

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

FACOLTÀ DI AGRARIA

DOTTORATO IN SCIENZE DELLE PRODUZIONI ANIMALI

DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRONOMICHE, AGROCHIMICHE E

DELLE PRODUZIONI ANIMALI

SEZIONE: SCIENZE DELLE PRODUZIONI ANIMALI

VALERIA ANDRONICO

EFFETTO DELL'ORARIO DI PASCOLAMENTO SULLA

COMPONENTE AROMATICA DELLA CARNE

Tutor

Prof. Luisa Biondi

Dottorato di Ricerca XXV ciclo 2009 - 2010

Il Segreto in una Formula
 $5l=2p=3v+2c=+d1s=RC$

INDICE

PARTE GENERALE

1. Introduzione	pag. 1
1.1. <i>Qualità della carne</i>	pag. 1
1.1.1. <i>Parametri della qualità della carne</i>	pag. 4
1.2. <i>Il Colore</i>	pag. 9
2. Il Flavour	pag. 12
2.1. <i>Formazione del flavour: ruolo della cottura</i>	pag. 14
2.2. <i>Formazione del flavour: ruolo dei fattori intrinseci ed alimentazione animale</i>	pag. 18
3. Scatòlo ed Indolo	pag. 25
3.1. <i>Biosintesi dei composti indolici e influenza sulla qualità della carne</i>	pag. 27
3.2. <i>Fattori che influiscono sull'accumulo dei composti indolici</i>	pag. 30
3.3. <i>Strategie per ridurre l'accumulo</i>	pag. 35
3.3.1. <i>La castrazione</i>	pag. 35
3.3.2. <i>Selezione Genetica</i>	pag. 37
3.3.3. <i>L'alimentazione</i>	pag. 37
4. Variazione della composizione del pascolo ed effetti sull'ingestione	pag. 44

PARTE SPERIMENTALE

5. Scopo del lavoro	pag. 49
6. Materiali e metodi	pag. 52

6.1. <i>Animali e diete</i>	pag. 52
6.2. <i>Macellazione e campionamento</i>	pag. 54
6.3. <i>Analisi chimiche</i>	pag. 55
6.3.1. <i>Pascolo</i>	pag. 55
6.3.2. <i>Liquido ruminale</i>	pag. 55
6.3.3. <i>Grasso perirenale</i>	pag. 56
6.3.4. <i>Muscolo</i>	pag. 59
6.3.4.1. <i>SMart Nose</i>	pag. 60
6.4. <i>Analisi statistica</i>	pag. 62
7. Risultati	pag. 65
7.1. <i>Performance di crescita in vivo e post mortem</i>	pag. 65
7.2. <i>Composizione chimica del pascolo</i>	pag. 66
7.3. <i>Liquido ruminale</i>	pag. 68
7.4. <i>Indolo e scatolo nel grasso perirenale</i>	pag. 72
7.5. <i>SMart Nose</i>	pag. 74
8. Discussione	pag. 77
8.1. <i>Performance in vivo e post mortem</i>	pag. 78
8.2. <i>Composizione chimica del pascolo</i>	pag. 79
8.3. <i>Liquido ruminale</i>	pag. 80
8.4. <i>Indolo e scatolo nel grasso perirenale</i>	pag. 84
8.5. <i>SMart Nose</i>	pag. 89
9. Conclusioni e prospettive	pag. 92
Bibliografia	pag. 94

PARTE GENERALE

1. Introduzione

1.1. Qualità della carne

La carne rappresenta un alimento estremamente importante nella dieta della popolazione mondiale. Per secoli, la carne è stata considerata un cibo nobile che contribuiva alla forza, alla salute e alla longevità dell'essere umano. Essa rappresenta, infatti, un'importante fonte di proteine ad elevato valore biologico, ferro, zinco, fosforo e vitamine del gruppo B (tiamina, riboflavina e cobalamina) (Tab. 1).

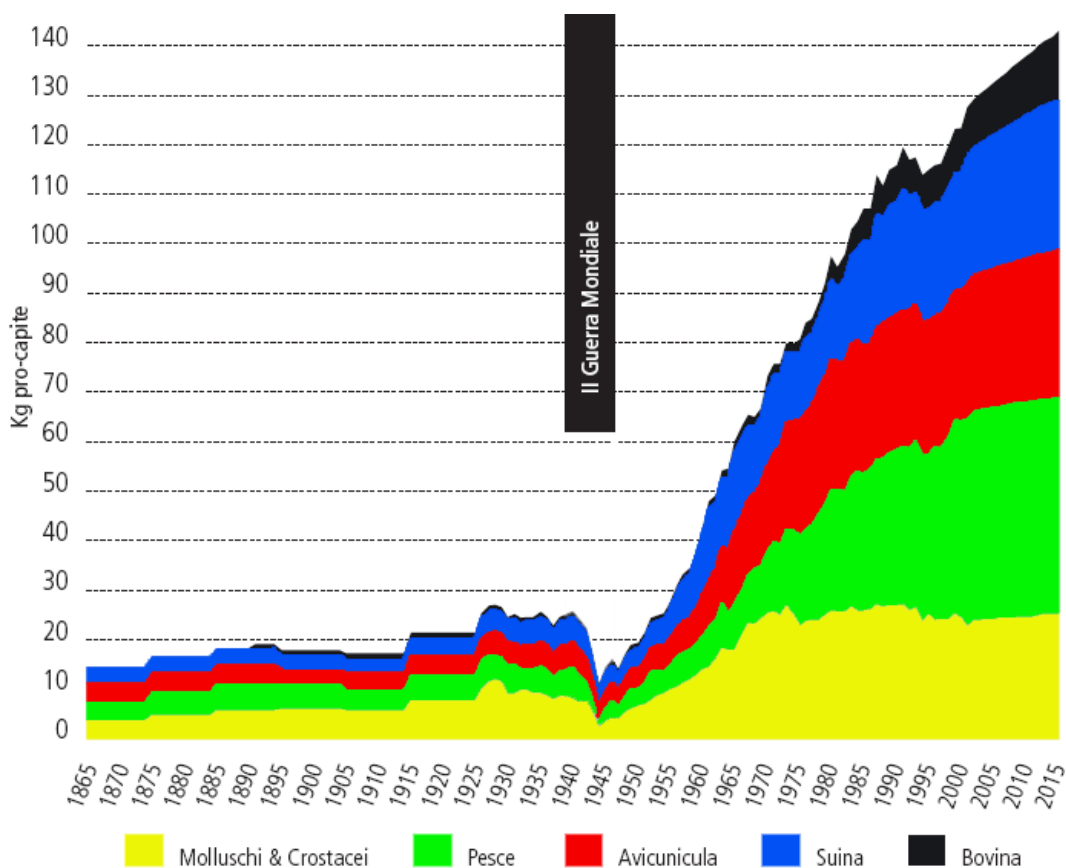
Tabella 1 - Comparazione di alcuni nutrienti contenuti nella carne bovina ed ovina.
Fonte: Vandendriessche (2008)

Valori per 100g	Carne	
	Bovina	Ovina
Energia (kJ)	523.0	564.5
Proteine (g)	22.5	20.3
Grasso (g)	3.7	5.8
Niacina (mg)	6.2	6.2
Vitamina B12 (µg)	1.4	1.7
Ferro (mg)	2.0	1.9
Zinco (mg)	4.3	3.5
Selenio (µg)	13.6	9.2

L'attenzione e la considerazione nei confronti di questo prodotto, e più in generale nei confronti dei prodotti di origine animale, è, però, molto mutata nel corso dei tempi. In Italia, in concomitanza con la crescita economica che ha caratterizzato il secondo dopoguerra, il consumo di carne è cresciuto in modo esponenziale (Fig. 1) assumendo a vero e proprio simbolo del benessere di quel periodo. Tale incremento è bruscamente rallentato alla fine degli anni '90 a

seguito di una serie di problemi igienico-sanitari legati all'allevamento degli animali (encefalopatia spongiforme bovina, febbre catarrale, scrapie, ecc), per poi riprendere a crescere. Scandali come quello della “mucca pazza”, se da una parte hanno minato la fiducia dei consumatori nei confronti dell'industria dei prodotti di origine animale, dall'altra li hanno resi più critici ed interessati alle dinamiche della filiera agroalimentare. Inoltre, la disponibilità di nuove conoscenze relative agli effetti dei comportamenti alimentari sulla salute umana che dimostrano, con sempre maggiore evidenza, la correlazione tra l'eccessivo consumo di carne e l'insorgenza di una serie di disturbi clinici (malattie cardiovascolari (Xiaosong, 2007), obesità (Liseeau et al., 2004), osteoporosi e diabete (Aggett et al. 2005), cancro del colon (Norat et al., 2005), ha spostato l'attenzione dalla quantità alla qualità della carne consumata nonché cambiato i parametri su cui si basa la valutazione della qualità della carne.

Figura 1 – Consumo procapite di alimenti di origine animale in Italia – Fonte ISTAT 2009



La norma ISO 9000 del 2000 definisce la qualità di un prodotto, sistema o processo, come la sua capacità di soddisfare le richieste implicite ed esplicite del cliente (consumatore). Nei prodotti alimentari si identificano diversi aspetti classici della qualità, generalmente raggruppati in aspetti igienico-sanitari, nutrizionali edonistici e tecnologici (Grunert, 2006). Alcuni di essi, come la sicurezza igienico-sanitaria di un alimento, ovvero la sua incapacità di provocare danno, malattia o morte all'individuo che lo assume, sono imprescindibili e garantiti dalla legge, quindi non risultano determinanti per le scelte del consumatore al momento dell'acquisto. Parametri come l'apporto calorico, la

percentuale di grasso nonché le sua composizione, l'aspetto, l'aroma, la facilità e/o velocità di cottura sono, invece, in grado di generare differenze fortemente caratterizzanti fra un prodotto e un altro e di condizionare profondamente le scelte di acquisto (Bernues et al., 2012). Negli ultimi anni, il consumatore ha posto l'attenzione anche su aspetti diversi da quelli classici. Oggi si dà, infatti, sempre più importanza ad aspetti etici, quali ad esempio il rispetto del benessere animale e dell'ambiente (Sepúlveda et al., 2011, Martín-Cerezo et al., 2005) o anche la valorizzazione dei prodotti del territorio (Luykx et al., 2008).

1.1.1. Parametri della qualità della carne

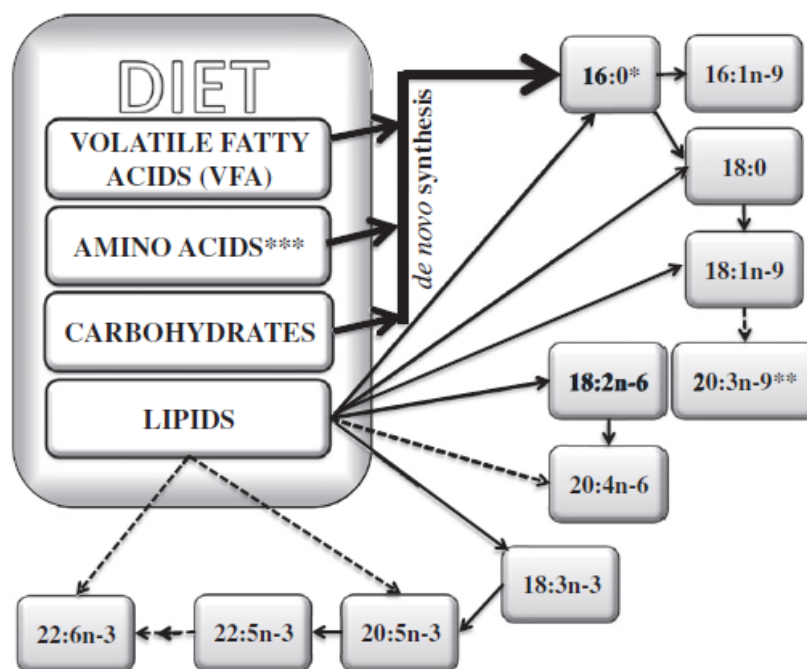
Il grasso e la sua composizione

Il grasso contenuto nella carne rappresenta uno dei principali fattori da tenere in considerazione quando si valuta la qualità di questo prodotto. D'Amicis e Turrini (2002) e Bernabéu e Tendero (2005) riportano che, nel corso degli ultimi anni, questo parametro ha riscosso un sempre maggiore interesse da parte del consumatore. È, infatti, noto che la quantità del grasso ingerito tramite il consumo di carne rappresenta un rischio per la salute umana. Il World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research (2007) ha osservato come in Nord America, dove si consuma la più elevata quantità di carne procapite, ci sia una netta correlazione tra un eccessivo consumo di carne, obesità, malattie cardiovascolari e cancro. Anche la qualità del grasso ingerito gioca un ruolo fondamentale nello sviluppo di queste patologie. Gli acidi grassi saturi (SFA), specificamente l'acido miristico (C14:0) e palmitico (C16:0), sono contenuti in concentrazioni più elevate nel grasso della carne dei ruminanti e sono anche quelli

per cui è stato dimostrato un ruolo nell'eziologia delle malattie dell'apparato circolatorio, tipiche della società occidentale (McAfee et al., 2010; Micha et al., 2010). Al contrario, il consumo di acidi grassi mono- (MUFA) e polinsaturi (PUFA), in particolare quelli della serie ω -3, è stato associato a una riduzione dei livelli di colesterolo, della pressione arteriosa e del diabete di tipo II (McAfee et al., 2010; Molendi-Coste et al., 2011). In considerazione di questo, la FAO (2010) afferma che solo il 10% dell'energia totale assunta con la dieta dovrebbe provenire dagli acidi grassi saturi.

Negli ultimi decenni è stata effettuata un'enorme quantità di studi per implementare strategie volte a ridurre l'accumulo di SFA a favore dei PUFA nel grasso della carne. Una parte degli acidi grassi contenuti nella carne è di origine endogena, un'altra parte proviene direttamente dall'alimentazione (Fig. 2) e può essere modificata dal regime alimentare cui sono sottoposti gli animali.

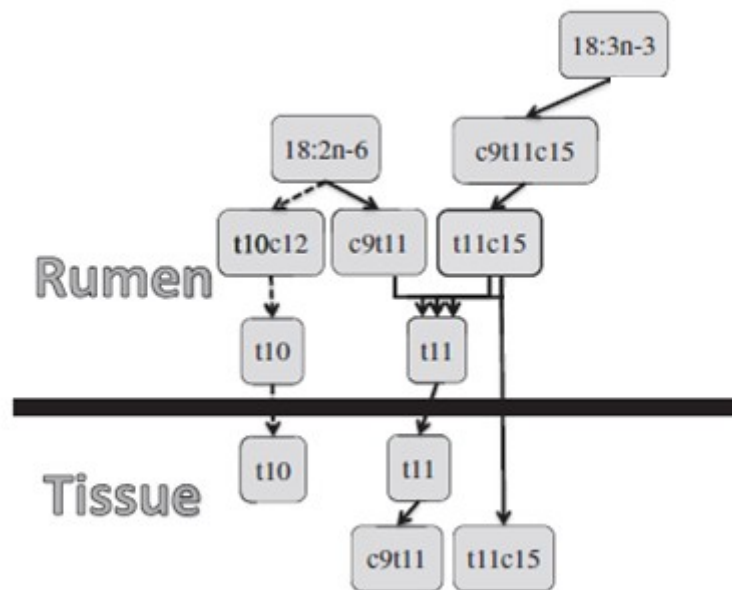
Figura 2 - Origine degli acidi grassi della carne – Fonte Mapiye et al., 2012



È stato osservato che una dieta ricca di PUFA basata sull'erba verde (Popova et al., 2007; Nuernberg et al., 2008) o provenienti da semi oleosi (Jenkins et al., 2008) è in grado di aumentare il tenore di PUFA nel grasso della carne. Infatti, oltre ad essere assorbiti e depositati nel grasso muscolare in maggiore quantità, essi producono anche un feed-back negativo sulla biosintesi *de novo* degli acidi grassi saturi. Tuttavia, nei ruminanti l'incremento del trasferimento dei PUFA dalla dieta al grasso del muscolo non è lineare come nei monogastrici (Jenkins et al., 2008) a causa della bioidrogenazione ruminale, processo per mezzo del quale, i PUFA, tossici per la microflora ruminale, vengono detossificati mediante una progressiva desaturazione dei doppi legami operata dagli enzimi batterici (Kemp e Lander, 1984). Il principale prodotto della bioidrogenazione ruminale è l'acido stearico (C18:0) (Harfoot e Hazelwood, 1997), un acido grasso saturo che contribuisce ad aumentare la percentuale di SFA nel grasso. Per aumentare l'efficienza di trasferimento dei PUFA dalla dieta al grasso è necessario proteggerli dall'attacco dei batteri ruminali. La somministrazione di alimenti ricchi di tannini condensati, molecole capaci di formare legami molto stabili con le proteine, si è dimostrato un mezzo efficace per inibire l'attività degli enzimi microbici a livello ruminale *in vitro* (Vasta et al., 2009a) e *in vivo* (Vasta et al., 2009b). Durante il processo di bioidrogenazione vengono prodotti una serie di intermedi molto importanti per gli effetti che hanno sulla salute umana; di particolare interesse è l'acido linoleico coniugato (*cis-9, trans-11* CLA). Questo acido grasso è l'unico per cui sia stata dimostrata l'attività anticarcinogenica, e pertanto gli alimenti che lo contengono possono essere definiti alimenti funzionali (Enser et al., 2001). Il CLA viene prodotto sia nel rumine durante la

bioidrogenazione ruminale a partire dall'acido linoleico e linolenico, sia a livello endogeno nella ghiandola mammaria e nel tessuto muscolare per opera dell'enzima Δ^9 -desaturasi a partire dall'acido trans-vaccenico (C18:1 trans) precedentemente formatosi nel rumine (Fig. 3). Come per gli altri PUFA, la sua presenza nella carne è positivamente correlata alla presenza dei suoi precursori polinsaturi (acido linoleico e linolenico) nella dieta e negativamente correlata ai fattori che inibiscono la bioidrogenazione ruminale.

Figura 3 - Origine dell'acido linoleico coniugato (c9 t11). Fonte Chilliard et al., 2007



La tenerezza

Sebbene essa non possa essere valutata al momento dell'acquisto ma solo al momento del consumo, la tenerezza rappresenta un altro fattore molto importante nel determinare la qualità della carne. Essa viene definita come lo sforzo al taglio misurato in kg/cm^2 (Warner et al., 2010). Essenzialmente, la tenerezza dipende dai

processi glicolitici post-mortem, dalle modalità di accorciamento del sarcomero durante il rigor mortis, dalla quantità e dalla solubilità del tessuto connettivo, dai processi proteolitici che si instaurano dopo la morte dell'animale a carico della componente fibrillare del muscolo e dalla quantità del grasso di infiltrazione (Koochmaraie & Geesink, 2006; Hocquette et al., 2010).

I processi metabolici delle cellule muscolari continuano per un certo periodo anche dopo la morte dell'animale; il catabolismo del glicogeno è uno dei processi più importanti nel determinare la tenerezza delle carni (Thompson et al., 2006). Infatti, l'utilizzo del glicogeno come fonte di energia per la respirazione cellulare determina un abbassamento del pH a seguito dell'accumulo di acido lattico e per la liberazione di ioni H^+ dall'ATP. L'ambiente acido che ne deriva determina il rilascio degli ioni Ca^{++} dal reticolo endoplasmatico e l'instaurarsi del *rigor mortis* (Thompson et al., 2006).

Hwang et al. (2003) studiando l'effetto dell'abbassamento di temperatura della carcassa sulla tenerezza della carne, hanno osservato che un abbassamento troppo rapido della temperatura dopo la morte dell'animale determina una repentina contrazione delle fibre muscolari e al contempo una glicolisi troppo lenta, causando vere e proprie contratture che contribuiscono a ridurre la tenerezza della carne; anche un abbassamento troppo lento della temperatura determina l'indurimento della carne. Infatti, in questo caso, la glicolisi, consuma troppo rapidamente il glicogeno contenuto nel muscolo andando a inficiare il proseguimento dei processi di frollatura. Le variazioni di pH e la concentrazione di ioni Ca^{++} sono responsabili anche dell'attivazione del sistema calpaine-calpastatine, enzimi proteolitici in grado di risolvere il *rigor mortis* e denaturare le

proteine mio fibrillari e sarcoplasmatiche favorendo l'intenerimento della carne (Weaver et al., 2008). Gli enzimi proteolitici non hanno, però nessun effetto sul tessuto connettivo, la cui quantità dipende essenzialmente dall'età dell'animale, dall'alimentazione e dal sistema di allevamento (Knee et al., 2007).

La quantità di glicogeno è quindi determinante per i processi di frollatura della carne; fattori come lo stress che precedono la macellazione, la tipologia di allevamento e il tipo di alimentazione influiscono sulla quantità di glicogeno nel muscolo. È noto, infatti, che un elevato stress poco prima della macellazione determina un elevato consumo di glicogeno nel muscolo, causando un insufficiente calo del pH e una ridotta attività degli enzimi proteolitici (Channon et al., 2000). È dimostrato che il sistema di allevamento e l'alimentazione influiscono sulla tenerezza delle carni (Knee et al., 2007); l'alimentazione influisce anche sullo stato di ingrassamento degli animali e di conseguenza sulla quantità di grassi di infiltrazione presente nel muscolo. Hocquette et al. (2010) riportano che il grasso di infiltrazione aumenta la tenerezza e la succosità della carne grazie alla sua azione di separazione fisica delle fibre di collagene.

1.2. Il colore

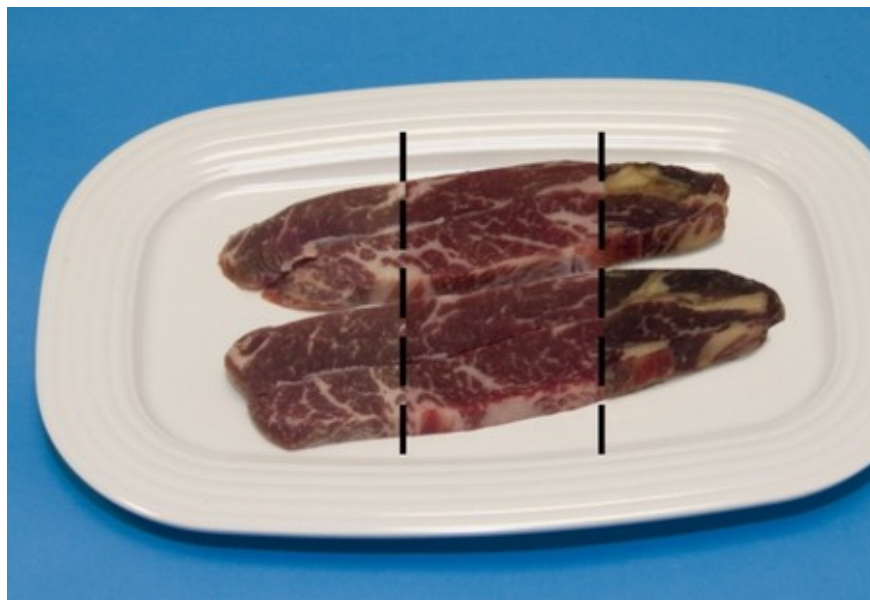
A fronte della molteplicità di aspetti qualitativi da valutare nel prodotto carne, al momento dell'acquisto, lo strumento più importante, se non l'unico, di cui dispone il consumatore per scegliere un prodotto piuttosto che un altro è la vista. Da più di 40 anni, infatti, il colore è ritenuto in assoluto l'attributo più importante di un alimento e della carne in particolare; infatti, un prodotto, il cui colore sia inaccettabile per il consumatore, non verrà acquistato e ogni suo altro attributo

perderà importanza (Clydesdale, 1978). Anche studi più recenti confermano che il colore della carne riveste un ruolo fondamentale nelle preferenze espresse dal consumatore (Liu et al., 1995; Smith et al., 2000; Bernues et al., 2012)

Il colore della carne è dovuto ai pigmenti presenti nel muscolo e principalmente alla mioglobina (Fox, 1987). Esso può variare dal rosso-rosa al rosso-mattone spento in funzione dello stato chimico in cui si trova la mioglobina; l'intensità del colore è, invece, direttamente proporzionale alla concentrazione del pigmento nel muscolo. Lo stato chimico della mioglobina dipende dal ferro presente nel suo gruppo eme, il quale è deputato a consentire gli scambi gassosi (ossigeno - anidride carbonica) nel muscolo. In condizioni fisiologiche, cinque dei sei potenziali siti di legame del ferro sono occupati, mentre il sesto rimane disponibile per il legame reversibile con l'ossigeno (Mancini e Hunt, 2005). In funzione dello stato di ossidazione dell'atomo di ferro e della pressione parziale di ossigeno, la mioglobina può trovarsi in tre diverse forme: deossimioglobina (rosso-rosa), ossimioglobina (rosso-ciliegia) e metamioglobina (rosso-mattone spento). La prima, che conferisce alla carne un color rosso-rosa tipico della carne appena tagliata, si ha quando il ferro si trova nello stato ferroso (Fe^{++}) e non vi è presenza di ossigeno nel sesto sito di legame; l'ossimioglobina determina il color rosso-ciliegia tanto apprezzato dal consumatore e si origina quando, in presenza di un'adeguata pressione di ossigeno, questo si lega al ferro del gruppo eme mantenendo però lo stato di ossidazione ferroso; l'ulteriore ossidazione del ferro ne determina la transizione a stato ferrico (Fe^{+++}), responsabile del colore rosso mattone spento (Fig. 4). Quindi, il colore rosso brillante è indice di una carne

fresca dove i processi ossidativi non si sono ancora esauriti o sono solo nella loro fase iniziale.

Figura 4 - Effetto dell'ossidazione sul colore della carne



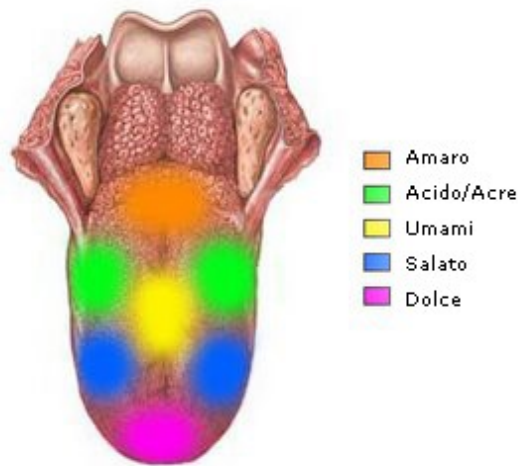
Se lo stato di ossidazione della mioglobina influisce sul cambiamento di colore durante la fase di stoccaggio del prodotto, il regime alimentare cui sono stati sottoposti gli animali contribuisce a determinare il colore iniziale della carne nonché l'andamento dei processi ossidativi. Un'alimentazione basata sul pascolo verde rende le carni più scure rispetto ai concentrati (Realini et al., 2004) e influisce positivamente sulla stabilità del colore (Luciano et al., 2009). La maggiore stabilità del colore deriverebbe dall'elevata quantità di antiossidanti, quali la vitamina E, acidi grassi polinsaturi, ecc, forniti con la dieta, che sarebbero in grado di proteggere più a lungo la mioglobina dai processi ossidativi (Luciano et al., 2011).

2. Il Flavour

In ordine di importanza, il flavour viene immediatamente dopo il colore nel determinare le scelte del consumatore (Bernues et al., 2012). Sebbene sia stato dimostrato che nelle carni rosse, il colore e il flavour sono negativamente correlate all'avanzare dei processi ossidativi (Greene, 1969) e che, in particolare, i prodotti dell'ossidazione della porzione lipidica possono dare origine ai cosiddetti off-flavours, è altrettanto vero che aromi e sapori indesiderabili possono essere presenti in una carne freschissima.

Il flavour viene definito come la caratteristica sensoriale data da un cibo, o da un'altra sostanza, derivante dalla combinazione di odore, sapore e dalla sensazione che esso dà in bocca (Farmer, 1994). Le sostanze chimiche responsabili del sapore stimolano specifici recettori posti sulla lingua (Fig. 5) dando vita ai cinque sapori: aspro, dolce, amaro, salato e umami (Maughan e Martini, 2012). Tuttavia, il senso del gusto da solo non è in grado di far percepire tutti gli aromi della carne. Nel caso specifico della carne, i composti volatili che si formano con la cottura e che vengono percepiti dall'epitelio olfattorio durante la masticazione contribuiscono alla percezione del suo tipico flavour (McCabe et al., 2007). Essi sono considerati i maggiori responsabili della formazione del flavour poiché l'olfatto è circa 10 mila volte più sensibile del gusto (Oddy et al., 2001).

Figura 5 - Senso del gusto. Fonte: Morini 2012.



Come per gli aspetti qualitativi brevemente riportati nei paragrafi precedenti, anche per il flavour della carne esiste una vasta letteratura che ha investigato i meccanismi e i fattori che ne influenzano la formazione (Elmore e Mottram, 2006), i gusti dei diversi consumatori nel mondo (Bernues et al., 2012) e il modo per avvicinare il sapore della carne alle richieste dei consumatori (Calkins e Hodgen, 2007; Young et al., 2006). Ford e Park (1980) distinguevano il flavour della carne dei ruminanti in tre categorie: normale, sgradevole (off-flavours) ed estraneo. La stessa classificazione è stata utilizzata anche in lavori più recenti da Jenschke et al. (2006) e Hodgen et al. (2006). Il sapore normale è associato al prodotto e può essere genericamente descritto come sapore di carne e a questo possono affiancarsi degli aromi tipici dovuti alla specie (Maughan e Martini, 2012) o alla razza (Utrilla et al., 2010) o al sesso (Resconi et al., 2009). Gli off-flavour si originano, invece, durante la conservazione o come risultato del deterioramento del prodotto, in particolare dall'irrancidimento della porzione

lipidica (Hoquette et al., 2010). Infine, i flavour estranei possono derivare da sostanze assunte con la dieta e/o derivanti dal metabolismo animale e che vengono depositate nel grasso e nei muscoli; il termine “estraneo” non è legato a un’accezione negativa del termine, ma al fatto che esso non dipende da fattori intrinseci (specie, razza, età, sesso, ecc.), ma da fattori estrinseci quali il sistema di allevamento e l’alimentazione (Vaste e Priolo, 2006). Pertanto, un flavour estraneo può allo stesso modo rappresentare sia una caratteristica normale o, comunque, accettabile per certi consumatori, sia un aroma troppo intenso o non accettabile per altri consumatori (Prescott et al., 2001). È, infatti, ben noto che l’aroma della carne viene giudicato in maniera diversa a secondo degli usi, delle tradizioni e della cultura popolare. Lo stesso flavour apprezzato o esaltato in una certa zona del mondo, può essere percepito come sgradevole e rifiutato in un’altra parte del mondo. Un esempio tipico è dato dai consumatori australiani i quali, essendo abituati a mangiare ovini allevati al pascolo, risultano meno sensibili al “sapore di pascolo” rispetto a quelli statunitensi, che consumano abitualmente ovini alimentati con concentrati (Singh et al., 2011).

2.1. Formazione del flavour: ruolo della cottura

Se si esclude un leggero odore simile a quello del sangue, la carne cruda è quasi priva di aroma. In essa, però, sono presenti i precursori necessari a sviluppare il tipico aroma. Questi composti possono essere raggruppati in due grandi categorie: lipidi e sostanze idrosolubili. L’aumento della temperatura dovuta alla cottura produce effetti differenti su queste due classi di molecole. I lipidi vengono degradati a composti più semplici; le sostanze idrosolubili, in

particolare gli zuccheri riducenti, a causa della riduzione della disponibilità di acqua entrano in contatto con il gruppo amminico degli aminoacidi dei composti proteici, e l'elevata temperatura catalizza la formazione dei prodotti della reazione di Maillard. Più di 1000 composti volatili (alcuni riportati in tabella 2) tra cui idrocarburi, aldeidi, chetoni alcoli, furani, composti pirrolici, piridine, pirazine tiazoli composti sulfurei e molti altri derivano da queste reazioni e sono responsabili del tipico aroma di carne (Calkins e Hodgen, 2007).

Tabella 2 - Composti volatili nella carne - Fonte Calkins e Hodgen 2007.

Compound name	Aromatic taste
Benzaldehyde	Pleasant, distinct
Benzene	Seafood, green, onion
Butenal	Goaty
n-Caprioc acid	Sweet and pungent odor, orange peel, lemon, resin
3-Carene	Roasted
Cyclobutanol	Mint, acetone
2, 4-Decadienal	Powerful, waxy, aldehydic, orange, citrus peel
Decanal	Tallow, orange
2-Decenal	Cooked beef
2, 3-Dimethyloxirane	Ammonia
2-Pentylfuran	Nut, fat
2, 4-Heptadienal	Oily, fatty, rancid, unpleasant, penetrating fruity odor in liquid
5-Methyl 2-heptanamine	Fragrant, woody, oily, green, fatty, winey, sap, herb
1-Heptanol	Fruity, spicy, cinnamon, penetrating fruity odor in liquid
2-Heptanone	Cloves, menthol, eugenol
6-Methyl 2-heptanone	Soapy, fatty, almond, fishy, unpleasant
3-Ethyl-2-methyl 1, 3-hexadiene	Fatty-green, grassy, strong green, tallow, fat,
Hexanal	Faint peculiar odor
Hexane	Woody, cut grass, chemical-winey, fatty, fruity, weak metallic
Hexanol	Resin, flower, green
2-Ethyl 1-hexanol	Green, sharp, leafy, fruity, unripe banana
3-Methylbutanal	Cooling sensation, wintergreen, gaultheria

Methyl salicylate	Fat, wax, green, watermelon, geranium, pungent
2, 4-Nonadienal	Floral, citrus, fatty, grassy, waxy, green
Nonanal	Hot milk, soap, green, fruity, floral
2-Nonanone	Cardboardy, orris, fat, cucumber, paper
2-Nonenal	Oil
Octanal	Penetrating aromatic odor, fatty, citrus, oily, walnut, chemical, metal
1-Octanol	Herb, butter, resin, gasoline
2-Methyl 3-octanone	Green, nut, fat
2-Octenal	Fruity, old apples
Pentanal	Very slight warmed-over flavor, oxidized
Pentane	Mild odor, fusel oil, fruit, balsamic
1-Pentanol	Mild
Propanol	Penetrating odor, sweet smell
Tridecane	Sweet, strong, spicy

Già da circa 50 anni si sa che dalla porzione magra della carne si originano quei composti che conferiscono tratti di aroma comune a tutte le carni, invece dalla porzione lipidica si sprigionano i composti responsabili dell'aroma specie-specifico (Hornstein e Crowe, 1960; Kramlich e Pearson, 1960; Macy et al., 1964; Wasserman e Gray, 1965: citati da Schreuers et al., 2008)

I principali composti idrosolubili precursori di sostanze aromatiche sono zuccheri liberi e fosfatati, zuccheri legati ai nucleotidi, amino acidi, peptidi e a basso peso molecolare. Durante la cottura è stata osservata la contemporanea diminuzione di carboidrati e amino acidi come conseguenza della su citata reazione di Maillard. La reazione prende avvio per condensazione (legame con conseguente eliminazione di una molecola d'acqua) tra il gruppo carbonilico di uno zucchero riducente e un composto contenente un gruppo amminico (amino acido); successivamente, la glicosilammina formatasi si riarrangia (riarrangiamento di Amadori) e si disidrata dando vita a prodotti in grado di continuare a reagire con

altre molecole reattive (aldeidi, chetoni, ammine, amino acidi, ecc) originando una molteplicità di sostanze aromatiche tra cui amino chetoni, amino alcol e composti bicarbonilici. Quando questi ultimi reagiscono con la cisteina, alla reazione di Maillard si associa quella di Strecker che porta alla formazione di solfuro di idrogeno, ammoniaca e acetaldeide. Tutte queste molecole costituiscono gli intermedi della formazione di importanti classi di aromi quali i furani, le pirazine, i pirroli, tiazoli ed altri composti aromatici. I composti sulfurei, derivati dalla cisteina, sembrano avere una grande importanza nella formazione dell'aroma della carne. Questo è confermato dal fatto che durante la reazione di Maillard, nel muscolo si ha una notevole diminuzione del contenuto di ribosio e cisteina (Fay et al., 2005).

Per quel che riguarda la componente lipidica, idrocarburi alifatici, aldeidi, chetoni, alcol e acidi carbossilici, sono alcuni dei composti di derivazione lipidica responsabili del flavour della carne cotta. Oltre agli idrocarburi alifatici, anche quelli aromatici (eterociclici e non) forniscono un notevole contributo nel caratterizzare l'aroma della carne. Normalmente questi composti sono il risultato dell'ossidazione che avviene a carico dei lipidi durante la conservazione e conferiscono alla carne un cattivo aroma di rancido Gatellier et al., (2005). Durante i processi di cottura, questi processi avvengono molto rapidamente e contribuiscono allo sviluppo di un aroma privo di off-flavours. Gli acidi grassi polinsaturi sono più suscettibili all'ossidazione rispetto a quelli saturi, a causa della minore energia necessaria per rompere i doppi legami (Elmor et al., 2002). Il livello di insaturazione dei fosfolipidi strutturali che costituiscono la membrana cellulare è più elevato rispetto a quello degli acidi grassi che costituiscono i

trigliceridi. Per questo motivo anche l'aroma delle carni più magre, dove il contenuto di grasso intramuscolare è molto basso, e cotte senza il grasso sottocutaneo, è ricco di composti volatili derivati dai lipidi. Il valore soglia oltre il quale l'aroma di queste sostanze può essere rilevato è generalmente molto più elevato rispetto al valore soglia dei composti zolfo e azoto derivanti dai precursori idrosolubili. Rispetto a questi ultimi, però, aldeidi saturi e insaturi derivanti dai precursori lipidici sono più abbondanti perciò svolgono un ruolo predominante nella formazione del flavour.

2.2. Formazione del flavour: ruolo dei fattori intrinseci e dell'alimentazione animale

Le sostanze che danno vita alle reazioni chimiche su descritte sono presenti nel muscolo già prima della cottura. L'accumulo di queste sostanze dipende sia da fattori intrinseci (età, sesso, specie, ecc.) sia da fattori estrinseci (alimentazione, sistema di allevamento), nonché dalla loro interazione.

Alcuni fattori intrinseci hanno effetti comuni su tutte le specie. Ne è un esempio il raggiungimento della maturità sessuale, il quale rappresenta un grave problema per la produzione di carne. Il testosterone e l'androsterone, ormoni steroidei prodotti dagli organi sessuali dei maschi interi maturi, si accumulano nel tessuto adiposo degli animali conferendogli il tipico odore di ferro o selvatico (Sellier et al. 2000; Quintanilla et al. 2003). La quantità di ormoni che si depositano nel grasso aumenta con l'età dell'animale fino a renderne la carne inaccettabile per il consumatore (Schoenfeldt et al., 2011).

Altri fattori sono, invece, peculiari di ogni specie e contribuiscono a sviluppare aromi ed odori specie-specifici. È il caso della composizione acidica della carne ovina. Tra gli acidi grassi responsabili del tipico aroma della carne ovina, un ruolo fondamentale è giocato da quelli a catena ramificata (Branched Chain Fatty Acids, BCFA), in particolare dall'acido 4-metilottanoico e dall'acido 4-metilnonanoico (Wong et al., 1975; Mottram, 1998). I carboidrati ingeriti con la dieta vengono metabolizzati dalla flora ruminale fino alla formazione di acidi grassi volatili a catena corta (acido propionico, acetico e butirrico). Nei piccoli ruminanti più che nei bovini, l'acido propionico promuove la biosintesi e l'accumulo di BCFA nel grasso corporeo (Vlaemink et al., 2006).

Altri fattori intraspecifici sembrano essere importanti nell'accumulo di BCFA nei tessuti, tra cui età e sesso. Agnelli macellati a 215 giorni di età presentavano una concentrazione di acido 4-metilottanoico e l'acido 4-metilnonanoico nel grasso significativamente maggiore rispetto a quella riscontrata in agnelli di 100 giorni di età e che avevano ricevuto la stessa dieta (Rousset-Akrim et al., 1997). Allo stesso modo, agnelli castrati e interi presentavano livelli diversi di BCFA con valori più elevati negli animali interi (Young et al., 2006).

Il processo di biosintesi endogeno degli acidi grassi a catena ramificata rappresenta un esempio interessante dell'interazione che, talvolta, può esistere tra fattori intrinseci ed estrinseci. L'accumulo di BCFA nel tessuto adiposo e nel grasso del muscolo, già particolarmente spinto nei piccoli ruminanti, può essere ulteriormente amplificato dalla dieta somministrata agli animali. Un eccesso di carboidrati non strutturali causa, infatti, un incremento della formazione di acido propionico a livello ruminale. Poiché esso rappresenta il principale precursore per

la gluconeogenesi nel fegato, quando la sua quantità supera la capacità del fegato di metabolizzarlo per la biosintesi di nuovi zuccheri, viene destinato alla produzione di BCFA (Vlaemink et al., 2006). Altri acidi grassi a catena dispari e ramificata vengono sintetizzati nel rumine come risultato della deaminazione e del metabolismo di sostanze azotate quali la valina, la leucina e l'isovalina quando l'apporto di carboidrati fermentescibili è troppo basso (Kaneda, 1991). Nonostante la correlazione positiva tra la concentrazione di BCFA e l'aroma di pecora, Young et al., (2006) suggeriscono che esso potrebbe essere molto forte anche quando la loro concentrazione non è elevata. Questo vuol dire che altri composti sono coinvolti nella formazione dell'aroma di pecora.

Oltre alle sostanze sintetizzate a livello endogeno, altre sostanze di origine esogena, o comunque riconducibili a fattori estrinseci contribuiscono alla formazione del flavour.

Nonostante le differenze culturali influiscano sulla percezione del flavour della carne ed esistano numerose variabili in grado di confondere i risultati delle ricerche (età dell'animale alla macellazione, peso vivo, marezatura, ecc), tutti gli studi condotti concordano sul fatto che esiste una differenza tra animali allevati al pascolo o alimentati con foraggi rispetto ad animali che hanno ricevuto concentrati o cereali (per review vedi Priolo et al., 2001; Schreurs et al., 2008). In particolare, è stato riscontrato un flavour molto intenso in animali alimentati al pascolo rispetto a quelli allevati con concentrati, definito come "selvatico", "fecale", "latteo", "di verro", "di cortile", "di pecora". Vista la correlazione tra questi aromi e il sistema di allevamento, sono stati raggruppati sotto il termine generico di "pascolo" (Schreurs et al., 2008). Bisogna fare, tuttavia, attenzione a

non confondere l'indesiderabile aroma di pascolo con quello normale distintivo della carne ovina e che rappresenta un fattore importante per le scelte dei consumatori. Senza dubbio l'alimentazione rappresenta in assoluto la fonte più importante di composti che contribuiranno a formare il flavour della carne. Una possibilità è che le sostanze aromatiche ingerite con la dieta possano essere assorbite e trasferite inalterate al muscolo e al tessuto adiposo. In realtà la maggior parte dei nutrienti assunti con la dieta vengono dapprima modificati dalle fermentazioni ruminali, assorbiti dall'intestino per poi essere ulteriormente metabolizzati e, infine, essere parzialmente escreti o depositati nei muscoli e nel grasso. I diversi costituenti aromatici e non (e i relativi loro prodotti di degradazione) che caratterizzano i pascoli e i foraggi tra cui la clorofilla e composti secondari come tannini e terpeni, contribuiscono a differenziare direttamente o indirettamente l'aroma della carne in funzione del regime alimentare con cui gli animali sono stati allevati (Vasta e Priolo, 2006).

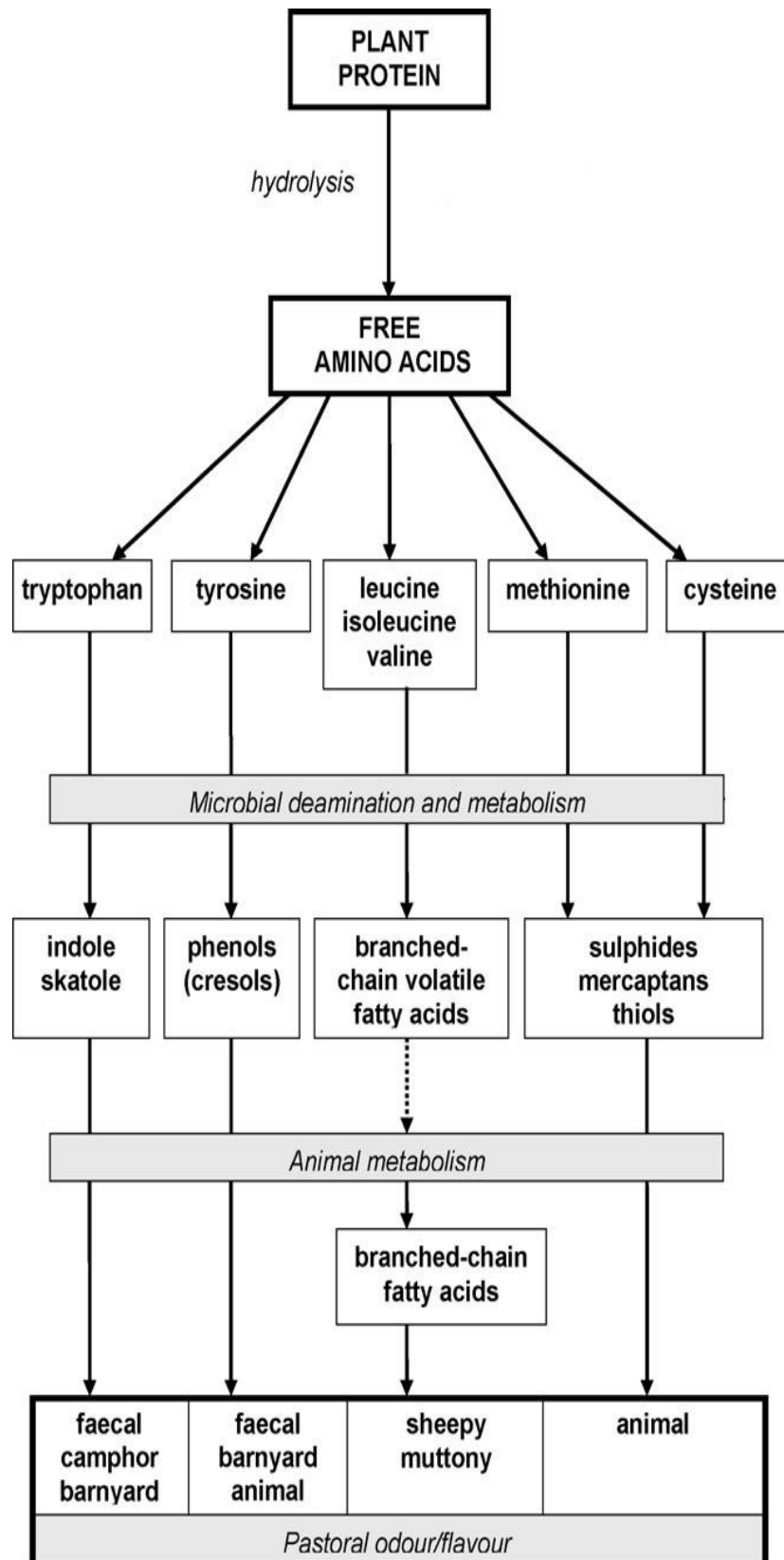
Una vasta gamma di queste sostanze tra cui composti sulfurei, fenolici, indolo e scatolo si originano dalle fermentazioni a livello ruminale delle sostanze azotate ingerite con la dieta (Serrano et al., 2001). Le proteine assunte tramite la dieta per poter essere digerite ed utilizzate dalla microflora ruminale e dall'animale devono prima essere solubilizzate (Min et al., 2000). La solubilizzazione consiste nella liberazione delle proteine vegetali nel rumine: in conseguenza della masticazione, le cellule vegetali vengono rotte e le sostanze azotate contenute nel lume cellulare vengono liberate nel rumine. Qui subiscono la degradazione operata dagli enzimi della microflora ruminale. Il risultato della combinazione dei processi di solubilizzazione e degradazione delle proteine sono i loro costituenti elementari,

ovvero peptidi ed amminoacidi. Una parte di essi lascia il ruminante tal quale e viene assorbita dall'intestino. Il destino della restante parte di peptidi ed amminoacidi varia in funzione della disponibilità energetica, rappresentata dai carboidrati fermentescibili, della microflora. In presenza di una sufficiente fonte di energia, peptidi e amminoacidi vengono utilizzati per la biosintesi di proteine batteriche; quando l'energia non è più sufficiente, i composti azotati vengono essi stessi utilizzati come fonte energetica e quindi ulteriormente degradati e metabolizzati, e alcuni di essi come ad esempio il triptofano danno vita a nuove sostanze con potere aromatico che vengono escrete tramite le feci e le urine, ma che in parte vengono anche assorbite e trasferite al muscolo e al grasso andando a costituirne l'aroma (Deslandes et al., 2001). Di conseguenza il regime alimentare e in particolare il rapporto tra carboidrati fermentescibili e proteine, nonché la natura delle proteine rappresenta un fattore essenziale nel determinare l'aroma della carne. È noto che i foraggi verdi e il pascolo presentano un rapporto carboidrati:proteine-fermentescibile molto elevato e che le loro proteine sono molto più solubili rispetto a quelle di cereali e concentrati (Prache et al., 2005). La conseguenza di queste caratteristiche è che la disponibilità di amminoacidi e peptidi, in seguito all'ingestione di una dieta basata su pascolo o foraggi verdi, eccede l'energia necessaria per la biosintesi di nuove proteine e che per questo motivo la componente estranea dell'aroma della carne sarà predominante.

Tra i prodotti della degradazione proteica (Fig. 6), i composti sulfurei e fenolici, scatolo e indolo rivestono particolare importanza nel conferire alla carne un flavour sgradevole. Essi possono essere percepiti anche quando sono presenti in quantità molto basse. Per lo scopo del presente lavoro di tesi, scatolo e indolo

verranno trattati in una sezione a se stante. Per quanto riguarda i composti sulfurei, in condizione di anaerobiosi i batteri convertono gli aminoacidi contenenti atomi di zolfo (metionina, cisteina e cistina) in solfiti e mercaptani (Le et al., 2005) facendo aumentare l'odore fecale e latteo. Per quel che concerne i composti fenolici, i più rappresentativi sono il 3-metilfenolo e il 4-metilfenolo, derivanti rispettivamente dalla fermentazione delle fibre vegetali e della lignina in particolare e dalla fermentazione della tirosina (Fraser et al., 2003).

Figura 6 – Meccanismo di produzione di sostanze aromatiche a partire da sostanze azotate.
(Fonte Schreurs et al., 2008)



3. Scatòlo e indolo

L'indolo (Fig. 7) e lo scatòlo (Fig. 8) sono composti volatili solubili in acqua, alcol, benzene e cloroformio. Chimicamente sono composti eterociclici aromatici. L'indolo (2,3-benzopirrolo) è costituito da un anello pirrolico saldato ad un anello benzenico; lo scatòlo deriva dall'indolo per sostituzione di un atomo di idrogeno con un gruppo metilico in posizione 3 dell'anello pirrolico (3-metil-indolo).

Figura 7 - Struttura dell'indolo

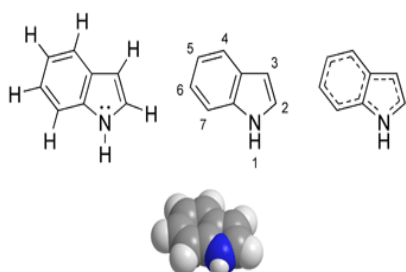
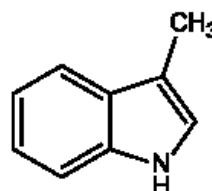


Figura 8 - Struttura dell'indolo



Entrambi i composti sono stati isolati dalle feci dei mammiferi come conseguenza del metabolismo batterico della flora ruminale nei poligastrici e di quella intestinale nei monogastrici (Merck, 1984). Oltre che per azione dei microrganismi, questi composti possono formarsi dalla pirrolisi del triptofano ed essere sintetizzati per reazione dell'idrossido di potassio con l'albumina della uova e sono stati ritrovati nelle feci degli uccelli, nel fumo di sigaretta e nel catrame (Merck, 1984; Thornton-Manning et al., 1993).

Inizialmente, la presenza dei composti di derivazione indolica negli alimenti, ed in particolare lo scatòlo, è stata studiata perché ritenuta responsabile dell'insorgenza di diverse malattie umane ed animali tra cui la schizofrenia, il coma epatico, il cancro al colon e alla vescica, l'edema e l'enfisema polmonare nei bovini

(Yokoyama e Carlson, 1979). Nonostante il nome della malattia, l'edema e l'enfisema polmonare non riguardano solo la specie bovina, ma tutti i ruminanti, gli equidi e l'uomo (Linden et al. 1996).

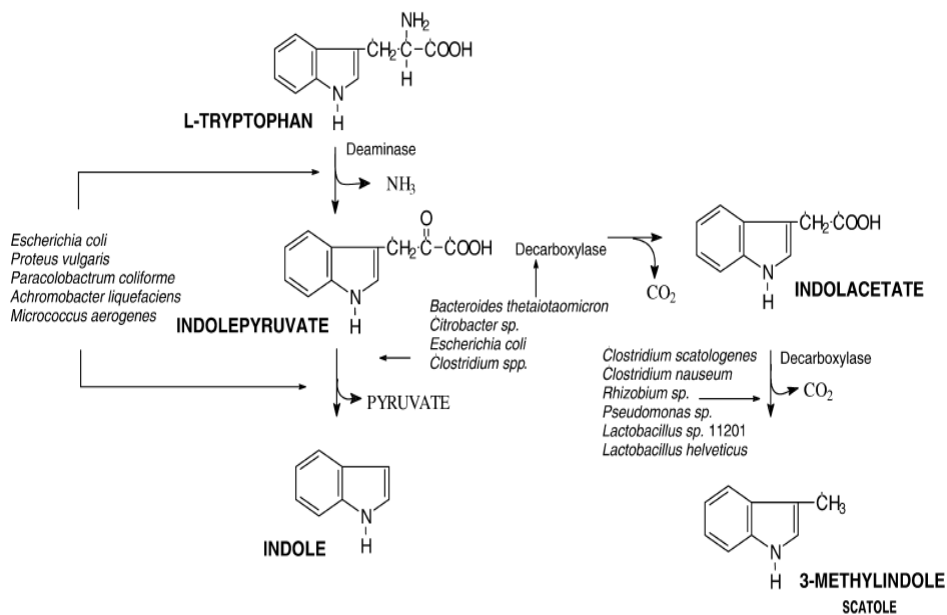
Nel circolo sanguigno, lo scatòlo agisce da pneumotossina altamente selettiva per l'apparato respiratorio, ma non provoca gravi danni ai tessuti e agli organi extra-polmonari. Viene attivato dal citocromo P450, una superfamiglia enzimatica di emoproteine presenti in tutti i domini viventi appartenente alla sottoclasse enzimatica delle ossidasi a funzione mista, responsabili della detossificazione delle sostanze xenobiotiche. Nei ruminanti, il citocromo P450 agisce formando con lo scatòlo un macromolecola che causa la perossidazione dei lipidi cellulari determinandone la degenerazione e la necrosi (Thornton-Manning et al., 1993). La capacità dello scatòlo di distruggere le membrane biologiche è dovuta alla sua lipofilia; infatti, grazie a questa caratteristica si infila nel doppio strato lipidico delle membrane cellulari, riducendone la fluidità e la mobilità dell'acqua causando una elevata instabilità (Bray et al., 1975). Secondo quanto riportato da Robic et al. (2008), i suini non sono sensibili alla tossicità dello scatòlo perché metabolizzano lo scatòlo in maniera diversa dalle altre specie. La detossificazione dello scatolo nei suini prevede una prima fase, simile a quella osservata nelle altre specie, che coinvolge il pool enzimatico P450; una seconda fase in cui lo scatolo viene solfatato per mezzo di una fenol-zolfotransferasi, a formare una molecola non in grado di destabilizzare la struttura della membrana cellulare.

3.1. Biosintesi dei composti indolici e influenza sulla qualità della carne

La biosintesi dell'indolo e dello scatolo (Fig. 9) avviene a livello del rumine per i poligastrici e a livello dell'intestino cieco e del colon per i monogastrici (suini). Nonostante questa differenza, il processo biosintetico risulta simile grazie al fatto che la flora batterica del rumine non è molto dissimile da quella che popola la porzione distale dell'intestino dei suini. L'unica differenza risiede pertanto nella sede di origine del triptofano: nei ruminanti esso deriva dai processi digestivi operati dai batteri ruminanti a carico della componente proteica della dieta, mentre nei monogastrici deriva dalla digestione della componente proteica della dieta che avviene nella porzione prossimale dell'intestino. Inoltre, poiché l'acido indolacetico (precursore dello scatolo) è naturalmente presente nei vegetali, parte dello scatolo viene prodotto direttamente dall'acido indolacetico ingerito mediante la dieta (Leveau et al., 2008).

In condizioni di anaerobiosi, in seguito all'azione di una deaminasi batterica, il triptofano perde un gruppo amminico e viene trasformato in indolpiruvato; questo può seguire due destini differenti: 1) essere degradato ad indolo dagli enzimi batterici mediante l'idrolisi del piruvato; 2) essere decarbossilato ad acido indolacetico, il quale può a sua volta essere ulteriormente decarbossilato e convertito in scatolo.

Figura 9 - Biosintesi dello scatolo e dell'indolo. Fonte Schreurs et al., 2008.



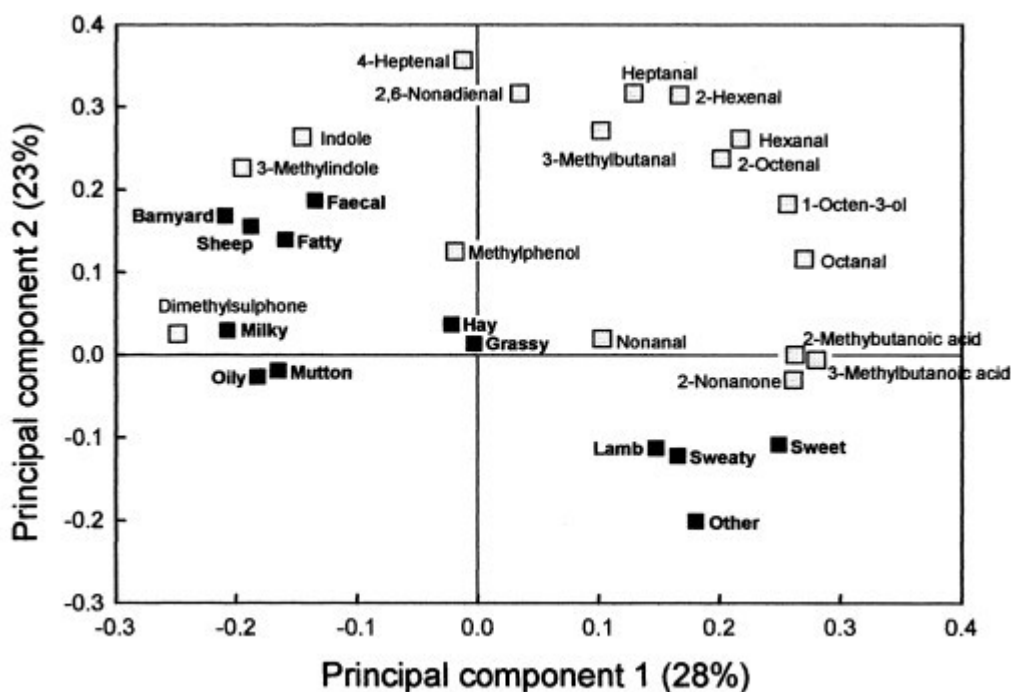
Entrambi questi prodotti rappresentano i prodotti finali della degradazione del triptofano, il che significa che non verranno ulteriormente trasformati, ma che potranno essere assorbiti nel ciclo ematico per essere depositati nei tessuti o escreti. È, infatti, stato dimostrato che la presenza di questi composti raggiunge il livello massimo nel sangue di bovini e caprini circa 12-24h dopo l'ingestione della fonte di triptofano per poi diminuire costantemente se non viene somministrata una nuova fonte dell'aminoacido (Hammond, 1984; Hammond et al., 1984). Tuttavia, fonti più recenti indicano che le massime concentrazioni di indolo e scatolo si raggiungono 1-2 ore dopo la fine del pasto, indicando pertanto un rapido assorbimento ruminale (Schreurs et al., 2007b)

Le vie di escrezione sono diverse: scatolo e indolo si possono infatti trovare nelle urine e nelle feci (Spiehs et al., 2011) ma anche nel latte (Roy et al., 2004). L'accumulo invece avviene preferenzialmente nel tessuto adiposo tanto da poter

essere utilizzato come parametro per tracciare il sistema di allevamento e l'alimentazione dei ruminanti (Vasta e Priolo 2006; Serrano et al., 2011).

La capacità di queste due molecole di conferire l'aroma fecale ai prodotti di origine animale dipende dalla loro concentrazione nell'alimento: se presenti in piccolissime quantità essi conferiscono un piacevole aroma di tipo floreale e di panna dolce, ma non appena si oltrepassa un valore soglia l'aroma si trasforma in un inaccettabile odore di feci (Peterson e Reineccius, 2003). Sebbene sia comunemente accettato che lo scatolo sia il principale responsabile nel conferire alla carne un inaccettabile aroma fecale, gli studi effettuati su specie diverse forniscono risultati a volte contrastanti. Young et al. (2003) hanno fornito evidenze dirette sia strumentali sia sensoriali dell'effetto che lo scatolo nel grasso della carne di agnelli allevati al pascolo ha sul flavour. La gascromatografia olfattometrica ha dimostrato che, tra tutti, lo scatolo era l'unico composto odoroso in grado di fornire il distintivo odore fecale; inoltre, un'analisi alle componenti principali della percezione odorosa registrata da un panel addestrato, ha mostrato che l'odore di feci (Faecal) e l'aroma "di pascolo" (insieme di faecal, Sheep barnyard) erano associati alla presenza di scatolo e indolo (Fig. 10). Per la carne suina il ruolo dello scatolo non è ancora così chiaro: Rius et al. (2001) hanno constatato la percezione di aroma fecale anche in presenza di basse concentrazioni di scatolo, attribuendo un ruolo più importante agli ormoni androgeni accumulatisi nella carne.

Figura 10 – Relazione tra sostanze aromatiche e flavour. Fonte: Young et al., 2003.



3.2. Fattori che influiscono sull'accumulo dei composti indolici

L'andamento della biosintesi dell'indolo e dello scatolo è influenzato da diversi fattori come la velocità di transito nel ruminante o nell'intestino, la velocità con cui vengono escreti, lo stato nutrizionale dell'animale, ma di fondamentale importanza sono la tipologia di microrganismi che popolano l'apparato digerente e la dieta somministrata agli animali (Zamaratskaia et al., 2009).

Riguardo la microflora, un'ampia gamma di microrganismi (*Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Paracolobactrum coliforme*, *Achromobacter liquefaciens*, *Micrococcus erogene*) e diversi protozoi sono in grado di produrre l'indolo perché possiedono la triptofanasi, un enzima batterico che catalizza reversibilmente la scissione della catena laterale del triptofano con formazione di indolo, ammoniaca e acido piruvico. La triptofanasi viene attivata dalla presenza di triptofano e

repressa dalla presenza di glucosio (Yokoyama e Carlson, 1979); vista la diffusione di questo enzima in molte specie batteriche, la produzione di indolo viene utilizzato come test diagnostico di routine per valutare l'attività metabolica della flora intestinale (Deslandes et al., 2006).

A differenza dell'indolo e dell'acido indolacetico, lo scatòlo viene prodotto da un numero limitato di microrganismi, in particolare lattobacilli e clostridi, ma non dai protozoi (Whitehead et al., 2008). Tuttavia, la contemporanea presenza di protozoi sembra aumentare la capacità dei batteri di produrre scatòlo (Mohammed et al., 2003); probabilmente, il metabolismo dei protozoi mette a disposizione una maggiore quantità di intermedi che possono essere trasformati in scatòlo. Deslandes et al. (2001) riportano sei specie di batteri in grado di produrre scatòlo: *Clostridium scatòlogenes*, *Clostridium nauseum*, *Pseudomonas sp.*, *Rhizobium sp.*, *Lactobacillus helveticus* e *Lactobacillus sp.* Strain 11201. Tra questi, l'unico batterio in grado di produrre lo scatòlo direttamente dal triptofano è il *Clostridium scatòlogenes* (Cook et al., 2007). In maniera simile a quanto visto per l'apparato respiratorio, lo scatòlo sembra presentare un'attività tossica anche nei confronti dei microrganismi. La sua presenza inibisce, infatti, la crescita microbica fatta eccezione per il *Lactobacillus sp.* Strain 11201, che riesce a sopravvivere in un ambiente con concentrazione di scatòlo fino a 700 µg/ml (Cook et al., 2007). Ad oggi, dalle ricerche effettuate in letteratura, non è presente alcuno studio che abbia investigato l'effetto diretto dell'alimentazione sulla crescita microbica dei diversi batteri che sintetizzano indolo e scatolo. Tuttavia, sono stati eseguiti alcuni studi *in vitro* relativi all'effetto del pH e della temperatura sulla proliferazione di tali microbi. In particolare, Honeyfield e Carlson (1990) hanno osservato che i livelli

massimi di crescita microbica si ottenevano a una temperatura di circa 37 °C e valori di pH compresi tra 5 e 7.5. Più recentemente, Liou et al. (2005) e Doerner et al. (2009) hanno confermato questi risultati relativamente al *Clostridium scatologenes*; questi autori hanno infatti osservato che il batterio si riproduce due volte più velocemente alla temperatura di 37 °C con un pH di 6.0 rispetto alla condizione di neutralità (pH=7.0).

Così come descritto per gli altri prodotti della degradazione proteica, anche per i prodotti di derivazione indolica, la dieta, ed in particolare il rapporto tra carboidrati fermentescibili e proteine, rappresenta un fattore determinante nella biosintesi dell'indolo e dello scatolo (vedi paragrafo 2.2). In tabella 3 sono riportati i valori del rapporto tra carboidrati-fermentescibili e proteine di alcune essenze foraggere e di concentrati somministrati agli animali in diverse prove sperimentali.

Tabella 3 - Rapporto Carboidrati-fermentescibili:Proteina in diversi alimenti zootecnici

	Carboidrati fermentescibili Proteina grezza	Autore
Pascolo naturale	0.73	Young et al., 2003
<i>Lolium multiflorum</i>	0.87	Gregorini et al., 2007
<i>Dactylis Glomerata</i>	0.80	Gregorini et al., 2008
<i>Tripsacum dactyloides</i>	0.84	Huntington et al., 2007
<i>Medicago sativa</i>	0.42	Burns et al., 2005
Fieno di erba medica	0.55	Burns et al., 2007
Fieno di erba medica	0.59	Avondo et al., 2009
Concentrato a base di erba medica	1.3	Pagano et al., 2012
Concentrato a base di erba medica	1.76	Young et al., 2003
Concentrato a base di mais	2.93	Young et al., 2003

Come si può osservare, i concentrati mostrano valori più elevati dei foraggi; tra questi ultimi, i foraggi verdi hanno rapporti più alti rispetto ai foraggi essiccati. Secondo quanto riportato da Sheat et al. (2001), per sostenere il metabolismo batterico è fondamentale sincronizzare la presenza di un'adeguata quantità di proteine e di energia, sottoforma di carboidrati fermentescibili. Infatti, in presenza di un basso rapporto tra carboidrati e proteine, la carenza di energia disponibile per i batteri ruminali rende necessario l'utilizzo degli aminoacidi come fonte energetica determinando la formazione di indolo e scatolo. Per questo motivo l'accumulo dei composti che derivano dalla degradazione proteica è maggiore negli animali allevati al pascolo (in cui questo rapporto è sempre inferiore ad uno) rispetto a quelli allevati in stalla.

A supporto di quanto detto, in letteratura sono presenti numerosi articoli che confermano questa relazione. Young et al. (2003) hanno osservato l'accumulo di scatolo e di indolo nel grasso perirenale di agnelli alimentati al pascolo o in stalla con due concentrati a diverso rapporto carboidrati:proteine. Gli autori hanno riportato che l'indolo e lo scatolo erano significativamente più alti nel grasso perirenale degli animali che avevano utilizzato il pascolo rispetto a quelli che avevano ricevuto le due tipologie di concentrato; inoltre, dal confronto tra i due tipi di concentrati, si è evidenziato come l'accumulo di indolo e scatolo fosse più alto per il gruppo di animali che aveva ricevuto il concentrato con il rapporto carboidrati:proteine più basso. In uno studio simile in cui Priolo et al. (2009) avevano comparato la presenza di indolo e scatolo nel tessuto adiposo di agnelli allevati in stalla con un concentrato commerciale o con erba verde sfalciata, i risultati indicano che l'indolo e lo scatolo erano significativamente più alti nel

gruppo di animali che avevano ricevuto l'erba verde rispetto a quelli che avevano ricevuto il concentrato. In questo esperimento gli autori hanno valutato anche l'effetto della somministrazione di una fonte esterna di tannini condensati. I tannini sono composti secondari che si ritrovano in quantità variabili nei foraggi animali, i quali hanno la capacità di formare legami stabili con le proteine e con gli enzimi, sequestrandoli, e di ridurre il metabolismo batterico e quindi in teoria anche la produzione dei loro metaboliti. A conferma di ciò, gli autori riportano che la quantità di scatolo è risultata significativamente più bassa nel grasso degli animali cui era stata somministrata la fonte di tannini condensati rispetto a quelli che non l'avevano ricevuta. Un risultato simile era stato precedentemente riportato da Schreurs et al. (2007b) i quali avevano comparato la presenza di scatolo e indolo nel grasso della carne di agnelli alimentati con essenze foraggere a contenuto crescente di tannini condensati.

Per quel che riguarda l'effetto dell'alimentazione sull'accumulo dei derivati indolici nelle carni degli animali di specie bovina, sono stati riportati risultati simili a quanto ottenuto per la specie ovina. Serrano et al. (2011) hanno osservato che lo scatolo si accumulava in quantità minori nel tessuto adiposo di vitelli alimentati al pascolo cui veniva somministrato anche un concentrato ad libitum rispetto a vitelli alimentati al pascolo cui il concentrato veniva fornito, invece, in quantità limitata. Anche in questo caso gli autori hanno attribuito questo risultato al rapporto carboidrati:proteine, più alto nella dieta contenente la maggiore quantità di concentrato, e che quindi avrebbe ridotto la degradazione delle proteine a livello ruminale e la conseguente disponibilità di triptofano per la biosintesi batterica di indolo e scatolo. Recentemente, Vasta et al. (2011) hanno

osservato, per la prima volta, la presenza di scatolo nel muscolo longissimus dorsi di gruppi di giovenche alimentate rispettivamente solo al pascolo, solo con concentrato, con insilato e pascolo o con insilato, pascolo e un'integrazione di concentrato. Secondo quanto riportato da questo studio, lo scatolo si accumula anche nel muscolo in quantità minori quando la dieta è ricca di concentrati. Gli autori concludono, anche, che la presenza di scatolo nel muscolo può far parte di un pool di parametri da utilizzare al fine di risalire alla tipologia di alimentazione somministrata agli animali.

3.3. Strategie per ridurre l'accumulo

3.3.1. Castrazione

Ridurre l'accumulo dei composti responsabili di aromi sgradevoli nella carne è uno degli obiettivi fondamentali per gli allevatori e i produttori di carne. Gli approcci usati fino ad oggi hanno riguardato sia metodi in grado di inibire il passaggio alla maturità sessuale, sia metodi meno cruenti basati sullo studio di alimentazioni studiate per ridurre la biosintesi di indolo e scatolo.

La castrazione chirurgica è stata ampiamente usata nella specie suina per ridurre la concentrazione di scatolo nel grasso al di sotto del valore soglia di 0.20-0.25 ppm oltre il quale l'odore viene avvertito (Peterson e Reineccius, 2003), inoltre, la castrazione elimina la possibilità di accoppiamenti non programmati che metterebbero a rischio i programmi di selezione e riduce l'aggressività tipica dei suini interi. Questa tecnica non è, tuttavia, esente da problemi. Inoltre, la castrazione chirurgica avviene senza l'uso di anestesia e questo sembra causare un trauma nei piccoli suinetti, che, rispetto ai non castrati, presentano alcuni disturbi

comportamentali. I comportamenti anomali iniziano pochi giorni dopo l'intervento e proseguono nelle settimane successive (Hay et al., 2003): il sintomo più evidente è l'elevato livello di vocalizzazione mostrato dai maialini castrati rispetto a quelli non castrati e alle femmine (Marx et al., 2003). Gli stessi sintomi sono stati riscontrati anche nei suinetti castrati chirurgicamente ma su cui era stata eseguita l'anestesia. (McGlone et al., 1993). Allevare animali interi è senza dubbio più conveniente perché la conversione dei nutrienti e la crescita ponderale sono superiori le carcasse ottenute sono più magre rispetto a quelle dei suini castrati (Bañón et al., 2004). Anche a livello nutrizionale, la carne dei maiali interi è superiore grazie al più alto contenuto di proteine (Naděje et al., 2000).

Prove simili sono state effettuate anche sugli agnelli. Young et al. (2006), in uno studio avente come scopo quello di ridurre il livello di scatolo nella carne ovina prodotta in Australia in modo da renderla accettabile anche in altri paesi, hanno confrontato la quantità di scatolo e indolo nella carne di agnelli interi e castrati macellati in modo scalare in un arco di tempo distribuito su due anni. I risultati mostrano differenze significative tra animali interi che presentavano livelli di scatolo e indolo costantemente più alti dei castrati durante tutto l'arco dei due anni. Tuttavia, andando a valutare l'effetto della castrazione sul flavour, le differenze tra animali interi e castrati si perdevano già dopo i primi tre mesi di ingrasso, rendendo quindi inutile la castrazione.

Oltre a tutti i motivi legati al benessere animale e al maggior costo di alimentazione legati all'allevamento di animali castrati, la tecnica della castrazione non può essere perseguita come metodo per la riduzione della presenza di scatolo nelle carni in quanto messa al bando da sempre più paesi. Dal

2009 la castrazione è stata vietata nel Regno Unito e in Australia, dal 2010 in Svizzera e dal 2018 lo sarà nei paesi dell'Unione Europea.

3.3.2. Selezione genetica

I divieti sulla castrazione stanno stimolando la ricerca di strumenti alternativi finalizzati alla riduzione dello scatolo nei tessuti animali. Tra le possibili alternative si annoverano la selezione di genotipi animali che naturalmente producono meno scatolo (Gregersen et al., 2012) e lo studio di tecniche di alimentazione in grado di ridurre la produzione di scatolo e indolo. La selezione genetica ha riguardato particolarmente la specie suina. Un tipo di approccio si basa sull'individuazione di una regione del DNA correlata alla presenza di scatolo e indolo nella carne per poi analizzare la reale relazione tra il gene o i geni presenti in quella zona e la presenza dei composti indolici. Un altro metodo è quello di analizzare l'espressione di quei geni ritenuti potenzialmente coinvolti nel metabolismo dello scatolo. Recentemente, Moe et al. (2009) hanno compendiato i geni candidati ad avere un effetto sull'odore di verro nella carne suina.

3.3.3. Alimentazione

Nei ruminanti, la produzione di indolo e scatolo è dovuta all'intensa attività operata dalla microflora ruminale che, in assenza di ossigeno e in condizioni di un disequilibrio tra energia disponibile (zuccheri fermentescibili) e proteine solubili, degrada il triptofano per trarne energia. Le strategie alimentari volte a ridurre la produzione di indolo e scatolo devono, pertanto, essere volte ad aumentare il rapporto carboidrati-fermentescibili: proteine-solubili (Schreurs et al., 2008).

Inoltre, è ben noto che tramite la dieta è possibile selezionare la microflora che colonizza l'ambiente ruminale.

Secondo gli studi presenti in letteratura ed esaminati nel paragrafo precedente, la via più semplice per ridurre la produzione di scatolo e indolo è quella di somministrare agli animali una dieta a base di concentrati. Tutti gli studi concordano sul fatto che il flavour fecale e pastorale si riduce drasticamente quando il pascolo rappresenta una quota minoritaria della dieta animale. Priolo et al. (2009) hanno osservato i livelli di scatolo e di indolo nel liquido ruminale e nel grasso perirenale di agnelli alimentati con erba fresca e con concentrati; i risultati mostrano, indiscutibilmente, come i livelli di scatolo e di indolo fossero il doppio nel grasso degli agnelli alimentati con erba rispetto a quelli alimentati concentrati. Questa soluzione, pur se semplice tecnicamente, è difficilmente applicabile a causa dei costi di gestione che si genererebbero. Infatti, l'utilizzo del pascolo naturale rappresenta un efficace metodo di riduzione dei costi di produzione che consente di rendere economicamente sostenibile l'attività di allevamento, in particolar modo nell'allevamento dei piccoli ruminanti in zone svantaggiate come quelle dell'area mediterranea (Galanopoulos et al., 2011).

Un periodo di finissaggio basato su concentrati potrebbe ridurre sia i costi sia l'effetto del pascolo sul flavour della carne (Leao et al., 2012), d'altro canto è stato osservato che spostando gli animali dal pascolo in stalla, si ottiene un iniziale e repentino calo del livello di scatolo che nel grasso perirenale rimane stabile a partire dalla seconda settimana successiva al cambio di alimentazione (Priolo et al., 2001 citato da Vasta e Priolo, 2006).

Anche l'utilizzo di essenze di pascolo diverse potrebbe contribuire a ridurre la formazione dello scatolo. Schreurs et al. (2007a) hanno riportato differenze di flavour derivanti dall'uso di specie vegetali con differente attitudine a generare indolo e scatolo. Queste differenze sono legate alla concentrazione di proteine grezze, nonché alla loro solubilità e degradabilità a livello ruminale sia in vivo (Schreurs et al., 2007b) sia in vitro (Schreurs et al., 2007a) che si è tradotta in una diversa produzione di scatolo e indolo. Schreurs et al. (2008) hanno raccolto in una tabella l'effetto di alcune essenze vegetali sul flavour (Tab. 3) derivante da una diversa biosintesi ruminale ed accumulo di indolo e scatolo nei tessuti esaminati, tuttavia gli autori non escludono che i diversi effetti possano essere dovuti anche alla presenza di altri derivati azotati sintetizzati a livello ruminale.

Tabella 4 – Influenza dei diversi foraggi sul flavour della carne ovina - Fonte Schreurs et al. (2008)

Reference	Forage diets	Meat Floavour/odour results
Cramer et al. (1967)	White clover, perennial ryegrass	Feeding clover gave a stronger flavour compared to feeding ryegrass
Shorland et al. (1970)	White clover, perennial ryegrass	Feeding clover gave a stronger flavour compared to feeding ryegrass
Nicol and Jagusch (1971)	Lucerne, ryegrass pasture	Lucerne gave more intense odour
Nixon (1981)	Lotus pedunculatus, red clover, white clover, Lucerne, perennial ryegrass	Off-flavours more predominant
Bailey et al. (1994), Trial 2	Lotus corniculatus, Lucerne, perennial ryegrass, white clover	No difference in flavour intensity
Fraser et al. (2004)	Red clover, lucerne, perennial ryegrass	No difference in flavour between
Schreurs et al. (2007b)	White clover, perennial ryegrass	Overall flavour intensity was higher from lambs fed white clover

Di particolare interesse è l'idea di sfruttare sostanze naturalmente presenti nei vegetali in grado di interferire con il metabolismo della microflora ruminale. I tannini condensati (TC) sono composti fenolici che si trovano nelle cellule di molte specie vegetali usate come foraggi, in grado di formare complessi insolubili con le proteine proteggendole dall'attacco degli enzimi ruminali e rallentandone la

degradazione (Min et al., 2003). Allo stesso modo i TC possono formare complessi con gli enzimi dei batteri del ruminale interferendo con la normale attività (Molan et al., 2001, Vasta et al., 2009a). Min et al. (2002) hanno riscontrato un'attività batteriostatica nei confronti di batteri proteolitici. I TC esplicano la loro azione anche nei confronti dei protozoi (Vasta et al., 2010), anch'essi coinvolti nella produzione di indolo.

Basandosi sul presupposto che i tannini condensati possano avere un effetto inibitorio sull'attività proteolitica dei batteri ruminali, sono stati effettuati diversi studi per valutare l'impatto che i TC hanno sulla produzione di indolo e scatolo, che confermano la loro capacità di inibirne la produzione.

Schreurs et al. (2007a,b) hanno messo a confronto tre essenze foraggere (Loglio perenne, sulla e trifoglio bianco) contenenti diverse quantità di tannini o privi di TC. Sebbene la quantità di proteina grezza non differisse significativamente tra i tre foraggi, la quantità di scatolo e indolo prodotta era inversamente proporzionale alla quantità di tannini presenti. Lo stesso risultato è stato ottenuto sia in vitro (Schreurs et al., 2007a) sia in vivo (Schreurs et al., 2007b). Ad ulteriore conferma del ruolo dei TC nell'inibire la produzione di scatolo ed indolo, nell'esperimento in vitro fu aggiunto polietilene glicole (PEG), un polimero in grado di legarsi ai TC con maggiore affinità rispetto alle proteine e creare complessi stabili. Il risultato fu un netto incremento della produzione di indolo e/o scatolo.

Tuttavia, l'effetto dei TC dipende anche dalla loro concentrazione. Priolo et al. (2005) mettendo a confronto una dieta di sola sulla (leguminosa foraggera contenente TC) con una dieta a base di concentrati, osservarono una maggiore quantità di scatolo nel grasso perirenale degli agnelli alimentati con foraggio.

Questo risultato sembrava essere in contrasto con quanto riportato precedentemente in letteratura e in particolare con uno studio simile effettuato per studiare la relazione tra i TC presenti nella sulla e la presenza di scatolo nel latte (Roy et al., 2004). Questi ultimi autori osservarono una riduzione della concentrazione di scatolo nel latte come conseguenza della somministrazione di *Hedysarum coronarium*. Priolo et al. (2005) conclusero ipotizzando che la quantità di TC forniti con la sulla non era sufficientemente elevata per produrre un effetto sulla microflora ruminale. In esperimenti in vitro, Schreurs et al. (2007a) riportano una riduzione tra il 20 e il 45% della produzione di scatolo come conseguenza della presenza dei tannini pari a 35g/kg di sostanza secca. Secondo gli autori, la variabilità dei risultati ottenuta con lo stesso livello di tannini condensati potrebbe essere ascritta alla tipologia di tannini condensati utilizzati. In un esperimento successivo, Priolo et al. (2009) per studiare l'effetto dei TC sulla produzione di scatolo e indolo e sul flavour della carne di agnelli alimentati con erba fresca (veccia, foraggera leguminosa non contenente TC) o concentrato, hanno aggiunto alle diete una fonte di tannini esterna, costituita da polvere di quebracho (*Schinopsis lorentzii*), in quantità sufficiente (40 g/kg SS) ad avere un effetto sulla popolazione ruminale. I risultati di questo studio evidenziano una riduzione significativa della concentrazione di scatolo nel liquido ruminale e nel grasso caudale come conseguenza della somministrazione TC.

Infine, un'ultima strada da seguire è quella di aumentare l'apporto di carboidrati altamente fermentescibili in modo da ridurre il rapporto carboidrati:proteine. Questo fornirebbe ai batteri ruminali l'energia necessaria per incorporare gli aminoacidi nelle proteine batteriche evitando il metabolismo del

triptofano e la conseguente produzione di indolo e scatolo. Mohammed et al. (2003), hanno dimostrato *in vitro* che è possibile ridurre da due a quattro volte la produzione di indolo e scatolo da triptofano, semplicemente aggiungendo al terreno di coltura amido o glucosio. In un esperimento eseguito *in vivo* su bovini da latte, Tavandale et al. (2006) hanno osservato che l'uso di una varietà di loglio ad alto contenuto di zuccheri ha ridotto significativamente la quantità di scatolo, indolo e *p*-cresolo nel latte rispetto alla varietà standard. Ad oggi nessuno studio del genere è stato effettuato sulla specie ovina.

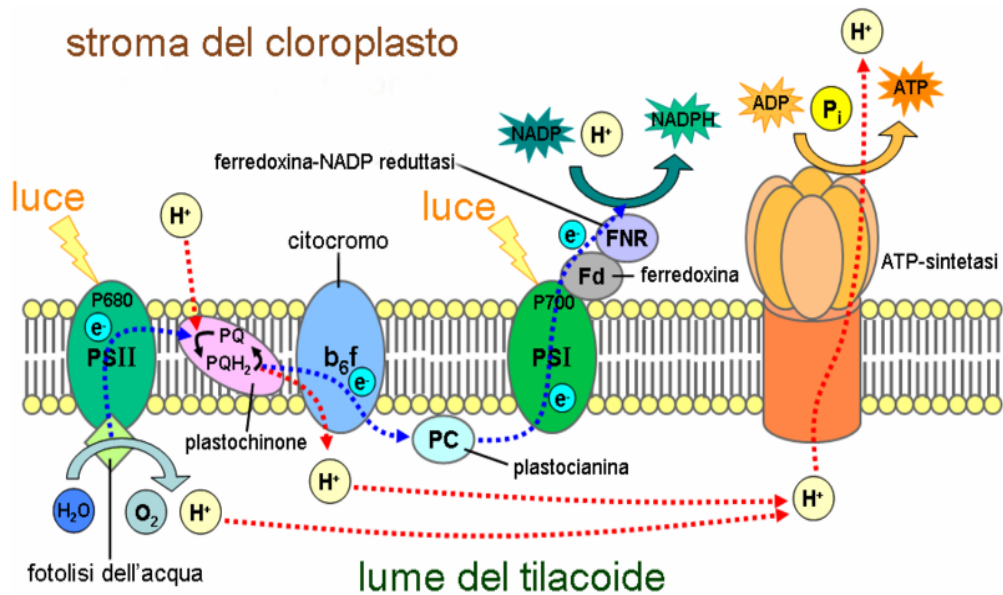
4. Variazione della composizione del pascolo ed effetti sull'ingestione

I fattori che influiscono sulla composizione chimica del foraggio sono molteplici. Innanzitutto la specie: in generale, le graminacee presentano, rispetto alle leguminose, un quantitativo di carboidrati superiore; per contro le leguminose sono più ricche di proteine. Lo stadio fenologico influisce in maniera importante sul contenuto di fibra: le piante che si trovano in uno stato fenologico avanzato hanno percentuali di NDF e lignina nettamente superiore, ma contenuto in proteine e zuccheri solubili (Water Soluble Carbohydrate, WSC) inferiore rispetto alle piante in fase di accrescimento.

L'irradiazione luminosa ha un ruolo essenziale nel fare variare il contenuto di WSC nell'arco della giornata e anche da un giorno all'altro. Durante il giorno, infatti, la radiazione solare consente l'attività di fotosintesi, il cui prodotto è rappresentato proprio dai WSC. La fotosintesi clorofilliana avviene per tappe riunibili in due fasi: 1. la fase luminosa (o fase luce-dipendente), dipendente dalla luce (Fig 11) ; 2. la fase di fissazione del carbonio (o fase oscura, indipendente dalla luce) di cui fa parte il ciclo di Calvin. Il ruolo della prima fase è quello di sfruttare l'energia della luce per produrre l'energia necessaria a fissare il carbonio nella seconda fase della fotosintesi. La seconda fase viene anche definita fase al buio, ma questo termine potrebbe essere fuorviante, in quanto non si riferisce all'assenza della luce dato che alcuni enzimi coinvolti in questa fase sono direttamente attivati proprio dalla luce, ma al fatto che non dipende strettamente dall'irradiazione solare, tanto che avviene contemporaneamente alla fase luminosa e non di notte. Infatti in assenza di luce si ha scarsità di ATP e NADPH, che si

formano durante la fase luminosa e gli stomi si chiudono, dunque non vi è accesso di CO₂.

Figura 11 - Fase I della fotosintesi – Fonte: http://it.wikipedia.org/wiki/File:Reazioni_luce-dipendenti.png



Il glucosio è il principale prodotto della fotosintesi, e da esso derivano altri zuccheri semplici. In condizioni di irradiazione solare ottimale, la quantità di WSC sintetizzati dalla pianta supera i fabbisogni metabolici e tali composti possono essere quindi accumulati per poi essere utilizzati durante la notte per la respirazione e per la crescita (Burner e Belesky, 2004; Watts e Chatterton, 2004).

L'incremento della concentrazione di WSC in rapporto alle ore di esposizione alla luce negli organi epigei delle piante è stato riportato da molti autori su diverse specie foraggere. Gregorini et al. (2008) hanno riportato un incremento del 64% degli zuccheri non strutturali in *Dactylis glomerata L.* tra la mattina e le prime ore del pomeriggio; in un esperimento su *Lolium multiflorum*, l'incremento di WSC è

stato pari al 33% (Gregorini et al., 2007). Risultati simili sono stati ottenuti anche con altre essenze: *Medicago sativa* L. (Burns et al., 2007), *Lolium perenne* (Avondo et al., 2008), *Festuca arundinacea* Schreb. (Fischer et al., 1999). Secondo quanto riportato da questi autori, il rapporto tra WSC e proteine tende a crescere nell'arco della giornata sia grazie all'incremento di WSC sia a causa della contemporanea diminuzione delle proteine. È, infatti, stata riportata una correlazione negativa tra l'andamento della biosintesi dei WSC e delle proteine nei vegetali (Elgersma et al. 2005; Tas et al. 2005).

Il livello di WSC nelle foraggere può influire sulla loro appetibilità e quindi sui livelli di ingestione. Maylland et al. (2000) hanno dimostrato che la composizione chimica, e in particolare il livello di carboidrati presente nei diversi organi vegetativi della pianta, gioca un ruolo fondamentale nella selezione al pascolo di un'essenza foraggera o di una particolare porzione della pianta. I livelli di ingestione dei ruminanti sembrano, infatti, essere positivamente correlati alla quantità di zuccheri solubili. Tava et al. (1995) hanno osservato nella specie ovina una preferenza per le cultivar di *Festuca arundinacea* Scherb. più ricche di WSC rispetto a quelle con un minore contenuto (133 vs 108 g/kg); Avondo et al. (2008) hanno osservato in capre al pascolo su *Lolium perenne* un'ingestione maggiore nelle ore pomeridiane rispetto alla mattina, attribuendo questo risultato alla maggiore concentrazione di WSC.

La possibilità di sfruttare la variazione della quantità di WSC nelle piante durante la giornata al fine di ottimizzare l'uso del pascolo e aumentare il rapporto carboidrati:proteine della dieta animale è stata studiata nei piccoli ruminanti. Avondo et al. (2008) hanno valutato l'effetto della variazione dell'orario di

pascolamento sulla composizione chimica del latte di capra. Gli autori hanno osservato un significativo aumento della percentuale di proteina totale nel latte ottenuto dagli animali che pascolavano il pomeriggio rispetto al mattino. Tale risultato è stato attribuito al miglior rapporto carboidrati:proteine:WSC della dieta ingerita al pomeriggio. L'incremento di zuccheri solubili, avrebbe favorito un miglior utilizzo dei nutrienti a livello ruminale con una maggiore disponibilità per l'animale dei precursori necessari alla biosintesi delle proteine del latte. Questo risultato sembrerebbe confermato anche dal dato relativo all'urea, indicatore dell'utilizzo delle proteine alimentari, che è risultato significativamente più basso nel latte degli animali che utilizzavano il pascolo nel pomeriggio rispetto al latte prodotto dagli animali che pascolavano la mattina.

PARTE SPERIMENTALE

5. Scopo del lavoro

Nel bacino Mediterraneo, la maggior parte del territorio destinato al pascolamento degli animali è rappresentato da pascoli naturali (Ruiz et al., 2009). Molto spesso, il foraggio ottenuto da questi pascoli è di scarsa qualità, o quand'anche di buona qualità, non è disponibile per l'intero periodo dell'anno. Quantità e qualità delle essenze foraggere pascolive naturali sono, infatti, fortemente condizionate dall'effetto stagione. Uno studio svolto in Tunisia della durata di due anni, riporta significative differenze stagionali sia della disponibilità sia della qualità della biomassa del pascolo naturale (Chemmam et al., 2009). Durante il periodo primaverile la quantità di biomassa prodotta era pari a 1.5 tonnellate SS/ha con una percentuale media di proteina grezza del 15%, in autunno la disponibilità scendeva a 1.2 tonnellate SS/ha con solo il 9% di proteina grezza. Variazioni quantitative ancora più ampie sono state riscontrate da Molénat et al. (2005) in uno studio simile condotto per valutare le caratteristiche del pascolo della regione di Causse nel sud della Francia. La biomassa disponibile, infatti, variava da un minimo di 0.2 t SS/ha in autunno ad un massimo di 1.0 t SS/ha in primavera.

Nonostante i limiti su descritti, il pascolo rimane spesso il sistema di elezione (o spesso l'unica forma di allevamento possibile) nelle zone povere e svantaggiate e per le produzioni meno redditizie a causa degli elevati costi di gestione che derivano da un sistema di allevamento intensivo (Castel et al., 2011). Di conseguenza, la principale sfida sembra essere quella di ottimizzare l'utilizzo delle risorse naturali a disposizione del bestiame greggi mantenendo elevati gli standard quali-quantitativi delle produzioni. In questo senso, la riscoperta e il miglioramento di pratiche tradizionali potrebbe contribuire a questo scopo. Il

pascolamento misto, cioè la contemporanea presenza di diverse specie animali nello stesso appezzamento nello stesso tempo, la gestione collettiva e condivisa di un medesimo pascolo sono alcune delle pratiche utilizzate nel passato e di cui è stata dimostrata l'efficienza (Hadjigeorgiou et al., 2005).

Un'altra pratica comunemente usata nel bacino Mediterraneo, in particolare per l'allevamento dei piccoli ruminanti, è quella del "pascolo breve". Secondo questo sistema, gli animali vengono condotti al pascolo per un periodo di circa 8h, nell'intervallo di tempo che intercorre tra le due mungiture giornaliere, per poi somministrare una quantità variabile di concentrati al rientro in stalla. Questo sistema consente da una parte di ridurre la pressione sul pascolo, che altrimenti si deteriorerebbe come dimostrato da Nedjraoui (2004) e da Ronchi e Nardone (2003) quando gli animali pascolano senza restrizioni, dall'altra di ridurre la quantità di concentrati utilizzati e quindi dei costi di gestione.

Come discusso nella parte generale del presente lavoro di tesi, la somministrazione di concentrati ha anche l'effetto di ristabilire un corretto equilibrio tra carboidrati fermentescibili e le proteine solubili della dieta al fine di ridurre le fermentazioni delle sostanze azotate a livello ruminale, i cui prodotti, in particolare l'indolo e lo scatolo, sono responsabili di odori e aromi indesiderati nei prodotti di origine animale. Poiché la concentrazione dei carboidrati solubili nei vegetali tende a crescere durante la giornata come conseguenza dell'accumulo dei prodotti della fotosintesi, la restrizione dell'orario di pascolo alle sole ore pomeridiane (quando il contenuto di WSC è massimo) potrebbe contribuire a un'ulteriore riduzione (o nel migliore dei casi all'eliminazione) dell'uso di concentrati, rappresentando così una strategia alternativa per ridurre ulteriormente

i costi di gestione e al contempo migliorare la qualità dei prodotti di origine animale.

Il presente lavoro di tesi è parte integrante di un più ampio progetto di ricerca finanziato dall'Unione Europea nell'ambito del Settimo Programma Quadro per la Ricerca, volto a migliorare le performances, la salute e il benessere animale nonché la qualità dei prodotti di origine ovina in un sistema di allevamento sostenibile; in particolare, lo scopo della tesi è stato quello di studiare l'effetto della variazione dell'orario di pascolamento sulla produzione a livello ruminale di scatolo e indolo, e sull'accumulo di queste sostanze nel grasso perirenale di agnelli da carne.

6. Materiali e metodi

6.1. Animali e diete

La prova sperimentale è stata condotta presso un'azienda agricola ubicata nel Comune di San Costantino Calabro in provincia di Vibo Valentia (38°38' N, 16°04' E) per un periodo complessivo di 92 giorni compresi tra il mese di marzo e maggio 2010: 20 giorni sono stati dedicati all'adattamento e 72 giorni al periodo sperimentale.

Per l'esperimento sono stati utilizzati 42 agnelli maschi di razza Merinizzata Italiana nati nella stessa azienda, selezionati in base al peso corporeo ed al ritmo di accrescimento rilevato con cadenza settimanale dalla nascita allo svezzamento avvenuto a un'età di 75 (± 15) giorni.

Dopo lo svezzamento, gli animali sono stati dapprima suddivisi in 4 gruppi in funzione del peso corporeo decrescente, per poi essere assegnati, su base casuale, a uno dei quattro gruppi sperimentali descritti di seguito. Nove agnelli sono stati allevati in stalla (gruppo stalla) e alimentati esclusivamente con un concentrato commerciale a base di orzo; l'alimentazione di questi animali era razionata, allo scopo di rendere gli incrementi ponderali di questi soggetti simili al valore medio degli incrementi dei tre gruppi al pascolo. I restanti 33 agnelli sono stati condotti quotidianamente al pascolo costituito da un erbaio di *Lolium perenne*. La scelta di utilizzare un pascolo monofita si è resa necessaria per impedire qualsiasi forma di selezione da parte degli animali; inoltre, poiché nella zona e nella stagione ove è stato eseguito l'esperimento si riportano precipitazioni piovose nell'ordine di 100 mm/mese non è stato necessario prevedere un impianto di irrigazione.

Degli animali inviati al pascolo, dodici agnelli (gruppo 8h) hanno pascolato per 8 ore, dalle ore 9 alle 17; dieci agnelli (gruppo 4hAM) hanno pascolato solo la mattina, dalle 9 alle 13; infine, 11 agnelli (gruppo 4hPM) hanno pascolato solo al pomeriggio, dalle 13 alle 17. Il pascolo, avente un'estensione di 1 ha, è stato suddiviso in 9 parcelle (3 per ciascun gruppo di pascolamento) ognuna delle quali è stata pascolata da un sottogruppo costituito da 3 o 4 animali (Tabella 5). Al ritorno dal pascolo, ogni sottogruppo di animali è stato alloggiato al coperto, in box multipli con libero accesso all'acqua.

Tabella 5 - Piano sperimentale

Gruppo stalla	Gruppo pascolo		
9 agnelli	Gruppo 8h	Gruppo 4hAM	Gruppo 4hPM
	Parcelle 1, 4 animali	Parcelle 1, 3 animali	Parcelle 1, 3 animali
	Parcelle 2, 4 animali	Parcelle 2, 3 animali	Parcelle 2, 4 animali
	Parcelle 3, 4 animali	Parcelle 3, 4 animali	Parcelle 3, 4 animali

Durante il periodo di adattamento, la dieta di svezzamento somministrata agli animali del gruppo stalla è stata progressivamente sostituita dal concentrato utilizzato durante il periodo sperimentale; anche durante questa fase, il concentrato era somministrato in quantità tale da rendere gli incrementi ponderali simili al valore medio degli incrementi dei tre gruppi al pascolo. Per quel che riguarda gli agnelli dei tre gruppi che utilizzavano il pascolo, durante il periodo di adattamento, essi hanno pascolato nelle stesse ore in cui avrebbero pascolato durante il successivo periodo sperimentale, e al ritorno in stalla hanno ricevuto quantità decrescenti di fieno fino alla sua eliminazione dalla dieta.

Tutti gli animali sono stati pesati settimanalmente. I livelli di ingestione al pascolo sono stati stimati due volte durante il periodo sperimentale al 15° e 65° giorno secondo il metodo riportato da Avondo et al. (2002) e da D'Urso et al. (1998). Lo stesso giorno in cui è stata stimata l'ingestione al pascolo, sono stati raccolti anche i campioni di pascolo. Il campionamento è avvenuto in orari diversi in funzione dei gruppi di pascolamento:

- Gruppo 4hAM: ore 9, 11 e 13
- Gruppo 4hPM: ore 13, 15 e 17
- Gruppo 8h: ore 9, 11, 13, 15, 17.

In ogni parcella e per ciascun orario di pascolamento sono stati prelevati n. 3 campioni di circa 1 kg di erba fresca. I campioni raccolti sono stati conservati sottovuoto e tenuti a -30 °C fino al giorno dell'analisi chimiche.

6.2. Macellazione e Campionamento

Alla termine del periodo sperimentale tutti gli animali sono stati tenuti a digiuno per una notte intera (12 ore) e successivamente trasportati presso un mattatoio commerciale dove sono stati macellati mediante la recisione della giugulare, previo stordimento effettuato con proiettile captivo.

Immediatamente dopo la morte, ogni animale è stato eviscerato. Il rumine, opportunamente isolato, è stato tagliato con un bisturi per raccoglierne il liquido, sul quale è stato immediatamente misurato il pH mediante l'uso di un pHmetro (Orion 9106; Orion Research Incorporated, Boston, MA); e stata prelevata un'aliquota di 100 mL previa filtrazione mediante l'uso di un doppio strato di

mussolina. Il campione di liquido ruminale è stato quindi conservato a una temperatura di -30 °C fino al giorno delle analisi.

A distanza di 20 minuti dalla morte, il muscolo Longissimus dorsi è stato prelevato dalla mezzena destra di ogni carcassa, avvolto in un foglio di alluminio e conservato sottovuoto a una temperatura di -25 °C fino al momento delle analisi chimiche. Contestualmente, dalla stessa mezzena è stato prelevato il grasso perirenale, posto sottovuoto e anch'esso conservato, fino al giorno delle analisi chimiche, a una temperatura di -25 °C.

6.3. Analisi chimiche

6.3.1. Pascolo

Per ogni data di campionamento (15° e 65° giorno), da ogni parcella di pascolo sono stati prelevati in maniera casuale i campioni di erba in diverse ore del giorno in funzione dell'orario di pascolamento (sez. 6.1). Ciascuno dei campioni è stato sottoposto ad analisi chimica per la determinazione della sostanza secca, della proteina grezza e del contenuto in NDF secondo il metodo AOAC (1995) e delle frazioni proteiche (Licitra *et al.* 1996). Il contenuto di carboidrati solubili (WSC) è stato determinato mediante il metodo modificato dell'antrone (Deriaz, 1961).

6.3.2. Liquido ruminale

Da ciascun campione di liquido ruminale è stata prelevata una prima aliquota di 15 mL per la determinazione della sostanza secca, ponendo in stufa a 105°C il campione fino a peso costante. Da ogni campione individuale di liquido ruminale, è stata prelevata una seconda aliquota di 15 mL destinata alla determinazione di

indolo e scatolo. Detta aliquota è stata centrifugata a $3.000 \times g$ per 5 minuti. Al surnatante (2 mL) così recuperato, sono stati aggiunti 10 μg di 5-methylindole come standard interno. I composti di derivazioni indolica sono stati estratti due volte mediante aggiunta di una miscela di esano ed etere dietilico (80:20 vol/vol) seguita da centrifugazione a $3.000 \times g$ per 5 min. Il surnatante ottenuto dalle due estrazioni consecutive è stato recuperato e unito a formare un unico campione che è stato, quindi, concentrato in corrente di azoto fino a un volume di 500 μL per essere analizzato al gascromatografo (TRACE 2000, Thermo-Finnigan, San Jose, CA) con le seguenti condizioni:

- Colonna Supelco SPB 5 (60 m \times 0.32 mm \times 1 μm);
- Temperatura dell'iniettore mantenuta a 255 °C;
- Condizioni del forno: temperatura iniziale di 40 °C per 4 minuti; rampa di 3 °C/min fino a 181 °C per 30 secondi; rampa di 1.8 °C/min fino a 188 °C per 30 secondi; rampa di 3 °C/min fino a 230 °C per 5 minuti.

La quantificazione dell'indolo e dello scatolo è stata ottenuta in funzione dell'area del picco relativo allo standard interno.

6.3.3. Grasso perirenale

I composti indolici sono stati estratti dal grasso perirenale contestualmente agli altri composti organici volatili allo scopo di valutare l'effetto del sistema di allevamento su tutti questi componenti. Coerentemente con lo scopo della tesi, tuttavia, verranno esaminati e discussi soltanto i dati relativi a indolo e scatolo. Il metodo di analisi adottato è quello riportato da Vasta et al. (2010b, 2011), parzialmente modificato. In dettaglio, il grasso perirenale, ancora congelato, è

stato ridotto in fette dello spessore di circa 1 mm con l'ausilio di un bisturi. Otto grammi (± 0.2 g) di grasso sono stati trasferiti in una provetta in vetro da 20 mL con tappo a setto/PTFE. Per l'estrazione dei composti volatili nello spazio di testa è stata utilizzata la tecnica di microestrazione in fase solida (SPME). La provetta contenente il campione è stata posta in un bagno di acqua a 90 °C (± 2 °C) per 20 minuti. Una fibra assorbente (Supelco, Bellefonte, PA; 57328-U) è stata, quindi, inserita nella provetta ed esposta allo spazio di testa per 20 minuti per consentire l'adsorbimento delle molecole. Dopo l'adsorbimento, la fibra è stata rimossa ed immediatamente inserita nell'iniettore del gascromatografo (TRACE 2000, Thermo-Finnigan, San Jose, CA) per l'analisi. L'iniettore, per la fase di desorbimento, è stato settato a 250 °C; il tempo di desorbimento è stato di 4 minuti. L'iniettore, settato a 255 °C durante l'analisi gascromatografica, era dotato di un liner di 0.75 mm (Supelco, Bellefonte, PA). Come gas di trasporto è stato utilizzato un flusso di elio di 1.0 mL/min. I composti volatili sono stati separati utilizzando le seguenti condizioni:

- Colonna Supelco SPB 5 (60 m \times 0.32 mm \times 1 μ m);
- Temperatura dell'iniettore mantenuta a 255 °C;
- Condizioni del forno: temperatura iniziale di 40 °C per 4 minuti; rampa di 3 °C/min fino a 181 °C per 30 secondi; rampa di 1.8 °C/min fino a 188 °C per 30 secondi; rampa di 3 °C/min fino a 230 °C per 5 minuti;
- Temperatura all'interfaccia tra gascromatografo e spettrometro di 280 °C.

Gli spettri di massa dei composti volatili sono stati generati da uno spettrometro di massa dotato di trappola ionica (Polaris Q, Thermo-Finnigan, San Jose, CA); l'acquisizione è stata eseguita in modalità electron impact (70 eV) da

10 microscansioni al secondo, osservando un range di massa compreso tra 33–230 m/z . Nel range di temperatura compreso tra 181 °C e 188 °C, lo strumento ha operato in modalità SIM (m/z 90, 103, 117, 130, 131) per la rilevazione dello scatolo e dell'indolo. L'identificazione dei composti è stata eseguita mediante la comparazioni tra gli spettri di massa ottenuti e un database di spettri (NIST 7 Mass Spectral Library (2000)) e per comparazione dell'indice di ritenzione lineare (Kondjoyan and Berdagué, 1996; NIST Mass Spec Data Center, 2008). Nel caso dell'indolo e dello scatolo, l'identificazione è stata ottenuta mediante comparazione con uno standard puro precedentemente iniettato. L'indice di ritenzione lineare è stato calcolato sulla base di una precedente iniezione di *n*-alkani della lunghezza di 5-17 atomi di carbonio. L'area dei picchi dei composti volatili è stata integrata sulla base di picchi specifici di ogni molecola al fine di evitare la sovrapposizione di ioni comuni. Inoltre, per prevenire l'”effetto memoria” della fibra assorbente e della colonna cromatografica, quotidianamente, sono stati analizzati 4 campioni provenienti da gruppi sperimentali diversi; anche la sequenza dei campioni provenienti dai diversi trattamenti sperimentali è stata cambiata ogni dieci giorni di analisi. Sebbene per il presente lavoro di tesi verranno discussi solo i dati relativi all'indolo e allo scatolo, si è preferito descrivere nella sua totalità il processo di estrazione, identificazione e quantificazione dei composti aromatici per una maggior completezza di informazione.

6.3.4. Muscolo

Il muscolo *Longissimus dorsi* è stato sottoposto alla determinazione dei composti volatili mediante Smart Nose. Aliquote di 4 grammi di campioni di *Longissimus dorsi* della mezzena destra di ogni agnello sono state poste all'interno di vial da 20mL chiuse con tappo ermetico provvisto di setto in silicone-PTFE. Ciascun campione è stato pesato in triplicato e collocato sull'autocampionatore in maniera random; questo per evitare che eventuali composti volatili molto più concentrati, possibilmente presenti in alcuni campioni, potessero influenzare l'analisi dei campioni successivi, evento che si può verificare nel caso in cui il tempo di purge tra i campioni non sia sufficiente a pulire del tutto l'iniettore.

Le vial sono state incubate per 30 min a 60°C sotto agitazione. I composti volatili sono stati estratti mediante una siringa a tenuta di gas ed iniettati all'interno dello spettrometro di massa a quadrupolo senza previa separazione gascromatografica.

Sotto elencate si trovano le principali condizioni operative:

- Temperatura dell' iniettore: 160°C
- Temperature della siringa: 100 °C
- Volume di iniezione: 2.5 ml
- Flusso di purge: 200ml/min
- Modalità di Ionizzazione Elettronica (EI): 70 e V
- m/z range: 10-160 amu
- Numero dei canali di massa: 150
- SEM voltage: 1240 V
- Tempo di purge tra i campioni: 120 s

- Tempo di purge dopo l'analisi: 15 min
- Il tempo di acquisizione totale è stato settato a 170 s, tempo sufficiente a misurare 3 cicli per ogni iniezione.

Tutti i set di dati sono stati trasformati utilizzando il software SMart Nose 151 in dotazione con lo strumento. Inizialmente è stato calcolato il valore medio dei tre cicli registrati e, in seguito, i dati processati sono stati normalizzati in funzione dello ione dell'argon ($m/z = 40$) dell'aria. Tale rapporto massa su carica non è soggetto praticamente a nessun tipo di contaminazione da parte di altri composti e la concentrazione di questo gas nello spazio di testa può essere considerata costante. Infine è stato effettuato il calcolo della PCA, in base agli ioni più discriminanti.

6.3.4.1. SMart Nose

Lo Smart Nose (Fig. 12) utilizzato per le analisi dei campioni è costituito dalle seguenti parti: un autocampionatore (CTC Combi Pal con Cycle Composer software), provvisto di travi porta-vial e fornetto, uno spettrometro di massa (MS) a quadrupolo ad alta sensibilità (Inficon AG) con un range di ioni di massa misurabili da 1 a 200 amu ed un software di analisi statistica multivariata (SMart Nose 151) per l'acquisizione dei dati. L'autocampionatore dello SMart Nose è totalmente programmabile e può contenere 2 x 32 vial da 10 o 20 ml. Per generare lo spazio di testa necessario, ciascun campione è riscaldato nel fornetto, che può raggiungere la temperatura massima di 200°C. La siringa pre-riscaldata inietta fino a 2.5 ml dello spazio di testa del campione dentro l'iniettore dello MS. La siringa e l'iniettore sono puliti con flusso di azoto dopo l'analisi di ogni campione.

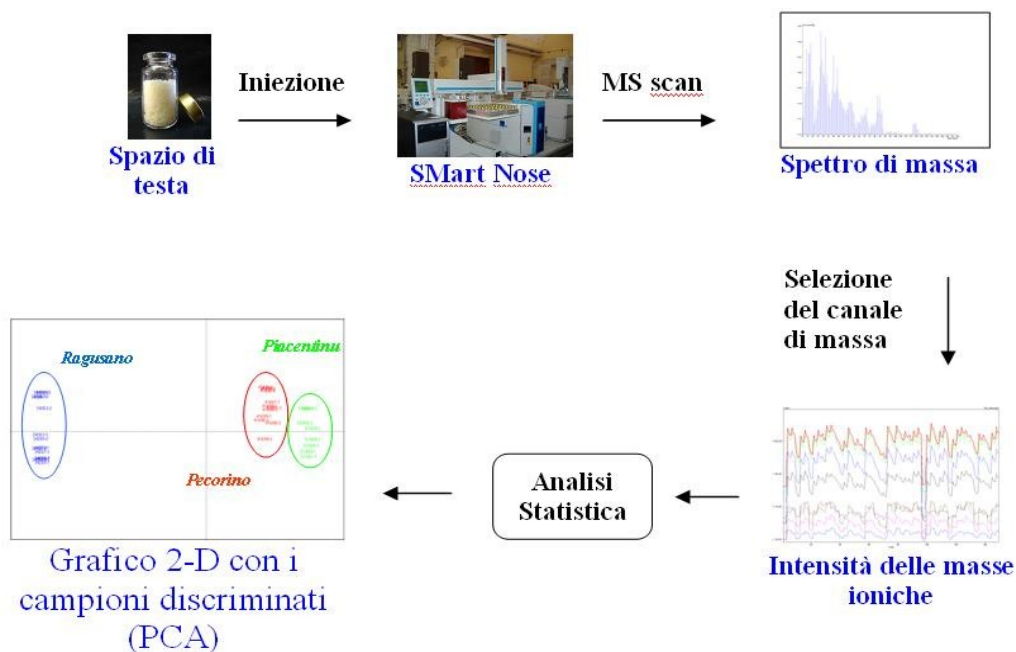
Figura 12 - Smart Nose



Le intensità degli ioni a diverso valore m/z sono conservati in un database e vengono registrate sottoforma di matrice. Il principio di analisi dello SMart Nose consiste nel paragonare gli spettri di massa della frazione volatile (spazio di testa) di tutti i campioni. Le sostanze però non sono separate, ma analizzate globalmente. L'identificazione dei vari campioni si basa sulle differenze, a volte piccole, tra gli spettri che costituiscono l'impronta digitale di ogni campione. I dati vengono poi trattati statisticamente mediante analisi multivariata, come ad esempio riportato in figura 13 nella quale è stata utilizzata l'Analisi delle Componenti Principali (PCA) per ottenere un grafico bidimensionale dei campioni discriminati.

Affinché il confronto tra i campioni sia più reale possibile si è ritenuto importante mantenere uguali per ogni campione le condizioni sperimentali, quali pesata, superficie e granulometria del campione, temperatura e tempo di incubazione e parametri come agitazione.

Figura 13 - Principio di analisi dello SMart Nose



6.4. Analisi statistica

Per la composizione chimica dell'erba, è stata eseguita un'analisi della varianza (ANOVA) per misure ripetute; l'orario di pascolamento (8h vs. 4hAM vs. 4hPM), la data di campionamento (15° vs. 65° giorno) e le loro interazioni sono stati considerati come fattori fissi, mentre i singoli campioni sono stati considerati come fattori random. Quando non significativa ($P > 0.05$), l'interazione è stata esclusa dal modello; quando l'ANOVA era significativa ($P \leq 0.05$) le medie sono state confrontate mediante comparazione a coppie (test di Tukey).

I dati relativi all'ingestione di sostanza secca ed alla quantità di di di scatola e indolo nel grasso perirenale e nel liquido ruminale sono stati analizzati secondo un modello completamente randomizzato che includeva l'effetto dell'orario di pascolamento e l'errore sperimentale. I singoli animali sono stati considerati come

unità sperimentale. Quando l'ANOVA è risultata significativa ($P \leq 0.05$) le medie sono state confrontate mediante il test di Tukey per la comparazione a coppie.

Relativamente alla componente aromatica della carne essa è stata esaminata mediante l'Analisi delle Componenti Principali (PCA), una tecnica per la semplificazione dei dati utilizzata nell'ambito della statistica multivariata. Si tratta di una tecnica statistica descrittiva, o di proiezione, che permette di visualizzare graficamente un set di dati, rappresentato matematicamente da una matrice, che contiene una riga per ciascun oggetto (campione) e una colonna per ciascuna variabile (m/z). Ciascuna riga della matrice può essere vista come un set di coordinate che rappresentano l'oggetto nello spazio delle variabili, ognuna delle quali definisce un asse. Tutti gli oggetti si dispongono in questo spazio assumendo una certa struttura. L'obiettivo della PCA è quello di rappresentare il set di dati in un nuovo spazio di dimensione inferiore rispetto a quello di partenza, i cui assi sono determinati dalle componenti principali (PC), che si ottengono da combinazioni lineari delle dimensioni iniziali (variabili originali). La grandezza dei coefficienti, nelle risultanti combinazioni lineari, danno un'indicazione dell'importanza relativa delle dimensioni iniziali nella struttura dei dati. Le PC si costruiscono lungo le direzioni di massima varianza, in modo che le proiezioni dei punti lungo quelle rette siano più espanse possibile. La nuova variabile (PC1), prima per dimensione della varianza, viene proiettata sul primo asse; la seconda nuova variabile (PC2) andrà nella seconda direzione di massima varianza e sarà perpendicolare alla prima e così via. La condizione di perpendicolarità è necessaria affinché le informazioni contenute sugli assi siano indipendenti. Lo zero del nuovo sistema di assi corrisponde al centro del gruppo di campioni. La

riduzione della complessità avviene limitandosi ad analizzare le principali (per varianza) tra le nuove variabili.

Il vantaggio della PCA non è solo quello di cambiare il sistema di coordinate in uno più rilevante (centrato sulla nuvola dei dati) e di ridurre la dimensionalità, ma anche quello di ridurre il rumore. La PCA, infatti, scompone la matrice originale dei dati in una parte che contiene la struttura dei dati, cioè l'informazione rilevante ed una che contiene il rumore (direzioni dello sciame dei dati in cui la varianza è così piccola da essere trascurabile) e che non viene considerata nella costruzione del modello. All'aumentare del numero delle PC del modello, la varianza spiegata aumenta; questa riassume quanto bene il modello ha catturato l'informazione contenuta nel set di dati. Tale aumento sarà sempre minore fino a quando risulterà poco rilevante. Il numero ottimale di PC da considerare viene scelto quando la varianza residua, che è complementare a quella spiegata (varianza residua + varianza spiegata = 100%) smette di diminuire.

7. Risultati

7.1. Performance di crescita e post mortem

I risultati riguardanti i livelli di ingestione e le performance in vivo e post mortem degli agnelli dei gruppi che utilizzavano il pascolo sono riportati nella tabella 5. Relativamente al gruppo stalla, i dati di questi animali sono stati esclusi dal modello di analisi statistica perché, come precisato in materiale e metodi, la crescita degli animali era sperimentalmente controllata per rimanere confrontabile a quella degli animali dei tre gruppi al pascolo allo scopo di ottenere simili livelli di grasso di deposito nelle carcasse e/o nelle carni. Quindi, gli incrementi ponderali ed il peso vivo finale e della carcassa sono stati il risultato di una “manipolazione” e non un effetto sperimentale della dieta.

Gli agnelli che hanno pascolato per l'intera giornata (gruppo 8h) hanno mostrato livelli di ingestione significativamente più elevati rispetto agli altri due gruppi pascolo ($p < 0.05$). Inoltre, essi hanno avuto un incremento ponderale e un peso vivo finale significativamente ($p < 0.05$) più alti in confronto agli agnelli dei due gruppi di animali che utilizzavano il pascolo soltanto per 4 h/d. Tuttavia, il peso della carcassa, in media pari a 7.12 kg, non differiva significativamente ($p > 0.05$) tra i tre gruppi che utilizzavano il pascolo secondo le tre diverse modalità sperimentali.

Tabella 6 – Effetti dell’orario di pascolamento sulle performance degli agnelli dei tre gruppi al pascolo

	Gruppi di pascolamento			SEM	P (significatività)
	8h	4hAM	4hPM		
Ingestione (g d ⁻¹)	485 ^a	349 ^b	375 ^b	13.6	<0.0005
Peso vivo iniziale (kg)	16.02	16.20	16.03	0.327	0.973
Peso vivo finale (kg)	20.59 ^a	18.76 ^b	18.58 ^b	0.422	<0.001
Tasso di crescita (g d ⁻¹)	62.96 ^a	37.35 ^b	35.07 ^b	3.99	0.004
Peso carcassa (kg)	7.65	7.00	6.72	0.219	0.199

^{a,b} lettere differenti lungo la stessa riga indicano differenze significative (p<0.05).

7.2. Composizione chimica del pascolo

La composizione chimica del pascolo utilizzato dagli animali durante il periodo sperimentale è riportata in tabella 6. La proteina grezza era significativamente (p<0.05) più alta nel pascolo del gruppo 4hAM rispetto a quello del gruppo 8h ma non differente rispetto al pascolo del gruppo 4hPM; sia il contenuto in zuccheri solubili (WSC) che il rapporto WSC/PG erano significativamente (p<0.05) più bassi nel pascolo del gruppo 4hAM rispetto ai gruppi 4hPM e 8h che tra di loro non hanno mostrato differenze significative. Nell’ambito della componente proteica, le frazioni proteiche A e B1, solubili e rapidamente fermentescibili a livello ruminale, non hanno mostrato differenze significative in funzione dell’orario di pascolamento. Solo la frazione proteica B2 (proteine vere mediamente degradabili) era significativamente più alta nel pascolo utilizzato dal gruppo 4hPM rispetto al pascolo del gruppo 4hAM.

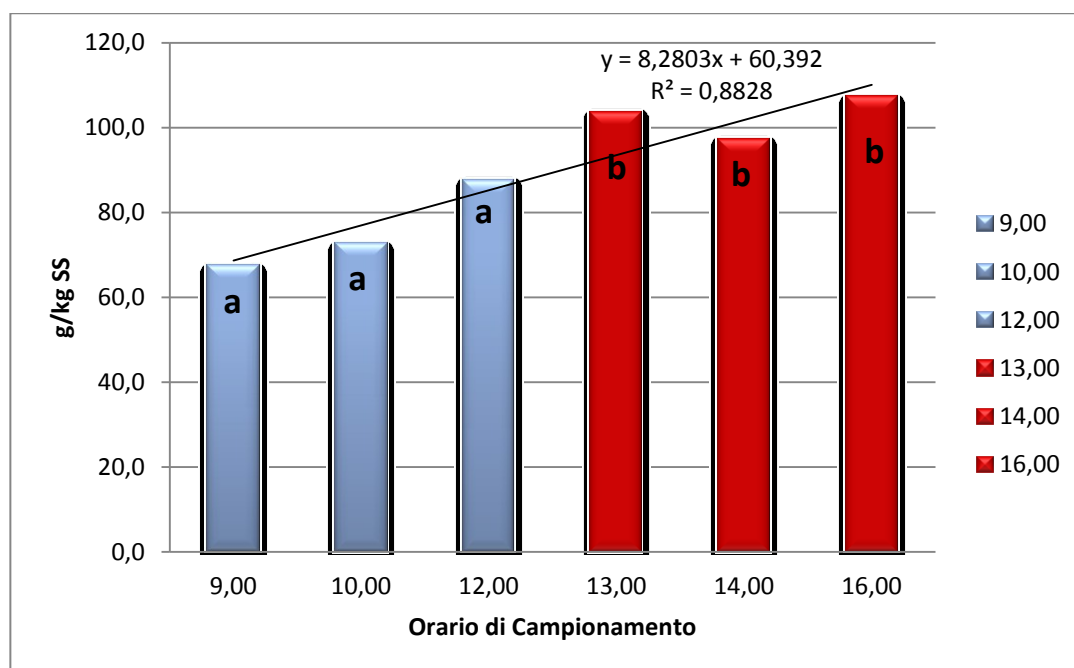
Tabella 7 – Composizione chimica del pascolo (g/kg SS)

	Orario di pascolamento			SEM	Significatività (p)		
	8h	4hAM	4HPM		Orario (H)	Data (D)	H×D
SS g/kg	137.3	130.3	142.1	4.57	0.359	<0.001	0.855
Proteina grezza (PG)	238.0 ^b	256.0 ^a	250.6 ^{ab}	4.12	0.036	0.000	0.541
NDF	435.2 ^b	443.00 ^a	424.4 ^b	3.72	<0.001	<0.067	0.003
WSC	80.0 ^a	58.3 ^b	85.8 ^a	3.64	0.002	0.025	0.467
Ceneri	160.2	156.3	150.1	4.89	0.541	0.969	0.943
WSC/PG	0.42 ^b	0.34 ^a	0.48 ^b	0.02	0.049	0.010	0.783
Frazioni proteiche (% PG)							
A	26.59	28.34	25.52	1.02	0.102	0.001	0.535
B1	4.30	4.74	5.03	0.34	0.507	0.267	0.075
B2	39.31 ^{ab}	35.83 ^b	43.59 ^a	4.31	0.022	0.000	0.013
B3	27.52	28.41	23.64	3.16	0.087	0.000	0.010
C	2.28	2.68	2.22	0.43	0.170	0.006	0.107

^{a,b} lettere differenti lungo la stessa riga indicano differenze significative (p<0.05)

Indipendentemente dalla modalità di utilizzo del pascolo, esaminando i risultati analitici ottenuti su tutti i campioni sperimentali di pascolo raccolti nelle due date di campionamento, emerge che la quantità di carboidrati solubili nel pascolo è progressivamente cresciuta nell'arco della giornata, come atteso (Fig. 14). In particolare, il contenuto in carboidrati solubili nel foraggio è risultato significativamente minore nei campioni raccolti tra le 9.00 e le 12.00 rispetto ai campioni raccolti tra le 13.00 e le 16.00.

Figura 14 – Quantità (g/kg SS) di WSC nel pascolo durante la giornata



Lettere diverse indicano differenza significativa (p<0.05)

7.3. Liquido ruminale.

La tabella 8 riporta i dati relativi all'effetto del tipo di alimentazione sul pH e sulla sostanza secca del liquido ruminale dei quattro gruppi sperimentali. La sostanza secca non ha mostrato alcuna differenza significativa tra i quattro gruppi, mentre il pH è risultato significativamente più basso nel liquido ruminale degli animali del gruppo stalla rispetto quello dei tre gruppi al pascolo, che tra loro non hanno mostrato differenze significative.

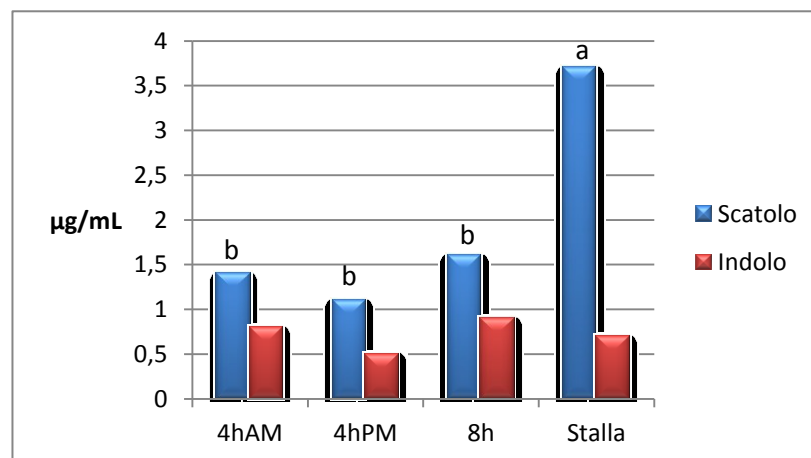
Tabella 8 - Effetti della tesi alimentare sul pH e sulla sostanza secca (g/100 g di liquido tal quale) del liquido ruminale. Comparazione dei 4 gruppi sperimentali

	Tesi alimentare				SEM	Significatività (p)
	Stalla	8h	4hAM	4HPM		
Sostanza secca	82.7	82.7	81.6	81.6	5.051	0.482
pH	6.3 ^a	7.0 ^b	7.1 ^b	7.0 ^b	0.005	<0.0001

^{a,b} lettere differenti sulla stessa riga indicano differenze significative (p<0.05).

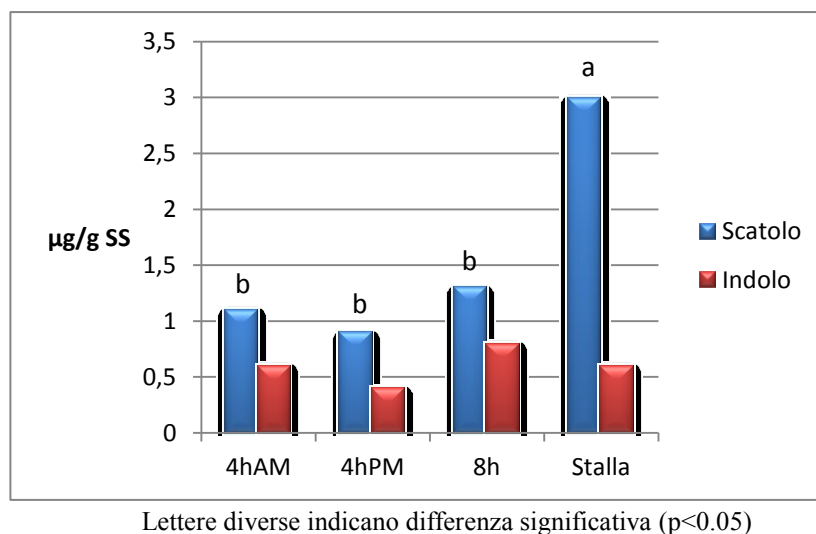
Le figure 15 e 16 riportano i dati relativi alla presenza di scatolo e indolo nel liquido ruminale. I valori di scatolo nel liquido ruminale sono stati significativamente influenzati dal tipo di alimentazione degli agnelli, sia quando espressi in termini di $\mu\text{g/mL}$ (fig. 15; $p < 0.0001$) che di $\mu\text{g/g SS}$ (fig. 16; $p < 0.0001$). Il livello di scatolo è infatti risultato significativamente più alto nel gruppo stalla rispetto agli altri gruppi sperimentali. Nessuna differenza significativa è stata riportata tra i tre gruppi di animali condotti al pascolo, in rapporto alle diverse modalità di utilizzo. Riguardo all'indolo, non è stata osservata nessuna differenza significativa tra i 4 gruppi, né per la concentrazione né per la quantità di indolo.

Figura 15 – Concentrazione di indolo e scatolo nel liquido ruminale ($\mu\text{g/mL}$). Comparazione di 4 gruppi sperimentali.



Lettere diverse indicano differenza significativa ($p < 0.05$)

Figura 16 - Concentrazione di indolo e scatolo espressa in $\mu\text{g/g}$ di SS del nel liquido ruminale. Comparazione di 4 gruppi sperimentali.



Per tutti i parametri oggetto di indagine nel liquido ruminale, al fine di evidenziare eventuali differenze tra i gruppi condotti al pascolo mascherate dalla significativa differenza in confronto al gruppo stalla, si è proceduto ad escludere il gruppo stalla dall'analisi statistica. La tabella 9 riporta i risultati dell'analisi statistica condotta applicando quest'altro modello relativamente ai dati del pH e della SS del liquido ruminale. Essa mostra che il diverso orario di utilizzo del pascolo da parte non ha influito su nessuno dei due parametri in esame.

Tabella 9 - Effetti della tesi alimentare sul pH e sulla sostanza secca del liquido ruminale. Comparazione di 3 gruppi sperimentali.

	Orario di pascolamento			SEM	Significatività (p)
	8h	4hAM	4HPM		
Sostanza secca	81.7	81.6	81.6	4.410	0.329
pH	7.0	7.1	7.0	0.023	0.081

Le figure 17 e 18 riportano i dati relativi alla presenza di indolo e scatolo nel liquido ruminale dei tre gruppi che utilizzavano il pascolo (8h, 4hAM e 4hPM). Anche applicando questo modello di analisi statistica (con tre livelli del fattore sperimentale invece di quattro, escludendo cioè il gruppo stalla), non è stata osservata nessuna differenza significativa tra i gruppi né per la concentrazione (Fig. 17; indolo $p=0.118$; scatolo $p=0.377$) né per la quantità (Fig. 18; indolo $p=0.113$; scatolo $p=0.347$) di indolo e scatolo.

Figura 17 – Concentrazione ($\mu\text{g/mL}$) di indolo e scatolo nel liquido ruminale. Comparazione di 3 gruppi sperimentali

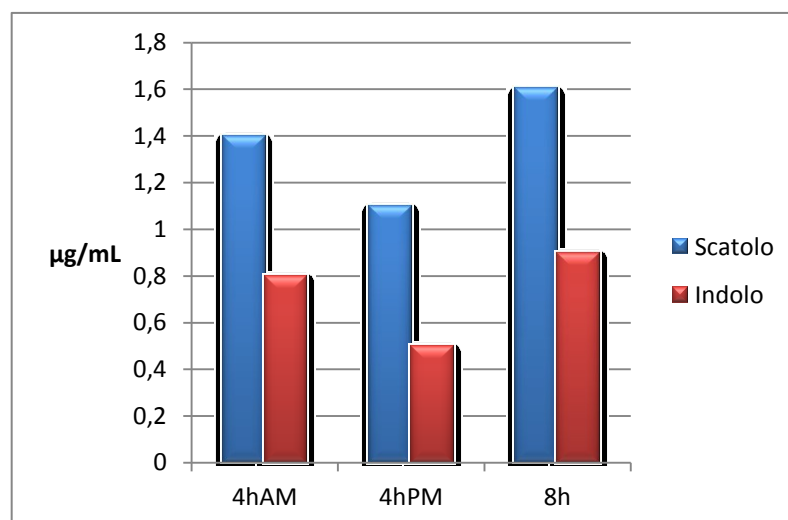
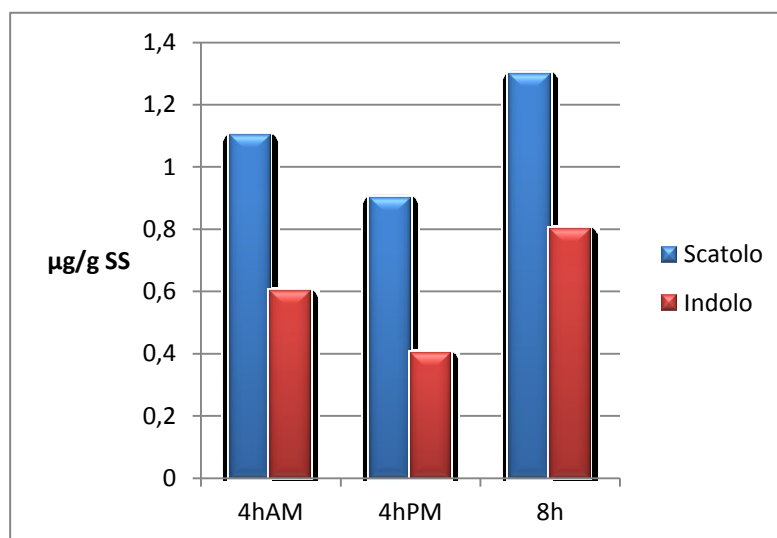


Figura 18 – Concentrazione di indolo e scatolo espressa in $\mu\text{g/g}$ di SS del nel liquido ruminale. Comparazione di 3 gruppi sperimentali.



7.4. Indolo e scatolo nel grasso perirenale

L'analisi statistica dei dati dei quattro gruppi di animali in prova (stalla e 3 gruppi al pascolo) ha evidenziato che il trattamento alimentare ha influenzato significativamente sia la concentrazione di indolo ($p < 0.0005$) che quella di scatolo ($p = 0.034$) nel grasso perirenale (Tab. 9). L'indolo era presente in concentrazione più bassa nel grasso perirenale degli animali del gruppo stalla rispetto agli animali alimentati al pascolo ($p < 0.05$), che invece non hanno mostrato differenze significative tra di loro. Lo scatolo è risultato significativamente più alto nel grasso degli animali del gruppo 4hAM rispetto agli animali del gruppo stalla ($p < 0.05$); non è stata invece osservata una differenza significativa tra i tre gruppi al pascolo. In sintesi, il modello di analisi dei dati comprendente i quattro gruppi sperimentali evidenzia che l'orario di pascolamento non ha modificato la presenza di indolo e scatolo nel grasso perirenale degli agnelli.

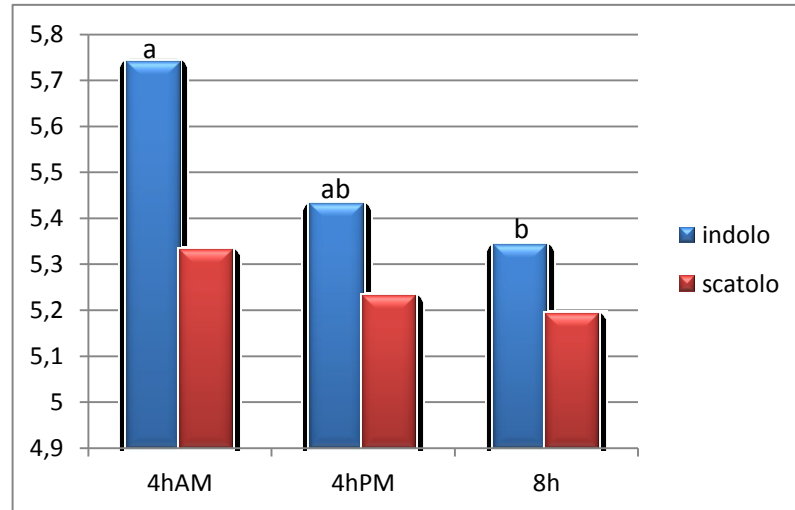
Tabella 10 - Effetti della tesi alimentare sulla concentrazione ($\mu\text{g/mL}$) di indolo e scatolo nel grasso perirenale.

	Orario di pascolamento				SEM	Significatività (p)
	Stalla	8h	4hAM	4HPM		
Indolo	4.85 ^a	5.34 ^b	5.74 ^b	5.43 ^b	0.073	<0.0005
Scatolo	4.80 ^a	5.19 ^{ab}	5.33 ^b	5.23 ^{ab}	0.063	0.034

^{a,b} lettere differenti sulla stessa riga indicano differenze significative ($p < 0.05$).

Come già fatto per la quantità e la concentrazione di scatolo e indolo nel liquido ruminale, anche per il grasso perirenale si è eseguita l'analisi statistica escludendo il gruppo stalla dal data set al fine di ridurre la variabilità ed evidenziare eventuali differenze significative tra i tre gruppi che utilizzavano il pascolo, seppure in orari differenti. Questa analisi non ha cambiato i risultati relativi allo scatolo (Fig. 19), che non è risultato influenzato dalla modalità di utilizzazione del pascolo. La diversa modalità di analisi dei dati ha permesso di evidenziare invece un significativo effetto della modalità di utilizzazione del pascolo nel caso dell'indolo. È emersa una significativa ($p < 0.05$) maggiore presenza di indolo nel gruppo 4hAM, che utilizzava il pascolo la mattina, rispetto al gruppo 8h, che utilizzava il pascolo dalle 9.00 alle 16.00 (Fig. 19).

Figura 19 – Concentrazione ($\mu\text{g/g}$) di indolo nel grasso perirenale. Comparazione di 3 gruppi sperimentali

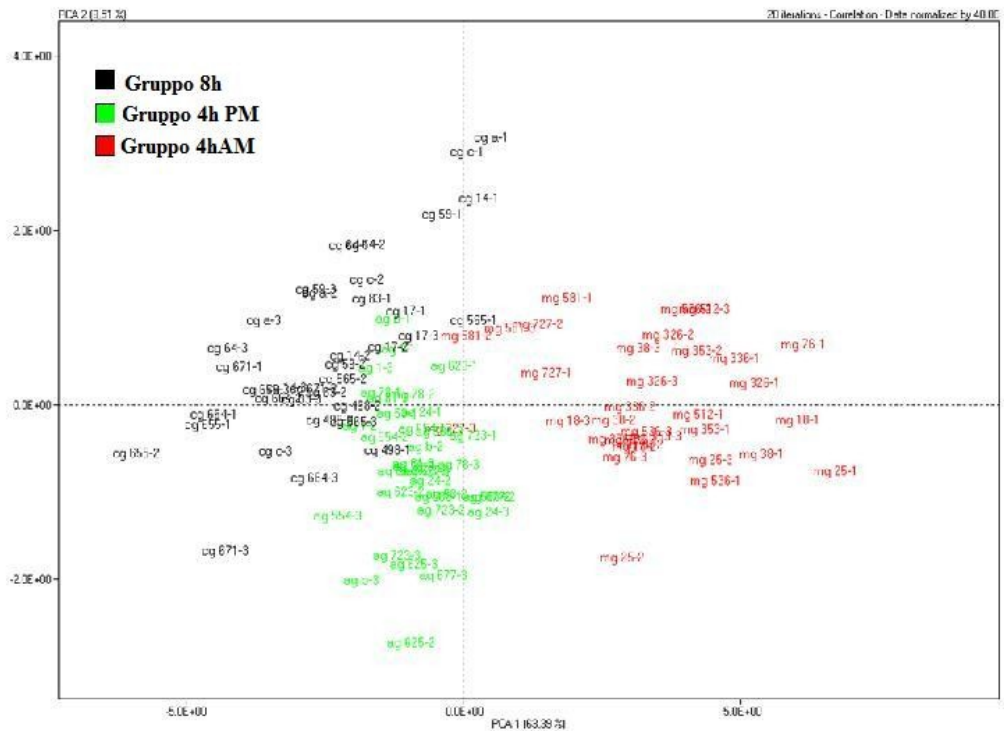


Lettere diverse indicano differenza significativa ($p < 0.05$).

7.5. SMart Nose

L'analisi delle componenti principali (PCA) dei dati ottenuti allo SMart Nose (Fig.20) mostra una netta discriminazione (PC1 63.39%; PC2 8.51%) fra i campioni dei gruppi 8h, 4hAM e 4hPM. La discriminazione fra i campioni di muscolo è avvenuta lungo la PC1, in dettaglio da sinistra verso destra si sono distribuiti il gruppo 8h, 4hAM e 4hPM, quindi la PC1 discrimina gli orari di utilizzo del pascolo da parte degli animali.

Figura 20 – PCA dei campioni di Longissimus dorsi dei gruppi 8h, 4hAM e 4hPM



I campioni dei gruppi 4hAM, 4hPM e 8h sono stati correttamente classificati rispettivamente con una percentuale del 91%, 83% e 92% (Tab. 10).

Tabella 11 – Classificazione dei campioni di carne secondo la componente aromatica.

Gruppo	Classificazione		% Classificazione
	Corretta	Errata	Corretta
4hAM	30	3	91%
4hPM	29	6	83%
8h	33	3	92%

Dalla PCA si evince che le differenze aromatiche fra il gruppo che ha pascolato per 8 ore dalle 9:00 alle 17:00 ed il gruppo che ha pascolato per 4 ore dalle ore 13:00 alle 17:00 sono minori rispetto a quelle con il gruppo MG che ha pascolato

per 4 ore dalle ore 9:00 alle 13:00. Inoltre considerato che le percentuali di corretta classificazione per i gruppi oggetto di studio oscillano dall' 83 al 92%, si può asserire che le tre modalità di pascolamento adottate per gli agnelli in prova non hanno portato a differenze aromatiche all'interno dei gruppi, facendo ottenere così gruppi di campioni molto omogenei tra loro.

8. Discussione

Come descritto da Vasta e Priolo (2006), la composizione chimica dell'alimentazione fornita ai ruminanti influenza fortemente la presenza nei tessuti e nel grasso dei composti volatili che derivano dal metabolismo animale. Tra questi ultimi composti si annoverano indolo e scatolo. La sintesi di indolo e scatolo nel rumine può essere modificata dal rapporto tra carboidrati e proteine nella dieta, come già noto in letteratura (Young et al., 2003; Schreurs et al., 2008 (review); Priolo et al., 2009). D'altro canto, diversi studi hanno evidenziato che nei foraggi gli acidi grassi, la proteina grezza e i carboidrati solubili sono soggetti a variazioni quantitative nell'arco della giornata (Vasta et al., 2012a; Pagano et al., 2011; Avondo et al., 2008, Orr e tal., 1997). Pertanto, l'esperimento qui discusso è stato progettato al fine di osservare se la variazione dell'orario di pascolamento (mattina vs. pomeriggio), che influisca sul contenuto di carboidrati solubili nel pascolo, potesse avere un effetto sul livello di indolo e scatolo prodotti nel rumine e, di conseguenza, potesse influire anche sul loro contenuto nel grasso degli agnelli in prova. Inoltre, attraverso l'analisi dei campioni di muscolo, si è voluto anche studiare una eventuale influenza del fattore sperimentale orario di utilizzo del pascolo sulla componente aromatica globale della carne, tale da permettere la discriminazione del diverso sistema di alimentazione utilizzato dagli animali. Il gruppo di animali che ha pascolato per 8 ore (gruppo 8h) è stato utilizzato come gruppo di riferimento perché rappresenta il sistema di allevamento tradizionale nell'ovicoltura dell'Italia Meridionale, sistema secondo cui le greggi sono condotte al pascolo nell'intervallo tra le due mungiture delle pecore, dalla mattina sino al pomeriggio (dalle 9.00 alle 17.00 nelle nostre condizioni sperimentali). Il

gruppo stalla, infine, è stato introdotto allo scopo di confermare o meno i dati di letteratura sulle differenze attese tra alimentazione al pascolo ed alimentazione in stalla.

8.1. Performance *in vivo* e *post mortem*

La maggiore ingestione di sostanza secca osservata per gli agnelli del gruppo 8h potrebbe essere attribuita al maggior tempo speso da questi animali al pascolo rispetto agli altri due gruppi di animali. Infatti, Pérez-Ramirez et al. (2008) hanno osservato che quando l'accesso al pascolo è ridotto a poche ore al giorno gli animali hanno livelli di DMI minore rispetto ad animali che possono pascolare senza restrizioni. Il maggiore DMI osservato per il gruppo 8h potrebbe giustificare il più elevato tasso di crescita osservato per questo gruppo rispetto ai gruppi 4hPM e 4hAM. Tuttavia, nonostante alla fine del periodo sperimentale gli animali del gruppo 8h avessero un peso vivo maggiore rispetto agli animali degli altri due gruppi alimentati al pascolo, il peso della carcassa non era significativamente diverso; pertanto, è possibile ipotizzare che il maggior peso vivo degli agnelli del gruppo 8h fosse dovuto a un maggiore peso del tratto digestivo di questi animali, come osservato precedentemente anche da Owens et al. (1993). In definitiva, quindi, gli animali che utilizzavano il pascolo solo per 4 h/d (di mattina o di pomeriggio) hanno consumato in media una minor quantità di alimento che hanno trasformato in una equivalente quantità di tutti i tessuti componenti la carcassa (ossa, muscolo, tendini e grasso); in altre parole, l'efficienza di trasformazione degli alimenti in tessuti è stata più elevata. Considerato che nel mercato italiano e meridionale in particolare l'agnello viene generalmente venduto al dettaglio come

carcassa o come mezzena, questo risultato potrebbe essere di grande interesse applicativo.

8.2. Composizione chimica del pascolo

Nel presente studio, la composizione chimica del pascolo ha subito dei cambiamenti durante il corso della giornata. In particolare, queste variazioni hanno riguardato i WSC, più bassi nel pascolo della mattina, e la PG e l'NDF che erano più alti nel pascolo della mattina, confermando i risultati di altri studi condotti in condizioni sperimentali differenti. Orr et al. (1997) e Avondo et al. (2008) riportano che il contenuto di WSC è più alto nel pomeriggio rispetto al mattino grazie all'accumulo di zuccheri semplici di origine fotosintetica. Taweel et al. (2005), comparando varietà di segale a contenuto di WSC differente, hanno concluso che una maggiore quantità di WSC si ottiene a spese della PG e dell'NDF, che erano più alti nel pascolo del mattino. Anche altri autori riportano che la presenza di WSC è inversamente correlata alla presenza di PG (Elgersma et al. 2005; Tas et al. 2005). Per quanto riguarda i dati relativi alle frazioni proteiche, in letteratura non sono presenti studi che analizzano il variare delle diverse frazioni durante l'arco della giornata. I valori del rapporto WSC/PG ottenuti nelle nostre condizioni sperimentali mostrano un trend crescente tra mattina e pomeriggio, analogamente a quanto riportato da Avondo et al. (2008).

Il confronto tra le due date di prelievo (15° e 65° giorno di prova) ha messo in evidenza una significativa riduzione della proteina grezza (PG pari a 270.6 vs 225.8 g/kg SS, rispettivamente al primo ed al secondo campionamento; $p < 0.0001$), nonché un significativo incremento del contenuto di NDF (NDF pari a

39.3 vs 47.2 g/kg SS, rispettivamente al primo ed al secondo campionamento; $p < 0.0001$). Si tratta di risultati attesi dovuti all'avanzamento dello stadio fisiologico dell'erba (Nordkvist & Aman, 2006). Il contenuto in WSC è stato modificato dalla data di campionamento come osservato anche da (Avondo et al., 2008). Il rapporto WSC/PG è diminuito tra il primo e il secondo giorno di sfalcio (0.4 vs 0.3 $p = 0.02$) come conseguenza del diverso contenuto di PG. Durante il periodo sperimentale, non si è provveduto ad osservare il comportamento al pascolo degli animali. Non si può escludere che gli animali assegnati ai tre diversi gruppi di pascolamento abbiano selezionato in maniera differente l'erba a loro disposizione e che questo possa avere modificato la composizione chimica del pascolo ingerito rispetto alla biomassa disponibile e analizzata, fenomeno confermato da diversi studi, anche nelle condizioni di allevamento tipiche dell'area del Mediterraneo (Abijaoudé et al., 2000a; 2000b).

8.3. Liquido ruminale

Secondo il modello statistico utilizzato per confrontare la varianze tra i 4 gruppi sperimentali, i valori di scatolo nel liquido ruminale erano significativamente più alti nel gruppo stalla rispetto ai tre gruppi pascolo, mentre nessuna differenza significativa è stata riportata tra i tre gruppi di animali condotti al pascolo. Per quanto riguarda la presenza di indolo, inoltre, non è stata osservata nessuna differenza significativa tra i quattro gruppi.

Come è noto, lo scatolo e l'indolo derivano dalla degradazione del triptofano per opera della microflora ruminale (Sheat et al., 2001). Numerosi studi di letteratura indicano che un basso rapporto carboidrati-solubili:proteina-grezza

favorisce la degradazione delle proteine a livello ruminale e quindi determina una maggiore sintesi dei composti di derivazione indolica (review: Vasta e Priolo, 2006 e Schreurs et al., 2008).

In letteratura non sono presenti studi che abbiano valutato l'effetto della variazione della composizione chimica del pascolo dovuta a un diverso orario di pascolamento sulla produzione di scatolo a livello ruminale. Tuttavia, diversi autori hanno osservato l'effetto di essenze foraggere a diverso contenuto di WSC sulla produzione di scatolo ed indolo.

Tavendale et al. (2005) hanno comparato l'effetto di tre tipi di loglio contenenti quantità di WSC decrescenti (rispettivamente *Lolium perenne*, *Lolium multiflorum* cv. Grassland Moata e *Lolium multiflorum* cv. Impact) sulla presenza dei prodotti della degradazione proteica nel rumine di vacche da latte. Gli autori riportano che la presenza di tali composti, tra cui l'indolo e lo scatolo, era significativamente più bassa nel rumine degli animali che avevano ricevuto *Lolium perenne*, ovvero l'essenza in cui il rapporto WSC:proteine era più elevato. Schreurs et al. (2007b) studiando l'effetto di tre essenze foraggere (trifoglio bianco, loglio perenne e *Lotus corniculatus*) sulla produzione di scatolo e indolo nel rumine, hanno riportato che la maggiore quantità di scatolo e di indolo è stata riscontrata nel rumine degli animali che avevano ricevuto il trifoglio bianco rispetto agli altri due gruppi di animali che avevano ricevuto rispettivamente loglio perenne e *Lotus corniculatus*. Gli autori spiegano che le differenze relative ai gruppi alimentati con trifoglio o con loglio possano derivare dalla differente composizione chimica delle due essenze, in particolare dal fatto che il trifoglio bianco fornisca una quantità significativamente maggiore di proteine altamente solubili e rapidamente

degradabili. Per quanto concerne le differenze riscontrate tra il gruppo che aveva ricevuto trifoglio bianco e quello che aveva ricevuto *Lotus corniculatus*, secondo gli autori, esse non sembrano derivare da un differente rapporto WSC:proteine-solubili (simile tra le due essenze), ma piuttosto dalla quantità di tannini condensati. Questi infatti erano presenti in concentrazione quattro volte maggiore nel *Lotus corniculatus* rispetto al trifoglio. Come descritto nella parte generale, i tannini condensati sono composti secondari che hanno la capacità di sequestrare le proteine e di ridurre l'attività microbica a livello ruminale con la conseguente diminuzione della presenza dei composti di derivazione indolica.

La letteratura sulla produzione di indolo e scatolo nel ruminale di agnelli alimentati al pascolo o con concentrato è scarsa. L'unico studio reperibile in letteratura che abbia investigato questo aspetto è quello di Priolo et al. (2009). In questo esperimento, gli autori, esaminando il liquido ruminale di agnelli alimentati in stalla con erba verde sfalciata o con concentrato commerciale, hanno osservato che la presenza di indolo e di scatolo era significativamente più alta nel gruppo di animali che avevano ricevuto l'erba verde ed hanno attribuito questo risultato al rapporto WSC:proteine più alto nella dieta del gruppo alimentato con concentrato. Pertanto, i risultati ottenuti nelle nostre condizioni sperimentali relativi al confronto tra stalla e pascolo sono in disaccordo con i risultati ottenuti da Priolo et al. (2009). È da evidenziare anche che sia Priolo et al. (2009) che nella nostra prova siano state usate essenze foraggere prive di tannini (veccia e loglio, rispettivamente).

Al fine di provare a spiegare il perché lo scatolo era presente in concentrazione maggiore nel liquido ruminale degli animali del gruppo stalla, potrebbe essere

utile descrivere i risultati riportati da Doerner et al. (2009). Essi hanno valutato *in vitro* l'effetto della variazione del pH e della temperatura sulla crescita del batterio *Clostridium scatologenes*, che, come riportato da Cook et al. (2007), è l'unico in grado di produrre scatolo direttamente dalla degradazione del triptofano. Doerner et al. (2009) hanno osservato un effetto della variazione del pH del terreno di coltura sulla capacità di moltiplicazione del batterio: in particolare, hanno osservato che il batterio si riproduceva due volte più velocemente alla temperatura di 37 °C con un pH di 6.0 rispetto alla condizione di neutralità (pH=7.0) e che addirittura la crescita del batterio si era arrestata a pH=8. Nelle nostre condizioni sperimentali, è stata riscontrata un'acidità significativamente più elevata nel liquido ruminale del gruppo stalla rispetto ai tre gruppi al pascolo (pH pari a 6.30 vs 7.06, rispettivamente; $p < 0.0001$). È noto che un'alimentazione basata sui concentrati riduce il pH a livello ruminale. La relazione tra la presenza di fibra nella dieta e la variazione di pH a livello ruminale è stata estensivamente studiata a causa dell'influenza che essa ha sia sulle performance produttive dei ruminanti sia sulla loro salute. La fibra ha il compito di stimolare la masticazione e la successiva ruminazione; durante la masticazione vengono prodotti i tamponi salivari che poi mediante la deglutizione arrivano al rumine dove neutralizzano gli acidi prodotti dalle fermentazioni (Michael 1997). È quindi plausibile pensare che nel rumine degli animali alimentati esclusivamente con il concentrato a base di orzo si siano create le condizioni di pH ideali per una maggiore moltiplicazione di batteri produttori di scatolo come il *Clostridium scatologenes*. Questa ipotesi sembra coerente anche con i risultati ottenuti dal modello statistico che prende in considerazione i dati dei soli gruppi al pascolo. Infatti, nel liquido ruminale

prelevato da questi animali non si era evidenziata alcuna differenza significativa nella presenza di indolo e scatolo. In questo caso, infatti, il pH non presentava differenze significative tra i tre gruppi. Tuttavia rimane complicato spiegare perché tra i tre gruppi pascolo non si sia registrato un effetto del diverso livello di WSC e del rapporto WSC/PG osservati nel foraggio sulla presenza di indolo e scatolo a livello ruminale, come invece atteso. Considerato che Schreurs et al. (2007b) hanno osservato un rapido assorbimento ruminale (poiché le massime concentrazioni di indolo e scatolo nel plasma sono state raggiunte 1–2 ore dopo la fine del pasto), si potrebbe ipotizzare che le attese differenze tra i tre gruppi al pascolo siano state attenuate dalle 12 ore di digiuno pre-macellazione. L'influenza del digiuno precedente la macellazione potrebbe essere stato più contenuto negli animali del gruppo stalla, permettendo di spiegare la differenza osservata. È verosimile che in questi animali la probabile elevata presenza del *Clostridium scatologenes*, favorita dalle condizioni di pH ruminale, possa aver determinato una prosecuzione del processo di fermentazione del triptofano durante le ore di digiuno, processo che avrebbe mantenuto elevato il livello di scatolo nel liquido ruminale prelevato alla macellazione.

8.4. Indolo e scatolo nel grasso perirenale

Una parte dello scatolo e dell'indolo prodotti a livello ruminale viene assorbita dalla stessa mucosa del rumine e trasferita al circolo sanguigno; la maggior parte viene, invece, assorbita a livello del duodeno (Deslandes et al., 2001). Dal circolo sanguigno, questi composti vengono escreti attraverso le urine oppure accumulati nei tessuti, quali ad esempio il grasso perirenale oggetto di analisi. Pertanto, come

già riportato da Priolo et al. (2009), l'accumulo di questi composti nel grasso perirenale degli agnelli dovrebbe essere proporzionale alla produzione di indolo e scatolo a livello del rumine. Tuttavia, nelle nostre condizioni sperimentali, l'accumulo di composti indolici nel grasso perirenale ha mostrato un trend diverso rispetto a quello osservato nel liquido ruminale, dove l'indolo era significativamente più alto negli animali del gruppo stalla rispetto a quelli che avevano utilizzato il pascolo.

Le differenze osservate tra i gruppi al pascolo ed il gruppo in stalla concordano con i risultati disponibili in letteratura. Infatti, l'accumulo dei composti di derivazione indolica nel tessuto adiposo dei ruminanti aumenta negli animali condotti al pascolo rispetto a quelli alimentati con concentrati. La letteratura dimostra inoltre che nel caso di alimentazione mista (pascolo e concentrati) anche il livello di concentrato somministrato agli animali può modificare la quantità di scatolo accumulato nei tessuti. Serrano et al. (2011) hanno osservato che lo scatolo si accumulava in quantità minori nel tessuto adiposo di vitelli alimentati al pascolo cui veniva somministrato anche un concentrato *ad libitum* rispetto a vitelli alimentati al pascolo cui il concentrato veniva fornito, invece, in quantità limitata. Gli autori hanno attribuito questo risultato al rapporto carboidrati:proteine, più alto nella dieta contenente la maggiore quantità di concentrato, e che quindi avrebbe ridotto la degradazione delle proteine a livello ruminale e la conseguente disponibilità di triptofano per la biosintesi batterica di indolo e scatolo. Risultati simili, riportati da Priolo et al. (2005), da Young et al. (2003) e raccolti in un lavoro di review da Schreurs et al. (2008), confermano la relazione inversa tra la presenza concentrati nella dieta animale e l'accumulo di derivati indolici nel

tessuto adiposo dei ruminanti. In uno studio recente, Vasta et al. (2011) hanno osservato, per la prima volta, la presenza di scatolo nel muscolo *longissimus dorsi* di gruppi di giovenche alimentate rispettivamente solo al pascolo, solo con concentrato, con insilato e pascolo o con insilato, pascolo e un'integrazione di concentrato. Secondo quanto riportato da questo studio, lo scatolo si accumula anche nel muscolo in quantità minori quando la dieta è ricca di concentrati. Gli autori concludono, anche, che la presenza di scatolo nel muscolo può far parte di un pool di parametri da utilizzare al fine di risalire alla tipologia di alimentazione somministrata agli animali. Recentemente, Coppa et al. (2011) hanno riportato che la presenza di scatolo era maggiore nel latte di vacche nutrite al pascolo rispetto al latte ottenuto da vacche allevate in stalla con fieno e concentrato. In letteratura sono presenti, tuttavia, anche studi in cui la relazione tra il pascolo e la maggiore presenza di scatolo non è confermata (Sebastià et al., 2003; Priolo et al., 2004). Nello studio di Priolo et al. (2004) la presenza di scatolo era solo tendenzialmente ($p \approx 0.1$) più elevata nel grasso caudale sottocutaneo di agnelli condotti al pascolo rispetto a quelli allevati in stalla. Nel caso di Sebastian et al. (2003), che non avevano riscontrato differenze significative nella presenza di scatolo nel grasso sottocutaneo tra agnelli alimentati al pascolo e agnelli alimentati in stalla con concentrati, erano stati presi in considerazione animali allevati in zone diverse e che avevano pascolato per tempi diversi (da 18 a 49 settimane), pertanto l'eterogeneità delle condizioni di allevamento potrebbe avere influito in qualche modo nel nascondere eventuali differenze.

Per quanto concerne la presenza di indolo e scatolo nel grasso degli animali dei tre gruppi pascolo, come già descritto e motivato nei risultati, si è provveduto a

confrontare le varianze relative ai soli dati dei tre gruppi al pascolo. Questa analisi statistica ha messo in evidenza un effetto della modalità di utilizzo del pascolo, cioè dell'orario di pascolamento, sul livello di indolo che è risultato significativamente più alto nel gruppo 4hAM rispetto al gruppo 8h.

Come discusso nel paragrafo precedente, questa prova sperimentale era stata progettata in modo tale da fornire agli animali che pascolavano durante il pomeriggio un pascolo con un più elevato contenuto in WSC ed un rapporto WSC:proteine maggiore rispetto a quelli che pascolavano al mattino, sulla base dei risultati riportati da Avondo et al. (2008) in differenti condizioni sperimentali. I dati analitici del pascolo vanno in questa direzione; infatti gli agnelli del gruppo 4h PM disponevano di un pascolo con un maggior quantitativo di WSC ed un più alto rapporto WSC/PG rispetto agli animali che utilizzavano il pascolo solo al mattino oppure dal mattino al pomeriggio.

I risultati ottenuti sul grasso perirenale, quindi, confermano le attese: l'erba verde utilizzata solo durante le ore del mattino è caratterizzata da una minor presenza di carboidrati solubili e favorisce un maggior accumulo di indolo nel grasso. Ciò indica che le caratteristiche qualitative dell'erba al mattino non permettono una ottimale utilizzazione delle fonti proteiche del pascolo stesso. L'utilizzo dell'erba nel pomeriggio, invece, a seguito della fotosintesi che ha favorito l'accumulo degli zuccheri solubili nella pianta, permette una migliore efficienza ruminale nell'uso delle fonti glucidiche ed azotate e, di conseguenza, permette di ridurre significativamente l'accumulo di indolo nei tessuti animali. Nel caso degli animali che utilizzavano il pascolo dal mattino al pomeriggio (gruppo 8 h nelle nostre condizioni sperimentali), la mancanza di significatività

nel contenuto di indolo in confronto al gruppo che pascolava solo nel pomeriggio, induce ad ipotizzare che essi abbiano intensificato il consumo di foraggio più a ridosso delle ore pomeridiane. È, infatti, riportato in letteratura che al pascolo i piccoli ruminanti riescono ad incrementare l'ingestione nelle ore pomeridiane (Fisher et al., 2005; Burns et al., 2005) ed a selezionare le diverse parti vegetative della pianta in funzione della loro composizione chimica (Maylland et al., 2000) in modo da ottimizzare l'ingestione di nutrienti per far fronte alle proprie esigenze nutrizionali (Avondo et al., 2008; Avondo et al., 2009; Pagano et al., 2011). Questo spiegherebbe anche la mancanza di differenze significative tra la presenza di indolo nel grasso degli animali del gruppo 8h e 4hPM.

Resta comunque da comprendere l'origine della incongruenza dei dati della concentrazione di scatolo nel liquido ruminale e nel grasso perirenale. Come mai lo scatolo, maggiormente presente nel liquido ruminale degli animali del gruppo stalla rispetto agli animali dei tre gruppi al pascolo, è risultato poi meno presente nel grasso perirenale degli animali dello stesso gruppo stalla? I dati osservati inducono ad ipotizzare che ci sia stata una diversa metabolizzazione nel fegato e quindi una differente escrezione, urinaria e/o fecale, dello scatolo tra il gruppo stalla ed i tre gruppi al pascolo. La letteratura indica che la maggior quota di scatolo ematico viene metabolizzata nel fegato (Friis 1993, cit. da Deslandes et al., 2001) e che i prodotti del metabolismo epatico vengono espulsi con le urine e con le feci (Spiehs et al., 2011, Rideout et al., 2004). Lo scatolo non metabolizzato nel fegato si accumula nel tessuto adiposo, nel fegato e nei reni (Friis, 1993, cit. da Deslandes et al., 2001) oppure, nel caso di fattrici in lattazione, viene escreto attraverso il latte (Roy et al., 2002). Ad oggi, non sono

stati trovati in letteratura studi finalizzati alla conoscenza dei fattori che favoriscono la metabolizzazione epatica e la conseguente escrezione o l'accumulo dello scatolo nei ruminanti.

8.5.Smart Nose

Lo Smart Nose, o un naso artificiale, è uno strumento analitico di nuova generazione basato sulla spettrometria di massa. Esso è sensibile ai composti volatili dello spazio di testa di diverse matrici e quindi, simula, in qualche modo, il naso umano (Ampuero and Bosset, 2003). Questo strumento consente la caratterizzazione diretta della componente aromatica di un liquido o di un solido senza la previa separazione dei costituenti dello spazio di testa. Pertanto, le informazioni relative ai composti aromatici non vengono analizzate singolarmente, come nelle classiche tecniche analitiche, ma globalmente. Esse, vengono raggruppate in un'unica complessa matrice che rappresenta l'impronta digitale dell'aroma di un dato campione. Pertanto, l'identificazione dei diversi campioni si basa sulle differenze, a volte piccole, tra gli spettri che costituiscono l'impronta digitale di ogni campione.

La scelta di applicare la tecnica SMartNose soltanto ai campioni dei gruppi pascolo è stata dettata da motivi scientifici. Infatti, le differenze nella componente aromatica della carne tra alimentazione in stalla ed alimentazione al pascolo sono state ampiamente dimostrate in letteratura, mediante la ricerca e l'individuazione delle diverse componenti volatili (review: Vasta e Priolo 2006; Vasta et al., 2007; Vasta et al., 2011). Pertanto includere nel nostro data set anche i campioni del gruppo stalla non avrebbe prodotto risultati innovativi; inoltre, la presenza dei

campioni del gruppo stalla avrebbe potuto rendere meno evidenti le eventuali differenze tra i tre gruppi al pascolo.

Dai risultati ottenuti nelle nostre condizioni sperimentali, si può asserire che il naso elettronico basato sulla spettrometria di massa, SMart Nose, è in grado di rilevare le differenze aromatiche sui campioni di muscolo di *Longissimus dorsi* ottenuti dagli agnelli che utilizzavano il pascolo. In dettaglio, dalla PCA si evince che le differenze aromatiche fra il gruppo 8h, che ha pascolato per 8 ore dalle 9:00 alle 17:00 ed il gruppo 4hPM, che ha pascolato per 4 ore dalle ore 13:00 alle 17:00 sono minori rispetto a quelle con il gruppo 4hAM, che ha pascolato per 4 ore dalle ore 9:00 alle 13:00. Inoltre, considerato che le percentuali di corretta classificazione per i gruppi oggetto di studio oscillano dall' 83 al 92%, si può asserire che all'interno di ogni gruppo le tre parcelle di pascolo su cui hanno pascolato gli agnelli non hanno portato a differenze aromatiche all'interno di ogni singolo gruppo di pascolamento, facendo ottenere così gruppi di campioni molto omogenei.

Poiché lo Smart Nose non fornisce informazioni riguardo ai singoli composti volatili che costituiscono l'aroma del campione analizzato, ma simula il naso umano restituendo un'unica informazione globale, bisognerebbe comparare i nostri risultati con quelli ottenuti in prove in cui sono stati utilizzati dei panelisti anziché con risultati ottenuti da un'analisi classica delle sostanze volatili. Purtroppo, in letteratura non esistono studi che testano l'aroma della carne in condizioni sperimentali simili alle nostre. Tuttavia, una parte del progetto europeo di cui questo studio fa parte integrante, aveva lo scopo di investigare l'effetto dell'orario di pascolamento sulla composizione dei composti volatili della carne di

agnello (Vasta et al., 2012b), il quale rappresenta l'unico studio con cui è possibile comparare direttamente i nostri risultati. Gli autori, dopo aver analizzato mediante gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa diverse decine di composti volatili contenuti nel grasso perirenale degli agnelli dei gruppi che avevano utilizzato il pascolo, hanno selezionato, mediante analisi discriminante stepwise, quelli che meglio discriminavano tra i tre gruppi di pascolo. I composti selezionati, sono stati quindi soggetti ad analisi di discriminante canonica, la quale ha permesso una netta separazione tra i tre gruppi. Gli autori hanno, infine, eseguito una validazione incrociata dei risultati, a seguito della quale ogni animale è stato attribuito al suo gruppo di origine con un'accuratezza mai inferiore al 90% per ciascun gruppo.

Comparando i dati appena descritti e quelli ottenuti nel presente lavoro, si evince che sia la tecnica classica sia lo SMart Nose hanno ben discriminato i tre gruppi di pascolamento. Tuttavia, lo Smart Nose, oltre ad una più semplice preparazione del campione da analizzare, presenta l'indubbio vantaggio di non perdere informazioni relative al campione stesso perché non esclude alcun composto volatile dall'analisi.

9. Conclusioni e prospettive

I risultati ottenuti nel presente lavoro di tesi evidenziano alcuni punti di interesse scientifico che possono costituire una innovazione della tecnica di allevamento e che, inoltre, danno adito ad ulteriori approfondimenti di ricerca.

La riduzione del numero di ore giornaliere dedicate al pascolamento in un sistema estensivo basato unicamente sul pascolo, ha avuto interessanti effetti su tre aspetti: il peso della carcassa, il livello di indolo accumulato nel grasso perirenale e la componente aromatica del muscolo.

Il peso della carcassa non è risultato modificato dal numero di ore di utilizzo del pascolo. Ciò sembra indicare una maggiore efficienza di trasformazione dell'alimento pascolo nei tessuti che compongono la carcassa da parte degli agnelli che hanno utilizzato il pascolo soltanto per 4 h/d (di mattina o di pomeriggio).

La minor presenza di indolo riscontrata nel gruppo di animali che utilizzava il pascolo nel pomeriggio rispetto a quanto osservato negli altri due gruppi che utilizzavano il pascolo solo di mattina oppure per 8 h/d, conferma che le caratteristiche chimiche dell'erba verde utilizzata solo durante le ore pomeridiane permettono una ottimale utilizzazione delle fonti proteiche del pascolo in relazione alla maggior presenza di carboidrati solubili. In sintesi, i dati qui mostrati suggeriscono che un accesso al pascolo limitato alle sole ore pomeridiane (l'innovazione della tecnica di allevamento cui si accennava inizialmente), oltre a mantenere inalterata la resa produttiva, rappresentata dalla carcassa, non influisce sulla presenza di indolo e scatolo nei tessuti animali rispetto alla tecnica classica di pascolamento che prevede l'utilizzo del pascolo per circa 8 h/d.

L'analisi strumentale (Smart Nose) ha dimostrato che è possibile, con buona approssimazione, distinguere i campioni di carne provenienti dai tre gruppi sperimentali, quindi dalle tre diverse modalità di utilizzo del pascolo, in funzione della loro componente aromatica globale. In prospettiva, sarebbe interessante verificare se tali differenze riscontrate a livello strumentale possano essere riscontrate anche da un panel addestrato che, inoltre, potrebbe evidenziare un giudizio di accettabilità complessiva diverso in funzione delle modalità di utilizzo del pascolo. Considerato che il gusto del consumatore non è standardizzato, si potrebbe ipotizzare un uso differenziato del pascolo durante l'arco della giornata in funzione della tipologia aromatica più gradita a particolari gruppi di consumatori.

Dal punto di vista tecnico-applicativo, i risultati ottenuti inducono ad ipotizzare che il pascolamento del gregge effettuato soltanto nelle ore pomeridiane potrebbe influire sui costi di produzione, sulla sostenibilità ambientale e, infine, sulla gradevolezza dei prodotti. Infatti, una diversa distribuzione delle ore di lavoro e dell'organizzazione dello stesso potrebbe portare ad ottenere una riduzione dei costi di gestione. La minore presenza degli animali al pascolo, a parità di carico di bestiame, potrebbe ridurre la attività di calpestamento che le greggi esercitano sul suolo e sul pascolo stesso, migliorando la sostenibilità del sistema di allevamento. Se, infine, la carne prodotta da animali che utilizzano il pascolo nel pomeriggio risultasse più gradita al consumatore, avremmo trovato un ulteriore punto di forza nella innovazione di processo esaminata in questo lavoro di tesi.

Bibliografia

- Abijaoudé J.A., Morand-Fehr P., Tessier J., Schmidely P., Sauvant D. (2000a). Diet effect on the daily feeding behaviour, frequency and characteristics of meals in dairy goats. *Livestock Production Science*. 64:29–37.
- Abijaoudé J.A., Morand-Fehr P., Tessier J., Schmidely P., Sauvant D. (2000b). Influence of forage: concentrate ratio and type of starch in the diet on feeding behaviour, dietary preferences, digestion, metabolism and performance of dairy goats in mid lactation. *Animal Science*. 71:359–368.
- Aggett P.J., Antoine J.M., Asp N.G., Bellisle F., Contor L., Cummings J.H., Howlett J., Muller, D.J.G., Persin C., Pijls L.T.J., Rechkemmer G., Tuijelaars S., Verhagen H. (2005). PASSCLAIM - Consensus on criteria. *European Journal of Nutrition*. 44:5-30.
- Ampuero S., Bosset J.O. (2003). The electronic nose applied to dairy products: a review. *Sensors and Actuators B-Chemical*. 94:1-12.
- AOAC (1995). Official methods of analysis (16th ed.). Washington DC: AOAC.
- Avondo M., Bordonaro S., Marletta D., Guastella A. M., D'Urso G. (2002). A simple model to predict the herbage intake of grazing dairy ewes in semi-extensive Mediterranean systems. *Livestock Production Science*. 73:275–283.
- Avondo, M., Bonanno, M., Pagano, R. I., Valenti, B., Di Grigoli, A., Licata, M. L., Galofaro V., Pennisi P. (2008). Milk quality as affected by grazing time of day in Mediterranean goats. *Journal of Dairy Research*. 75:48–54.
- Avondo M., Pagano R.I., Guastella A.M., Criscione A., Di Gloria M., Valenti B., Piccione G., Pennisi P. (2009). Diet selection and milk production and composition in Girgentana goats with different alpha(s1)-casein genotype. *Journal of Dairy Research*. 76:202-209.
- Bañón S., Andreu C, Leancina J., Garrido M.-D. (2004). Fresh and eating pork quality from entire versus castrates havey males. *Food Quality and Preferences*. 15:292-300.

- Bernues A., Ripoll G., Panea B. (2012). Consumer segmentation based on convenience orientation and attitudes towards quality attributes of lamb meat. *Food quality and Preference*. 26:211-220.
- Bernabéu R., Tendero A. (2005). Preference structure for lamb meat consumers. A Spanish case study. *Meat Science*. 71:464–470.
- Bray T.M., Sandberg H.E., Carlson J.R. (1975). An EPR study of structural perturbations induced by 3-methylindole in the protein and lipid regions of erythrocyte membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 382: 534-541.
- Burner D.M., Belesky D.P. (2004). Diurnal effects on nutritive value of alley-cropped orchardgrass herbage. *Crop Science*. 44:1776-1780
- Burns J.C., Mayland H.F., Fisher D.S. (2005). Dry matter intake and digestion of alfalfa harvested at sunset and sunrise. *Journal of Animal Science* 83:262–270.
- Burns J.C., Fisher D.S., Mayland H.F. (2007). Diurnal shift in nutritive value of alfalfa harvested as hay and evaluated by animal intake and digestion. *Crop Science*. 47:2190-2197.
- Calkins C.R., Hodgen J.M. (2007). A fresh look at meat flavor. *Meat Science*. 77: 63-80.
- Castel J.M., Mena Y., Ruiz F.A., Camúnez-Ruiz J., Sánchez-Rodríguez M. (2011). Changes occurring in dairy goat production systems in less favored areas of Spain. *Small Ruminant Research*. 96:83–92.
- Channon H. A., Payne A., Warner R.D. (2000). Halothane genotype, pre-slaughter handling and stunning method all influence pork quality. *Meat Science*. 56:291–299.
- Chemmam M., Moujahed N., Ouzrout R., Guellati M.A. (2009). Seasonal variations of chemical composition, intake and digestibility by ewes of natural pasture in the south-eastern regions of Algeria. *Options Méditerranéennes Série A* 85, 123–127. Available online at: http://www.ciheam.org/publications/options-mediterraneennes._5_40027_.php

- Chilliard Y., Glasser F., Ferlay A., Rouel L., Doreau M. (2007). Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 109:828-855.
- Clydesdale F. M. (1978). Colorimetry – Methodology and applications. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 10:243-301.
- Cook K.L., Rothrock M.J., Loughrin J.H., Doerner K.C. (2007). Characterization of skatole-producing microbial populations in enriched swine lagoon slurry. *Fems Microbiology Ecology*. 60:329-340
- Coppa M., Martin B., Pradel P., Leotta B., Priolo A., Vasta V. (2011). Effect of a Hay-Based Diet or Different Upland Grazing Systems on Milk Volatile Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59:4947-4954.
- D'Amicis A., Turrini A. (2002). The role of meat in human nutrition: the Italian case. Proc. 48th International Congress on Meat Science and Technology, Roma, Italy (2002), pp. 117–119.
- D'Urso G., Avondo M., Bordonaro S., Marletta D., Guastella A. M. (1998). Effect of sustained-release somatotropin on performance and grazing behavior of ewes housed at different stocking rates. *Journal of Dairy Research* 81:958–965.
- Deslandes B., Garépy C., Haude A. (2001). Review of microbiological and biochemical effect of skatole on animal production. *Livestock Production Science*. 71: 193-200.
- Deriaz R. E. (1961). Routine analysis of carbohydrates and lignin in herbage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 12:152–160.
- Doerner K.C., Cook K.L., Mason B.P. (2009). 3-Methylindole production is regulated in *Clostridium scatologenes* ATCC 25775. *Letters In Applied Microbiology*. 48:125-13.
- Duckett S.K., Kuber P.S. (2001). Genetic and nutritional effects on lamb flavour. *Journal of Animal Science*. 79:E249–E259.
- EC (2007). Council Regulation (EC) No. 834/2007 of 28 June 2007 on organic production and labelling of organic products and repealing Regulation (EEC)

- No 2092/91. *Official Journal of the European Union*. L 189/1. 20.7.2007. Luxembourg.
- Elgersma A., Maudet P., Witkowska P., Wever A.C. (2005). Effects of nitrogen fertilization and regrowth period on fatty acid concentrations in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) *Annals of Applied Biology*. 147:145–152
- Elmore J.S., Campo M.M., Enser M., Mottram D.S. (2002). Effect of lipid composition on meat-like model systems containing cysteine, ribose, and polyunsaturated fatty acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50:1126–1132.
- Elmore J.S., Mottram D.S. (2006). The role of lipid in the flavor of cooked beef. *Development in food science*. 43:37-378.
- Enser M. (2001). The role of fats in human nutrition. In B. Rossel (Ed.), *Oils and Fats*. Vol 2. Animal Carcass fats (pp. 77-122). Leatherhead, Surrey, UK: Leatherhead Publishing.
- FAO (2010). Fats and fatty acids in human nutrition. FAO report of an expert consultation. FAO Food and Nutrition paper, vol. 91, Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Farmer L.J. (1994). The role of nutrients in meat flavour formation. *Proceedings of the Nutrition Society*. 53:327–333.
- Fay L.B., Brevard H. (2005.) Contribution of mass spectrometry to the study of the Maillard reaction in food. *Mass Spectrometry Review*. 24:487–507.
- Fisher D.S., Burns J.C., Mayland H.F. (2005). Ruminant selection among Switchgrass hays cut at either sundown or sunup. *Crop Science* 27:1394–1402.
- Ford A.L., Park R.J. (1980). Odours and flavours in meat. In: Lawrie, R.A. (Ed.), *Developments in Meat Science*, vol. 1. Elsevier Applied Science, London, pp. 219–248.
- Fox J.B. (1987). The Pigments of Meat. In *The Science of Meat and Meat Products*; Price J. F., Schweigert, B. S., Eds.; Food and Nutrition Press: Westport, CT; pp 193-215.

- Fraser K., Lane G.A., Schreurs N.M., Tavendale M.H., McNabb W.C., Marotti D.M. (2003). Effects of different forages on methylphenol formation in the rumen of sheep. *Proceedings of New Zealand Society of Animal Production*. 63:40–44.
- Friis C. (1993). Distribution, metabolic fate and elimination of skatole in the pig. *Measurement and Prevention of Boar Taint in Entire Male Pigs*, INRA, Paris (1993) pp. 113–115
- Galanopoulos K., Abas Z., Laga V., Hatziminaoglou L., Boyazoglu J. (2011). The technical efficiency of transhumance sheep and goat farms and the effect of EU subsidies: Do small farms benefit more than large farms? *Small Ruminant Research*. 100:1-7
- Gatellier P., Mercier Y., Juin H., Renerre M. (2005). Effect of finishing mode (pasture- or mixed-diet) on lipid composition, colour stability and lipid oxidation in meat from Charlois cattle. *Meat Science*. 69:175–186.
- Greene B.E. (1969). Lipid oxidation and pigment changes in raw beef. *Journal of Food Science*. 34:110-113.
- Gregorini P., Eirin M., Refi R., Ursino M., Ansi E., Gunter S.A., (2007). Timing of herbage allocation in strip grazing: Effects on grazing pattern and performance of beef heifers. *Journal of Animal Science*. 84:1943-1950.
- Gregorini P., Soder K.J., Sanderson M.A. (2008). Case study: a snapshot in time of fatty acids composition of grass herbage as affected by time day. *The professional Animal Scientist*. 24:675-680.
- Gregersen V.R., Conley L.N., Sorensen K.K., Guldbrandtsen B., Velandar I.H., Bendixen C. (2012). Genome-wide association scan and phased haplotype construction for quantitative trait loci affecting boar taint in three pig breeds. *BMC Genomics*. 13: article 22
- Grunert, K. G. (2006). Future trends and consumer lifestyles with regard to meat consumption. *Meat Science*. 74:149–160.

- Hammond A.C., Glenn B.P., Huntingdon G.B., Breeze R.G. (1984). Site of 3-methylindole and indole absorption in steers after ruminal administration of l-tryptophan. *American Journal of Veterinary Research*. 45:171–174
- Hay M., Vulin A., Génin S., Sales P., Prunier A. (2003). Assessment of pain induced by castration in piglets: behavioral and physiological responses over the subsequent 5 days. *Applied Animal Behaviour Science*. 82:201-218.
- Hadjigeorgiou I., Osoro K., Fragoso de Almeida J.P., Molle G. (2005). Southern European grazing lands: production, environmental and landscape management aspects. *Livestock Production Science*. 96:51–59.
- Harfoot C.G., Hazelwood G.P. (1997). Lipid metabolism in the rumen. In: the rumen microbial cosystem. Ed. P.N. Hobson and C.S. Stewart. Chapman & Hall, London; pp 107-115.
- Hocquette J.F., Gondret F., Baéza E., Médale F., Jurie C., Pethick D.W. (2010). Intramuscular fat content in meat-producing animals: Development genetic and nutritional control and identification of putative markers. *Animal* 4:303–319.
- Hodgen J., Calkins C., Cuppett S. (2006). Protocol for determining volatile compound differences between liver-like and normal beef samples using gas chromatography. *Journal of Animal Science*. 84: 90-90
- Honeyfield D.C., Carlson J.R. (1990). Assay for enzymatic conversion of indolacetic acid to 3-methylindole in a ruminal *Lactobacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*. 56:724-729.
- Hornstein I., Crowe P.F. (1960). Flavor studies on beef and pork. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 8:494-498.
- Huntington G.B., Burns J.C. (2007). Afternoon harvest increases readily fermentable carbohydrate concentration and voluntary intake of gamagrass and switchgrass baleage by beef steers. *Journal of Animal Science*. 85:276–28.
- Hwang I.H., Devine C.E., Hopkins D.L. (2003). The biochemical and physical effects of electrical stimulation on beef and sheep meat tenderness. *Meat Science*. 65:677–691.

- Jenkins T.C., Wallace R.J., Moate P.J., Mosley E.E. (2008). Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *Journal of Animal Science*. 86:397-412.
- Jenschke B., Hamling A., Hodgen J., Meisinger J., Moss D., Ahnstrom M.L., Calkins C. (2006). A novel procedure to identify off-flavored beef steaks. *Journal Of Animal Science*. 84:90-90.
- Kaneda T., (1991). Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function and taxonomic significance. *Microbiological Reviews*. 55:288–302.
- Kemp P., Lander D.J., (1984). Hydrogenation in vitro of α -linolenic acid to stearic acid by mixed cultures of pure strains of rumen bacteria. *Journal of Genetics Microbiology*. 130:527-533.
- Knee B.W., Cummins L.J., Walker P.J., Kearney G.A., Warner R.D. (2007). Reducing dark-cutting in pasture-fed beef steers by high-energy supplementation. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 47:1277-1283.
- Kondjoyan, N., & Berdagué, J. -L. (1996). A compilation of relative retention indices for the analysis of aromatic compounds. Clermont Ferrand, France: Laboratoire Flaveur.
- Koohmaraie M., Geesink G.H. (2006). Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. *Meat Science*. 74:34–43.
- Kramlich W.E., Pearson, A.M. (1960). Separation and identification of cooked beef flavor components. *Food Research*. 25:712-719.
- Lane G.A., Fraser K. (1999). A comparison of phenol and indol flavour compounds in fat, and of phenols in urine cattle fed pasture or grain. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 42:289–296.
- Lawrie R.A. (1998). Lawrie's Meat Science, 6th edition. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK.

- Le P.D., Aarnink A.J.A., Ogink N.W.M., Becker P.M., Verstegen M.W.A. (2005). Odour from animal production facilities; its relationship to diet. *Nutrition Research Reviews*. 18:3–30.
- Leao A.G., Sobrinho A.G.D., Moreno G.M.B., de Souza H.B.A., Giampietro A., Rossi R.C., Perez H.L. (2012). Physic-chemical and sensorial characteristics of meat from lambs finished with diets containing sugar cane or corn silage and two levels of concentrate. *Journal of Animal Science*. 41:1253-1262.
- Leveau H. J., Saskia G. (2008). Discovery of a bacterial gene cluster for catabolism of the plant hormone indole 3-acetic acid. *Fems Microbiology Ecology*. 65:238-250.
- Licitra G, Hernandez TM & Van Soest PJ 1996 Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* 57 347–358
- Linden A., Desmetch D., Vandenput S., van de Weerdt M.L., Lekeux P. (1996). Effect of serotonergic blockade on calf pulmonary function after the intravenous administration of 3-methylindole. *Journal of Comparative Pathology*. 114:361–371.
- Liou J.S., Balkwill D.L., Drake G.R., Tanner R.S. (2005). *Clostridium carboxidivorans* sp. nov., a solvent-producing clostridium isolated from an agricultural settling lagoon, and reclassification of the acetogen *Clostridium scatologenes* strain SL1 as *Clostridium drakei* sp. nov. *International Journal of Systematic Evolution Microbiology*. 55:2085–2091.
- Lissau I., Overpeck M.D., Ruan W.J., Due P., Holstein B.E., Hediger M.L. (2004). Body mass index and overweight in adolescents in 13 European countries, Israel, and the United States. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*. 158:27-33.
- Liu Q., Lanari M.C., Schaefer D.M. (1995). A review of dietary vitamin E supplementation for improvement of beef quality. *Journal of Animal Science*. 73:3131-3140.

- Luciano G., Monahan F.J., Vasta V., Pennisi P., Bella M., Priolo A. (2009). Lipid and colour stability of meat from lambs fed fresh herbage or concentrate. *Meat Science*. 82:193-199.
- Luciano G., Moloney A.P., Priolo A., Rohrle F.T., Vasta V., Biondi L., Lopez-Andres P., Grasso S., Monahan F.J. (2011). Vitamin E and polyunsaturated fatty acids in bovine muscle and the oxidative stability of beef from cattle receiving grass or concentrate-based rations. *Journal of Animal Science*. 89:3759-3768.
- Luykx D.M.A.M., van Ruth S.M. (2008). An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products. *Food Chemistry*. 107: 897-911.
- Macy R.L., Naumann H.D., Bailey M.E. (1964). Water-soluble flavor and odor precursors of meat. I Qualitative study of certain amino acids, carbohydrates, non-amino acid nitrogen compounds, and phosphoric acid esters of beef, pork, and lamb. *Journal Food Science*. 29:136-141.
- Mancini R.A., Hunt M.C. (2005). Current research in meat color. *Meat Science*: 71:100-121.
- Mapiye C., Aldai N., Turner T.D., Aalhus J.L., Rolland D.C., Kramer J.K.G., Dugan M.E.R. (2012). The labile lipid fraction of meat: From perceived disease and waste to health and opportunity. *Meat Science*. 92:210-220.
- Martínez-Cerezo S., Sañudo C., Medel I., Olleta J.L. (2005). Breed, slaughter weight and ageing time affects on sensory characteristics of lamb. *Meat Science*. 69:571–578.
- Marx G., Horn T., Thielebein J., Knubel B., von Borell E. (2003). Analysis of painrelated vocalization in young pigs. *Journal of Sound and Vibration*. 266:687-698.
- Maughan C., Martini S. (2012). Identification and Quantification of Flavor Attributes present in Chicken, Lamb, Pork, Beef, and Turkey. *Journal of Food Science*. 7:S115-S121.

- Maylland H., Gregorini P., Mertend D.R., Taylor J.B., Burns J.C., Fisher D.S., Ciavarella T., Smith K., Shewmaker G., Griggs T. (2000). Diurnal changes in forage quality and their effects on animal preference, intake and performances. p. 233 in Proc. 35th California Alfalfa Symp., Visalia, CA.
- McAfee A.J., McSorley E.M., Cuskelly G.J., Moss B.W., Wallace J.M.W., Bonham M.P., Fearon A.M. (2010). Red meat consumption: An overview of the risk and benefits. *Meat science*, 84:1-13.
- McCabe C., Rolls E.T. (2007). Umami: a delicious flavor formed by convergence of taste and olfactory pathways in the human brain. *European Journal of Neuroscience*. 25:1855-1864.
- McGlone J.J., Nicholson R.I., Hellman J.M., Herzog D.N. (1993). The development of pain in young pigs associated with castration and attempts to prevent castration-induced behavioural changes. *Journal of Animal Science* 71:1441-1446.
- Merck (1984). The Merck Index. An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals, 10th Edition. Merck, Rahway, NJ
- Micha R., Wallace S.K., Mozaffarian D. (2010). Red and processed meat consumption and risk of incident coronary heart disease, stroke, and diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Circulation*. 121:2271-2283.
- Michael S. A. (1997). Relationship Between Fermentation Acid Production in the Rumen and the Requirement for Physically Effective Fiber. *Journal of Dairy Science*. 80:1447-1462.
- Min B.R., McNabb W.C., Barry T.N., Peters J.S. (2000). Solubilization and degradation of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase (EC 4.1.139; Rubisco) protein from white clover (*Trifolium repens*) and *Lorus Curniculatus* by rumen microorganism and the effect of condensed tannins on the processes. *The Journal of Agricultural Science Cambridge*. 134: 305-317.
- Min B.R., Attwood G.T., Reilly K., Sun W., Peters J.S., Barry T.N., McNabb W.C. (2002). *Lotus corniculatus* condensed tannins decrease in vivo populations of

- proteolytic bacteria and affect nitrogen metabolism in the rumen of sheep. *Canadian Journal of Microbiology*. 48:911–921.
- Min B.R., Barry T.N., Attwood G.T., McNabb W.C. (2003). The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Animal Feed Science and Technology*. 106:3–19.
- Moe M., Lien S., Aasmundstad T., Meuwissen T.H., Hansen M.H., Bendixen C., Grindflek E. (2009) Association between SNPs within candidate genes and compounds related to boar taint and reproduction. *BMC Genetics*. 10:32
- Mohammed N., Onodera R., Or-Rashid M.M. (2003). Degradation of tryptophan and related indolic compounds by ruminal bacteria, protozoa and their mixture in vitro. *Amino Acids* 24:73–80.
- Molan A.L., Attwood G.T., Min B.R. and McNabb W.C. (2001). The effect of condensed tannins from *Lotus pedunculatus* and *Lotus corniculatus* on the growth of proteolytic rumen bacteria in vitro and their possible mode of action. *Canadian Journal of Microbiology*. 47:626–633.
- Molénat G., Foulquie D., Autran P., Bouix J., Hubert D., Jacquin M., Bocquier F., Bibe B. (2005). Pour un élevage ovin allaitant performant et durable sur parcours: un système expérimental sur le Causse du Larzac. *INRA Productions Animales*. 18:323–338. Available online at: <http://www.inra.fr/internet/Produits/PA/index.php>
- Molendi-Coste O., Legry V., Leclercq I.A. (2011). Why and how meet n-3 PUFA dietary recommendations? *Gastroenterology Research and Practice*. 2011.
- Mottram D.S. (1998). Flavour formation in meat and meat products: a review. *Food Chemistry*. 62:415–424.
- Morini S. (2012). Available online at <http://chefmarcofraschetti.blogspot.it/2012/04/abstract-cibo-gli-aspetti-molecolari.html>
- Naděje B., Koucký M., Ševčíková S., Adamec T., Laštovková J. (2000). Assessment of boar and barrow meat. *Czech Journal of Animal Science* 45:539-544.

- Nedjraoui D. (2004). Evaluation des ressources pastorales des régions steppiques algériennes et définition des indicateurs de dégradation. *Cahiers Options Méditerranéennes* 62 :239–243.
- NIST Mass Spec Data Center, S.E. Stein Director, “Retention Indices” in NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69, Eds. P.J. Linstrom and W.G. Mallard, National Institute Standards and Thechnology, Gaithersburg MD, 20899, 2008. <http://webbok.nist.gov>.
- Norat T., Bingham S., Ferrari P., Slimani N., Jenab M., Mazuir M., Overvad K., Olsen A., Tjønneland A., Clavel F., Boutron-Ruault M.C., Kesse E., Boeing H., Bergmann M.M., Nieters A., Linseisen J., Trichopoulou A., Trichopoulos D., Tountas Y., Berrino F., Palli D., Panico S., Tumino R., Vineis P., Bueno-De-Mesquita H.B., Peeters P.H.M., Engeset D., Lund E., Skeie G., Ardanaz E., Gonzalez C., Navarro C., Quiros J.R., Sanchez M.J., Berglund G., Mattisson I., Hallmans G., Palmqvist R., Day N.E., Khaw K.T., Key T.J., San Joaquin M., Hemon B., Saracci R., Kaaks R., Riboli E. (2005). Meat, fish, and colorectal cancer risk: The European prospective investigation into cancer and nutrition. *Journal of the National Cancer Institute*. 97: 906-916.
- Nordkvist E., Aman P. (2006). Changes during growth in anatomical and chemical composition and in-vitro degradability of Lucerne. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 37:1–7.
- Nuernberg K., Fischer A., Nuernberg G., Ender K., Dannenberger D. (2008). Meat quality and fatty acid composition of lipids in muscle and fatty tissue of Skudde lambs fed grass versus concentrate. *Small Ruminant Research*. 74:279–293.
- Oddy V.H., Harper G.S., Greenwood P.L., McDonagh M.B. (2001). Nutritional and developmental effects on the intrinsic properties of muscles as they relate to the eating quality of beef. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 41:921–942.
- Orr R.J., Penning P. D., Harvey A., Champion R.A. (1997). Diurnal patterns of intake rate by sheep grazing monocultures of ryegrass or white clover. *Applied Animal Behaviour Science*. 52:65–77.

- Owens F.N., Dubeski P., Hanson, C.F. (1993). Factors that alter the growth and development of ruminants. *Journal of Animal Science* 71:3138–3150.
- Pagano R.I., Valenti B., De Angelis A., Avondo M., Pennisi P. (2011). Morning versus afternoon cutting time of Berseem clover (*Trifolium alexandrinum* L.) affects feed intake, milk yield and composition in Girgentana goats. *Journal of Dairy Research*. 78:500-504.
- Pérez-Ramirez E., Delagarde R., Delaby L. (2008). Herbage intake and behavioral adaptation of grazing dairy cows by restricting time at pasture under two feeding regimes. *Animal*. 2:1384–1392.
- Peterson D.G., Reineccius G.A. (2003). Characterisation of the volatile compounds that constitute fresh sweet cream butter aroma. *Flavour Fragrance Journal*. 18:215–220.
- Popova T. (2007). Effect of the rearing system on the fatty acid composition and oxidative stability of the M. longissimus lumborum and M. semimembranosus in lambs. *Small Ruminant Research*. 71:150–157.
- Prescott J., Young O., O’Neill L. (2001). The impact of variations in flavour compounds on meat acceptability: a comparison of Japanese and New Zealand consumers. *Food Quality and Preference*. 12:257–264.
- Prache S., Cornu A., Berdagùe J.L., Priolo A. (2005). Traceability of animal feeding diet in the meat and milk of small ruminants. *Small Ruminant Research*. 59:157–168.
- Priolo A., Micol D., Agabriel J. (2001). Effects of grass feeding systems on ruminant meat colour and flavour: a review. *Animal*. 50:185–200.
- Priolo A., Cornu A., Prache S., Krogmann M., Kondjoyan N., Micol D., Berdagùe J.L. (2004). Fat volatiles tracers of grass feeding in sheep. *Meat Science*. 66:475-481.
- Priolo A., Bella M., Lanza M., Galofaro V., Biondi L., Barbagallo D., et al. (2005). Carcass and meat quality of lambs fed fresh sulla (*Hedysarum coronarium*) with or without polyethylene glycol or concentrate. *Small Ruminant Research*. 59:281–288.

- Priolo A., Vasta V., Fasone V., Lanza C.M., Scerra M., Biondi L., Bella M., Whittington F.M. (2009). Meat odour and flavour and indoles concentration in ruminal fluid and adipose tissue of lambs fed green herbage or concentrates with or without tannins. *Animal*. 3:454-460.
- Quintanilla R., Demeure O., Bidanel J.P., Milan D., Iannuccelli N., Amigues Y., Gruand J., Renard C., Chevalet C., Bonneau M. (2003). Detection of quantitative trait loci for fat androstenone levels in pigs. *Journal of Animal Science*. 81: 385-394.
- Realini C.E., Duckett S.K., Brito G.W., Dalla Rizza M., De Mattos D. (2004). Effect of pasture vs. concentrate feeding with or without antioxidants on carcass characteristics, fatty acid composition, and quality of Uruguayan beef. *Meat Science*. 66:567-577.
- Resconi V.C., Campo M.M., Furnols M.F.I., Montossi F., Sanudo C. (2009). Sensory evaluation of castrated lambs finished on different proportions of pasture and concentrate feeding systems. *Meat Science*. 83:31-37.
- Rideout T.C., Fan M.Z., Cant J.P., Wagner-Riddle C., Stonehouse P. (2004). Supplementation of chicory inulin in growing pigs. Excretion of major odor-causing and acidifying compounds in response to dietary. *Journal of Animal Science*. 82:1678-1684.
- Riedel J.-L., Casasús I., Bernuès A. (2007). Sheep farming intensification and utilization of natural resources in a Mediterranean pastoral agro-ecosystem [Abstract]. *Livestock Science*. 111:153–163.
- Rius M.A., Garcia-Regueiro J.A. (2001). Skatole and indole concentrations in Longissimus dorsi and fat samples of pigs. *Meat Science*. 59:285–291.
- Robic A., Larzul C., Bonneau M. (2008). Genetic and metabolic aspects of androstenone and skatole deposition in pig adipose tissue: A review. *Genetics Selection Evolution*. 40:129–143.
- Ronchi B., Nardone A. (2003). Contribution of organic farming to increase sustainability of Mediterranean small ruminants livestock systems. *Livestock Production Science*. 80:17-31.

- Rousset-Akrim S., Martin J.F., Bayle M.C., Berdague J.L. (1997). Comparison between an odour profile and a flavour profile of dry fermented sausages. *International Journal of Food Science and Technology*. 32: 539-546.
- Roy N.C., Knight, T.W. Reynolds, G.W., Deighton, M.H., Death A.F., Sinclair B.R., Peters J.S., McNabb W.C. (2002). The effect of condensed-tannins in fresh Sulla (*Hedysarum coronarium*) on the net flux of fatty acids across the mammary gland and their secretion in the milk of lactating ewes. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*. 62:231-235.
- Roy N.C., Fraser K., Lane G.A., Reynolds G.W., Deighton M.H., Peters J.S. (2004). The effects of condensed-tannins on the net flux of skatole and indole across the mammary gland and their secretion in milk of lactating ewe fed fresh sulla (*Hedysarum coronarium*). *Animal Production in Australia*. 24:189–192.
- Ruiz F.A., Mena Y., Castel J.M., Guinamard C., Bossis N., Caramelle-Holtz E., Contu M., Sitzia M., Fois N. (2009). Dairy goat grazing systems in Mediterranean regions: a comparative analysis in Spain, France and Italy. *Small Ruminant Research*. 85:42–49.
- Sebastià I., Viallon C., Berge P., Dransfield E., Berdagué J.L. (2003). Analysis of the volatile fraction and the flavour characteristics of lamb: relationships with the type of feeding. *Sciences des Aliments*. 23:497–511.
- Shingfield K.J., Chilliard Y., Toivonen V., Kairenius P., Givens D.D. (2008). Trans fatty acids and bioactive lipids in ruminant milk. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 606:3–65.
- Schoenfeldt H.C., Strydom P. E. (2011). Effect of age and cut on cooking loss, juiciness and flavour of South African beef. *Meat Science*. 87:180-190.
- Schreurs N.M., Tavendale M.H., Lane G.A., Barry T.N., Lopez-Villalobos N., McNabb W.C., (2007a). Effect of different condensed tannin-containing forages, forage maturity and nitrogen fertiliser application on the formation of indole and skatole in vitro rumen fermentations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 87:1076–1087.

- Schreurs N.M., Marotti D.M., Tavendale M.H., Lane G.A., Barr T.N., Lopez-Villalobos N., McNabb W.C., (2007b). Concentration of indoles and other rumen metabolites in sheep after a meal of fresh white clover perennial ryegrass or *Lotus corniculatus* and the appearance of indoles in the blood. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 87:1042–1051.
- Schreurs N.M., Lane G.A., Tavendale M.H., Barry T.N., McNabb W.C. (2008). Pastoral flavour in meat products from ruminants fed fresh forages and its amelioration by forage condensed tannins. *Animal Feed Science and Technology*. 146:193-221.
- Sepúlveda W.S., Maza M.T., Pardos L. (2011). Aspects of quality related to the consumption and production of lamb meat. Consumers versus producers. *Meat Science*. 87:366-372.
- Serrano E. Cornu A.; Kondjoyan N., Agabriel J., Micol D. (2011). Traceability of grass feeding in beef: terpenes, 2,3-octanedione and skatole accumulation in adipose tissue of young bulls. *Animal*. 5:641-649.
- Singh P., Wani A.A., Saengerlaub S., Langowski H.C. (2011). Understanding critical factors for the quality and shelf-life of map fresh meat: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51:146-177.
- Sheat G.W., Coulon J.B., Young, O.A. (2001). Grassland management and animal product quality. In Proceedings of the 19nd international grassland congress, 11–21 February 2001, Sao Paulo, Brazil (pp. 1019–1026).
- Sellier P., Le Roy P., Fouilloux M.N., Gruand J., Bonneau M. (2000). Responses to restricted index selection and genetic parameters for fat androstenone level and sexual maturity status of young boars. *Livestock Production Science*. 63:265-274
- Smith G.C., Belk K.E., Sofos J.N., Tatum J.D., Williams S. N. (2000). *Economic implication of improved color stability in beef*. In E. A. Decker, C. Faustman, & C. J. Lopez-Bote (Eds.), *Antioxidant in Musce Foods: Nutritional Strategies to Improve Quality* (pp. 397-426). New York: Wiley Interscience.

- Spiehs M.J., Varel V.H. (2011). Nutrient excretion and odorant production in manure from cattle fed corn wet distillers grains with soluble. *Journal of Animal Science*. 87:2977-2984.
- Tas B.M., Taweel H.Z., Smit H.J., Elgersma A., Dijkstra J., Tamminga S. (2005). Effects of perennial ryegrass cultivars on intake, digestibility, and milk yield in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 88:3240–3248
- Tava A., Bernardo N., Cunico C., Romani M., Odoardi M. (1995) Cultivar differences and seasonal changes of Primary Metabolites and Flavor Constituents in Tall Fescue in Relation to Palatability. *Journal of Agricultural and food chemistry*. 43:98-101.
- Tavendale M.H., Pacheco D., Lane G.A., Fraser K., Death A.F., Burke J.L., Hickey M.J., Cosgrove G.P. (2006). The effects of ryegrass varieties differing in soluble sugar content on the rumen fermentation of amino acids and consequences for milk flavour chemistry. *Proceedings of New Zealand Grassland Association*. 68:261–265.
- Taweel H.Z., Tas B.M., Smit H.J., Elgersma A., Dijkstra J., Tamminga S. (2005). Effects of feeding perennial ryegrass with an elevated concentration of water-soluble carbohydrates on intake, rumen function and performance of dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*. 121:243–256.
- Thompson J. M., Perry D., Daly B., Gardner G.E., Johnston D.J., Pethick D.W. (2006). Genetic and environmental effects on the muscle structure response post-mortem. *Meat Science*. 74:59–65.
- Thornton-Manning J.R., Nichols W.K., Manning B.W., Skiles G.L., Yost G.S. (1993). Metabolism and bioactivation of 3-methylindole by Clara cells, alveolar macrophages, and subcellular fractions from rabbit lungs. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 122:182–190.
- Utrilla, Maria; Soriano A.; Garcia Ruiz A. (2010). Quality attributes of pork loin with different levels of marbling from Duroc and Iberian cross. *Journal of Food Quality*. 33:802-820.

- Vandendriessche F (2008). Meat products in the past, today and in the future. *Meat Science* 78:104-113.
- Vasta V., Priolo A. (2006). Ruminant fat volatiles as affected by diet. A review. *Meat Science*. 73:218-228
- Vasta V., Ratel J., Engel E. (2007). Mass spectrometry analysis of volatile compounds in raw meat for the authentication of feeding background of farm animals. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 55:4630-4639.
- Vasta V., Makkar H.P.S., Mele M., Priolo A. (2009a). Ruminant biohydrogenation as affected by tannins in vitro. *British Journal of Animal Nutrition*. 102:82-92.
- Vasta V., Mele M., Serra A., Scerra M., Luciano G., Lanza M., Priolo A. (2009b). Metabolic fate of fatty acids involved in ruminal biohydrogenation in sheep fed a concentrate or herbage with or without tannins. *Journal of animal science*. 87:2674-2684.
- Vasta V., Yanez-Ruiz D., Mele M., Serra A., Luciano G., Lanza M., Biondi L., Priolo A. (2010a). Bacterial and Protozoal Communities and Fatty Acid Profile in the Rumen of Sheep Fed a Diet Containing Added Tannins. *Applied And Environmental Microbiology*. 76:2549–2555.
- Vasta V., Jerônimo E., Brogna D.M.R., Dentinho M.T.P., Biondi L., Santos-Silva J., Priolo A., Bessa R.J.B. (2010b). The effects of grape seed extract or *Cistus Ladanifer* L. on muscle volatile compounds of lambs fed dehydrated lucerne supplemented with oil. *Food Chemistry*, 119:1339–1345.
- Vasta V., Luciano G., Dimauro C., Röhrle F., Priolo, A., Monahan F. J., Maloney A.P. (2011). The volatile profile of longissimus dorsi muscle of heifers fed pasture, pasture silage or cereal concentrate: implication for dietary discrimination. *Meat Science*. 87:282–289.
- Vasta V., D'Alessandro A.G., Priolo A., Petrotos K., Martemucci G., (2012a). Volatile compound profile of ewe's milk and meat of their suckling lambs in relation to pasture vs. indoor feeding system. *Small Ruminant Research*. 105:16-21.

- Vasta V., Ventura V., Luciano G., Andronico V., Pagano R.I., Scerra M., Biondi L., Avondo M., Priolo A. (2012b). The volatile compounds in lamb fat are affected by the time of grazing. *Meat Science*. 90:451-456.
- Vlaeminck V., Fievez V., Cabrita A.R.J., Fonseca A.J.M., Dewhurst R.J. (2006). Factors affecting odd-and branched-chain fatty acids in milk: a review. *Animal feed science and technology*. 131:389–417.
- Warner R.D., Greenwood P.L., Pethick D.W., Ferguson D.M. (2010). Genetic and environmental effects on meat quality. *Meat Science*. 86:171-183.
- Wasserman A.E., Gray N. (1965) Meat flavor. I. Fractionation of water-soluble flavor precursors of beef. *Journal of Food Science*. 30:801-807.
- Watts K.A., Chatterton N.J. (2004). A review of factors affecting carbohydrate levels in forage. *Journal of Equine Veterinary Science*. 24:84-86.
- Weaver A.D., Bowker B.C., Gerrard D.E. (2008). Sarcomere length influences postmortem proteolysis of excised bovine semitendinosus muscle. *Journal of Animal Science*. 86:1925–1932
- Whitehead T.R., Price N.P., Drake H.L., Cotta M.A. (2008). Catabolic pathway for the production of skatole and indoleacetic acid by the acetogen *Clostridium drakei*, *Clostridium scatologenes*, and swine manure. *Applied And Environmental Microbiology*. 74:1950-1953.
- Wong E., Johnson C.B., Nixon L.N. (1975). The contribution of 4-methyloctanoic (hircinoic) acid to mutton and goat meat flavour. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 18:261–266.
- Wood J.D., Ensewer M. (1997). Factors influencing fatty acids in meat and the role of antioxidants in improving meat quality. *British Journal of Nutrition*. 78:S49–S60.
- World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. (2007). Food, Nutrition, Physical Activity and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. American Institute for Cancer Research, Washington, DC (2007).

- Yokoyama M.T., Carlson J.R. (1979). Microbial metabolites of tryptophan in the intestinal tract with special reference to skatole. *American Journal of Clinical Nutrition*. 32:173–178.
- Young O.A., Berdagué J.L., Viallon C., Rousset-Akrim S., Thériez M. (1997). Fat-borne volatiles and sheepmeat odour. *Meat Sci*. 45:183–200.
- Young O.A., Lane G.A., Priolo A., Fraser K. (2003). Pastoral and species flavour in lambs raised on pasture, lucerne or maize. *Journal of the Science of Food and Agricultural*. 83:93–104.
- Young O.A., Lane G.A., Podmore C., Fraser K., Agnew M.J., Cummings T.L., Cox N.R. (2006). Changes in composition and quality characteristics of ovine meat and fat from castrates and rams aged to 2 years. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 49:419–430.
- Zamaratskaia G., Babol J, Madej A, Squires EJ, Lundström K. (2004). Age-related Variation of Plasma Concentrations of Skatole, Androstenone, Testosterone, Oestradiol-17 β , Oestrone Sulphate, Dehydroepiandrosterone Sulphate, Triiodothyronine and IGF-1 in Six Entire Male Pigs. *Reproduction in Domestic Animals*. 39:168–172.
- Zarovali MP, Yiakoulaki MD and Papanastasis VP 2007. Effects of shrub encroachment on herbage production and nutritive value in semi-arid Mediterranean grasslands. *Grass and Forage Science* 62, 355–363.