RELAZIONE FINALE PROGETTO PRONIRS

Reg. (CE) n. 1698/2005 - PSR 2007 - 2013

DGR n. 877 del 07/04/2009

MISURA 124 – "Cooperazione per lo sviluppo di nuovi prodotti, processi e tecnologie nel settore agricolo, alimentare e forestale"

1. Introduzione

La filiera suinicola italiana, unica nel contesto europeo, è caratterizzata dalla produzione e trasformazione di suini "pesanti e maturi" nel rispetto di linee guida imposte da disciplinari di produzione di prodotti tipici stagionati DOP. La conformità della materia prima a precisi standard qualitativi rappresenta elemento di primaria importanza per l'ottimizzazione dei processi produttivi. Lo sviluppo di metodologie per la misurazione on-line delle caratteristiche qualitative delle cosce legate all'attitudine alla trasformazione permetterebbe l'assestamento di sistemi di formazione dei prezzi e di pagamento della qualità della materia prima. Una possibile tecnica per la misurazione on-line delle caratteristiche qualitative delle cosce è si basa sull'impiego della spettroscopia nel vicino infrarosso (NIRS) che, dopo adeguata calibrazione strumentale, può consentire analisi rapide, affidabili, non invasive, con costi limitati e realizzabili tramite strumenti portatili negli stabilimenti di macellazione e lavorazione delle carni.

2. Obiettivi

Il progetto PRONIRS aveva l'obiettivo di valutare la possibile introduzione della tecnologia NIRS portatile quale strumento per la misurazione on-line delle principali caratteristiche qualitative (n. di iodio e profilo acidico del grasso di copertura, tenore di acqua e lipidi della carne) e per la predizione dell'attitudine alla trasformazione tecnologica (calo di stagionatura e consistenza del prodotto finale) di cosce suine destinate alla produzione di prodotti tipici stagionati DOP.

3. Materiale e metodi

3.1. Macellazione

La prova sperimentale ha riguardato in totale 1,540 suini, provenienti da un unico allevamento (Agricola San Luigi, partner P1) e macellati a gruppi di 70 animali, ad un peso medio di 166 ± 15 kg. Gli animali oggetto di studio erano la progenie di 24 verri della linea GOLAND C21 e di 193 scrofe ibride Goland (linea di derivazione Large White).

Le macellazioni, che hanno avuto luogo approssimativamente ad intervalli di 3 settimane, sono state effettuate presso il macello di Agricola Tre Valli (partner P3) sito a Magreta (MO). Prima della macellazione i suini sono stati identificati individualmente e, successivamente alla macellazione, è stata garantita, mediante apposizione di identificativi individuali, la corrispondenza tra carcassa o tagli e l'animale da cui erano stati ottenuti. Per tutti gli animali macellati sono stati eseguiti e

registrati i rilievi ponderali di carcassa, cosce e tagli magri. Sulle carcasse, a livello dorsale, è stato misurato lo spessore del lardo dorsale mediante Fat-O-Meter e, sulla coscia, del pH a 45 min dalla macellazione e del colore mediante colorimetro. Da ogni carcassa è stato prelevato un campione di lombo per l'analisi della composizione centesimale. Dopo la macellazione, le cosce sono state mantenute in cella frigorifera a 4°C per 24 h sino al momento della rifilatura. Tutte le operazioni di prelievo dei campioni individuali del grasso di copertura delle cosce e di acquisizione on-line degli spettri sono state effettuate in concomitanza con la rifilatura. Dopo la rifilatura, le cosce sono state trasferite alla stagionatura.

3.2. Prelievo dei campioni di grasso di copertura

Un campione di grasso di rifilatura è stato prelevato da ciascuna coscia nella linea di sezionamento, garantendo la tracciabilità dell'animale durante tutto il processo. La rifilatura delle cosce destinate a prosciutto DOP, effettuata dal personale del macello, è stata realizzata mediante taglio semicircolare della porzione in eccesso nella zona dorsale della coscia, in corrispondenza della superficie di sezionamento della carcassa. Il campione così prelevato era costituito da cotenna, grasso di copertura e da residui di fibre muscolari.

Dal campione è stata ricavata una porzione di grasso, di lunghezza compresa tra 10 e 20 cm e di peso pari a circa 150 g, comprendente sia lo strato esterno che quello interno del grasso sottocutaneo. Tale campione è stato utilizzato per la determinazione analitica del numero di iodio (secondo metodica di Wijs) e del profilo acidico (analisi gas-cromatografica), messi successivamente in relazione con le informazioni spettrali.

3.3. Acquisizione degli spettri

Gli spettri sono stati raccolti da uno spettrometro LabSpec®2500 (ASD Inc., Boulder, Colorado, USA) a scansione monocromatore post-dispersivo a serie di diodi, lavorando, in modalità riflettanza, tra 350 e 2,500 nm dotato di software Indico™ Pro (ASD Inc., Boulder, Colorado, USA).

L'acquisizione degli spettri ha riguardato le cosce fresche, il campione di grasso sottocutaneo prelevato dalla coscia e macinato, il campione di lombo, sia intero che macinato. Lo spettro è stato acquisito in diversi siti della superficie di sezionamento della coscia, comprendenti sia tessuto muscolare (3 punti) che grasso sottocutaneo (8 punti). I siti di acquisizione per il tessuto muscolare comprendevano la sezione trasversale del muscolo bicipite femorale e la sezione longitudinale e trasversale del muscolo semimembranoso. I siti di acquisizione per il grasso sottocutaneo di ciascuna coscia fresca sono stati in seguito ridotti a 5 a causa del limitato spessore presentato dal grasso in 3 dei punti inizialmente considerati, aspetto che rendeva impossibile acquisire correttamente lo spettro. I 5 punti designati comprendevano: 1) un punto in posizione cranio-mediale, 2) un punto caudo-mediale o "grasso in corona", 3) un punto caudo-laterale, 4) un punto laterale, e 5) un punto cranio-laterale. Lo spettro NIR è stato inoltre acquisito in triplo per ciascun campione di grasso rifilato e in seguito macinato tramite Retsch grindomix (4,000 g x 10 s).

Per quanto riguarda le letture sui lombi interi, queste sono state eseguite direttamente in macello in tre punti diversi di una delle due superfici di taglio del lombo. Gli spettri sono stati inoltre acquisiti in triplo sul medesimo campione di lombo dopo macinazione tramite Retsch grindomix fino a completa omogeneizzazione.

3.4. Valutazione e stagionatura delle cosce

Le cosce rifilate sono state sottoposte a valutazione lineare dei seguenti aspetti: globosità, marezzatura, copertura adiposa, colore della superficie muscolare e venature e, in seguito, a misurazione dello spessore del grasso in corona mediante strumentazione ecografica. A ciascuna coscia è stata infine applicata una targhetta numerata in modo da garantirne la tracciabilità nella successiva fase di stagionatura. La stagionatura è stata effettuata presso stabilimento del gruppo Veronesi s.p.a (partner P2). Rilievi del peso individuale delle cosce oggetto di studio sono stati registrati in 4 diversi momenti del processo di stagionatura della coscia (all'arrivo, al termine della salatura, a fine riposo e al termine della stagionatura) e al termine della stagionatura è stata eseguita la valutazione lineare della consistenza del prodotto stagionato mediante pressione manuale operata dal valutatore.

3.5. Determinazione del numero di iodio

La determinazione del numero di Iodio è stata condotta secondo il metodo di Wijs (A.O.A.C., 2000) modificato come segue. Un'aliquota (0,68 ÷ 0,71 g) di grasso fuso a 95°C per 40 min è stata versata in una beuta da 500 ml, nella quale sono stati aggiunti 20 ml di cloroformio in modo da mantenere il grasso in soluzione e 25 ml di reattivo di Wijs. Dopo energica agitazione, la beuta veniva riposta al buio per un 1 h. In modo analogo veniva preparato un bianco con solvente e reattivo di Wijs, ma senza aggiungere la matrice da analizzare. Terminato il periodo d'incubazione necessario, venivano aggiunti 20 ml di ioduro di potassio 10 M e 150 ml di acqua. Infine, la soluzione veniva titolata con una soluzione standard di tiosolfato di sodio in presenza di un indicatore (salda d'amido) fino a viraggio della colorazione giallo paglierino a bianco.

Il numero di iodio veniva calcolato sulla base della seguente relazione:

$$\frac{(V1 - V2) \times 1{,}269 \times c}{m}$$

dove:

V1 = ml di tiosolfato di sodio utilizzati per titolare la soluzione del "bianco";

V2 = ml di tiosolfato di sodio utilizzati per la determinazione;

c = concentrazione esatta (normalità) della soluzione di tiosolfato di sodio;

m = peso in grammi del campione.

3.6. Determinazione del profilo acidico del grasso di copertura

Un'aliquota di 20 mg di grasso fuso è stata sottoposta a trans-esterificazione aggiungendo 150 µl di sodio metossido e messa in agitazione continua mediante vortex per 10 min. In seguito, sono stati aggiunti 100 µl di acido ossalico. Dopo ulteriore agitazione, i metilesteri degli acidi grassi sono stati analizzati mediante gascromatografia (GC Shimadzu 17A), utilizzando una colonna capillare Supelco Omegowax 250 (30 m x 0.25 mm ID), con le seguenti condizioni di analisi: temperatura iniettore: 250°C, temperatura detector (FID): 260°C, flusso di elio: 0.8 ml/min, programma della camera termostatica: 140°C (isoterma iniziale), incremento di 4°C/min, isoterma finale a 220°C.

3.7. Analisi centesimale della carne di lombo

L'analisi centesimale è stata condotta sui campioni di lombo, prelevati da ogni carcassa e liofilizzati. Il contenuto di sostanza secca è stato determinato secondo il metodo AOAC (Official Methods of Analysis, 1990) n.950.46, il contenuto di ceneri secondo il metodo AOAC n.31.012, la proteina grezza secondo il metodo Kjeldahl semiautomatizzato (AOAC, n.981.10). Infine, il contenuto di estratto etereo è stato determinato secondo il metodo AOAC n.960.39 per la determinazione quantitativa dei lipidi grezzi presenti nella carne o nei prodotti carnei. Tutti i valori dei componenti chimici sono stati misurati espressi come percentuali della sostanza secca.

3.8. Analisi statistica

Le equazioni di predizione delle caratteristiche d'interesse sono state ottenute mediante modified partial last squares regression (MPLS) usando il software WINISI v. 1.50 (Infrasoft Internation, Port Matilda, PA, USA). Diversi trattamenti matematici sono stati applicati agli spettri prima dello sviluppo dell'equazione di calibrazione. Gli spettri sono stati sottoposti a standard normal variate, detrend, multiplicative scatter correction e/o loro combinazioni e derivatizzati. Le derivate sono state calcolate con gap tra 1 e 20 e smooth tra 1 e 8. I modelli di predizione sono stati validati mediante utilizzo di procedure a cross-validation basate sulla creazione di 4 subset estratti in modo casuale dai dati di partenza. Lo standard error in cross-validation (SE_{CV}) e il coefficiente di determinazione in cross-validation tra valori predetti e osservati (R^2_{CV}) sono stati calcolati e utilizzati per esaminare e valutare la capacità predittiva delle equazioni di calibrazione sviluppate. Il pre-trattamento matematico migliore era quello in grado di assicurare il più basso valore di SE_{CV} e al contempo il più alto valore di R^2_{CV}. Una volta sviluppate le equazioni di calibrazione utilizzando i 700 campioni iniziali, si è proceduto alla validazione dei risultati sulla parte rimanente dei dati disponibili (circa 800).

4. Risultati

4.1. Caratteristiche del grasso sottocutaneo della coscia fresca

Le statistiche descrittive relative al numero di iodio e al profilo acidico dei campioni analizzati sono riportate in Tabella 1. Il numero iodio medio è risultato pari a 67.75, mentre l'acido linoleico (C18:2n6) rappresentava, in media, il 13.8% degli acidi grassi totali e 85% degli acidi grassi polinsaturi (PUFA). Nonostante l'inclusione nello studio di campioni prelevati da suini provenienti da altri allevamenti e macellati nelle stesse giornate, in generale è stato possibile osservare una ridotta variabilità del numero di iodio, C16:0, C18:1n9, acidi grassi saturi (SFA), e acidi grassi monoinsaturi (MUFA).

Tabella 1. Statistiche descrittive della composizione del grasso

Carattere[1]	Mean	CV	Minimo	Massimo
N. iodio	67.75	4.5	60.10	86.70
C16:0	21.53	4.5	17.15	23.94
C18:0	10.62	11.2	0.11	14.62
C18:1n9	42.16	4.1	36.04	47.68
C18:2n6	13.39	12.6	7.82	19.21
SFA	33.97	5.1	23.63	38.47

MUFA	48.89	4.0	41.59	55.27
PUFA	15.56	12.2	9.25	22.18
INS	1.90	7.5	1.56	2.67
MP	3.20	16.4	2.01	5.63

[1]Tutti gli acidi grassi sono espressi in g/100g di grasso totale; SFA = acidi grassi saturi; MUFA = acidi grassi monoinsaturi; PUFA = acidi grassi polinsaturi; INS = indice di insaturazione; MP = MUFA/PUFA.

4.2. Predizione NIRS della composizione del grasso

I parametri dei modelli di calibrazione per la predizione del numero di iodio e del profilo acidico, ottenuti mediante acquisizione degli spettri sulle cosce fresche e sul grasso macinato, sono riportati nella Tabella 2.

La regione dello spettro inferiore a 500 nm e quella superiore a 2,000 nm sono state caratterizzate da un rapporto tra segnale e rumore di fondo troppo basso e non sono state pertanto considerate nell'analisi multivariata. Per ridurre l'eccesso d'informazione e prevenire i fenomeni di multicolinearità tra informazioni spettrali, state incluse nell'analisi chemometrica le riflettanze relative a lunghezze d'onda separate da intervalli di 4 nm. I pre-trattamenti matematici che hanno permesso di ottenere le migliori performance di calibrazione sono stati lo standard normal variate e il detrend associati alla derivata prima.

La capacità predittiva dei modelli di calibrazione è stata valutata comparando i valori di SE_{CV} e R^2_{CV}. Il parametro SE_{CV} è indicatore dell'errore medio di predizione, mentre R^2_{CV} misura quanta parte della varianza della variabile dipendente viene spiegata dal modello di calibrazione basato sull'informazione spettrale. Valori di R^2_{CV} compresi tra 0.50 e 0.65 indicano in genere scarse performance di predizione dei modelli che possono essere utilizzati unicamente per distinguere tra valori estremi. Valori di R^2_{CV} compresi tra 0.66 e 0.81 indicano invece una capacità predittiva abbastanza accurata, valori superiori a 0.82 indicano buone predizioni, e valori maggiori di 0.91 sono considerati eccellenti.

Dalla comparazione delle performance di calibrazione ottenute nei diversi siti di acquisizione on-line degli spettri è possibile concludere che i punti di acquisizione più favorevoli per lo sviluppo di calibrazioni siano risultati quelli situati nella porzione laterale della coscia (3, 4 e 5). In generale, le curve di calibrazione sviluppate utilizzando gli spettri acquisiti nei punti 1 e 2 hanno evidenziato valori di R^2_{CV} per il numero di iodio e il contenuto di acidi grassi pari o inferiori a 0.6. Le migliori performance di predizione sono state osservate utilizzando lo spettro medio acquisito nei punti 3, 4 e 5 che ha permesso di raggiungere valori di R^2_{CV} pari o superiori a 0.8 per il numero di iodio, C18:2n6, PUFA, e rapporto tra acidi grassi mono- e polinsaturi (MP).

Come atteso, i valori di R^2_{CV} ottenuti per i modelli sviluppati con gli spettri acquisiti on-line sulle cosce fresche sono risultati inferiori a quelli propri dei modelli basati sugli spettri del grasso macinato. Le differenze di R^2_{CV} sono tuttavia accettabili in considerazione del vantaggio pratico-applicativo garantito dalla predizione on-line della composizione del grasso.

La prova di validazione dei risultati utilizzando la seconda parte del dataset ha evidenziato una correlazione tra valori predetti e misurati pari a 0.85 per il numero di iodio, C18:2n6 e PUFA. Per questi caratteri è quindi possibile concludere che l'acquisizione on-line degli spettri permette di ottenere predizioni sufficientemente accurate e tali da poter essere impiegate praticamente sia dagli operatori del settore della trasformazione che nel contesto della selezione e del

miglioramento genetico della specie suina.

Table 2. Parametri dei modelli di calibrazione[1] ottenuti utilizzando gli spettri acquisiti on-line nei diversi punti di lettura (da 1 a 5) del grasso sottocutaneo delle cosce fresche e sul grasso macinato.

	Coscia fresca												Grasso macinato	
	1		2		3		4		5		Media punti 3,4,5			
Carattere[2]	SE_{CV}	R^2_{CV}	SE_{CV}	R^2_{CV}	SE_{CV}	R^2_{CV}	SE_{CV}	R^2_{CV}	SE_{CV}	R^2_{CV}	SE_{CV}	R^2_{CV}	SE_{CV}	R^2_{CV}
N. iodio	1.969	0.585	2.059	0.548	1.803	0.663	1.456	0.773	1.560	0.750	1.276	0.833	0.925	0.913
C16:0	0.829	0.187	0.862	0.132	0.840	0.181	0.775	0.296	0.781	0.287	0.759	0.324	0.706	0.414
C18:0	0.877	0.399	0.951	0.293	0.848	0.444	0.766	0.540	0.795	0.498	0.670	0.652	0.486	0.816
C18:1n9	1.467	0.228	1.449	0.216	1.389	0.285	1.391	0.303	1.384	0.327	1.138	0.541	1.047	0.596
C18:2n6	1.079	0.384	1.036	0.585	0.946	0.676	0.783	0.770	0.846	0.742	0.662	0.844	0.438	0.930
SFA	1.306	0.365	1.444	0.257	1.247	0.433	1.068	0.589	1.142	0.525	0.987	0.644	0.777	0.782
MUFA	1.659	0.226	1.690	0.159	1.517	0.348	1.502	0.345	1.491	0.377	1.211	0.593	0.972	0.730
PUFA	1.201	0.594	1.183	0.575	1.095	0.663	0.900	0.763	0.942	0.750	0.738	0.847	0.499	0.929
INS	0.109	0.369	0.121	0.205	0.104	0.404	0.091	0.564	0.096	0.520	0.080	0.669	0.066	0.770
MP	0.330	0.507	0.320	0.545	0.286	0.659	0.266	0.686	0.258	0.695	0.219	0.797	0.161	0.879

[1] SE_{CV}: errore standard in cross-validation; R^2_{CV}: R^2 in cross validation;

[2] SFA: acidi grassi saturi; MUFA: acidi grassi monoinsaturi; PUFA: acidi grassi polinsaturi; INS: indice di insaturazione; MP: MUFA/PUFA.

4.3. Predizione della composizione della carne di lombo

Le statistiche descrittive e i parametri di calibrazione ottenuti per la composizione centesimale del lombo sono riportati in Tabella 3. I valori di SE_{CV} sono risultati molto più bassi per tutti i costituenti quando l'acquisizione degli spettri è avvenuta utilizzando il campione macinato rispetto al campione tal quale. Le calibrazioni ottenute a partire da spettri acquisiti sui campioni interi permettono unicamente di distinguere tra valori estremi in relazione al contenuto di sostanza secca, proteina grezza ed estratto etereo, ma non risultano applicabili per la predizione accurata di differenze nel contenuto di ceneri. Ciò ne precluderebbe l'impiego qualora l'obiettivo fosse ottenere predizioni accurate di singoli valori di composizione chimica oppure una precisa classificazione delle carcasse in base alla composizione del lombo. Tuttavia, i valori di R^2_{CV} ottenuti dalle calibrazioni sui lombi interi corrispondono a coefficienti di correlazione tra dato predetto e misurato pari a circa il 70%. Tali valori potrebbero essere comunque ritenuti sufficienti per ipotizzare una selezione genetica basata sulle predizioni NIRS della composizione della carne, in quanto le correlazioni genetiche tra dati NIR-predetti e misurati risultano, di norma, superiori a quelle fenotipiche. Inoltre, è opportuno ricordare che l'unica possibile alternativa sarebbe rappresentata dal prelievo di campioni di lombo da ciascun suino, deprezzando di conseguenza il taglio, e l'esecuzione di analisi chimiche in laboratorio necessarie alla determinazione della composizione centesimale. Questo limiterebbe il numero di suini sui quali eseguire l'analisi e renderebbe la selezione genetica per questi caratteri impraticabile.

Tabella 3. Statistiche descrittive della composizione centesimale dei campioni di lombo e parametri dei modelli di calibrazione[1] ottenuti utilizzando gli spettri NIR.

Carattere[2]	Statistiche descrittive				Calibrazione Lombo intero		Calibrazione Lombo Macinato	
	Media	CV	Minimo	Massimo	SE_{CV}	R^2_{CV}	SE_{CV}	R^2_{CV}
SS, %	25.97	0.11	19.00	44.98	1.874	0.515	1.027	0.853
PG, % SS	75.19	0.07	59.89	87.68	4.068	0.487	0.870	0.974
EE, % SS	21.01	0.28	8.24	35.53	4.197	0.518	0.855	0.979
CEN, % SS	3.53	0.10	2.44	5.10	0.239	0.437	0.122	0.860

[1]SE_{CV}: errore standard in cross-validation; R^2_{CV}: coefficiente di determinazione in cross-validation;
[2]SS: sostanza secca; PG: proteina grezza; EE: estratto etereo; CEN: ceneri;

4.4. Predizione del calo di stagionatura e della consistenza finale

Gli spettri acquisiti sulle cosce fresche sono stati utilizzati anche per lo sviluppo di modelli per la predizione del calo di stagionatura e della consistenza finale del prodotto. Per quanto riguarda i cali di stagionatura, e in analogia con i risultati ottenuti per la composizione del grasso di copertura, i valori di R^2_{CV} più elevati sono stati ottenuti utilizzando gli spettri acquisiti nei punti 3, 4 e 5 della coscia fresca per predire il calo di fine salatura. Tali valori sono però risultati bassi e inferiori a 0.35. Pertanto, la sola acquisizione on-line degli spettri NIRS non è sufficiente per la definizione di modelli di predizione dell'entità dei cali di stagionatura. Ulteriori approfondimenti permetteranno di valutare se modelli di predizione basati sull'impiego congiunto di spettri e altre caratteristiche valutate e/o misurate sulla coscia fresca possono condurre a miglioramenti

significativi dell'accuratezza di predizione. Risultati simili a quelli descritti per i cali di stagionatura sono stati ottenuti per la predizione della consistenza finale del prosciutto crudo stagionato.

Il responsabile scientifico

Prof. Paolo Carnier