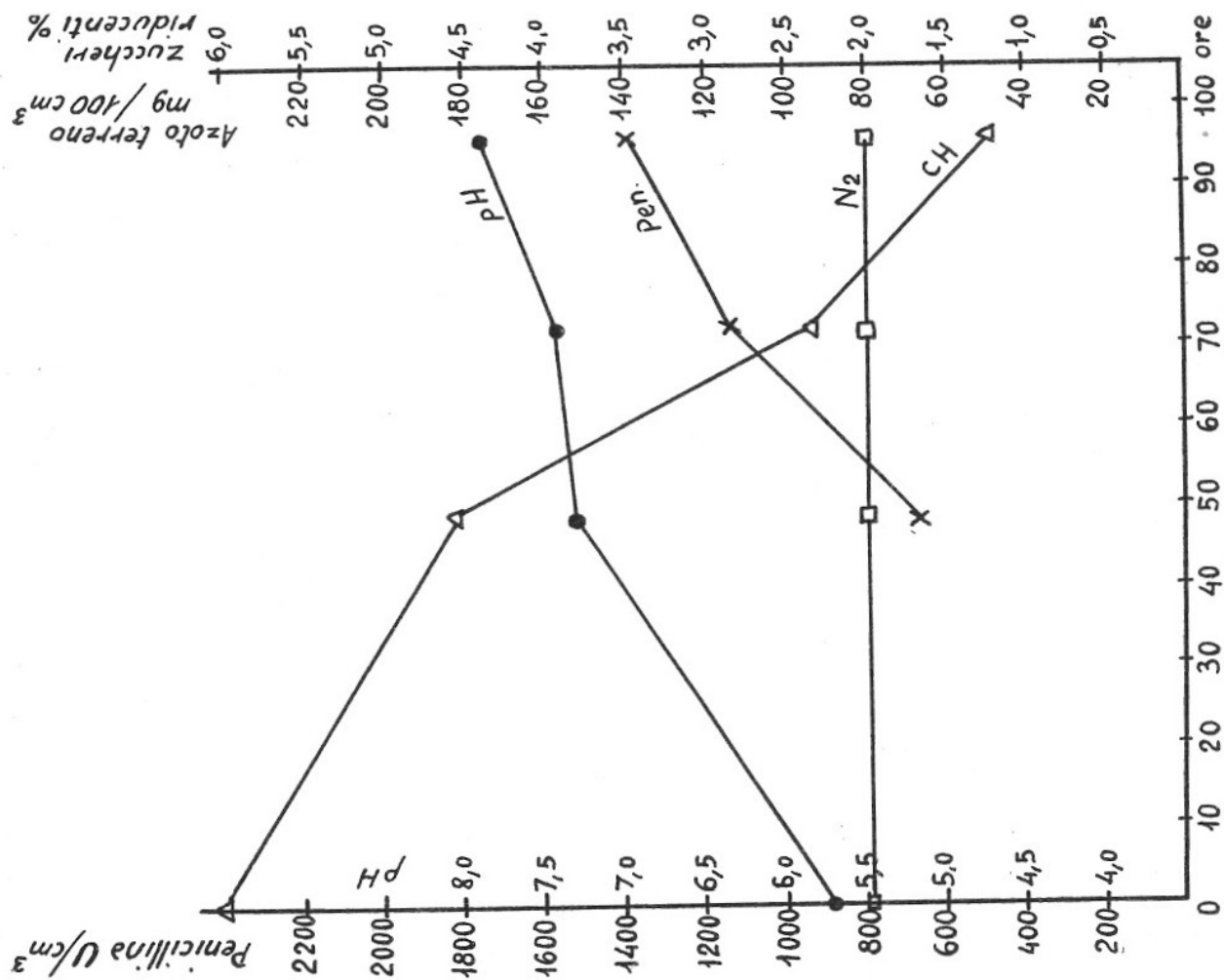


Fig. 3. - Farina di fave 4,3% (azoto totale 170 mg/100 cm³).

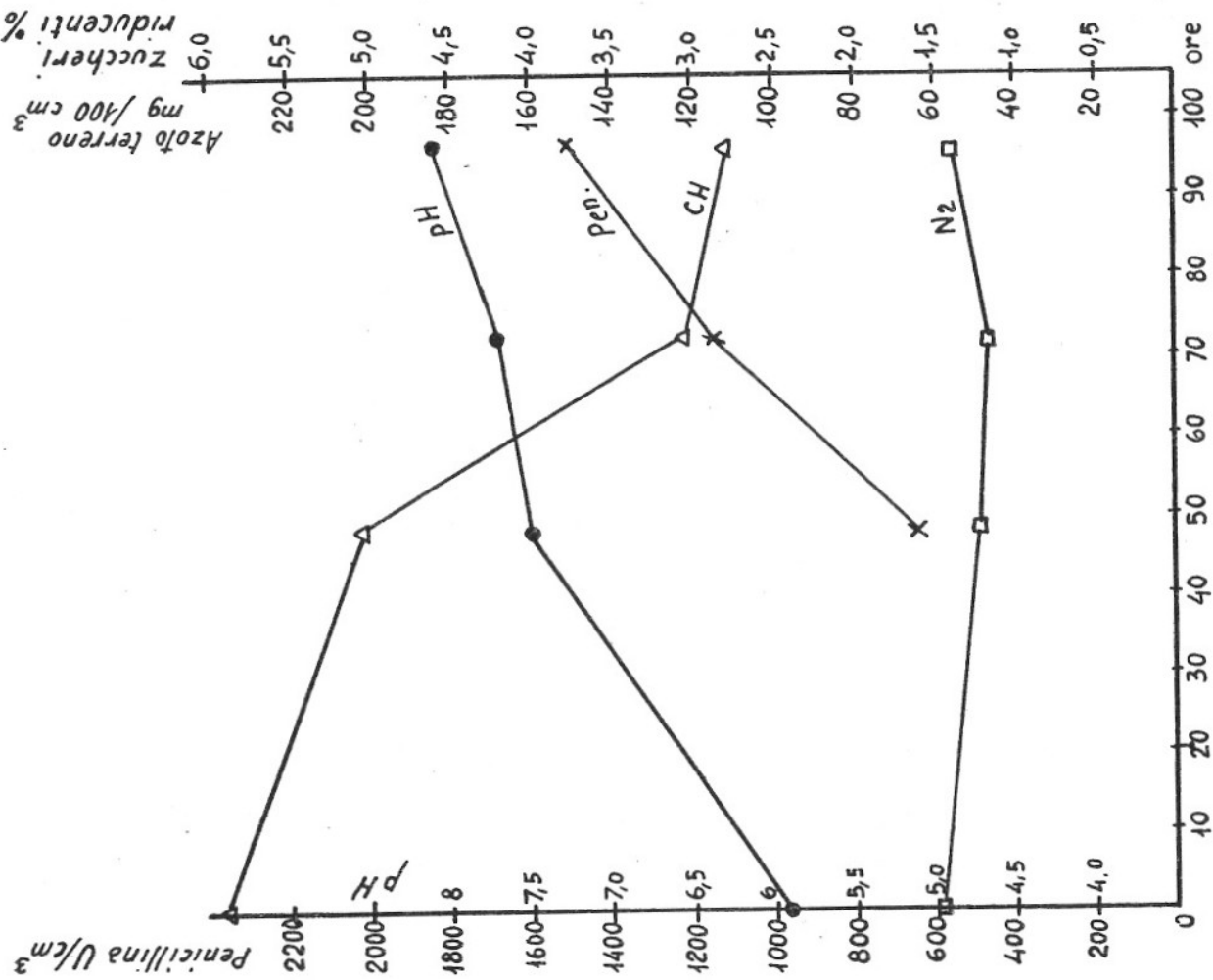


Fig. 4. - Farina di fagioli 3,2% (azoto totale 170 mg/100 cm³).

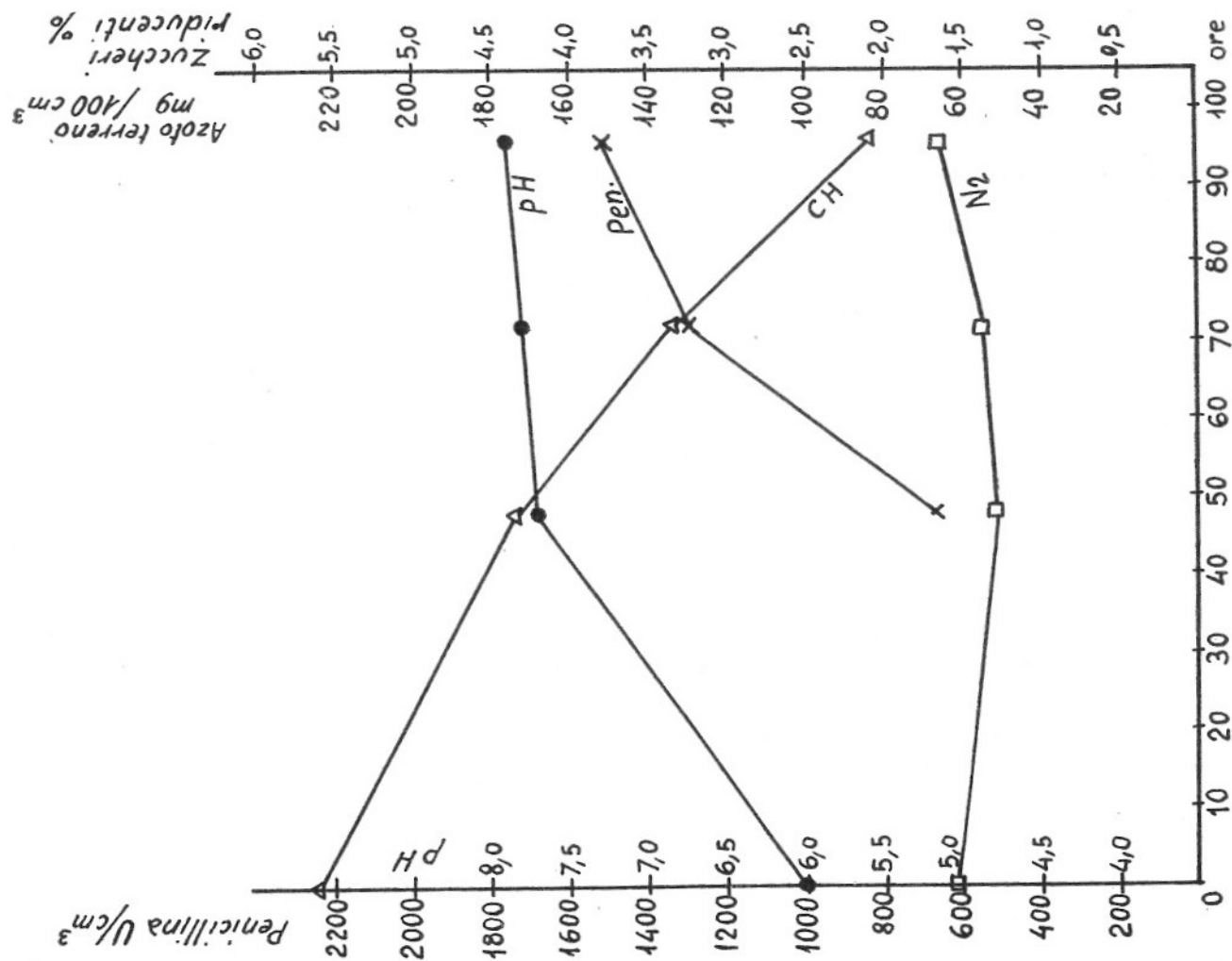


Fig. 5. - Farina di lenticchie 3% (azoto totale 144 mg/100 cm³).

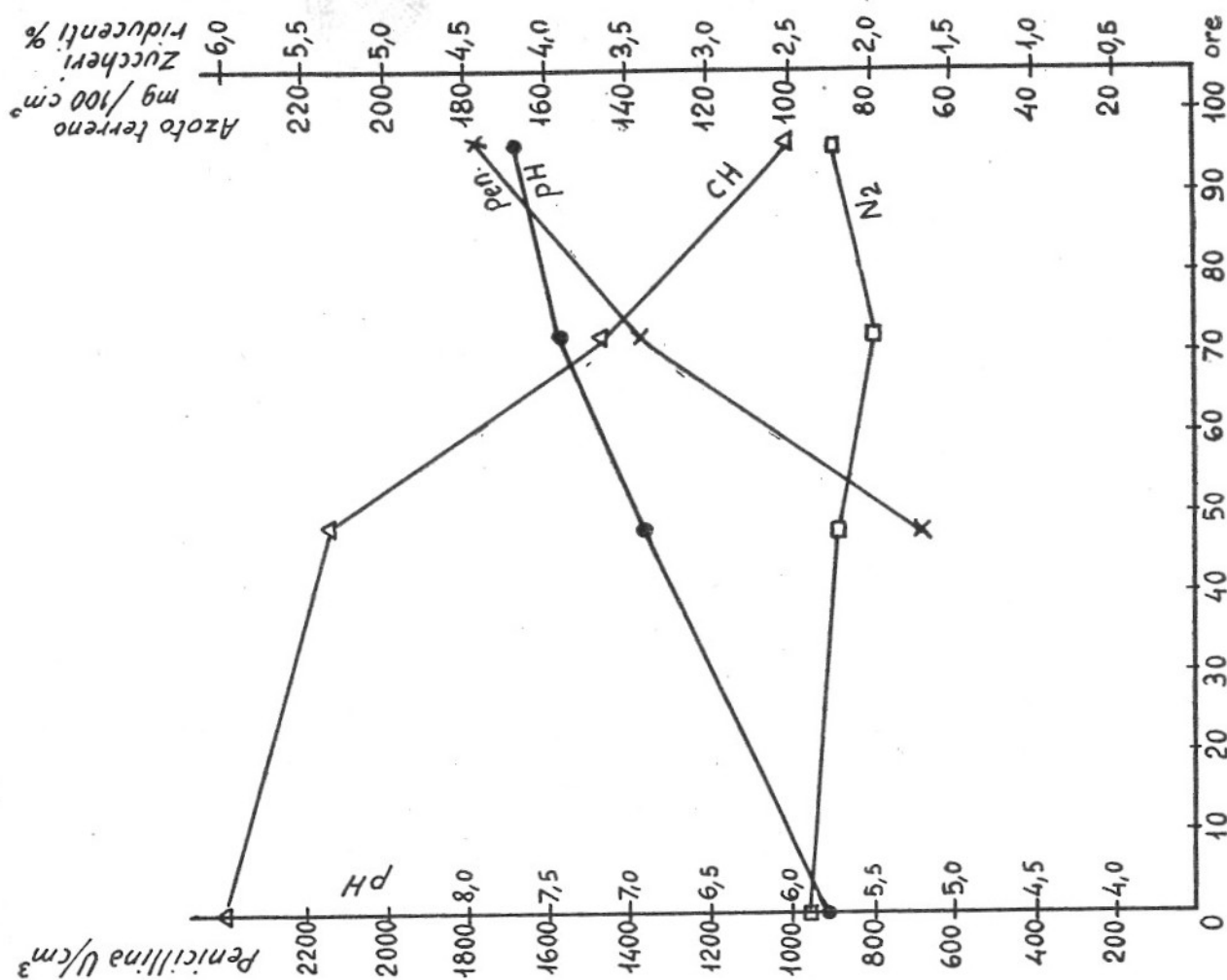


Fig. 5a. - Farina di lenticchie 4,7% (azoto totale 170 mg/100 cm³).

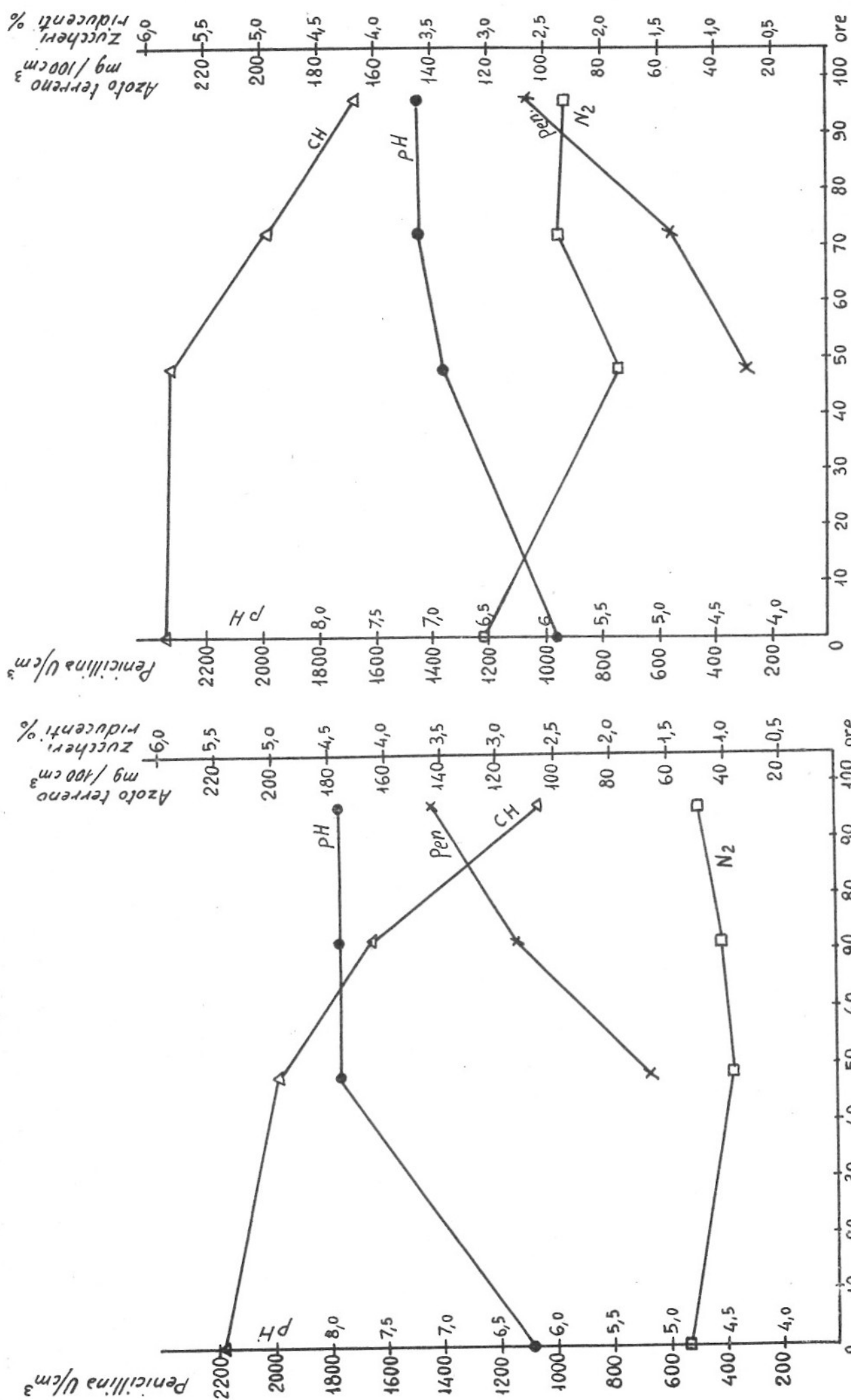


Fig. 6a. - Farina di ceci 6.7% (azoto totale 170 mg/100 cm³).

Fig. 6. - Farina di ceci 3% (azoto totale 76,5 mg/100 cm³).

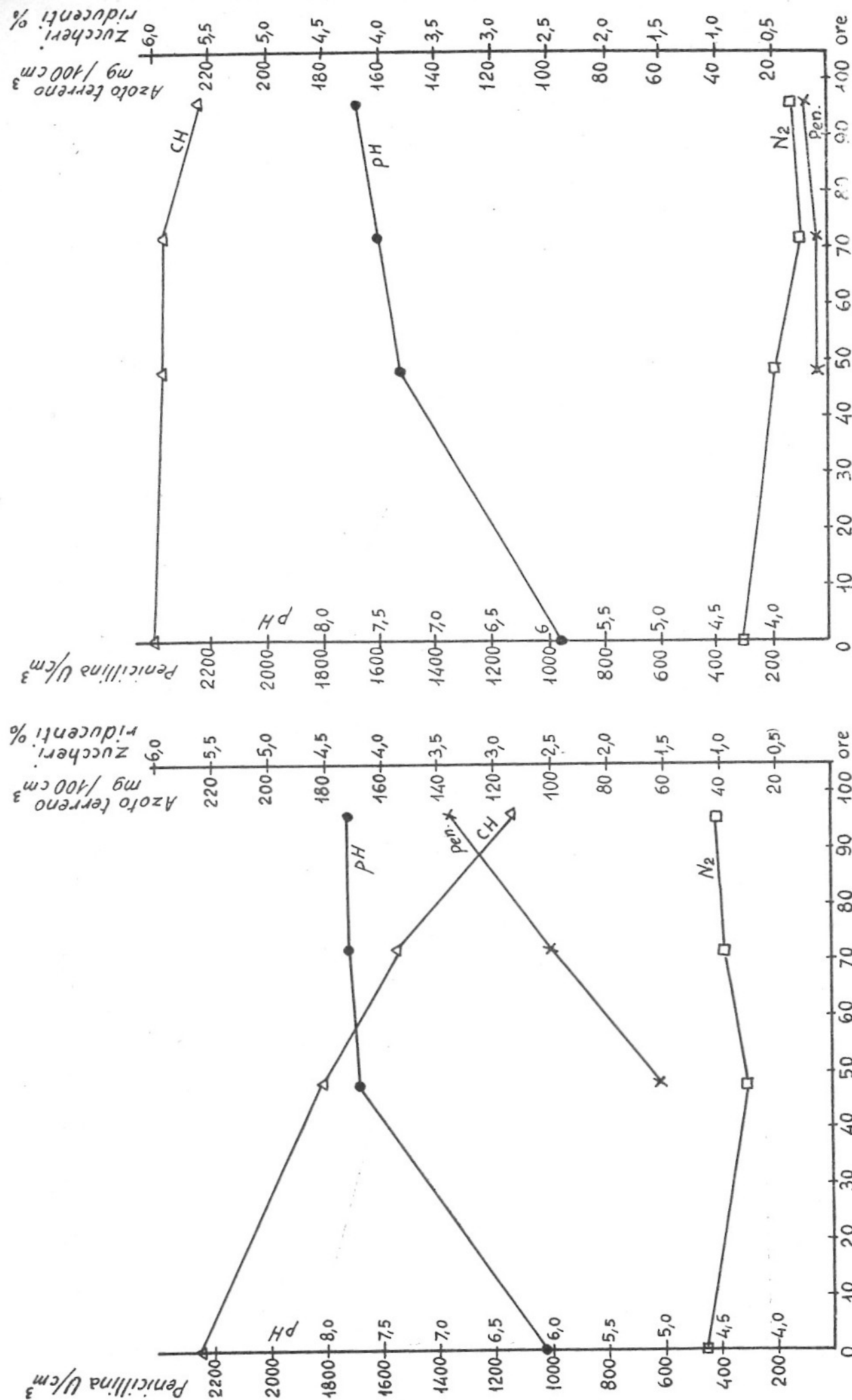


Fig. 7. - Farina di seme di pomodoro 3% (azoto totale 135 mg/100 cm³).

Fig. 8. - Farina di carrube 3% (azoto totale 52 mg/100 cm³).

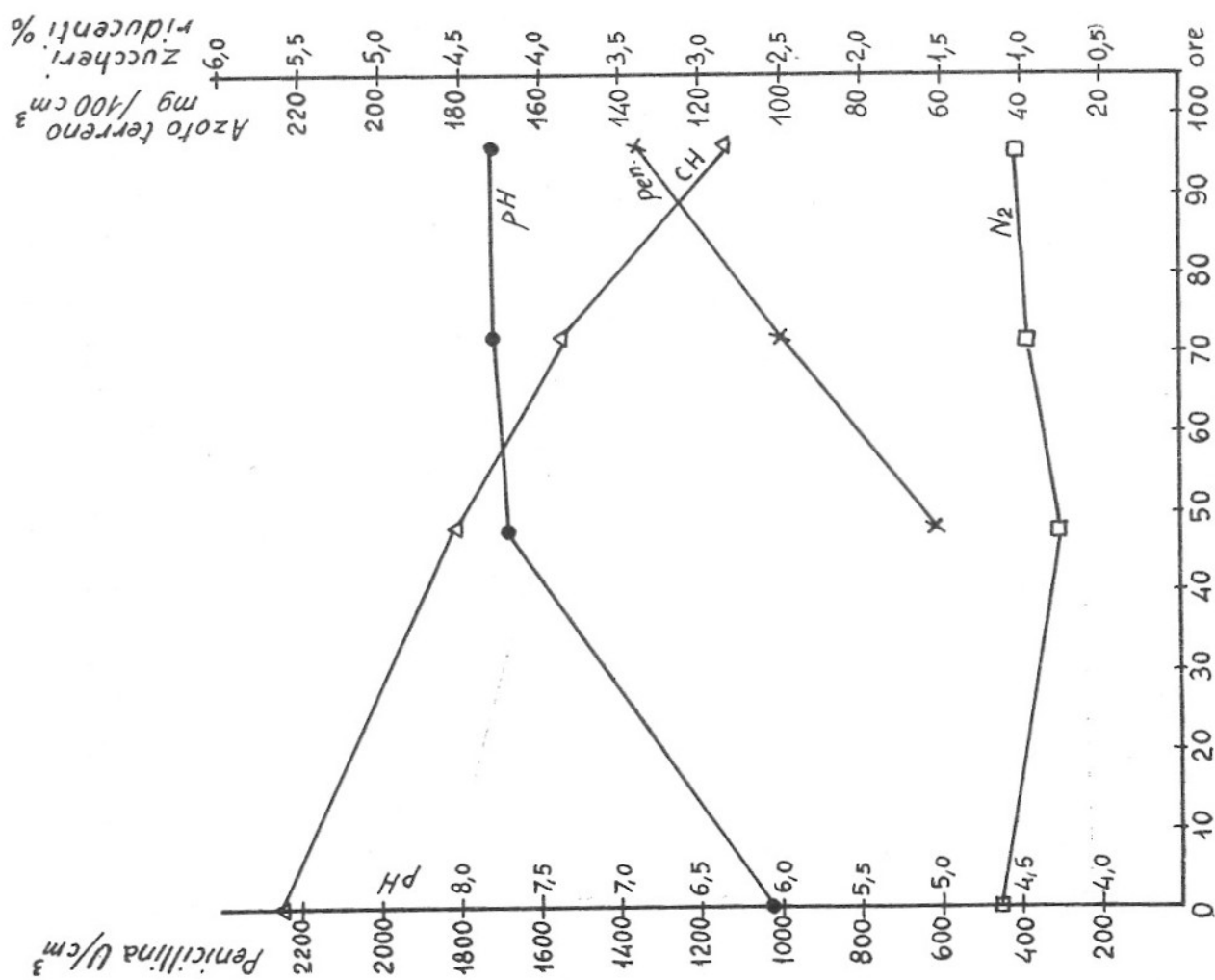


Fig. 7. - Farina di seme di pomodoro 3% (azoto totale 135 mg/100 cm³).

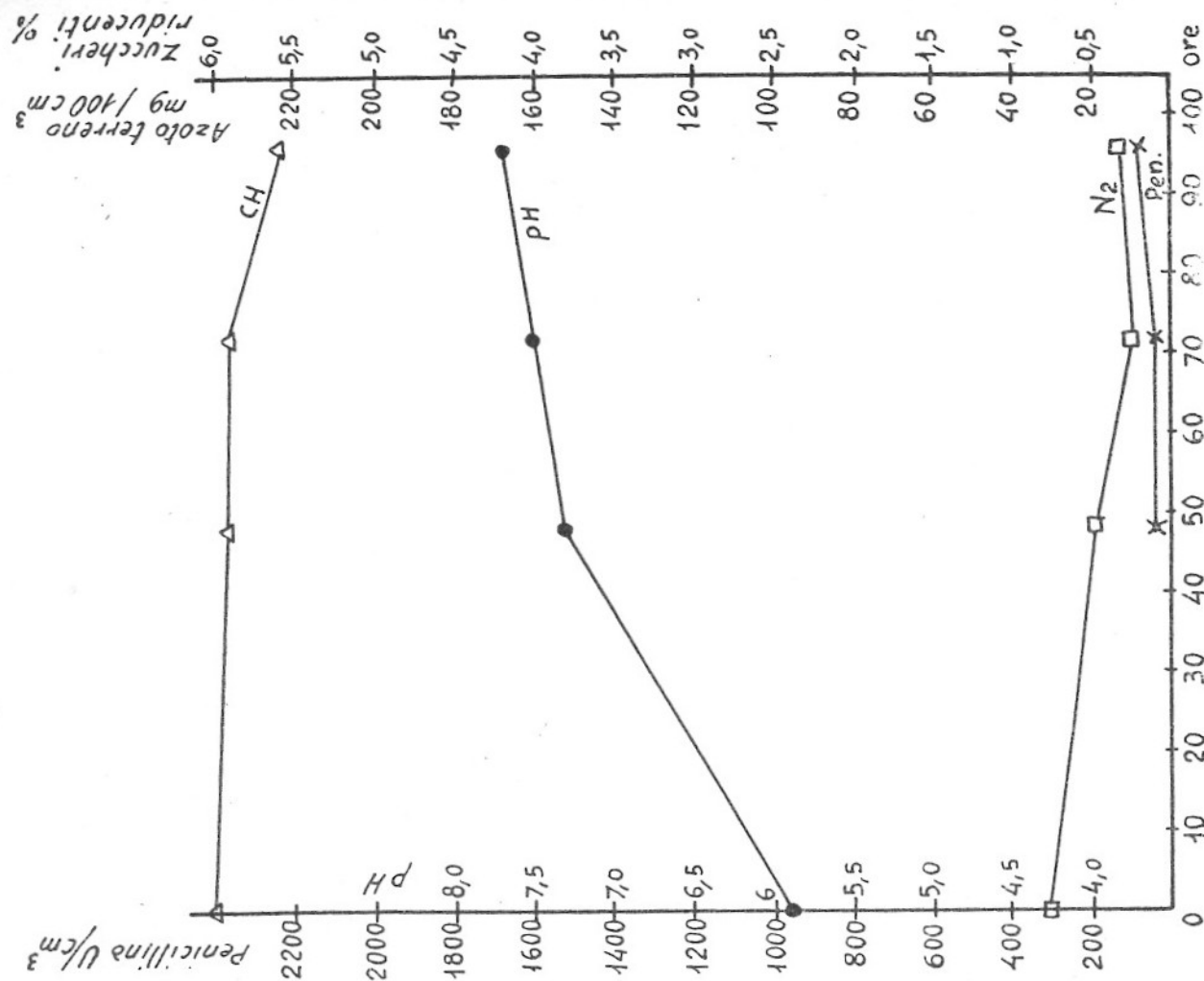


Fig. 8. - Farina di carrube 3% (azoto totale 52 mg/100 cm³).

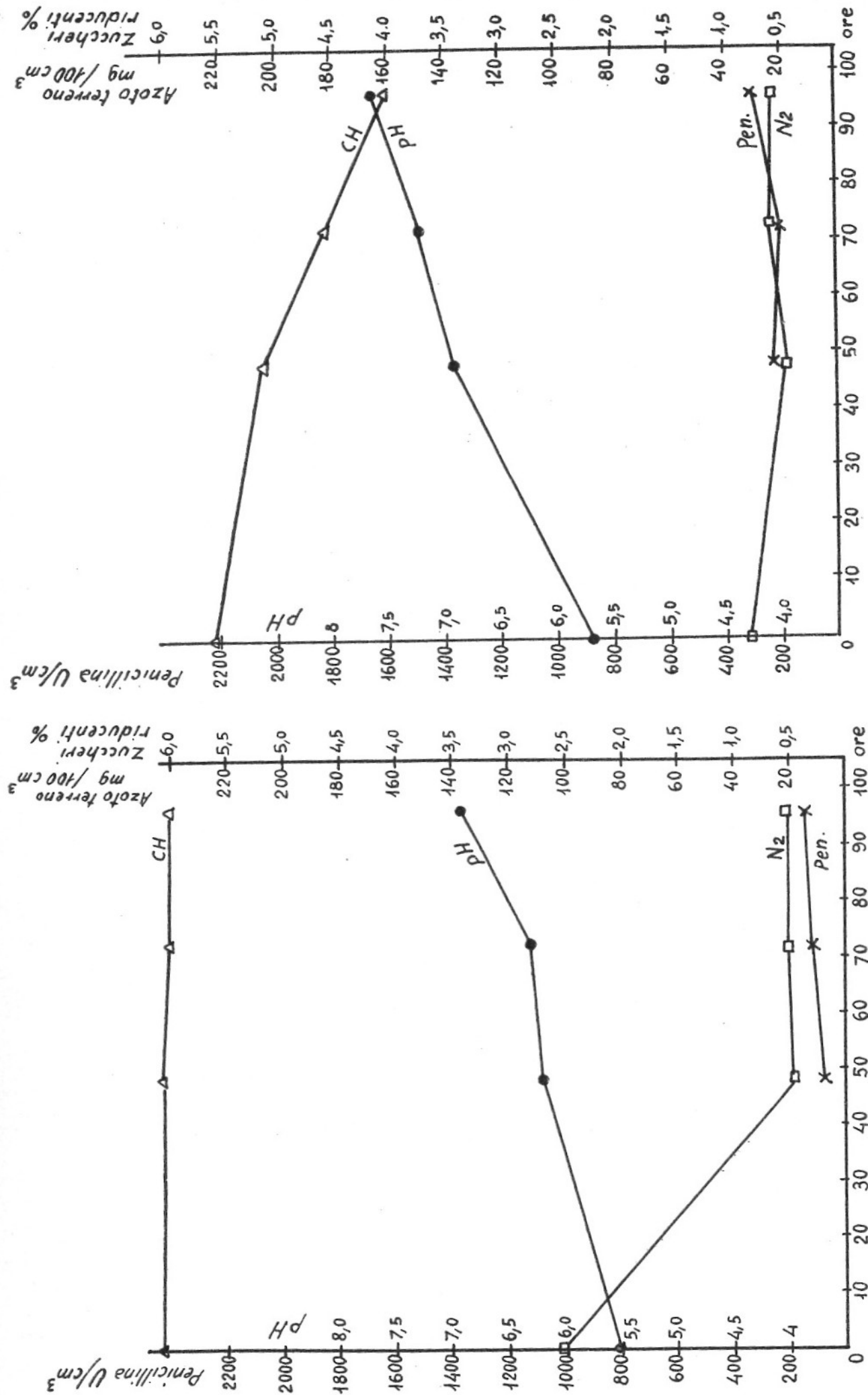


Fig. 8a. - Farina di carrube 10% (azoto totale 170 mg/100 cm³).

Fig. 9. - Farina di vinaccioli 3% (azoto totale 53,5 mg/100 cm³).

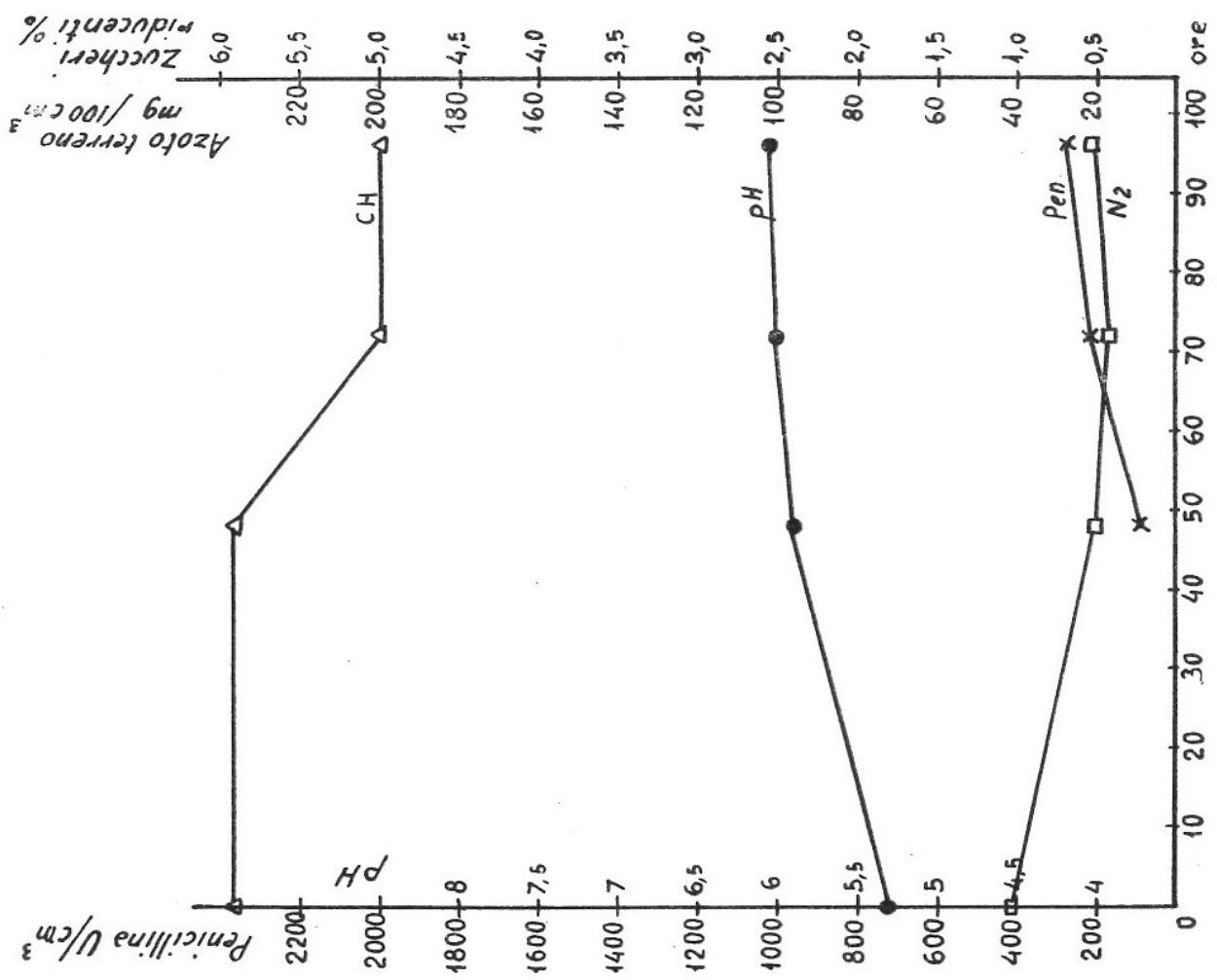


Fig. 9a. - Farina di vinaccioli 9,6% (azoto totale 170 mg/100 cm³).

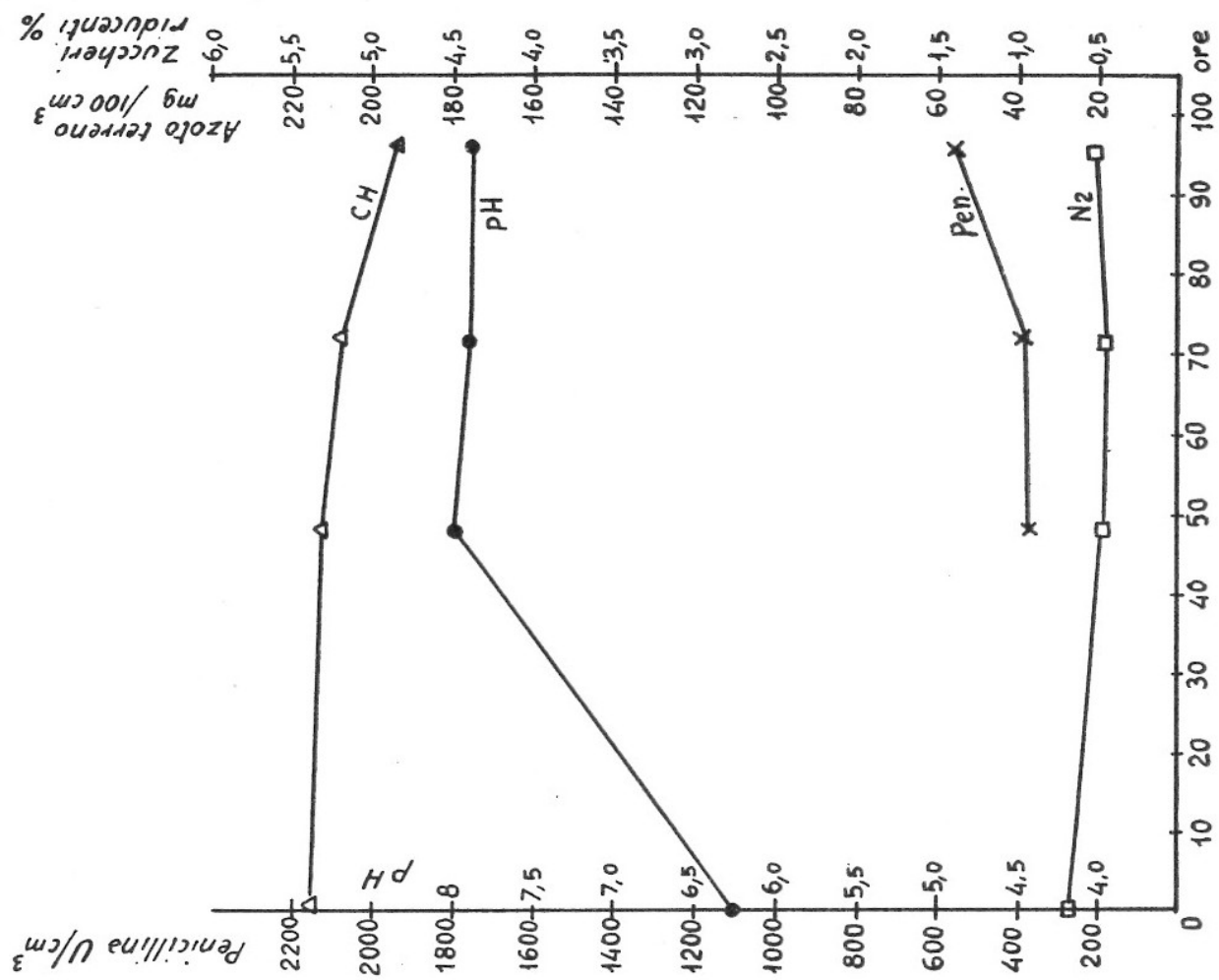


Fig. 10. - Farina di mais 3% (azoto totale 38,7 mg/100 cm³).

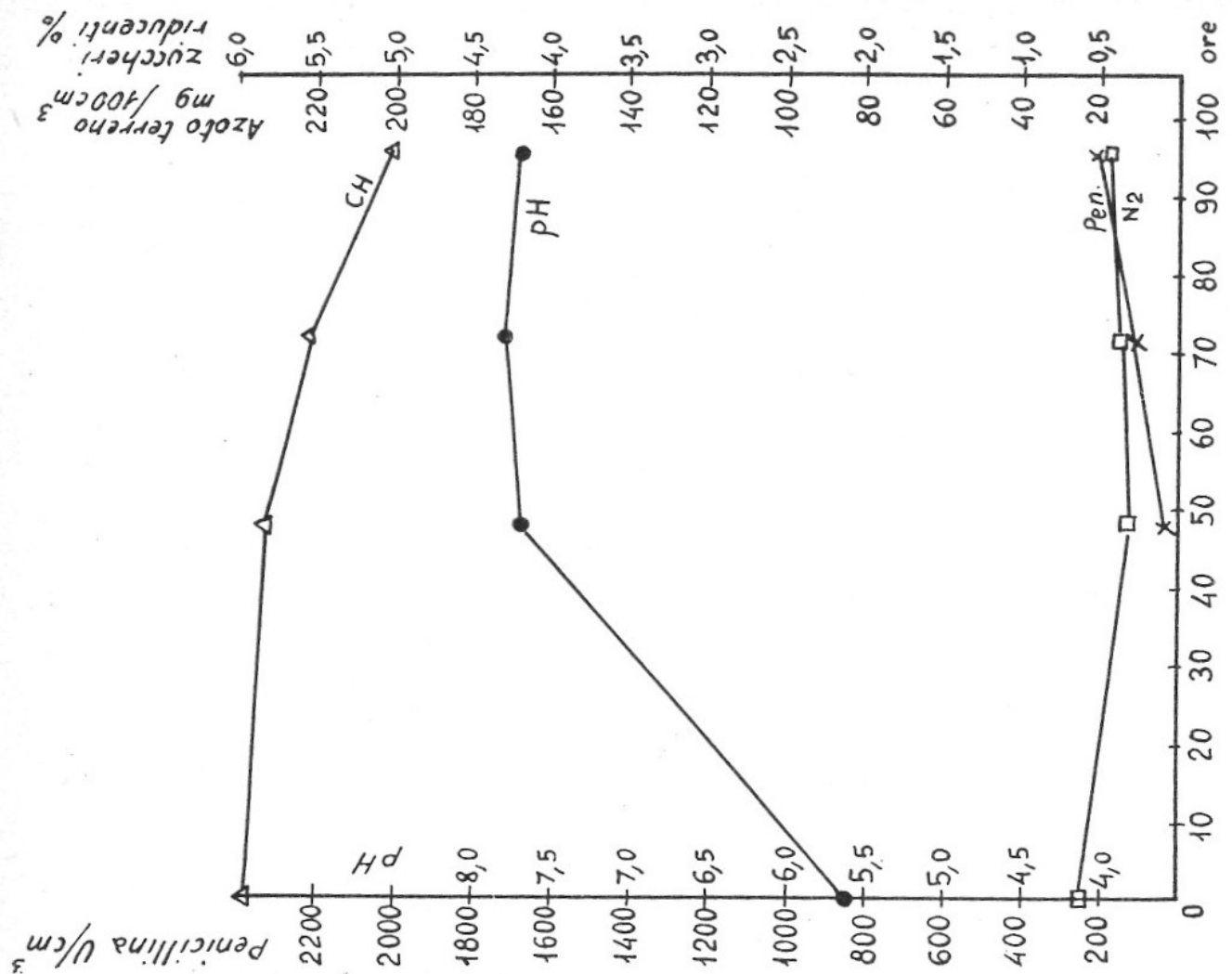


Fig. 11. - Farina di castagne 3% (azoto totale 27 mg/100 cm³).

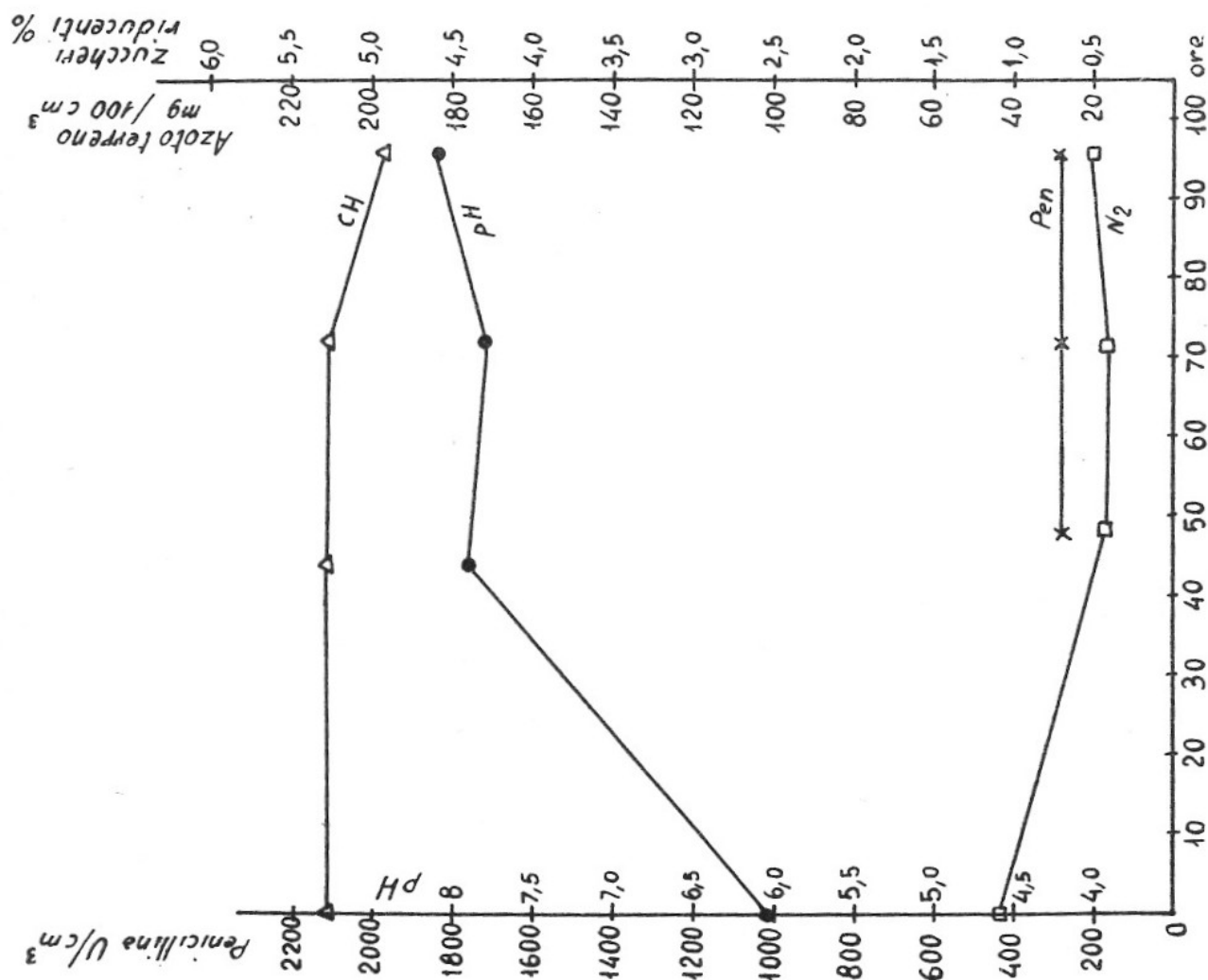


Fig. 11. - Farina di castagne 3% (azoto totale 27 mg/100 cm³).

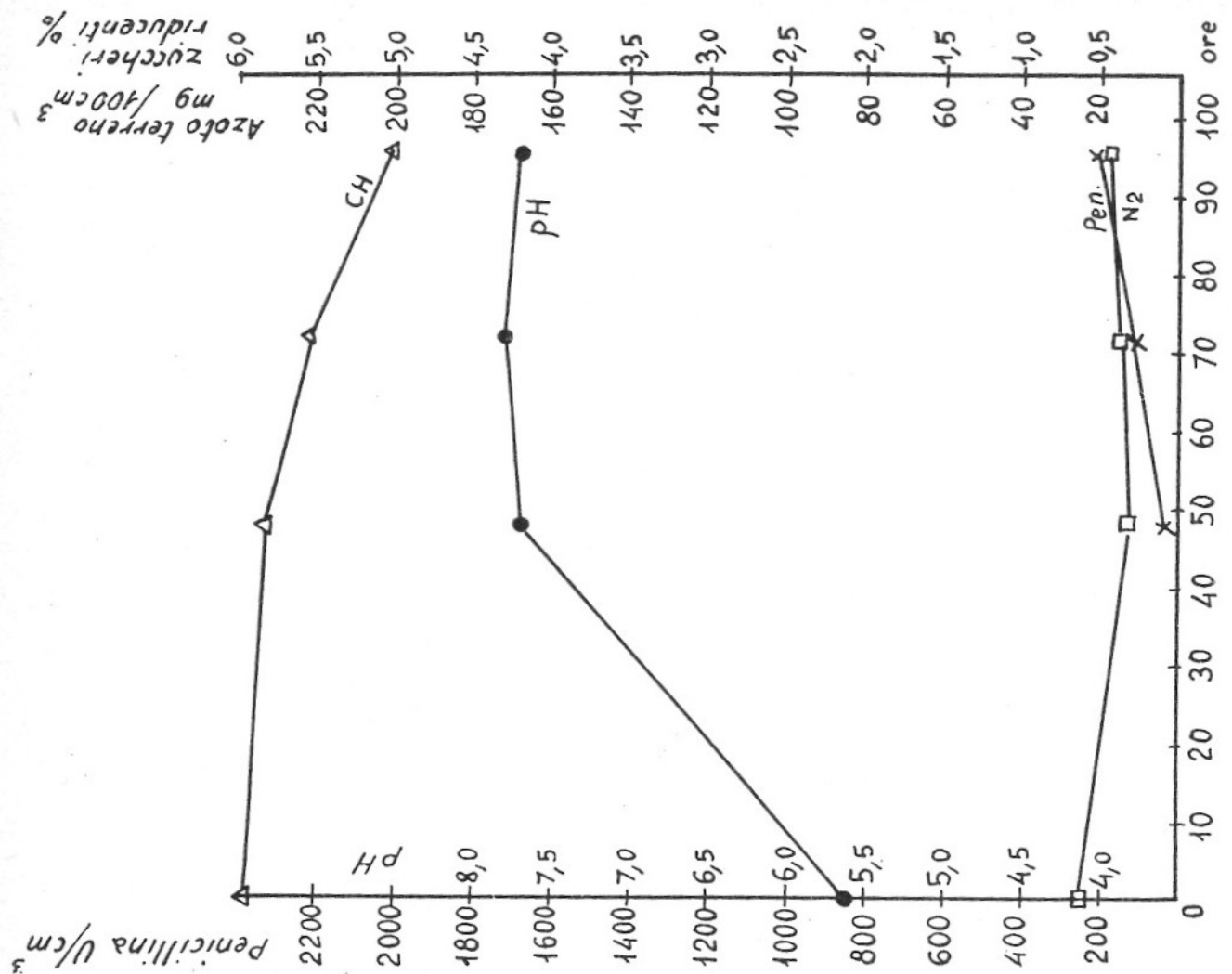


Fig. 11. - Farina di castagne 3% (azoto totale 27 mg/100 cm³).

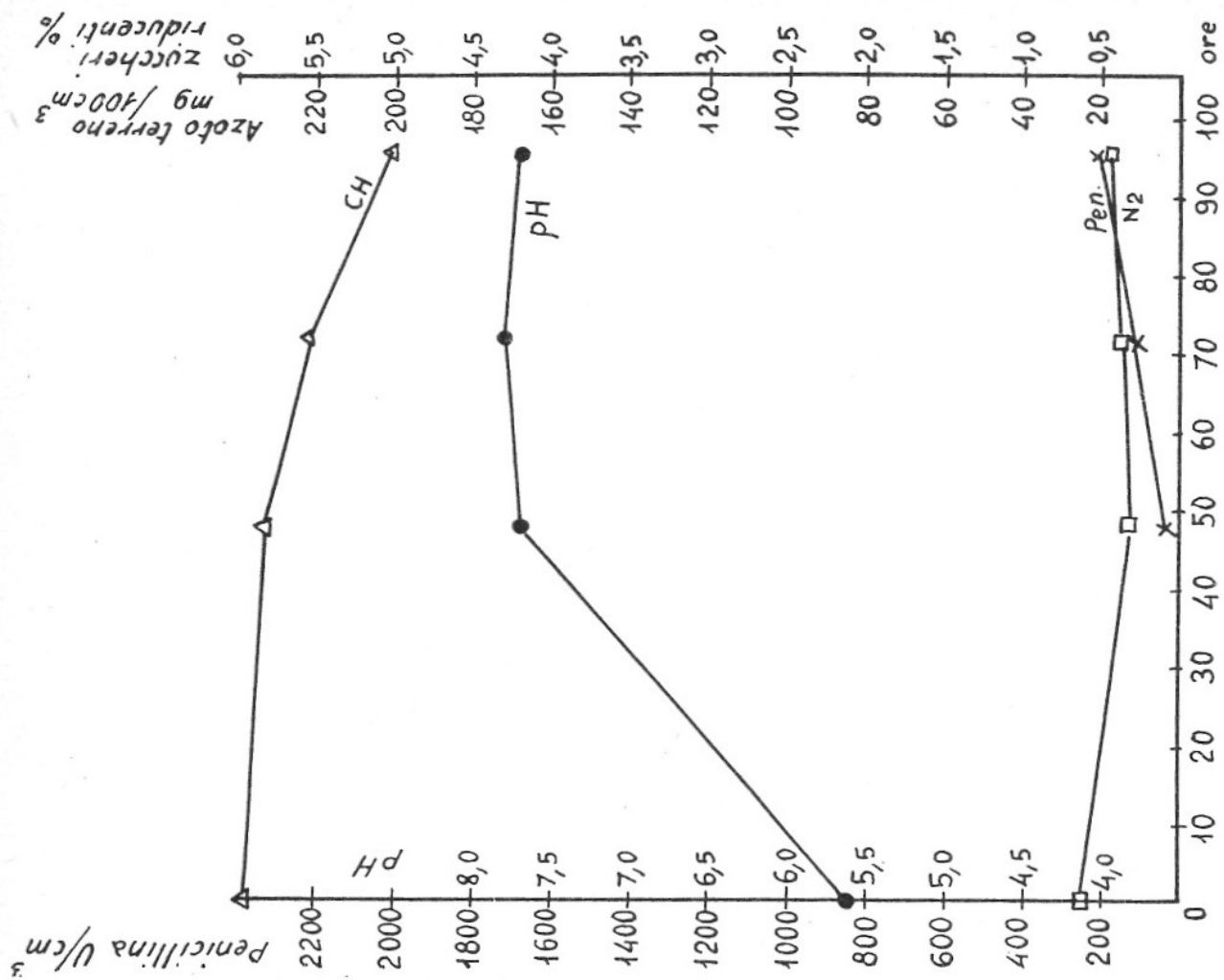


Fig. 11. - Farina di castagne 3% (azoto totale 27 mg/100 cm³).

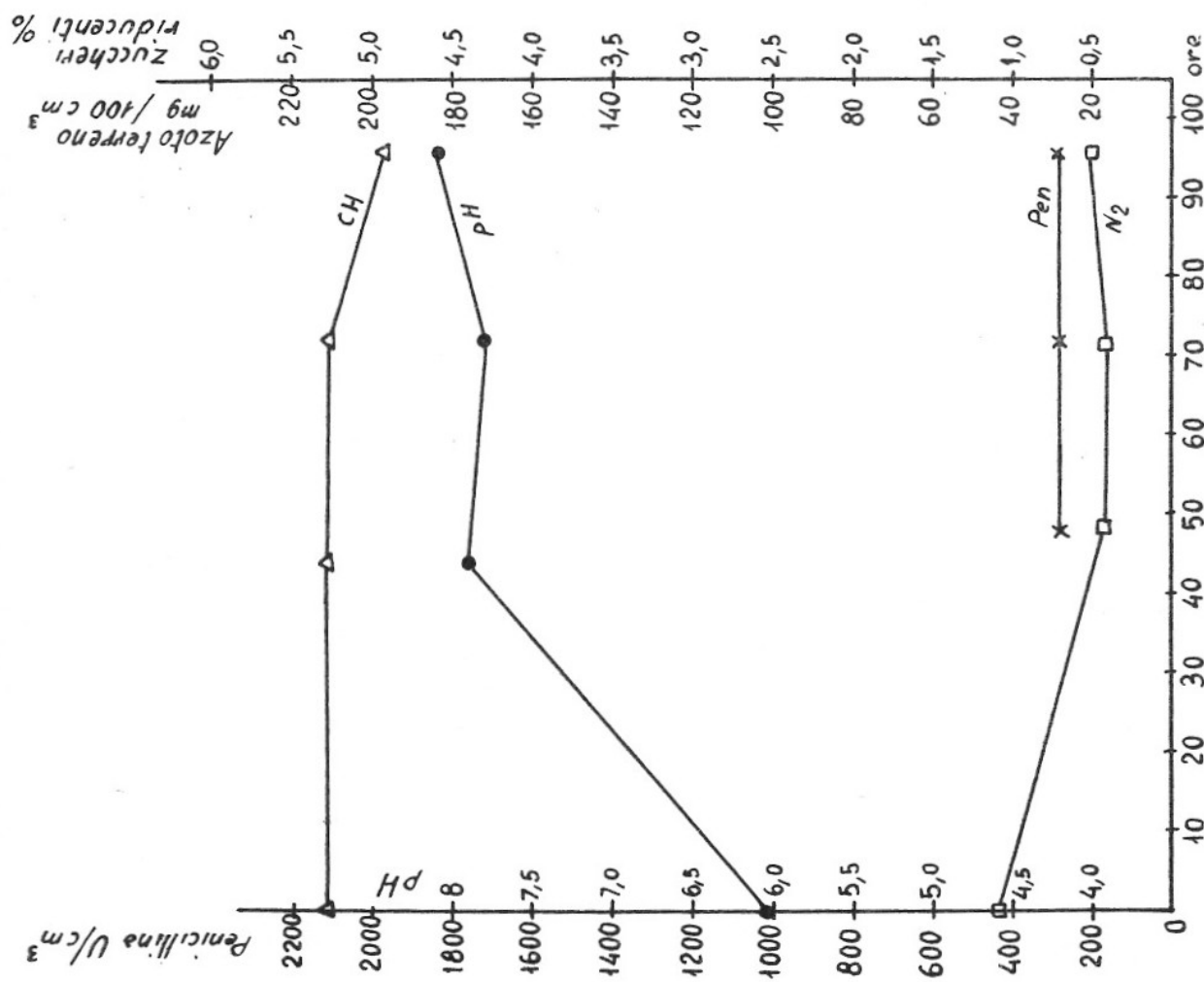


Fig. 12. - Farina di polpa di mele 3% (azoto totale 27 mg/100 cm³).

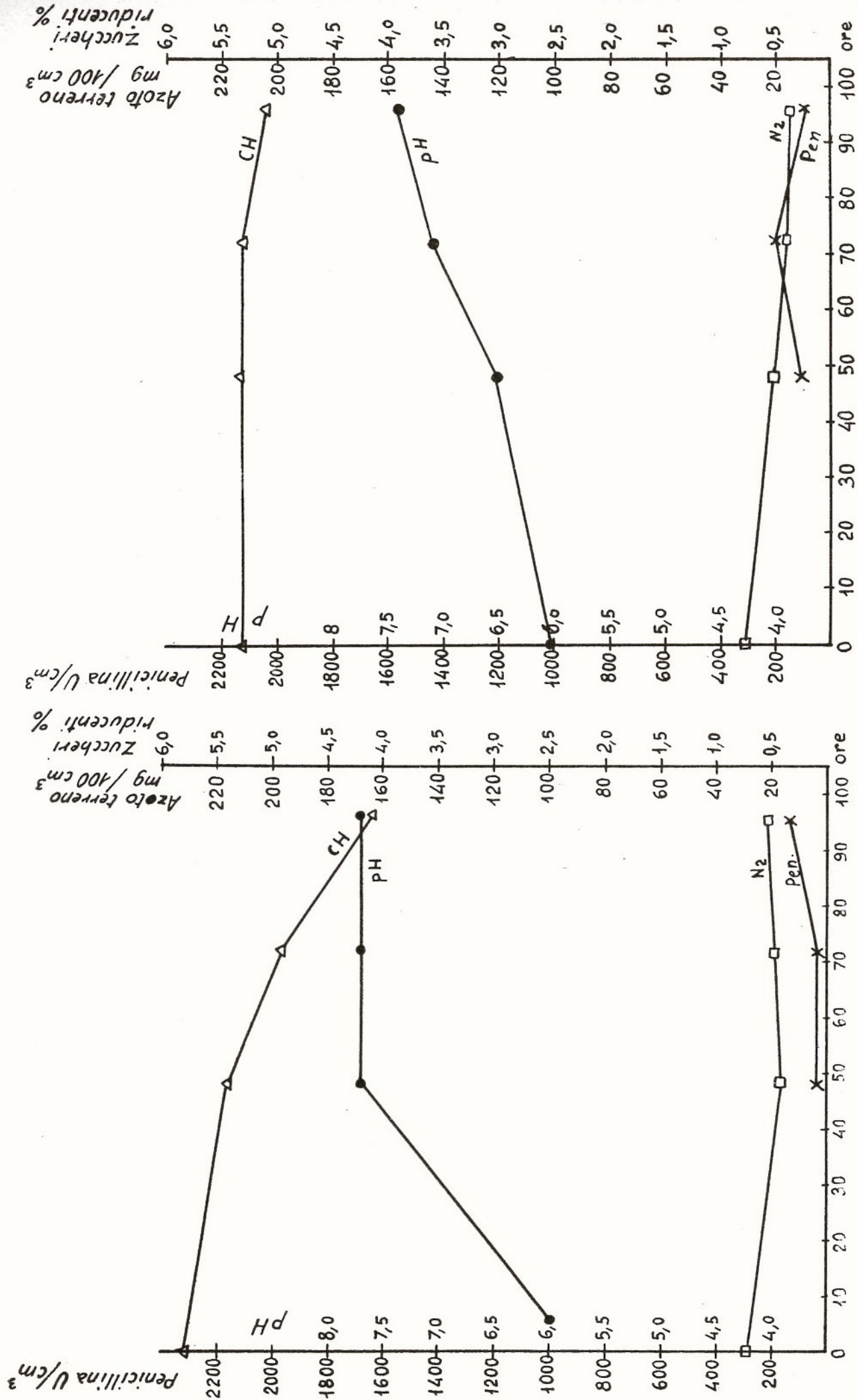


Fig. 13. - Farina di scarto di grano 3% (azoto totale 48 mg/100 cm³).

Fig. 14. - Farina di ghiande 3% (azoto totale 29 mg/100 cm³).

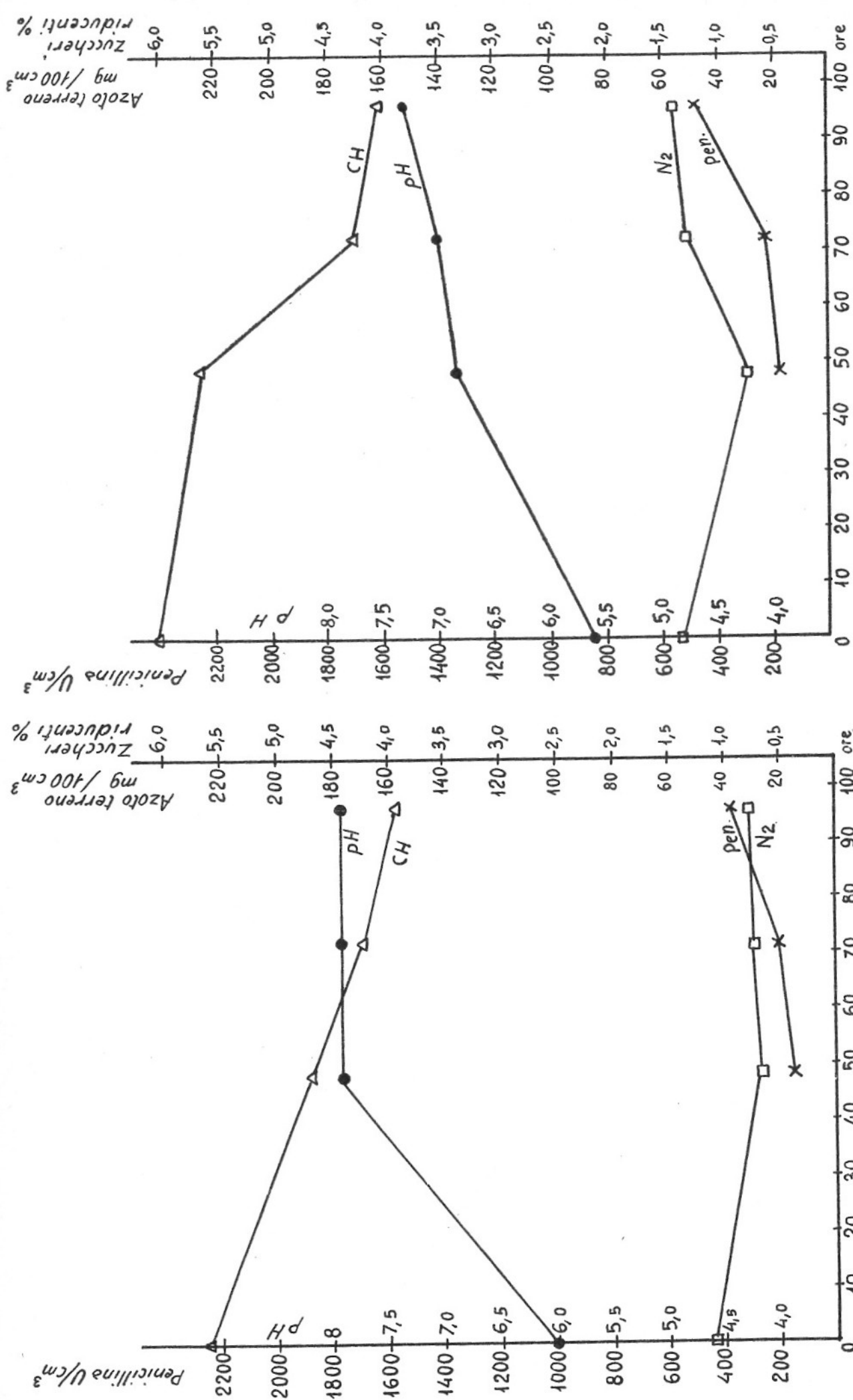


Fig. 14b. - Farinetta di pomodoro 3% (azoto totale 73 mg/100 cm³)

Fig. 14a. - Farinetta di pomodoro 6,8% (azoto totale 170 mg/100 cm³).

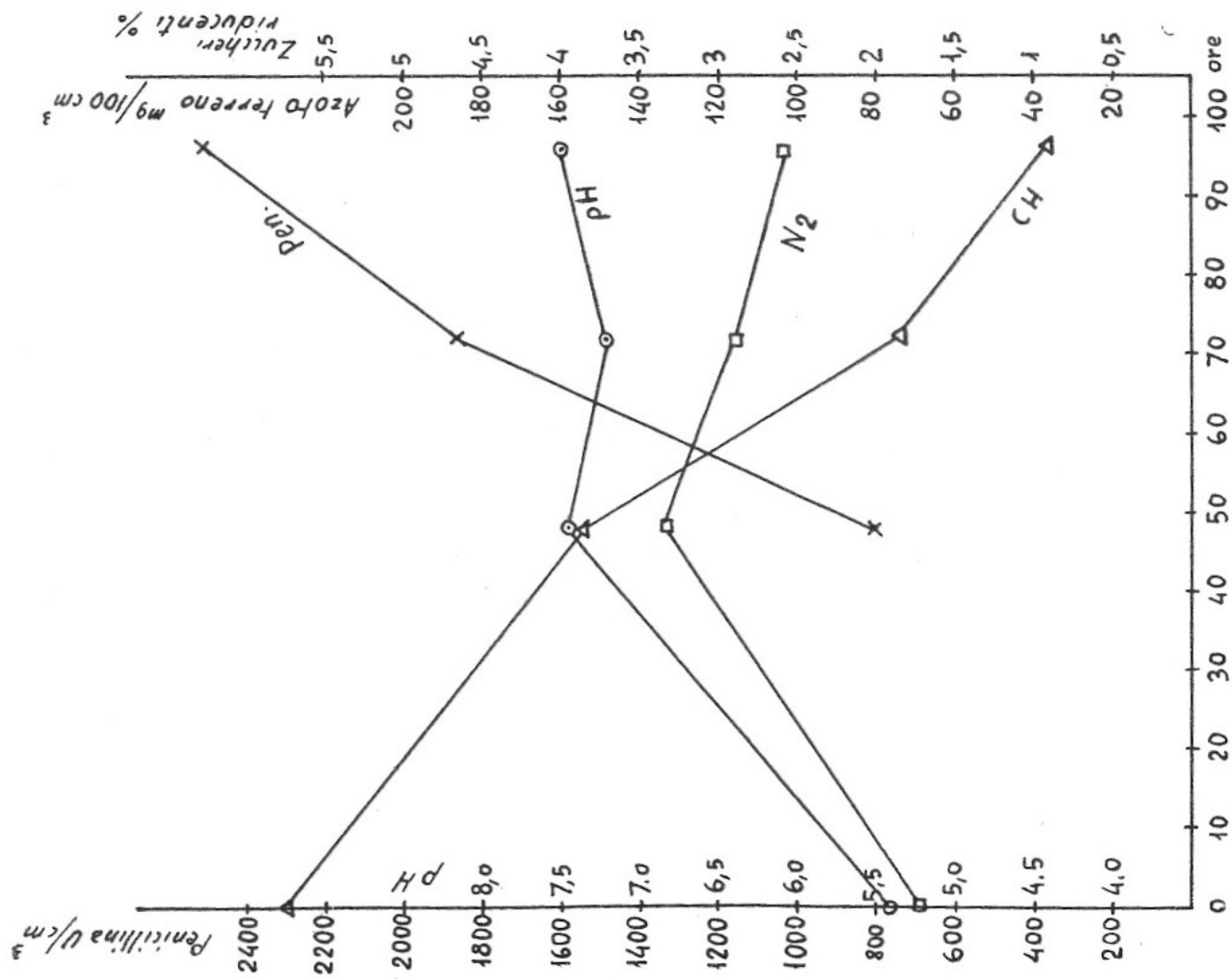


Fig. 16. - Proteine di arachidi (azoto totale 240 mg/100 cm³).

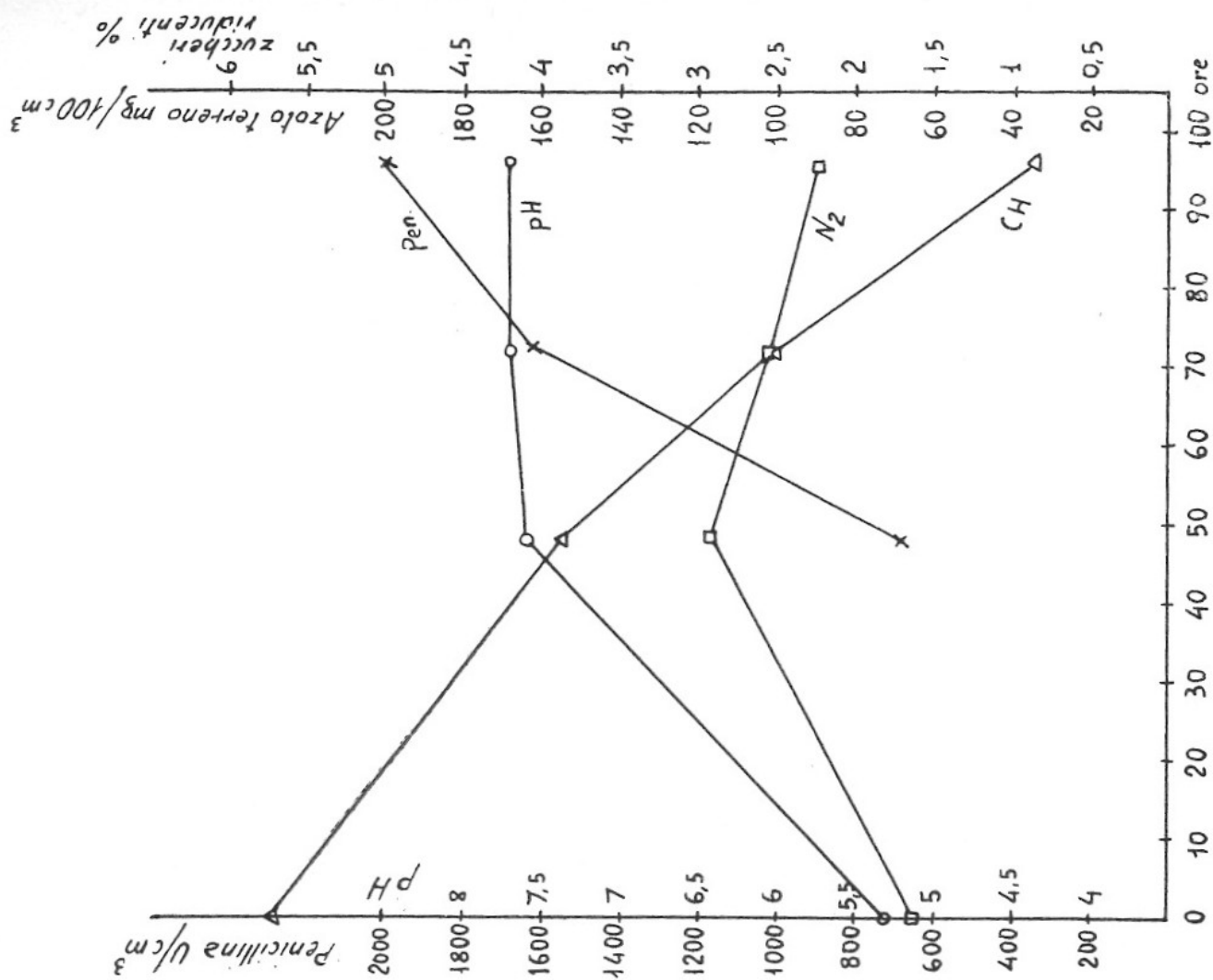


Fig. 17. - Proteine di lupini (azoto totale 203 mg/100 cm³).

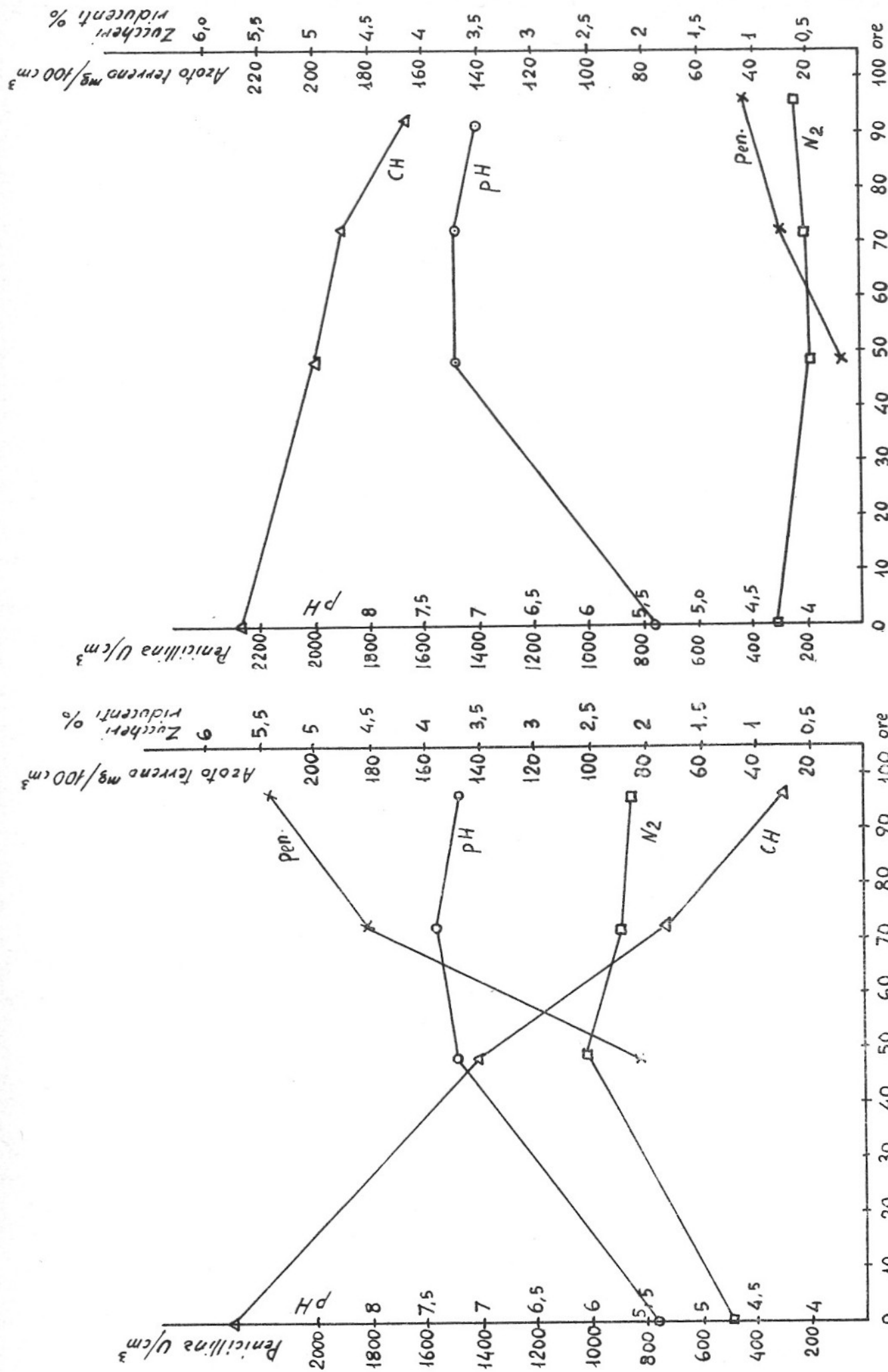


Fig. 48. - Proteine di cecì (azoto totale 192 mg/100 cm³).

Fig. 49. - Proteine di carrube (azoto totale 93 mg/100 cm³).

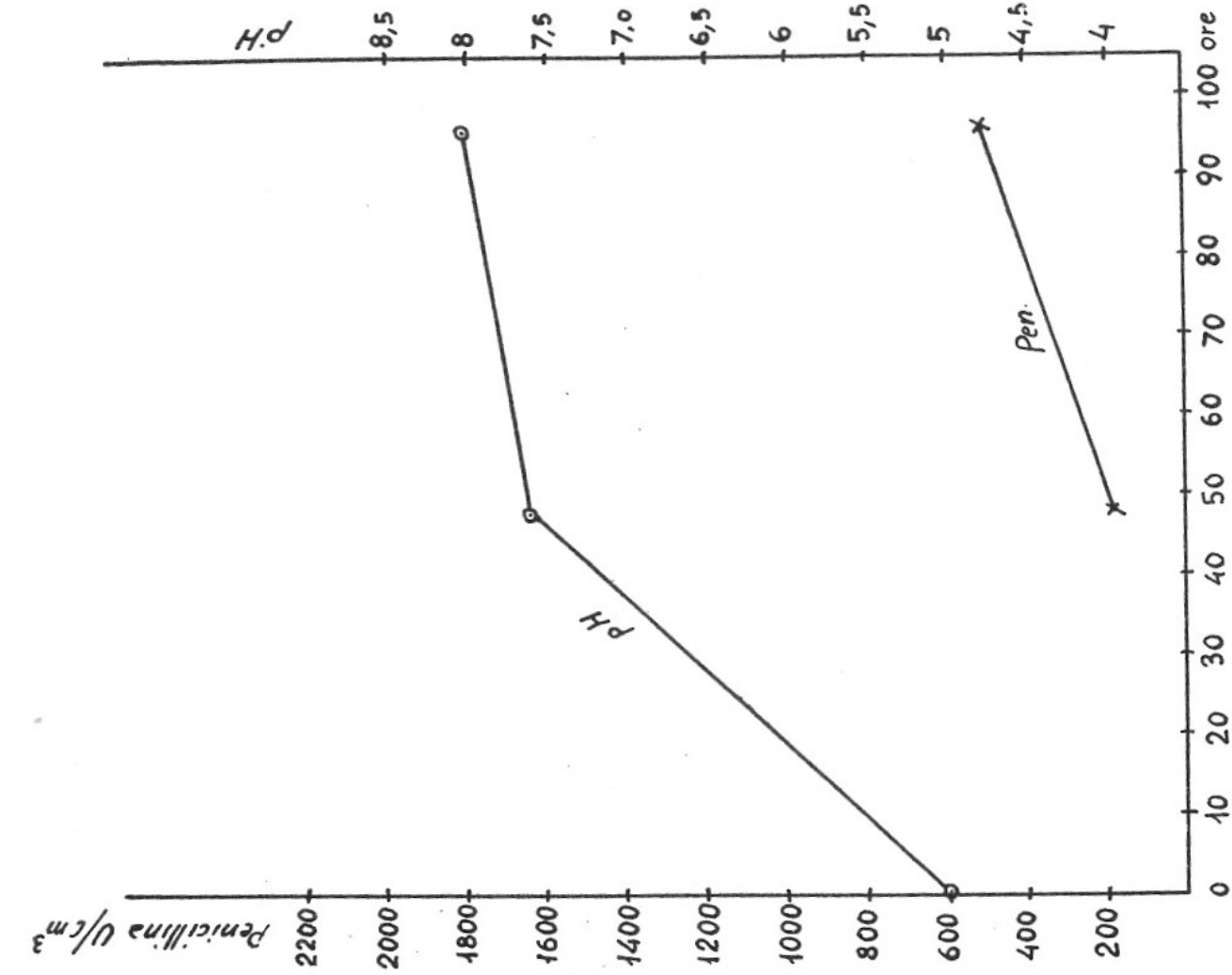


Fig. 19a. - Proteine di carrube (azoto totale 240 mg/100 cm³).

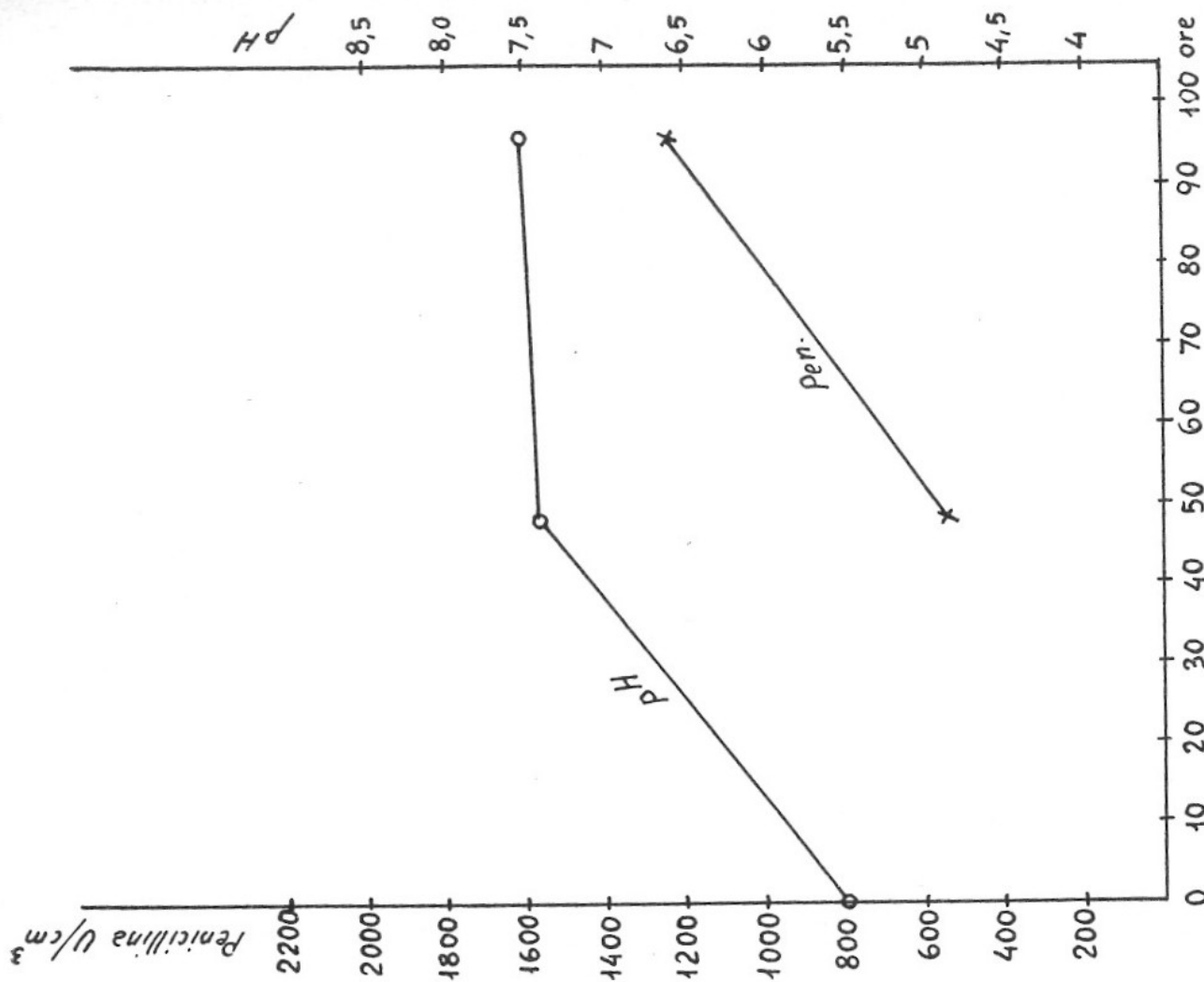


Fig. 20. - Proteine di vinaccioli (azoto totale 240 mg/100 cm³).

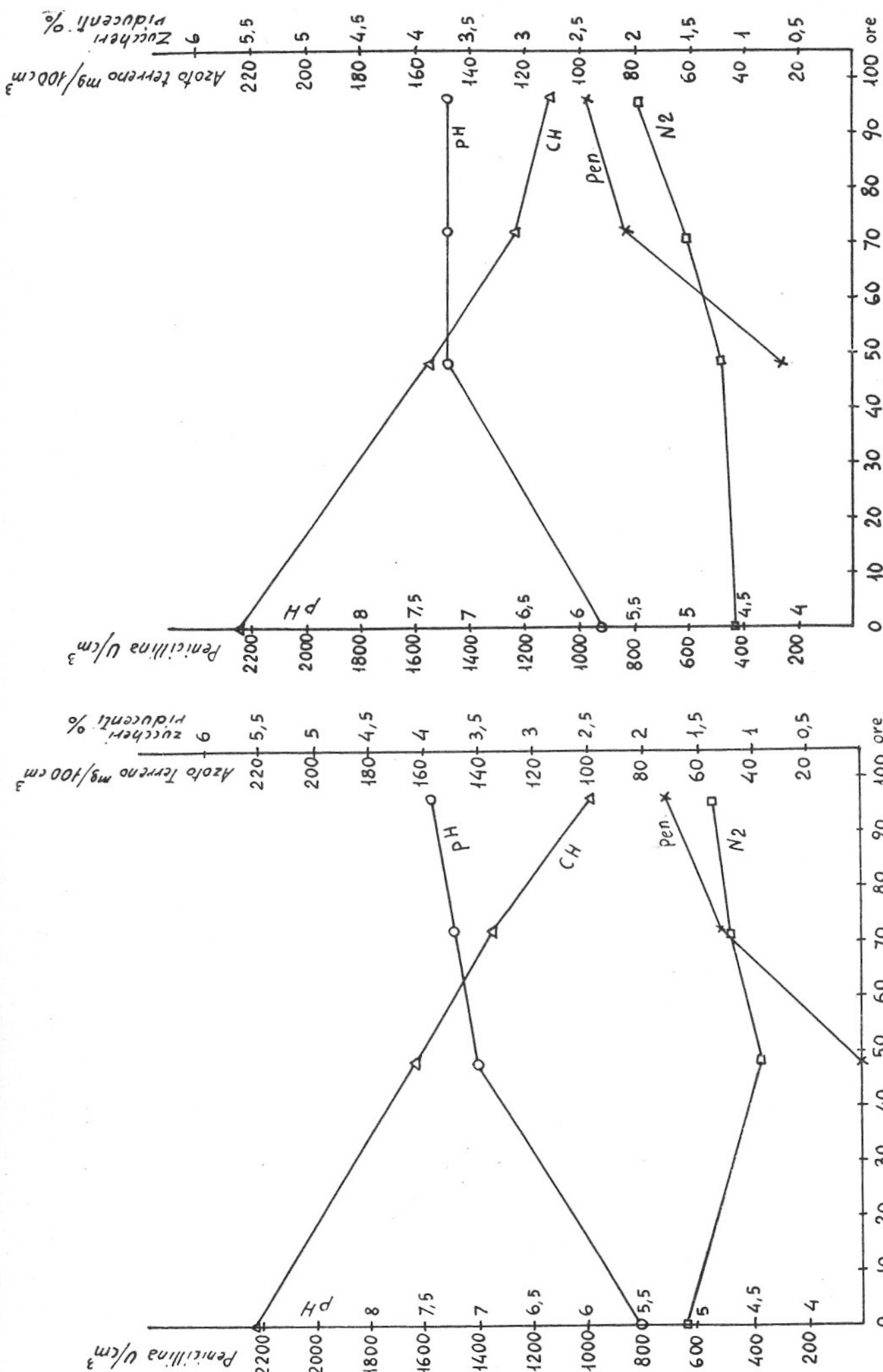


Fig. 21. - Proteine di castagne (azoto totale 105 mg/100 cm³).

Fig. 20a. - Proteine di vinaccioli (azoto totale 129 mg/100 cm³).

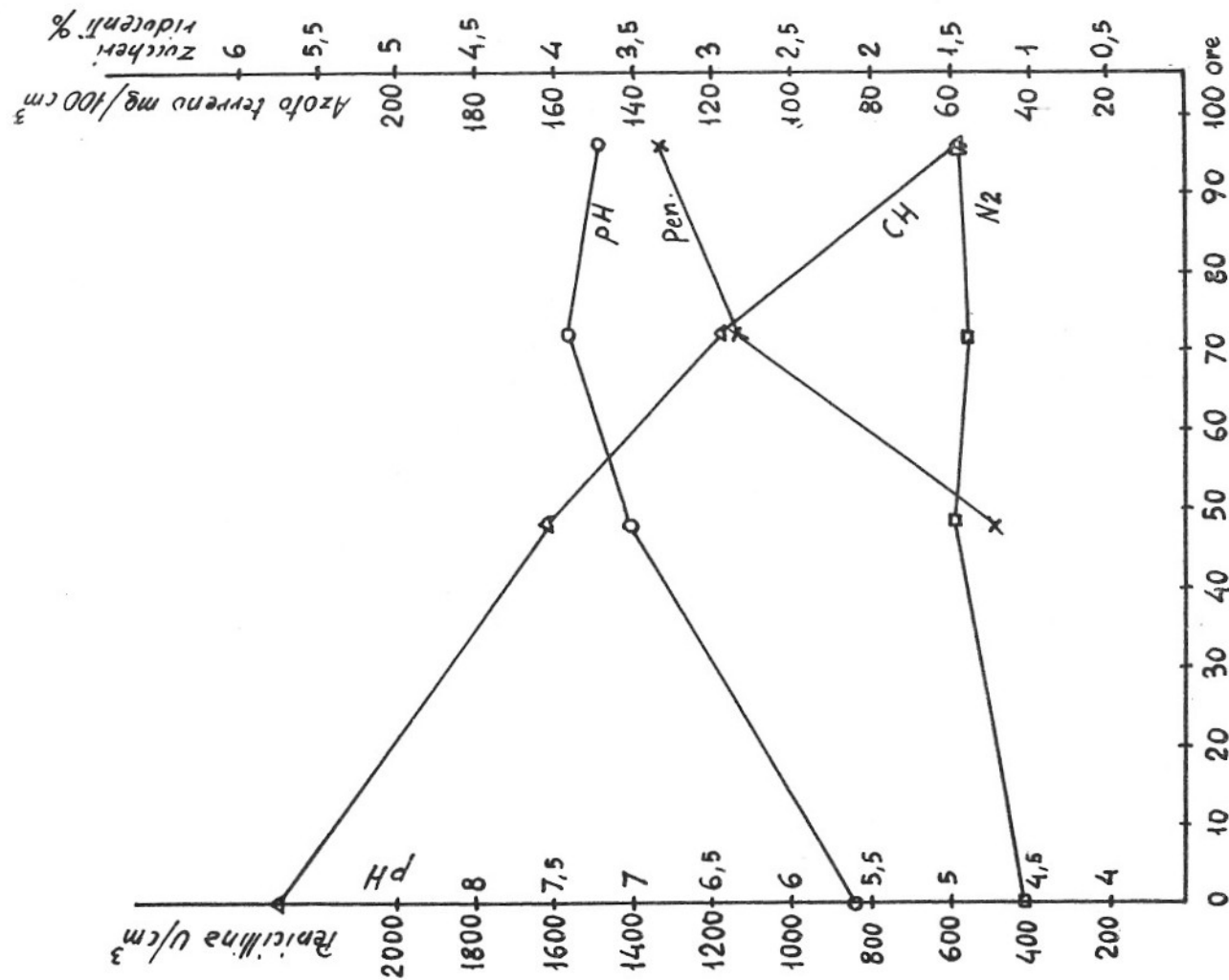


Fig. 22. - Proteine di mais (azoto totale 121 mg/100 cm³).

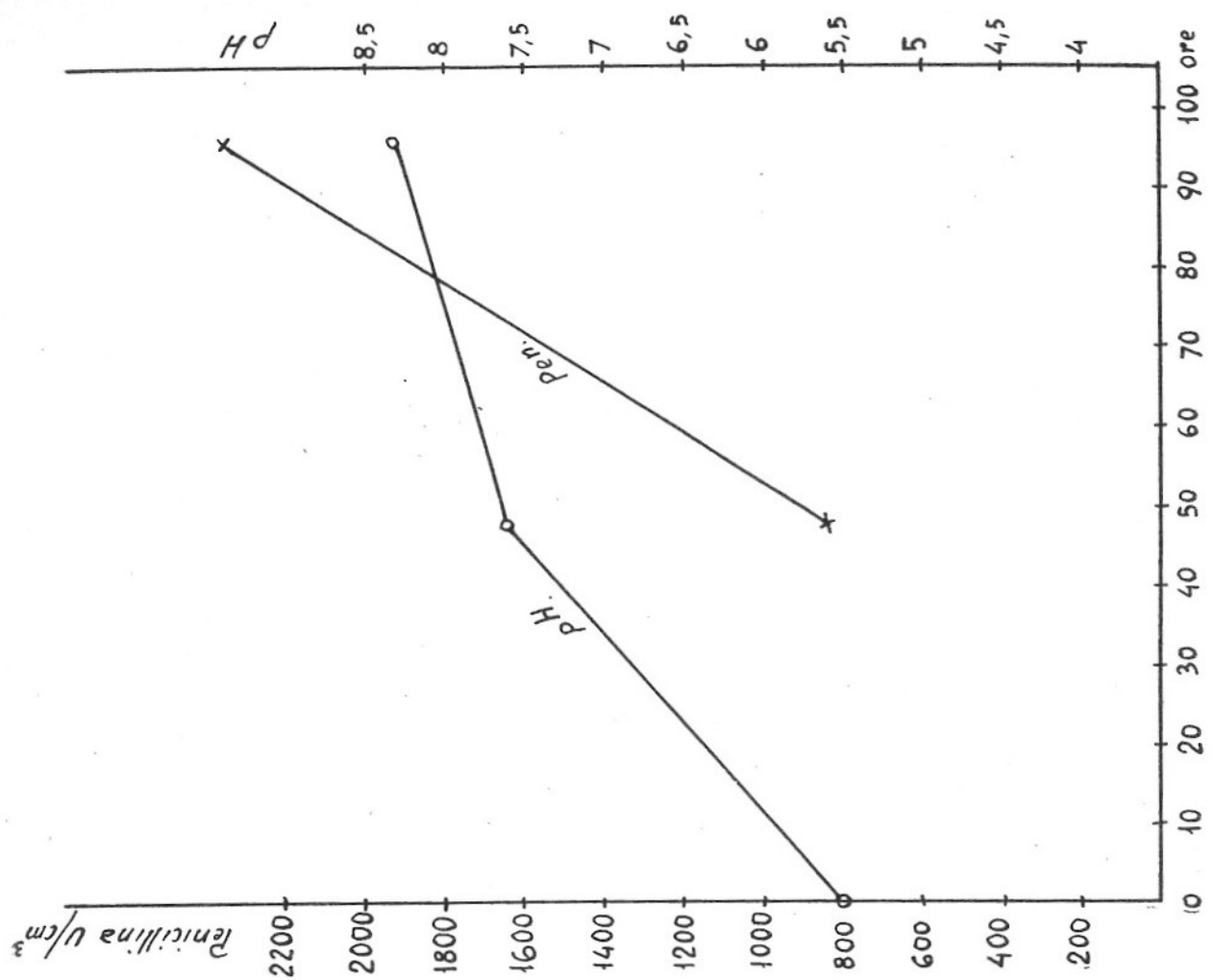


Fig. 22a. - Proteine di mais (azoto totale 210 mg/100 cm³).

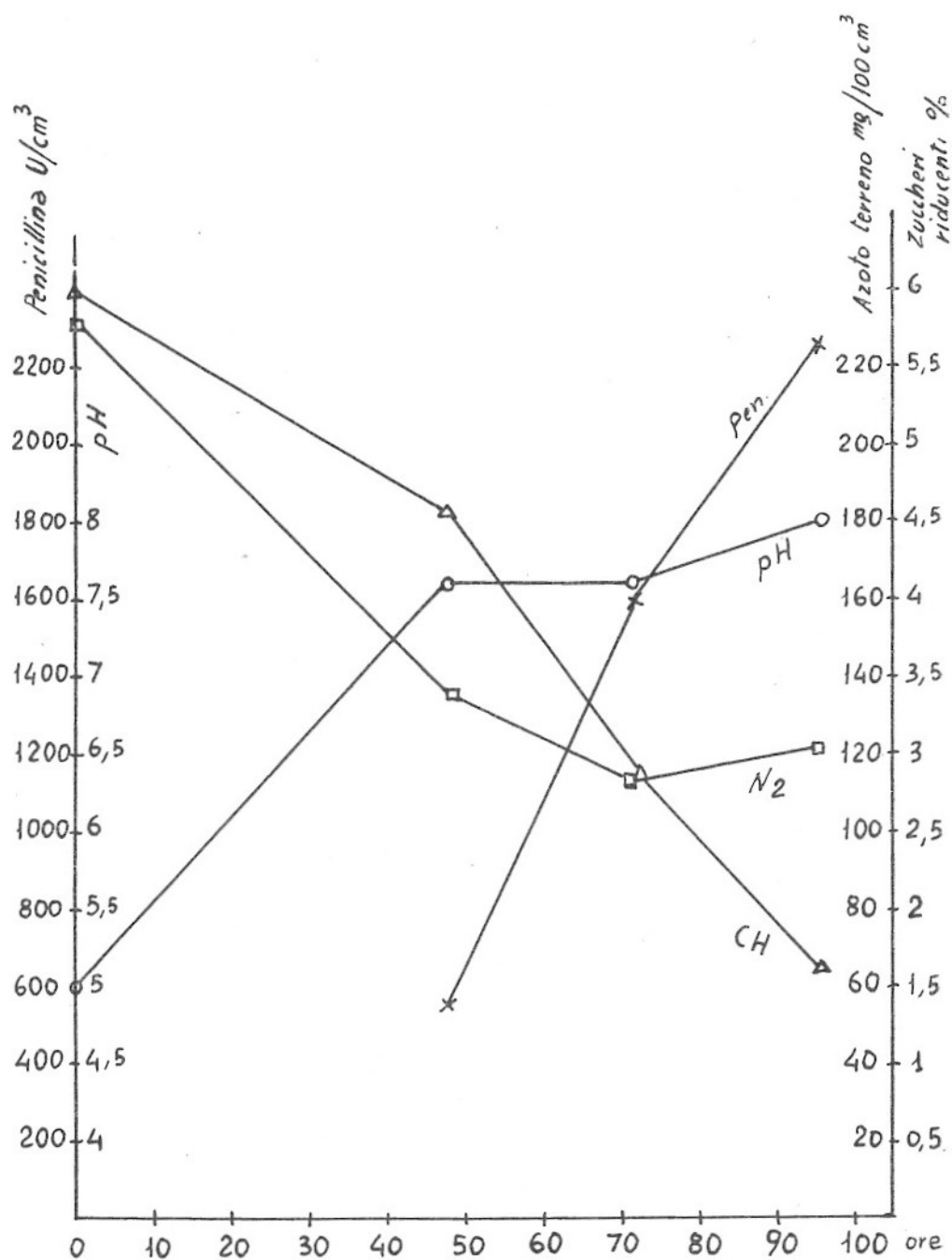


Fig. 23. - Controllo con *corn steep liquor* (azoto totale 210 $mg/100 cm^3$).