UNICARVE - Produttori Carni Bovine del Triveneto

SOCIETÀ COOPERATIVA AGRICOLA

Piano di Sviluppo Rurale 2007 / 2013

Misura 124 – P.I.F.

Miglioramento delle caratteristiche dietetiche nutrizionali della carne bovina del Veneto (MICAVE)

Relazione finale di sintesi e abstract dell'attività svolta

Attività di Ricerca e Sperimentazione proposta da:

UNICARVE Produttori Carni Bovine del Triveneto s.c.a.

Riassunto

Miglioramento delle caratteristiche dietetiche nutrizionali della carne bovina del Veneto (MICAVE)

Unicarve è un'associazione che associa oltre 700 aziende zootecniche ed è un costante punto di riferimento per tutti gli allevatori di bovini da carne. Nel 2008 sollecitata dalla base associativa l'associazione si è fatta promotrice di un Progetto Integrato di Filiera che ha raccolto 45 progetti per investimenti pari a 11.775.250 €. Fra gli interventi presentati vi è un progetto di sperimentazione svolto in collaborazione con l'Università di Padova, l'Istituto Zooprofilattico delle Venezie e alcune aziende private avente lo scopo di studiare il "sistema" veneto per la definizione di "politiche " di sostegno del settore aventi come obbiettivo la valorizzazione delle produzioni regionali e lo sviluppo di sistemi di analisi rapidi e portatili, attraverso l'impiego della tecnica NIR, si è composta di due fasi: la prima è stata eseguita presso gli allevamenti per l'analisi della situazione del comparto zootecnico e il controllo delle materie prime e delle razioni; la seconda presso i macelli per il controllo della qualità delle produzioni.

Nel corso del biennio 2009/2010 sono stati collezionati 329 campioni di Unifeed provenienti da allevamenti associati ad Unicarve con l'intento di creare una nuova calibrazione per uno strumento NIR portatile già precalibrato per l'analisi delle farine di mais, farina di estrazione di soia, fieno polifita, fieno di medica, silomais e pastone di mais. I campioni di unifeed sono stati scansionati con lo strumento e successivamente analizzati chimicamente per i seguenti parametri: sostanza secca, ceneri, proteina, estratto etereo, NDF, ADF, amido. Le calibrazioni di tipo PLS-1 di Galactic Grams ottenute con pretrattamenti di tipo 1,4,4 e SNV, hanno prodotto buoni risultati per tutti i parametri (1-VR>0.75) ad eccezione di NDF (0.68) e ADF (0.59), SECV rispettivamente di 1.79 e 1.07.

Per completare il controllo delle attività produttive della filiera e dei risultati di produzione, si è voluto sviluppare un sistema di analisi rapida che, al pari del NIR portatile impiegato nell'alimentazione dei bovini, permetta un controllo rapido ed efficiente della qualità della carne. È stato necessario sviluppare un sistema NIR portatile perché quelli attualmente esistenti non sono portatili. Lo strumento N.I.R. portatile impiegato opera tra 600-1100nm (passo 2nm) con lettura del campione in modalità *interactance*. Le calibrazioni sono state ottenute con Partial Least Square di Unscrambler®, dopo aver applicato pretrattamenti matematici degli spettri: derivata prima (gap 4), smooth 4 e *Standard Normal Variate* and *Detrending*. Sono stati prelevati da 92 bovini diverse parti dello stesso bovino ovvero la 7/8 costa intera, il biancostato con osso, il grasso dal fiocco di pancia e al fine di ampliare il campione sono state inoltre prelevate matrici di preparati a base di carne, quali (hamburger) e materia prima utilizzata per la loro preparazione (macinato). I migliori risultati di calibrazione sono stati ottenuti per sostanza secca, ceneri, proteine con 1-VR superiori a 0.95. L'idrossiprolina ha un valore di 1-VR di 0.61. Miglioramenti sono stati ottenuti con calibrazioni specifiche per il contenuto di grasso del campione.

Infine è stata fatta una valutazione dell'incidenza dello stress da trasporto sulle caratteristiche qualitative delle carni. Allo scopo sono stati verificati alcuni parametri biochimici del sangue prelevato ai bovini sia in allevamento che al macello. I risultati

hanno messo in evidenza l'esistenza di un rapporto diretto tra i tempi di viaggio e lo stress accumulato dai bovini trasportati. In conclusione la ricerca ha messo in evidenza la tipicità dell'allevamento zootecnico veneto, basato sull'allevamento di bovini per lo più acquistati in Francia, allevati in ambiente protetto e controllato, alimentati con razioni a base di cereali. Tali peculiarità hanno permesso di fornire le basi per la definizione del disciplinare di produzione regionale "Vitellone e Scottona ai Cereali" e della richiesta di riconoscimento alla commissione U.E. di STG (Sistema Tradizionale Garantito). L'applicazione in campo della tecnologia nir è risultata essere efficiente ed efficace nelle determinazioni già nelle prime fasi e sicuramente migliorabile nello spettro delle predizioni. In conclusione i risultati ottenuti chiariscono molti dei punti oggetto della ricerca, aprendo nel contempo altri filoni che per limiti di tempo e finanziamento non si è potuto approfondire ed in particolare lo studio dell'incidenza della razione e dello stress degli animali sulle caratteristiche chimiche e organolettiche delle carni macellate.

Abstract

Improvement of dietary nutritional characteristics of beef in the Veneto (MICAVE)

Unicarve is an association with gathers over 700 farms and it a constant benchmark for all beef producers. In 2008, solicited by its affiliated operators, became the promoter of an Chain Integrated Project which collected 45 proposals for investments of a total of 11.775.250 €. Among the projects there is a experimental study developed in collaboration with Università di Padova and Istituto Zooprofilattico delle Venezie and a group of private farms with the aim to investigate the "Veneto Region system" to define sustain policies for the industry with the objective to enhance the value of local products and to develop fast and portable analyses instruments, working on the basis of NIR technique. The research was divided into two phases: the first one took place at the farms to survey the condition of the beef industry and to examine animal feeding ingredients and rations; the second took place at the slaughterhouses to verify the quality of meat.

The development of two portable analytical Near Infrared devices for rapid analysis was divided into two phases: the first phase was performed at the farming to control raw materials and rations; the second at the slaughterhouses for the quality control of production.

During the years 2009 and 2010 329 TMR samples were collected from farms associated with Unicarve in order to develop a new calibration for a portable NIR instrument already pre-calibrated for analysis of maize flour, soybean flour, hay, alfalfa hay, corn silage and high moisture corn. TMR samples were scanned with the instrument and then analyzed in laboratory for the following parameters: dry matter, ash, protein, ether extract, NDF, ADF, starch. PLS-1 Calibrations from Galactic Grams, with math treatment 1,4,4 and SNV, have produced good results for all parameters (1-VR> 0.75) except for NDF (0.68) and ADF (0.59), SECV 1.79 and 1.07 respectively.

To completely control the productive process and production results, we wanted to develop a rapid assay system that, like the portable NIR used in feed, allow a rapid and efficient control of meat quality. It was necessary to develop a portable NIR system because existing models are not portable. The instrument laptop N.I.R. worked on 600-1100nm (step 2 nm) range, with interactance mode. The calibrations were obtained using Partial Least Square on Unscrambler®, after applying mathematical pretreatments of the spectra: first derivative (gap 4), smooth 4 and Standard Normal Vary and Detrending. Samples were collected from 92 beef cattle by different parts of the same carcass: 7/8 ribs, fat by short ribs, fat from the stomach and in order to expand the sample variability were also taken hamburger and others muscles. Best results were obtained for calibration of dry matter, ash, protein with 1-VR greater than 0.95. The hydroxyproline has a value of 1-VR of 0.61. Improvements have been obtained with specific calibrations for the fat content of the sample. Thereafter an evaluation was made on the influence of stress related to animal transportation on quality traits of bulls carcasses. To this aim some biochemical parameters where measured on blood collected from the same bulls at the farm and at the slaughterhouse. The results showed a direct connection between length of travel and stress generated by animals during transportation.

In conclusion the study put in evidence the peculiarity of the Veneto Region beef production system, based on fattening of young bulls mostly imported from France, reared in a protected and controlled environment, fed cereal based rations. These characteristics allowed to put in evidence the aspects to create the regional quality label manual "Vitellone e Scottona ai Cereali" and to apply for the recognition of an STG label from EU.

The on-field applications of NIR technique resulted efficient and reliable yet since the first measures and its range of predictions can be easily improved.

The results explained many of the aspects which were object of the study, and at the same time opened new ideas and applications which, for time and economical limitations, could not be developed; in particular a further idea was to study the relations of ration characteristics and animal stress with chemical and physical characteristics of meat after slaughter.

Studio del "sistema" zootecnico veneto

Vista la grande variabilità dei dati oggetto ricerca e considerato quale incidenza possa avere una dieta "diversa" ai fini della definizione delle caratteristiche delle carni, al fine di dare una base pratica alla ricerca in progetto ci si è posti l'obbiettivo di concentrarsi sulla dieta "standard" dell'allevatore veneto e quindi si è provveduto inizialmente a identificare quale poteva essere la razione più comunemente usata dagli allevatori veneti e di verificarne l'attualità.

Per raggiungere tale obbiettivo si è partiti dai risultati di un'indagine condotta nel 2005 (allegato1 articolo / sunto) effettuata presso un campione di 306 allevamenti situati nella Regione Veneto.

Lo studio in questione è stato effettuato in collaborazione tra il dipartimento di Scienze Animali dell'Università di Padova, Pioneer Hi-Bred e UNICARVE, ed aveva lo scopo di monitorare le caratteristiche degli allevamenti veneti di bovini.

In particolare tra gli aspetti gestionali e strutturali sono stati utilizzati i dati relativi all'alimentazione nella fase di finissaggio dei bovini, ovvero la composizione alimentare e le analisi chimiche condotte sui campioni raccolti in sede di visita presso gli allevamenti.

Partendo dai dati raccolti da questo lavoro si è potuto estrapolare quella che nel 2005 poteva definirsi "razione tipo" in termini qualitativi (materie prime utilizzate) e quantitativi .

A fronte di questo si è provveduto ad individuare fra le aziende che hanno partecipato alla ricerca del 2005 un campione di allevatori rappresentativo, allo scopo di verificare se quanto veniva fatto nel 2005 in termini di alimentazione poteva considerarsi ancora attuale.

Per far questo è stato identificato un campione di circa 70 allevamenti di bovini da carne individuato fra un gruppo di aziende rappresentative distribuite in tutto il territorio regionale e per ognuna di esse sono state raccolte le informazioni ed i campioni con le stesse modalità della precedente indagine.

I dati relativi alla composizione delle razioni raccolte presso le aziende sono stati poi elaborati classificando le diete in base ai contenuti di silomais e cereali.

Questo ha permesso di confrontare i risultati a distanza di 5 anni e di verificare se le caratteristiche del razionamento sono nel frattempo cambiate rispetto alle classificazioni effettuate nel 2005 .

Tale attività svolta con la supervisione del Prof Giulio Cozzi del Dip. Scienze Animali dell'Università di Padova ha visto impegnati i tecnici dell'O.P. Unicarve (nella figura del dott. Rubello Silvano per la raccolta dati) e quelli di Unicarve (nella figura del dott. Mazzenga Alessandro e Tiziana Vecil per l'elaborazione)

In questa fase i tecnici sono stati impegnati principalmente nelle visite aziendali per la raccolta di dati e di campioni di unifeed al fine di monitorare sia la dieta somministrata con la raccolta di alcuni dati di relativi alla composizione alimentare delle razioni di finissaggio dei bovini provvedendo inoltre a raccogliere nella stessa sede dei campioni di tali razioni dalle mangiatoie.

Questi campioni (76 prelievi) sono poi stati consegnati al laboratorio di analisi del Dipartimento di Scienze Animali e sottoposti ad analisi dei principali componenti chimici. (allegato 2)

Risultati

Gli alimenti utilizzati per la preparazione delle razioni di ogni allevamento sono stati raggruppati (tabella 1) in 3 categorie: una comprendente l'insilato di mais, una i cereali ed una in cui sono stati inclusi tutti gli altri alimenti, da ora in poi esclusi dalla trattazione.

Tabella 1.
Composizione dei tipi genetici del campione di aziende dall'indagine del 2005

	Tipi genetici			
306 aziende	PUR	DAT	INF	Totale
n. animali	64.974	29.410	50.792	145.176
% animali	45	20	35	100

PUR: razze pure; DAT: razze a duplice attitudine; INF: incroci francesi.

Nell'elenco iniziale ricavato dall'indagine del 2005 era presente anche un esiguo numero di aziende che non utilizzavano il silomais.

In questa ricerca i dati di tali aziende non sono stati utilizzati, dato che si ritiene non fossero rappresentative del sistema di razionamento tradizionale Veneto, basato, su un medio-alto utilizzo di insilato di mais a causa in particolare della composizione della "mandria" veneta (tabella 2).

Tabella 2.
Composizione dei tipi genetici del campione di aziende dal controllo 2009/10

	Tipi genetici			
75 aziende	PUR	DAT	INF	Totale
n. animali	18.242	4.009	15.609	37.860
% animali	48	11	41	100

La categoria cereali è stata utilizzata per raggruppare gli alimenti concentrati energetici della razione, ovvero farine di granelle (mais, orzo, frumento), pastone di mais integrale o di granella, mangimi con un contenuto di proteina grezza inferiore al 15% sulla sostanza secca.

Successivamente sono stati calcolati i valori della mediana dei dati relativi al contenuto di cereali e di silo mais nelle razioni.

In particolare per quanto riguarda i cereali il valore di mediana è risultato pari a 2.5kg di sostanza secca, mentre per il silomais tale valore è stato riscontrato pari a 2.7 kg di sostanza secca.

Dalla combinazione di questi valori sono state ricavate 4 classi:

Classe 1: silomais minore o uguale a 2.7 kg e cereali oltre 2.5 kg

Classe 2: silomais minore o uguale a 2.7 kg e contenuto di cereali minore o uguale a 2.5 kg

Classe 3: silomais oltre 2.7 kg e contenuto di cereali minore o uguale a 2.5 kg

Classe 4: silomais oltre 2.7 kg e cereali oltre 2.5 kg.

Assieme alla composizione alimentare dai dati dell'indagine del 2005 sono stati ricavati i tipi genetici delle aziende.

Anche in questo caso è stato fatto un raggruppamento in categorie rappresentative dei principali tipi di bovini, ed in particolare le varie tipologie sono state inserite in 3 gruppi principali:

Puri o razze pure (PUR): principali razze da carne francesi, italiane o belga (Limousine, Charolaise, Piemontesi, Blue Belga …)

Duplice attitudine (DAT): bovini di razze a duplice attitudine, puri o incroci (Pezzati Rossi, Incroci tra razze da carne e da latte…)

Incroci francesi (INF): incroci tra razze pure o tra pure e duplice attitudine ma comunque con caratteristiche qualitative intermedie tra le due classi precedenti: (razze rustiche francesi, incroci francesi o irlandesi).

La composizione del campione di aziende utilizzato per l'aggiornamento del 2009/10 per quanto riguarda i tipi genetici rispecchia a grandi linee la fotografia degli allevamenti del 2005; infatti la percentuale di aziende divise per tipo genetico allevato non si discosta di molto tra i due gruppi.

Il numero di bovini provenienti da razze a duplice attitudine è sensibilmente minore, per il fatto che le aziende che scelgono questo tipo di animali di solito sono quelle di dimensioni minori (220 capi di media contro i 570 delle aziende con razze pure da carne e 600 per quelle con incroci francesi, stesso trend riscontrato nel 2005).

Il dato rilevato dal campione è risultato in parte simile a quello ottenuto utilizzando la rinnovata Banca Dati Unicarve che permette l'estrazione dei capi presenti in tutte le aziende iscritte (mediamente 600 allevamenti).

In questo caso (Tabella 3) i capi appartenenti al gruppo dei Duplice Attitudine sono risultati di poco superiori agli Incroci Francesi.

Tabella 3.
Composizione dei tipi genetici del campione aziende B.D. UNICARVE nel 2009

	Tipi genetici			
600 aziende	PURI	DUPLICE AT	INCROCI FR	Totale
n. animali	142.527	4.009	15.609	277.600
% animali	51	26	23	100

PUR: razze pure; DAT: razze a duplice attitudine; INF: incroci francesi.

Dall'elaborazione dei dati emersi sulle razioni effettuata, come visto in precedenza, separando le aziende in base al contenuto di silomais e di cereali è invece emersa una situazione differente: mentre nel 2005 (tabella 4) le 4 classi erano risultate mediamente bilanciate, con prevalenza della classe 3, nel campione di aziende monitorate nel 2009 vi è una netta prevalenza di aziende che formulano razioni del tipo descritto dalla classe 2, seguite da un'alta presenza di razioni di classe 4. Queste due classi si allontanano notevolmente dalla classe 3, ancora discretamente rappresentata, e dalla classe 1 in cui le aziende si riducono a solo 5 unità.

Tabella 4.
Distribuzione delle aziende per classi di contenuto di silomais e cereali dall'indagine del 2005.

	Classi di silo mais/cereali			
	1	2	3	4
Silo mais Kg SS	≤ 2.7	≤ 2.7	> 2.7	> 2.7
cereali Kg SS	≤ 2.5	> 2.5	≤ 2.5	> 2.5
n. aziende	68	72	95	71
% aziende	22	24	31	23

Traducendo questo risultato è possibile affermare che nel campione 2009/10, (tabella 5) che si può ritenere rappresentativo per quanto riguarda la varietà di tipi aziendali, tipi genetici, zone geografiche del Veneto e metodi di razionamento, vi sono due tipi principali di razioni che meglio rappresentano le realtà produttive:il tipo descritto dalla classe 2, ovvero razioni con un contenuto di silomais inferiore ai 2,7 kg e di cereali sopra i 2,5 kg ed a seguire in ordine di importanza le razioni incluse nella classe 4, caratterizzate da un contenuto di silomais superiore a 2,7 kg e di cereali superiore ai 2,5 kg.

Tabella 5.
Distribuzione delle aziende per classi di contenuto di silomais e cereali - controllo del 2009/10.

		Classi di silomais/cereali			
		1	2	3	4
Silomais	Kg SS	≤ 2.7	≤ 2.7	> 2.7	> 2.7
Cereali	Kg SS	≤ 2.5	> 2.5	≤ 2.5	> 2.5
n. aziende		4	36	11	25
% aziende		5	48	15	33

Acquisto NIR portatile e costruzione curva per razioni aziendali

Il progetto si propone di individuare e di dotare OP. Unicarve di uno strumento in grado di "analizzare" in tempi rapidi la dieta degli animali allevati. Si è scelto quindi di sfruttare la tecnologia del vicino infrarosso NIR in grado di dare una predizione analitica dei prodotti in tempi rapidissimi (pochi secondi).

Questa tecnologia è oramai d'uso comune presso laboratori di analisi e mangimifici che utilizzano strumenti NIR da banco mentre in questo caso la soluzione proposta prevede di trasferire su una macchina facilmente trasportabile il know-how necessario all'effettuazione di analisi direttamente in azienda. Il NIR acquistato è già fornito di alcune curve di calibrazione per l'analisi di farina di mais, farina di estrazione di soia, fieno di prato, fieno di medica, silomais e pastone di mais, cosa che ha permesso un grosso risparmio economico rispetto alle spese di laboratorio inizialmente previste per la completa calibrazione dello strumento.

Al fine di allargare il ventaglio di analisi possibili è stata implementata la curva dell'unifeed tori in modo da effettuare questa analisi basilare nella realtà zootecnica veneta.

Allo scopo si è quindi provveduto a raccogliere 186 campioni (tab. 6.a) di Unifeed di allevamenti associati ad Unicarve, durante l'anno 2009.

Successivamente, nel corso del 2010 sono stati raccolti 143 campioni (tab. 6b) di unifeed (tabella 6b) rappresentativi della realtà dell'allevamento veneto del vitellone da carne.

I campioni sono stati raccolti direttamente in mangiatoia subito dopo la somministrazione con carro miscelatore prima che potesse esserci selezione da parte dell'animale. I campioni raccolti, dal peso approssimativo di 1.5-2.0kg, sono stati chiusi in un sacchetto etichettato con codice aziendale e data di prelievo. Per evitare l'avviarsi di processi fermentativi, i sacchetti sono stati prontamente chiusi e conservati in frigoriferi portatili e trasportati rapidamente in luoghi di stoccaggio in congelatori -18°C.Gli stessi campioni sono stati scansionati freschi tal quale con lo strumento NIR (AgriNIR™ NIR analyzer for forages, Dinamica Generale®) operante tra 1100nm-1800nm, passo 10nm, per la creazione del *dataset* di calibrazione; per la scansione dei campioni è stata impiegata la cella di lettura in dotazione allo strumento, provvista di vetro quarzato ad alta trasparenza. Ciascun campione è stato scansionato in doppio, ottenendo due spettri di assorbimento successivamente mediati per ridurre gli errori di campionamento.

Tabella 6a:caratteristiche chimico-nutrizionali di 186 campioni di unifeed per la calibrazione, raccolti nel corso del 2009 (valori espressi sul tal quale)

Costituente	Media	DS	Min	Max
SS	62.01	10.47	31.44	88.42
AMIDO	20.53	5.58	8.40	40.88
PG	8.48	2.15	4.08	16.34
ADF	9.46	2.07	5.40	16.49
NDF	18.77	3.78	10.33	32.22
CEN	3.51	0.87	1.90	6.74
EE	1.89	0.68	0.81	5.93

Tabella 6b:caratteristiche chimico-nutrizionali di 143 campioni di unifeed per la calibrazione, raccolti nel corso del 2010 (valori espressi sul tal quale)

Costituente	Media	DS	Min	Max
SS	62.15	9.53	32.43	85.23
AMIDO	20.21	4.37	12.54	38.23
PG	8.32	2.10	5.12	15.54
ADF	9.21	2.02	6.36	15.21
NDF	18.55	3.15	12.53	28.20
CEN	3.43	0.80	2.75	5.91
EE	1.78	0.62	1.13	4.88

I campioni sono stati inviati presso il laboratorio NIRS-XRF del Dipartimento di Scienze Animali per l'implementazione delle curve di calibrazione per i seguenti parametri: sostanza secca (essicazione in stufa con metodo ISTISAN 1996/34), ceneri (incenerimento in muffola con metodo ISTISAN 1996/34), proteina grezza (Kjeldhal con metodo ISTISAN 1996/34), estratto etereo (Soxhlet con metodo GUCE n° L 257/98), NDF (Ankom con metodo CNR-IPRA Q. 8/1987), ADF (Ankom sequenziale con metodo CNR-IPRA Q. 8/1987) e amido (HPLC con metodo MI 03).

Successivamente, i dati spettrali e chimici sono stati utilizzati per la costruzione degli algoritmi di calibrazione (tabella 7). Gli algoritmi sono stati sviluppati in ambiente Galactic Grams pacchetto *software* con i PLS / IQ add-on. È stato scelto l'algoritmo *Partial Least Square* (PLS-1) con pretrattamenti matematici dei dati spettrali:

- *Standard Normal Variate* per la riduzione dell'effetto *scattering* dovuto alla forma fisica del campione;
- Derivata prima, passo 4 (pari a 40nm) e allisciamento di 4 (pari a 40nm).
- La PLS-1 è di tipo Modify PLS (MPLS) in cui i dati relativi alla concentrazione dei campioni sono inclusi nel processo di decomposizione. L'algoritmo PLS-1, contrariamente a PLS-2, permette di calibrare ottenendo differenti set di *scores* e di *loading vectors* per ciascun parametro calibrato che perciò risultano più accurati. Comunque questo richiede maggior tempo di calcolo da parte del *computer*.

Dopo la creazione delle curva di base per l'unifeed composta dai campioni raccolti nel 2009 e nel 2010 si è voluto valutare le performance dello strumento portatile attraverso una validazione. Per fare ciò sono stati raccolti e analizzati con Agrinir direttamente in allevamento 59 campioni di razione.
I campioni e i relativi spettri sono stati inviati presso il laboratorio NIRS-XRF dove sono stati analizzati con uno strumento NIR da banco (FOSS 5000).
Dal confronto sono emerse buone correlazioni tra le risposte dei due strumenti evidenziando tuttavia piccole differenze (1-2%) nella predizione di alcuni parametri.

Per compensare tali differenze e quindi allineare le due macchine si è provveduto ad inviare i 59 campioni di unifeed alle successive analisi chimiche di laboratorio per un aggiornamento della calibrazione (tabella 8).

Risultati

In base ai campioni raccolti e alle analisi effettuate nel corso del 2009 e 2010 è stata implementata la curva di calibrazione per l'unifeed tori, le cui statistiche sono riportate in tabella 7.

Tabella 7: Prestazioni predittive della calibrazione base di unifeed tal quale (143 campioni del 2009 e 86 campioni del 2010)

Constituente	Media	DS	Min	Max	SEC	RSQ	SECV	1-VR
SS	61.94	10.23	31.25	92.62	1.05	0.99	1.13	0.99
AMIDO	20.18	4.92	5.42	34.95	2.25	0.79	2.39	0.76
PG	8.29	1.85	2.74	13.84	0.71	0.85	0.77	0.83
ADF	9.39	1.81	3.97	14.81	1.14	0.60	1.22	0.55
NDF	18.79	3.35	8.73	28.85	1.79	0.72	1.92	0.68
CEN	3.46	0.80	1.05	5.88	0.35	0.82	0.39	0.77
EE	1.84	0.55	0.19	3.49	0.22	0.83	0.26	0.77

SEC= Errore standard di Calibrazione; RSQ= coefficiente di determinazione in calibrazione; SECV= errore standard in cross-validazione;RSQcv= coefficiente di determinazione in cross-validazione

Dopo validazione della calibrazione su un pool di 59 nuovi campioni non compresi nel data set originario si è reso necessario aggiornare il dataset inserendo i nuovi campioni dando così origine ad una nuova curva di calibrazione più robusta (tabella 8).

Tabella 8: Prestazioni predittive della calibrazione di unifeed tal quale dopo l'aggiornamento con 59 campioni

Constituente	Media	DS	Min	Max	SEC	RSQ	SECV	1-VR
SS	60.89	9.87	31.28	90.50	1.25	0.98	1.32	0.98
AMIDO	19.63	4.55	5.97	33.30	2.00	0.81	2.16	0.78
PG	8.04	1.75	2.80	13.28	0.67	0.85	0.73	0.82
ADF	9.39	1.66	4.40	14.38	1.02	0.62	1.07	0.59
NDF	18.69	3.14	9.28	28.11	1.69	0.71	1.79	0.68
CEN	3.34	0.78	1.00	5.68	0.36	0.79	0.37	0.78
EE	1.86	0.54	0.25	3.48	0.26	0.76	0.28	0.73

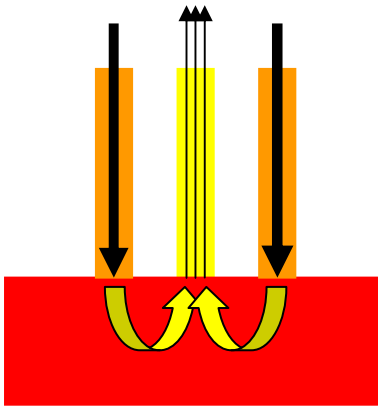
SEC= Errore standard di Calibrazione; RSQ= coefficiente di determinazione in calibrazione; SECV= errore standard in cross-validazione;RSQcv= coefficiente di determinazione in cross-validazione

Lo strumento nir portatile si è dimostrato robusto, maneggevole e adatto all'utilizzo diretto presso gli allevamenti. Lo strumento ha dimostrato buone capacità predittive sulle matrici per le quali era già precalibrato dando risposte in linea con l'atteso.

Per quanto riguarda l'implementazione della nuova curva per l'analisi della razione aziendale (unifeed tori) lo strumento è stato calibrato per tutti i parametri nutrizionali di interesse fornendo buoni risultati per tutti i parametri (1-VR>0.75) ad eccezione di NDF (0.68) e ADF (0.55), SECV rispettivamente di 1.79 e 1.07. Nel complesso si sono raggiunti i risultati attesi rendendo lo strumento in grado di analizzare direttamente in allevamento i principali foraggi e la razione presenti in azienda, fornendo risposte in tempo reale e rendendo possibili aggiustamenti in tempi rapidi della formulazione della razione da fornire ai bovini.

Costruzione curva NIR per la carne

Per completare il controllo delle attività produttive della filiera e dei risultati di produzione, si è voluto sviluppare un sistema di analisi rapida che, al pari del NIR portatile impiegato nell'alimentazione dei bovini, permetta un controllo rapido ed efficiente della qualità della carne. La scelta dello strumento NIR doveva per forza ricadere su prototipi e non su strumenti preesistenti, poiché questi ultimi sono tutti macchinari "da banco" ovvero adatti all'impiego in laboratori (anche aziendali e poco strutturati) ma assolutamente non portatili. Inoltre le caratteristiche del prodotto (la carne e le carcasse) ci hanno indotti a scegliere un prototipo particolarmente adatto, basato sul concetto di *interactance*.

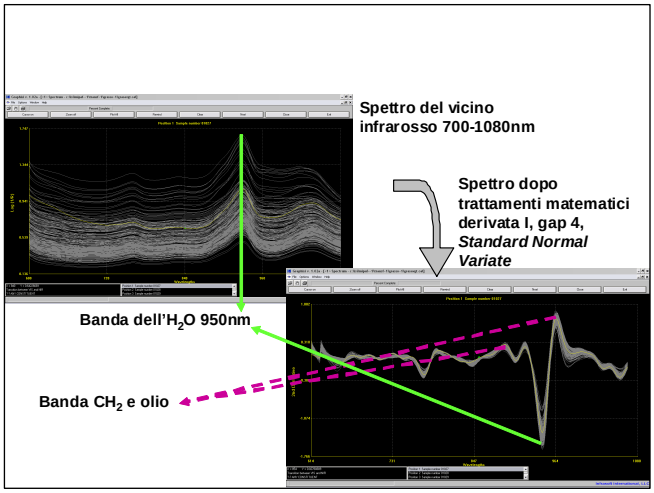


Questa modalità di lettura si basa su questi principi:

- Matrici che permettano il passaggio della luce (TRASMISSIONE);
- NON è necessario mantenere un cammino ottico costante;
- Range spettrale ottimale
  700 – 1100nm;
- Sensori al Silicio economici.

Il funzionamento dello strumento sviluppato da Grainit® è raffigurato affianco, la luce prodotta da una sorgente ad alta emissione di infrarossi penetra perpendicolarmente nel campione, dopo un breve passaggio (qualche millimetro/qualche centimetro) è riflessa diffusamente ma in parte può essere raccolta dalla fibra ottica collimata posta al centro della sonda. Dalla fibra ottica la luce è trasmessa al sensore che trasforma il segnale analogico in uno digitale analizzabile dal computer tramite appositi programmi di gestione.

Lo strumento N.I.R. portatile impiegato opera tra 600-1100nm (passo 2nm) con lettura del campione in modalità interactance. La sonda è posta a contatto del campione e rileva, mediante una fibra ottica, la luce infrarossa che da un illuminante esterno attraversa il campione. Lo strumento è comandato dall'operatore mediante l'impiego di un computer *touch screen*.



Come *reference* strumentale è stata impiegata una ceramica standard certificata SRS-40-020 Labsphere®. Il tempo di acquisizione di un singolo spettro è di circa 40-50msec; gli spettri sono mediati a gruppi di cinque per ridurre l'effetto del rumore strumentale e migliorare il rapporto segnale su rumore. Sono stati collezionati un minimo di dieci ripetizioni di spettri ottenuti in diverse zone della superficie del campione e in seguito le ripetizioni sono state mediate tra loro per aumentare la rappresentatività dell'analisi N.I.R. Tutto il sistema è montato sullo zaino per

rendere lo strumento comodamente trasportabile ed è alimentato da batterie con autonomia di circa tre ore. Le calibrazioni sono state ottenute con Partial Least Square di Unscrambler, dopo aver applicato pretrattamenti matematici degli spettri: derivata prima (gap 4), smooth 4 e *Standard Normal Variate* and *Detrending*, analogamente a quanto descritto al precedente capitolo. L'analisi di confronto è stata ottenuta presso il laboratorio di analisi NIRS-XRF del Dipartimento di Scienze Animali dell'Università di Padova (ora Medicina Animale Produzione e Salute).
L'attività svolta è consistita principalmente nella raccolta di campioni di carne definiti secondo il calendario concordato fra l'Università e la struttura di macellazione Tosetto, già aderente al PIF, al fine di "costruire" una curva predittiva sfruttando la tecnologia NIR da utilizzare direttamente in catena di macellazione. Sono state così prelevate, con la diretta collaborazione dei tecnici e addetti della struttura, diverse parti dello stesso bovino ovvero la 7/8 costa intera, il biancostato con osso, il grasso dal fiocco di pancia e al fine di ampliare il campione sono state inoltre prelevate matrici di preparati a base di carne, quali (hamburger) e materia prima utilizzata per la loro preparazione (macinato).

In questa prima fase di costruzione del data set di calibrazione, sono stati individuati animali che coprissero un'ampia variabilità in termini di stato di ingrassamento e razze bovine allevate. A questo ha fatto seguito una decina di visite durante le quali erano selezionati 4-5 capi da cui prelevare i tagli concordati come descritto da un totale di 92 bovini a 24h dalla macellazione. Per ciascun capo è stata eseguita una sessione di acquisizione degli spettri delle carcasse di animali appena macellati (carcasse calde) con l'impiego del prototipo di strumento NIR.

Parallelamente, sono stati prelevati 51 campioni di hamburger, 18 campioni di macinato e 17 campioni di muscolo per la preparazione del macinato.

Presso il laboratorio dell'Università, sono state eseguite le letture mediante il prototipo di strumento NIR, dei tagli campione. Il conteggio delle scansioni NIR al macello e presso il laboratorio è riportata nella seguente tabella 9.

Tabella9 Scansioni eseguite con prototipo NIR

Tipo materiale	N° scansioni NIR
costata (longissimus dorsi)	86
biancostato - esterno	134
biancostato - interno	134
macinato scelto	54
fiocco di pancia superficie	132
fiocco di pancia fetta	86
hamburger	51
schiena	48
macinato misto bov/sui	18
costata (tutto)	44
muscolo per macinato	13
muscolo per macinato (spalla)	2
muscolo per macinato (campanella)	1
muscolo per macinato (coscia)	1
Totale complessivo	804

Sono stati estratti dei campioni di tessuto destinati all'analisi chimica e macinati mediante mulino a lame Grindomix Retsch® (8000gir/sec per 10sec), liofilizzati ed inviati al laboratorio per le analisi.

In totale sono stati lavorati ed inviati al laboratorio 328 campioni da cui si è potuto ricostruire la situazione esemplificata nella tabella seguente tabella 10.

Tabella 10
N° campioni e relative parti anatomiche utilizzate

Tipo materiale	Conteggio campioni
biancostato - esterno	51
biancostato - interno	52
costata (longissimus dorsi)	45
costata (tutto)	7
fiocco di pancia fetta	73
fiocco di pancia superficie	45
hamburger	32
macinato misto bov/sui	5
macinato scelto	18
Totale complessivo	328

I campioni citati nella tabella precedente sono stati analizzati per la composizione chimica, come segue: sostanza secca, ceneri, proteina, grassi (estratto etereo), profilo acidico (GC metodo MI02), colesterolo (HPLC metodo MI 01) e collagene espresso come contenuto di idrossiprolina ad esclusione del fiocco di pancia (HPLC). La scelta dei campioni destinati all'analisi chimica è stata eseguita applicando l'algoritmo di selezione del software WinISI basato sul calcolo della distanza di *Mahlanobis*, come spiegato al capitolo precedente.

In aggiunta a quanto detto è stata fatta una successiva e ulteriore selezione di 22 campioni di grasso prelevato dal fiocco di pancia di animali macellati in vari macelli della Regione Veneto, per migliorare e ampliare la variabilità della calibrazione. Tutti i campioni sono destinati all'analisi chimica secondo le modalità sopra descritte.

Questo lavoro ha permesso la creazione di una curva di lettura e la costruzione di un NIR portatile in grado di essere trasportato a spalla in macello ed effettuare la lettura delle carni per mezzo di una sonda da inserire nella carne nei punti individuati. Le calibrazioni sono state ottimizzate impiegando un algoritmo del *software* WinISI di eliminazione degli *outliers*.

Tabella 11
Prestazioni predittive della calibrazione della carne

Costituenti	N	Mean	SD	SEC	RSQ	SECV	1-VR
Colesterolo (%estratto etereo)	110	23.81	12.94	10.70	0.32	10.87	0.30
Sostanza secca	215	47.71	22.28	4.02	0.97	4.35	0.96
Ceneri	171	0.95	0.14	0.07	0.77	0.07	0.73
Proteina	182	19.91	5.19	1.75	0.89	1.85	0.87
Estratto etereo (grasso totale)	184	19.98	21.29	3.83	0.97	4.16	0.96
C18_0	194	17.37	3.55	2.58	0.47	2.67	0.43
C18_1n9ct	199	37.87	3.87	3.05	0.38	3.26	0.29
C18_1n11trans-Va	164	2.55	0.48	0.44	0.16	0.46	0.10
C18_2n6ct	189	2.96	1.21	0.87	0.49	0.96	0.37
C18_3n6	187	0.09	0.03	0.03	0.34	0.03	0.15
C18_3n3	195	0.27	0.08	0.07	0.26	0.08	0.17
C18_2c9t11	178	0.17	0.08	0.06	0.27	0.07	0.25
C20_0	188	0.12	0.03	0.03	0.27	0.03	0.22
C20_1n9	191	0.13	0.06	0.04	0.48	0.05	0.32
C20_2	97	0.07	0.04	0.03	0.38	0.04	0.10
C20_3n6	153	0.06	0.03	0.03	0.04	0.03	0.02
C20_4n6	143	0.08	0.04	0.04	0.27	0.04	0.26
C20_3n3	35	0.03	0.02	0.02	0.04	0.02	-0.10
C20_5n3_EPA	53	0.05	0.03	0.03	0.00	0.03	-0.05
C22_0	24	0.05	0.02	0.02	0.00	0.03	-0.15
C22_1n9	62	0.06	0.03	0.03	0.01	0.04	-0.10
C23_0	31	0.04	0.03	0.03	0.04	0.03	0.01
C22_6n3_DHA	34	0.04	0.03	0.01	0.90	0.01	0.73
Ac. Gr. saturi	192	47.57	4.08	2.95	0.48	3.11	0.42
Ac. Gr. monoinsturi	199	44.15	4.63	3.52	0.42	3.69	0.37
Ac. Gr. poliinsturi	190	3.67	1.24	0.88	0.50	0.97	0.39
Omega 3	192	0.29	0.09	0.08	0.27	0.08	0.19
(monoinsaturi+poliniosaturi)/ saturi	197	1.02	0.19	0.14	0.47	0.15	0.41
Omega 6	188	3.14	1.14	0.84	0.46	0.94	0.33
Monoinsaturi/polinsaturi	195	12.59	3.89	2.93	0.43	3.24	0.30
Colesterolo	183	76.54	26.77	19.73	0.46	21.05	0.39
Idrossiprolina (ind. collagene)	85	413.69	445.60	242.31	0.70	278.17	0.61

SEC= Errore standard di Calibrazione; RSQ= coefficiente di determinazione in calibrazione; SECV= errore standard in cross-validazione;RSQcv= coefficiente di determinazione in cross-validazione

Per migliorarne le prestazioni, la calibrazione è stata ulteriormente divisa in due considerando come discriminante il contenuto in grasso. I tagli classificati con i numeri 1-2-4 sono considerati "grassi", gli altri sono considerati "magri", pur ammettendo eccezioni alla seguente sommaria classificazione:

1 biancostato - esterno

2 biancostato - interno

2 costata (tutto)

3 bovino

3 bovino adulto hamburger

3 costata (longissimus dorsi)

3 hamburger

3 macinato misto bov/sui

3 macinato scelto

3 Vitello hamburger

3 vitellone hamburger

4 fiocco di pancia fetta

Di seguito (tabella 12 e 13) sono riportate le prestazioni di calibrazione per i principali parametri analizzati, per rispettivamente la frazione grassa e magra:

Tabella 12
Prestazioni predittive della calibrazione della carne:frazione grassa

FRAZIONE GRASSA	N	Mean	SD	SEC	RSQ	SECV	1-VR
Sostanza secca	128	59.54	22.64	4.76	0.96	5.08	0.95
Ceneri	86	0.82	0.30	0.14	0.80	0.14	0.79
Proteina	99	19.86	6.86	2.66	0.85	2.70	0.84
Estratto etereo (grasso totale)	96	29.42	25.37	5.01	0.96	5.74	0.95
Colesterolo	97	95.46	26.84	26.66	0.01	27.04	0.02
Idrossiprolina (indice collagene)	22	984.60	661.01	522.43	0.38	628.22	0.15

SEC= Errore standard di Calibrazione; RSQ= coefficiente di determinazione in calibrazione; SECV= errore standard in cross-validazione;RSQcv= coefficiente di determinazione in cross-validazione

Tabella 13
Prestazioni predittive della calibrazione della carne:frazione magra

Frazione magra	N	Mean	SD	SEC	RSQ	SECV	1-VR
Sostanza secca	87	31.16	5.45	1.39	0.93	1.71	0.90
Ceneri	85	0.97	0.07	0.03	0.85	0.03	0.82
Proteina	83	20.45	1.14	0.61	0.71	0.71	0.62
Estratto etereo (grasso totale)	88	9.66	6.29	1.77	0.92	2.26	0.87
Colesterolo	86	57.49	7.53	3.51	0.78	3.95	0.73
Idrossiprolina (indice collagene)	6	273.02	265.97	132.18	0.75	160.68	0.64

SEC= Errore standard di Calibrazione; RSQ= coefficiente di determinazione in calibrazione; SECV= errore standard in cross-validazione;RSQcv= coefficiente di determinazione in cross-validazione

Lo strumento portatile si è dimostrato robusto e idoneo all'analisi della carne al macello.

Nonostante le dimensioni, grazie alla installazione "a zaino" e la dotazione a batteria si è potuto effettuare la scansione direttamente dalla linea di macellazione.

Le prestazioni predittive hanno confermato l'ottima attendibilità di questa tecnica per la determinazione del contenuto di acqua, grasso e proteina (Tabella 11,12 e 13). Queste prestazioni non si sono però confermate (Tabella 11) per quanto riguarda il profilo acidico ed il contenuto di colesterolo che permetterebbero di qualificare in maggior dettaglio le proprietà nutrizionali della carne.

La suddivisione della calibrazione fra la frazione magra e grassa, ha permesso di rilevare come, la determinazione dell'idrossiprolina, indicatore della presenza di collagene ed anche del collagene sia decisamente migliore se l'analisi NIR viene applicata sulle frazioni magre.

In conclusione, nonostante non si sia riuscito a determinare con accuratezza il profilo acidico ed il colesterolo, la tecnica NIR si è confermata valida per la determinazione dei principali parametri nutrizionali con il contenuto di acqua, proteina e grasso, che grazie alla robustezza e portabilità dello strumento impiegato, potrebbe essere trasferita direttamente al macello, con una identificazione delle carcasse in base alle specifiche caratteristiche.

Queste informazioni potrebbero diventare un ulteriore supporto per la stesura della carta di identità del bovino, potendo implementare le informazioni da vivo con quelle della carne e indirizzare così i tagli della mezzena verso i diversi mercati che richiedono caratteristiche diverse di composizione della carne.

Valutazione dello stress da trasporto dei bovini

Molte volte gli operatori zootecnici, sottovalutano l'influenza dello stress da trasporto in quella che genericamente và definita come "qualità della carne".

Non sempre infatti a una buona alimentazione, ad una particolare attenzione delle condizioni di allevamento, alla cura durante la macellazione segue una carne con caratteristiche equivalenti.

Ci si è resi conto infatti che anche lo stress da viaggio influisce, in negativo, nel caratterizzare le proprietà delle carni.

Nell'ambito del PIF si è previsto quindi di effettuare una "misurazione" dei parametri biochimici al fine di verificare lo stress degli animali, monitorando e comparando alcuni parametri ematici sui bovini durante la fase di allevamento e successivamente al momento della macellazione.

Non conoscendo in modo approfondito quelle che potevano essere le reazioni fisiologiche degli animali trasportati si è deciso di applicare un pannello molto ampio di analisi biochimiche, che, valutate insieme potevano fornire il quadro più realistico della situazione di stress degli animali.

Sulla base di queste considerazioni sono stati analizzati i seguenti parametri biochimici ed immunitari, suddivisi per:

Profilo biochimico: albumina, urea, proteine totali, rapporto albumina/globulina, glucosio, colesterolo, acidi grassi non esterificati, bilirubina totale e frazionata, creatinina, AST, CK, LDH, calcio, fosforo, magnesio, ferro, cloro, sodio, potassio, zinco.

Profilo da stress: emocromo, cortisolo, siero proteine (metodo elettroforesi), betaidrossibutirrato (β-OHB), lattato.

In totale sono stati prelevati 49 campioni di sangue, su cui sono state effettuate le determinazioni analitiche previste nel profilo biochimico ed in quello da stress.

Gli stessi soggetti sono stati poi seguiti al macello dove sono stati prelevati altri campioni ematici al momento della macellazione.

Gli impianti di macellazione coinvolti sono stati 3 distanti dalle aziende in cui si è effettuato il prelievo da un minimo di 12 a un massimo di 120 Km con tempi di percorrenza quindi variabili dai 15 minuti ad 1ora e 40 minuti.

Sui campioni prelevati al macello sono state effettuate le stesse determinazioni, cioè il profilo biochimico ed il profilo da stress.

Dalla ricerca svolta sono stati messi in evidenza alcuni importanti aspetti legati allo stress da trasporto nei bovini, mettendo a confronto i livelli di cortisolo rilevati all'atto del prelievo in allevamento con quelli al macello, come evidenziato in tabella 14.

Tabella 14:
variazione del contenuto medio di cortisolo, albumina, glucosio e colesterolo fra i bovini in allevamento ed al macello

		Cortisolo nmol/l	**Albumina g/l**	**Glucosio mmol/l**	**Colesterolo nmol/l**
Allevamento	MEDIA	47,56	33,18	3,96	3,19
	DS	23,60	2,61	0,25	0,79
Macello	MEDIA	133,28	34,75	5,11	3,17
	DS	69,80	3,01	1,20	0,90

I livelli che sono risultati maggiormente correlati alla variazione del cortisolo sono stati fra i parametri ematologici l'incremento del rapporto granulociti neutrofili/linfociti, a causa della variazione positiva dei neutrofili al macello rispetto all'allevamento ed alla speculare riduzione dei linfociti (tabella 15).

Tabella 15:
variazione dei principali parametri ematologici fra i bovini in allevamento ed al macello

		WBC K/ml	**NEU K/ml**	**LYM K/ml**	**HCT %**	**N/L**
Allevamento	MEDIA	**8,42**	**2,62**	**4,87**	**39,50**	**0,63**
	DS	**1,57**	**0,90**	**1,60**	**2,98**	**0,39**
Macello	MEDIA	**8,52**	**4,22**	**3,45**	**43,63**	**1,45**
	DS	**2,18**	**1,83**	**1,29**	**3,88**	**1,06**

Inoltre negli animali al macello sono risultati alterati anche i parametri relativi agli enzimi muscolari ed epatici, ed un marker di funzionalità epatica quale la bilirubina (tabella 16).

Tabella 16:
variazione del contenuto medio di CK, AST, bilirubina totale e magnesio fra i bovini in allevamento e al macello

		CK U/l	**AST** U/l	**BIL T** mmol/l	**MG** mmol/l
Allevamento	MEDIA	**253,50**	**76,32**	**2,74**	**0,87**
	DS	**125,30**	**14,99**	**1,01**	**0,07**
Macello	MEDIA	**369,15**	**92,19**	**4,18**	**0,86**
	DS	**198,40**	**15,10**	**1,74**	**0,09**

Le alterazioni dei parametri ematici osservate negli animali trasportati evidenziano come il trasporto rappresenti una condizione stressante, in grado di alterare in maniera più o meno marcata l'assetto metabolico e l'equilibrio omeostatico degli animali, considerando un tempo medio di percorrenza di 60 minuti .

Le analisi effettuate mettono in evidenza inoltre che la minor incidenza di alcuni parametri, in particolare la disidratazione degli animali, può aver influito sulla riduzione del grado di stress.

Considerato che i due fattori che incidono maggiormente su questo fenomeno sono la stagione e la durata del trasporto, la tipologia di allevamenti e macelli considerati per il campionamento, può sicuramente essere considerata a ridotto impatto su questo fattore.