

E. BOSELLI, D. PACETTI,
P. LUCCI, G. DI LECCE,
F. CURZI, N.G. FREGA

Effetti della supplementazione sui lipidi di carne suina

PROGRESS IN NUTRITION
VOL. 10, N. 2, 86-100, 2008

TITLE

Effects of the supplementation on the lipids of pork meat

KEY WORDS

Animal feeding, pork meat lipids, phospholipids molecular species, high performance liquid chromatography, tandem mass spectrometry, fatty acids, vitamin E

PAROLE CHIAVE

Mangimi, lipidi di carne suina, specie molecolari fosfolipidiche, cromatografia liquida ad alta prestazione, spettrometria di massa tandem, acidi grassi, vitamina E

Dipartimento di Scienze degli Alimenti - Università Politecnica delle Marche, Ancona

Indirizzo per la corrispondenza:

Dr. Emanuele Boselli
Dipartimento di Scienze degli Alimenti,
Università Politecnica delle Marche
Via Breccie Bianche,
60131 Ancona (Italy)
Tel. +390712204923
Fax: +390712204980
E-mail: e.boselli@univpm.it

Summary

In order to evaluate the effects of a dietary treatment with 3% high oleic sunflower oil (O) (85% oleic acid) to Italian heavy pigs, either or not in combination with 250 $\mu\text{g g}^{-1}$ α -tocopheryl acetate (E), high resolution chromatographic techniques were used and the characterization of the fatty acid profile, triacylglycerols and phospholipids molecular species of the loin (*Longissimus lumborum*) was achieved. The supplementation with high oleic sunflower oil lead to an increase of the triacylglycerols containing oleic acid in the raw meat, and a decrease of both linoleic and saturated acids, regardless the sex of the animals and the addition of vitamin E. In contrast, the unsaturation degree of the molecular species of phospholipid was less affected than triacylglycerols. Moreover, the content of phosphatidylcholine increased to the detriment of phosphatidylserine in the meat obtained with the diet O and O+E, with respect to the corresponding controls (C and E). The level of free and esterified vit. E in the supplemented fodder decreased of about 10-15% after a 2-week storage at room temperature. The average content of free α -tocopherol in the meat increased upon supplementation, but the data dispersion was high.

Riassunto

Per valutare gli effetti di diete arricchite con olio di girasole alto-oleico (O) (circa l'85% di acido oleico) e/o α -tocoferilacetato (E) sulla frazione lipidica della carne di suini pesanti italiani è stata determinata la composizione degli acidi grassi, dei triacilgliceroli, dei fosfolipidi ed il contenuto di vitamina E nei campioni di carne cruda (*Longissimus lumborum*). La supplementazione con olio di girasole alto-oleico ha comportato un incremento dell'acido oleico nei trigliceridi della carne ed un decremento, sia dell'acido linoleico, che degli acidi grassi saturi, nei campioni di entrambi i sessi con o senza l'aggiunta di vitamina E. Rispetto ai trigliceridi, gli effetti della supplementazione dietetica sui livelli di insaturazione delle specie molecolari fosfolipidiche sono stati meno evidenti. Comunque, nei campioni appartenenti ai gruppi dietetici O e OE, confrontati con i rispettivi gruppi di controllo C ed E, si è verificato un incremento del contenuto di fosfatidilcolina (PC) a scapito della fosfatidilserina (PS). La quota di vitamina E (libera ed esterificata) presente nei mangimi addizionati e conservati per

due settimane a temperatura ambiente è diminuita del 10-15%. Il contenuto medio di α -tocoferolo libero nella carne è aumentato a seguito della supplementazione, sebbene sia elevata la dispersione del dato.

Introduzione

Nel recente passato molti studi hanno posto l'attenzione sulla frazione lipidica della carne suina, al fine di valutare l'incidenza della composizione del grasso sulla qualità nutrizionale e tecnologica, sia della carne cotta, che dei prodotti fermentati (prosciutti, salami, etc.) (1-3).

Inoltre, molti gruppi di ricerca hanno incentrato la propria attenzione sulla componente lipidica della dieta suina in relazione all'attitudine produttiva degli animali (4), alla *shelf life* della carne e dei derivati (5, 6), agli effetti sulle proprietà sensoriali (7, 8) e all'incremento del valore nutrizionale della carne (9).

Diverse sono le variabili che incidono sulla composizione del grasso della carne, come la razza ed il genotipo (10), la tipologia di allevamento, la composizione dei mangimi e fattori intrinseci tra i quali le caratteristiche della fibra muscolare e la tipologia del grasso (11): i lipidi della carne possono essere suddivisi in lipidi visibili ed intramuscolari. Quest'ultimi si caratterizzano per una frazione lipidica con un più alto grado di insaturazione, poiché

contiene un'elevata quota di fosfolipidi. Recentemente l'alimentazione zootecnica si è orientata verso l'utilizzo di mangimi arricchiti con fonti naturali di acidi grassi polinsaturi, come gli acidi grassi della serie $\omega 3$ o gli isomeri coniugati dell'acido linoleico (12). Tuttavia, l'incremento del contenuto di acido linoleico nella carne causa l'abbassamento del punto di fusione del grasso e riduce la stabilità ossidativa, influenzando negativamente le proprietà tecnologiche (13) e sensoriali (14). I processi ossidativi, infatti, sono fra le principali cause del deterioramento qualitativo della carne e dei prodotti di trasformazione e portano ad un decadimento del flavour, del colore e del valore nutrizionale della carne stessa, limitandone conseguentemente la shelf-life (15). L'utilizzo di olio di girasole alto-oleico nei mangimi può essere considerato vantaggioso in quanto permette, diversamente dall'impiego di altri oli vegetali, di incrementare il contenuto calorico della dieta senza aumentare, al contempo, l'assunzione giornaliera di acido linoleico. La stabilità ossidativa della carne e dei prodotti da essa ottenuti dipende sia dal bilancio tra anti- e pro-ossidanti, che dal

contenuto di substrati suscettibili ai processi ossidativi, come gli acidi grassi polinsaturi (PUFA), il colesterolo, le proteine e i pigmenti (16). Di conseguenza l'aggiunta, nel regime dietetico, di un'adeguata aliquota di antiossidanti, come l' α -tocoferilacetato, può portare ad un incremento della stabilità ossidativa (17-19).

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di evidenziare eventuali effetti della somministrazione dietetica di mangimi arricchiti con olio di girasole alto-oleico e/o α -tocoferilacetato sulla composizione dei lipidi della carne di suini pesanti italiani. Quattro differenti diete (mangime di controllo, C; mangime di controllo addizionato di α -tocoferilacetato, E; mangime di controllo con l'aggiunta di olio di girasole alto-oleico, O; mangime convenzionale addizionato di olio di girasole alto-oleico e α -tocoferilacetato, OE) caratterizzate dallo stesso rapporto lisina/calorie (20), sono state somministrate, rispettivamente, a quattro gruppi di suini fino alla macellazione (160-170 kg). Il grasso estratto dai campioni di *Longissimus lumborum*, è stato caratterizzato mediante tecniche cromatografiche ad alta risoluzione: il profilo acidico del gras-

so totale, della frazione lipidica polare e apolare e la composizione in triacilgliceroli sono stati caratterizzati mediante gas-cromatografia capillare (GC); le specie molecolari fosfolipidiche (PL) sono state determinate mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) accoppiata in parallelo ad uno spettrometro di massa di secondo ordine (MS-MS) e ad un rivelatore a diffusione di luce (ELSD); l' α -tocoferolo (E) è stato quantificato attraverso un'analisi HPLC e rivelatore spettrofluorimetrico (FD).

Materiali e metodi

Solventi, reagenti e standard

I solventi utilizzati per la cromatografia liquida erano tutti di purezza superiore al 99,8% e forniti dalla Lab-Scan Analytical Sciences (Dublino, Irlanda) e da Merck & Co. Inc. (Darmstadt, Germania). I reagenti per la derivatizzazione erano Sigma-Aldrich (Milano, Italia) e Fluka (Buchs, Svizzera). Gli standard di colesterolo, mono, di e trigliceridi, metilesteri, fosfolipidi e tocoferoli erano Sigma-Aldrich (Milano, Italia).

Disegno sperimentale e campionamento

64 suini italiani (32 maschi castrati e 32 femmine, *Duroc x Large*

White) sono stati suddivisi in 4 gruppi costituiti ciascuno da 8 maschi e da 8 femmine aventi un peso medio di 70 kg. Ogni gruppo è stato assegnato ad un determinato regime dietetico. Le diete dei 4 gruppi, distribuite giornalmente e in quantità controllata, avevano lo stesso rapporto lisina/calorie. I regimi dietetici erano così formulati: 1) mangime di controllo (C) (mangime convenzionale costituito da mais, orzo, crusca, soia, integratori e senza aggiunta di grassi); 2) mangime convenzionale addizionato di 250 mg kg⁻¹ di α -tocoferilacetato (E); 3) mangime di controllo con l'aggiunta del 3% di olio di girasole alto-oleico (85% di acido oleico e 7% di acido linoleico) (O); 4) mangime convenzionale addizionato del 3% di olio di girasole alto-oleico e di 250 mg kg⁻¹ di α -tocoferilacetato (OE). I maiali sono stati allevati fino al raggiungimento del peso di macellazione tipico dei suini pesanti (160-170 kg). Successivamente i lombi sono stati affettati per ottenere bracioline di circa 200 g di peso, che sono state confezionate in vassoi e conservate a -18°C.

Estrazione della frazione lipidica dal mangime

L'estrazione della frazione lipidica dal campione è stata eseguita utilizzando il metodo di Bligh e Dyer (21) su 100 g di mangime.

Estrazione della frazione lipidica dalla carne

I lipidi totali della carne di maiale sono stati estratti seguendo il metodo di Folch (22), apportando alcune modifiche (23), su 60 g di carne.

Derivatizzazione del grasso e profilo gascromatografico del grasso totale (lipidogramma)

Un'aliquota di grasso (30 mg) è stata addizionata di una soluzione di 1,2,3-triundecanoina (C₆H₆₈O₆) in cloroformio, utilizzata come standard interno e successivamente derivatizzata secondo Sweeley (24). Il campione è stato ripreso con esano ed iniettato (1 μ l) in un gas-cromatografo HRGC 5300 Carlo Erba Instruments (Milano, Italia) corredato di un rivelatore a ionizzazione di fiamma e di una colonna capillare Varian (Walnut Creek, CA, USA) lunga 25 m, con un diametro interno di 0,25 mm, rivestita con una fase stazionaria CP-TAP (fase a media polarità) dello spessore di 0,1 μ m. L'introduzione del campione avveniva mediante sistema split e il gas di trasporto, elio, aveva un flusso di 2 ml min⁻¹. Il programma di temperatura del forno partiva da 220°C e, con una velocità di 5°C min⁻¹, giungeva a 340°C; con un'ulteriore rampa di temperatura, a 3°C min⁻¹, raggiungeva 360°C; quest'ultima era mantenuta per 30 min. La tempera-

tura dell'iniettore e quella del rivelatore erano entrambe impostate a 380°C. L'identificazione dei picchi presenti nel tracciato cromatografico è stata condotta con l'ausilio di composti standard e mediante comparazione dei lipidogrammi del grasso di maiale con altri tracciati, ottenuti iniettando olio vergine di oliva, olio di soia e di lino, e confrontandoli con precedenti lavori (25).

Trasmetilazione del grasso e condizioni cromatografiche per l'analisi degli acidi grassi

Gli esteri metilici degli acidi grassi (FAMES) del grasso totale (mangime) e del grasso totale, della frazione polare e della frazione non polare purificate secondo i metodi descritti in seguito (carne), sono stati ottenuti utilizzando il metodo di Christie (26). La trasmetilazione delle frazioni lipidiche (50 mg per i lipidi totali, 50 mg per la frazione dei lipidi neutri e 5 mg per la frazione dei lipidi polari) è stata condotta con l'1% di acido solforico in metanolo. I metilderivati degli acidi grassi sono stati analizzati mediante gascromatografia capillare, utilizzando uno strumento CP-9003 (Chrompack Middelburg, NL), equipaggiato con un rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID), una colonna capillare CP-Sil 88 (100 m x 0,25 mm d.i., spessore della fase stazionaria 0,2 µm) e provvisto di iniettore on-column. Il

flusso del gas di trasporto, elio, era di 1,6 ml min⁻¹. La temperatura del rivelatore era di 230°C; la temperatura dell'iniettore è stata mantenuta costante a 60°C per 6 min e poi è stata aumentata fino a 225°C con un incremento di 20°C min⁻¹. Il programma di temperatura del forno partiva da 55°C, mantenuta per 3 min, e poi incrementata a 4°C min⁻¹ fino al raggiungimento di 140°C. Dopo 1 minuto, a 2°C min⁻¹, si raggiungeva la temperatura di 225°C che rimaneva costante per 30 min. L'identificazione dei picchi è stata effettuata mediante confronto con i tempi di ritenzione di standard puri.

Saponificazione del mangime e analisi della frazione dell'insaponificabile mediante GC-MS

La frazione insaponificabile del grasso è stata ottenuta secondo la metodica ufficiale NGD (27) su 5 g di carne. L'insaponificabile quindi è stato ripreso in 1 ml di esano. Prelevata una goccia di insaponificabile, è stata effettuata la silanizzazione secondo Sweeley (24) e dopo allontanamento dei reagenti, mediante flusso di azoto, il campione è stato iniettato in un gas-cromatografo Varian 3900 (Walnut Creek, CA, USA). Quest'ultimo era corredato di un rivelatore di massa a trappola ionica Varian Saturn 2100 T e di una colonna capillare lunga 30 m, con diametro in-

terno pari a 0,25 mm e fase stazionaria DB-5MS (J&W Scientific, Folsom, CA, USA) dello spessore di 0,25 µm. La temperatura dell'iniettore era di 300°C e il flusso del gas carrier (elio) di 0,5 ml min⁻¹. La temperatura iniziale del forno era di 200°C ed incrementava di 2,5°C min⁻¹ fino a 280°C. L'identificazione dei composti è stata effettuata mediante l'utilizzo di standard e facendo riferimento alle frammentazioni di massa.

Estrazione e determinazione dei tococromanoli presenti nei mangimi e nella carne

L'estrazione e la determinazione dei tococromanoli presenti nei mangimi e nella carne sono state effettuate secondo il metodo di Hewavitharana A.K. et al. apportando alcune modifiche (28): sono stati messi 2 g di mangime o carne in una provetta tipo Falcon da 50 ml, a cui sono stati aggiunti 8 ml di etanolo assoluto. Il tutto è stato omogeneizzato per circa 1 min; successivamente sono stati aggiunti 10 ml di acqua distillata per poi omogeneizzare per un altro minuto. Sono stati aggiunti 8 ml di esano e, dopo aver agitato il campione al vortex è stata effettuata la separazione delle fasi mediante centrifugazione a 2500 rpm (1750 g) per 10 minuti. Il surnatante è stato raccolto in una beuta ed il solvente è stato allontanato tramite

evaporatore rotante. Il grasso così estratto è stato conservato a -18°C fino al momento dell'analisi. La determinazione dei livelli di α -tocoferolo e α -tocoferilacetato è stata ottenuta mediante analisi HPLC (High Performance Liquid Chromatography) in fase diretta, utilizzando il grasso tal quale. La separazione HPLC è stata effettuata su una colonna Prodigy-Si (250 mm x 4,6 mm d.i., spessore della fase stazionaria 5 μm); il rivelatore era un fluorimetro Jasco 821FP operante ad una lunghezza d'onda di eccitazione e di emissione di 290 e 330 nm rispettivamente; il flusso in colonna era $1,3\text{ ml min}^{-1}$ ed il loop era da 20 μl . La fase mobile isocratica era una miscela di esano/isopropanolo/ac. acetico (99,5:0,5:0,1 v/v). La quantificazione è stata ottenuta con il metodo della retta di taratura in un range di concentrazioni da 1,62 a 26 mg l^{-1} per quanto riguarda l' α -tocoferolo e da 31,5 a 225 mg l^{-1} per l' α -tocoferilacetato.

Analisi HPLC-ESI-MS-MS delle specie molecolari fosfolipidiche

a. Isolamento della frazione polare dal grasso

I fosfolipidi sono stati isolati dall'estratto lipidico mediante SPE (*Solid Phase Extraction*) (29), utilizzando una colonnina di silice (Supelclean LC-Si Tubes, 6 ml volume, 1 g di sorbente, Supelco, Bellefonte, USA). Il grasso (5 mg), risospeso in

250 μl di soluzione cloroformio/metanolo/acqua (5:5:1, v/v) è stato depositato sulla colonnina. L'eluizione è avvenuta con 10 ml di esano/etere (4:1, v/v), 10 ml di esano/etere (1:1, v/v), 10 ml di metanolo e 10 ml di una soluzione cloroformio/metanolo/acqua (3:5:2, v/v). Dopo aver riunito la frazione metanolica e la frazione cloroformio/metanolo/acqua, contenenti entrambi la componente lipidica polare, è stato fatto evaporare il solvente sotto flusso di azoto e il residuo è stato risospeso in 500 μl di una soluzione di cloroformio/metanolo/acqua (5:5:1, v/v). Successivamente la frazione è stata analizzata mediante HPLC.

b. Separazione delle classi fosfolipidiche - condizioni HPLC

Le classi fosfolipidiche della carne sono state analizzate tramite un sistema HPLC accoppiato on-line a due sistemi di rivelazione: uno spettrometro di massa e un rivelatore a diffusione di luce (ELSD) con una ripartizione dell'eluente rispettivamente di $0,3\text{ ml min}^{-1}$ e di $0,7\text{ ml min}^{-1}$. Le due tecniche di rivelazione sono state comparate per ottenere sia un'analisi qualitativa che quantitativa. Il sistema HPLC, in fase normale, era dotato di una colonna Polaris Si-A (100 mm x 4,6 mm d.i., spessore della fase stazionaria 5 μm); l'eluizione per gradiente utilizzava 2 miscele di solventi: miscela A ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/$

NH_3 , 33% 70:25:1, v/v) e miscela B ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_3$, 33% 60: 34:5,5:0,5, v/v); il gradiente di eluizione adottato è stato il seguente: si passava dal 100% di A (tempo 0) al 100% di B in 10 min; quest'ultimo veniva mantenuto per 15 min per poi tornare al 100% di A in 5 min. Il flusso in colonna era di 1 ml min^{-1} ed il loop era da 5 μl .

c. Caratterizzazione delle specie molecolari fosfolipidiche - Spettrometria di massa

L'identificazione delle classi fosfolipidiche e la caratterizzazione delle specie molecolari è stata effettuata utilizzando uno spettrometro di massa a trappola ionica Finnigan LCQ-Duo (Thermoquest, Rodano, Italia) equipaggiato con interfaccia ad elettronebulizzazione e operante in ionizzazione positiva. Per l'identificazione delle specie molecolari fosfolipidiche ci si è avvalsi della spettrometria di massa di secondo ordine (analisi HPLC-ESI-MS-MS). I parametri di ionizzazione per elettronebulizzazione (ESI) sono stati i seguenti: ionizzazione positiva, voltaggio dello spray ionico 5 kV, temperatura del capillare 200°C , voltaggio del capillare 6V, tube lens offset-10 V. Gli esperimenti di spettrometria di massa di secondo ordine (tandem mass spectrometry) sono stati condotti utilizzando un'energia di collisione pari al 45%. L'integrazione dei picchi è stata effettuata utiliz-

zando il software ICIS (Interactive Chemical Information System) fornito da Finnigan. L'identificazione dei singoli componenti è avvenuta per comparazione dei tempi di ritenzione e degli spettri di massa dei picchi incogniti con quelli di fosfolipidi standard reperiti in commercio.

d. Analisi quantitativa delle classi fosfolipidiche – ELSD

La determinazione quantitativa delle singole classi fosfolipidiche è stata effettuata utilizzando un rivelatore a diffusione di luce (ELSD), PL-EMD 960 (Polymer Laboratories, Amherst, MA, USA). Il flusso dell'aria compressa era di $7,5 \text{ l min}^{-1}$, ad una temperatura di 60°C . La quantificazione è stata effettuata costruendo una retta di taratura per ogni singola classe fosfolipidica in un range di concentrazione da 100 a 300 mg l^{-1} .

Analisi statistica

Al fine di valutare gli effetti delle differenti diete sulla composizione lipidica della carne cruda di maiale, è stata condotta, utilizzando il software GraphPad InStat ver.3.0 system (GraphPad Software, San Diego, Ca, USA) l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) e il test di Tukey-Kramer, ottenuti considerando i dati degli acidi grassi, dei triacilgliceroli, dell' α -tocoferolo e delle specie molecolari fosfolipidiche. Inoltre è stato

effettuata l'Analisi delle Componenti Principali (PCA) utilizzando il programma *The Unscrambler* (CAMO, Corvallis, USA) per avere una visione completa delle possibili connessioni tra le diete e le variabili prese in considerazione.

Risultati e discussione

Contenuto di α -tocoferolo e α -tocoferilacetato nei mangimi

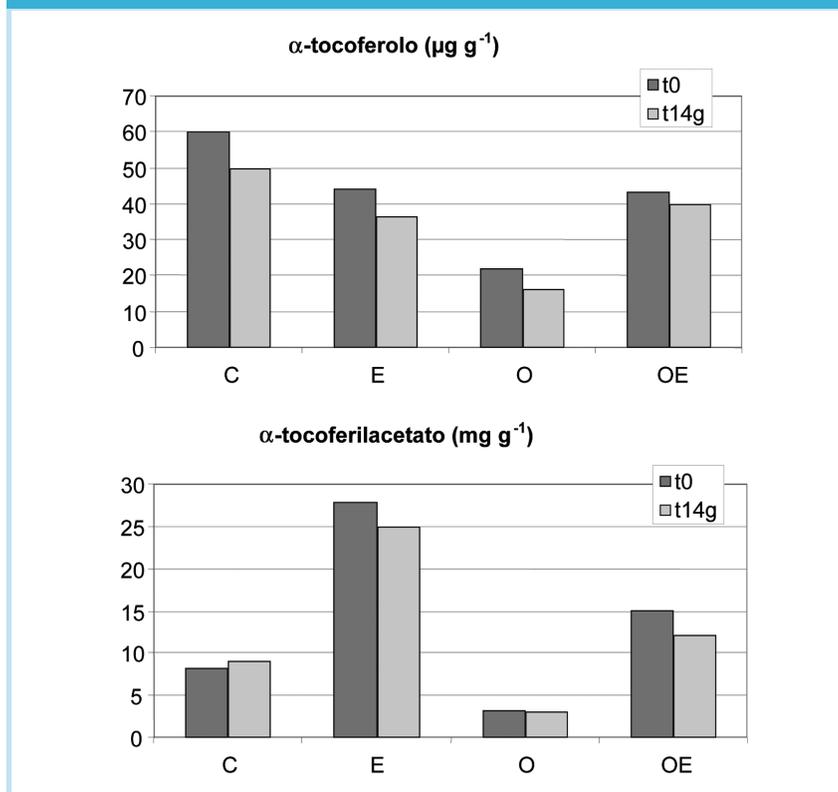
I campioni di mangime presi in considerazione sono stati 8: i 4 tipi di mangimi (C; O; E; OE) sono stati prelevati al momento della formulazione (campioni t0) e dopo un periodo di conservazione in silos durato 14 giorni (campioni 14 gg). La concentrazione di α -tocoferolo ($\mu\text{g g}^{-1}$ sulla frazione lipidica totale) e di α -tocoferilacetato (mg g^{-1} sulla frazione lipidica totale) è riportata in figura 1. La quota di vitamina E riscontrata nel mangime in cui non vi è stata alcuna supplementazione (C), è da attribuire alla quota di tococromani naturalmente presenti (o addizionati) nelle matrici vegetali utilizzate per la formulazione del mangime stesso. Si può constatare (Tab. 1) che, all'interno dei gruppi in cui c'è stata la supplementazione con α -tocoferilacetato, ci sia, tra i campioni t14 gg e i rispettivi campioni t0, un calo del contenuto sia dell' α -tocoferolo che dell' α -tocoferilacetato. Tale calo consisteva in

una diminuzione del contenuto di tocoferolo libero e dell'acetato nel grasso pari a $7,5 \mu\text{g g}^{-1}$ e $2,9 \text{ mg g}^{-1}$ nel gruppo E e rispettivamente di $3,4 \mu\text{g g}^{-1}$ e $2,8 \text{ mg g}^{-1}$ nel gruppo OE. Questa diminuzione del tenore in vitamina E registrata durante la conservazione dipende da processi di ossidazione che si possono verificare durante la fase di stoccaggio dei mangimi. Questo suggerisce che la preparazione di mangimi arricchiti di vitamina E deve essere effettuata solo in previsione di una loro immediata somministrazione agli animali.

Analisi della componente lipidica totale dei mangimi

In figura 2 è riportato un esempio di tracciato cromatografico ottenuto dall'analisi della frazione lipidica totale del mangime di controllo. Il tracciato rispecchia la qualità della frazione del grasso normalmente utilizzato per la formulazione dei mangimi per uso zootecnico: è presente un'elevata frazione di digliceridi, monogliceridi ed acidi grassi liberi, segno di una forte idrolisi del grasso. Analizzando i diversi mangimi, appare subito evidente che, nei campioni a base di olio di girasole alto-oleico, la quota di acido oleico libero, risultava maggiore, se confrontata con quella dei mangimi di controllo con e senza aggiunta di vitamina E (Tab. 2). Anche l'olio di girasole alto-oleico utilizzato per arricchire i mangimi non era di qualità

Figura 1 - Concentrazione di α -tocoferolo ($\mu\text{g g}^{-1}$ di grasso) e α -tocoferilacetato (mg g^{-1} di grasso) nei mangimi. Dieta C, controllo; dieta E, controllo + 250 mg kg^{-1} di α -tocoferilacetato; dieta O, controllo + 3% di olio di girasole alto-oleico; dieta OE, controllo + 250 mg kg^{-1} di α -tocoferilacetato + 3% di olio di girasole alto-oleico. t0: prelievo immediato del mangime subito dopo la preparazione; t14 gg: attesa di 14 giorni tra la preparazione del mangime e il prelievo



pari a quella per uso alimentare: la componente triacilgliceridica ha subito processi idrolitici, con conseguente incremento degli acidi grassi liberi e della frazione dei monogliceridi, in particolare del monostearilglicerolo. In tabella si nota come, nei mangimi C ed E, i trigliceridi risultino presenti in maggior quantità se confrontati con i valori ottenuti nei

campioni O ed OE ad eccezione della trioleina che risulta essere il trigliceride più rappresentativo.

Per quanto riguarda invece i digliceridi, questi risultano presenti e distribuiti omogeneamente nelle varie tipologie di mangime ad eccezione dell'1,2-dioleilglicerolo e della quota relativa alla somma dei digliceridi 1-oleil-2-linoleilglicerolo e

1,3-dioleilglicerolo, in cui si verifica un incremento del loro livello nei formulati arricchiti di olio di girasole alto-oleico. Confrontando i dati ottenuti dal campione di controllo O e del mangime OE, si nota che in quest'ultimo la quota dei di- e trioleilgliceroli era maggiore e che, invece, il livello di acido oleico libero era minore. Questo mostra una marcata azione protettiva dell' α -tocoferilacetato sulla matrice lipidica del mangime.

Caratterizzazione dell'insaponificabile del grasso del mangime

I componenti della frazione dell'insaponificabile del mangime C sono i principali fitosteroli presenti nelle matrici vegetali costituenti il mangime stesso (Fig. 3). Il fitosterolo preponderante era il β -sitosterolo, seguito dal suo omologo saturo (β -sitostanolo), dal campesterolo, dal campestanolo e dallo stigmasterolo. Inoltre è stato possibile rivelare la presenza dell' α -tocoferolo presente anche nei campioni di controllo. Questo profilo è compatibile con quello di una miscela costituita da mais e orzo in granello, crusca di grano tenero e farina di estrazione di soia.

Composizione acidica del grasso totale, della frazione polare e della frazione neutra della carne

Applicando il test Tukey-Kramer e l'analisi della varianza (ANOVA)

Tabella 1 - Concentrazione di α -tocoferolo ($\mu\text{g g}^{-1}$ di grasso) e di α -tocoferilacetato (mg g^{-1} di grasso) nei mangimi

Tipologia mangime	α -tocoferolo ($\mu\text{g g}^{-1}$)	α -tocoferilacetato (mg g^{-1})
C t0	60,1	8,22
C t14 gg	49,8	9,13
E t0	44,0	27,8
E t14 gg	36,5	24,9
O t0	21,9	3,18
O t14 gg	16,4	3,05
OE t0	43,3	15,0
OE t14 gg	39,9	12,2

Dieta C, controllo; dieta E, controllo + 250 mg kg^{-1} di α -tocoferilacetato; dieta O, controllo + 3% di olio di girasole alto-oleico; dieta OE, controllo + mg kg^{-1} di α -tocoferilacetato + 3% di olio di girasole alto-oleico. t0: prelievo immediato del mangime subito dopo la preparazione; t14 gg: attesa di 14 giorni tra la preparazione del mangime e il prelievo

alla media dei 4 gruppi in questione, ottenuta da 4 repliche (4 diversi suini) per ogni gruppo di campioni, non sono state evidenziate differenze statisticamente significative tra i quattro gruppi, sia per la composizione degli acidi grassi totali, che per la frazione polare e neutra (30); questo è dovuto alla forte dispersione del dato. Il profilo acidico della quota lipidica della carne ottenuta dalla supplementazione con olio di girasole alto-oleico e vitamina E è riportato in figura 4.

Tuttavia, la frazione polare differiva notevolmente dalla composizione della frazione neutra, in quanto conteneva più elevate quantità di $C_{18:2}$, $C_{20:3}$ e $C_{20:4}$. Gli acidi grassi preponderanti della frazione polare erano il linoleico, l'oleico, il palmitico, lo stearico e l'arachidonico, mentre per quanto concerne la fra-

zione neutra e il grasso totale, i preponderanti erano l'oleico, il palmitico e lo stearico. L'analisi statistica multivariata ha permesso di evidenziare i raggruppamenti di campioni e di valutare quali siano le variabili che maggiormente spiegano la varianza complessiva, in quanto permette di riassumere i risultati, ottenuti sulla base di numerose variabili, in poche dimensioni, conservando il più possibile l'informazione presente nei dati originali. Infatti, le variabili misurate nella sperimentazione (acidi grassi, triacilgliceroli, specie molecolari dei fosfolipidi, α -tocoferolo) sono numerose, correlate in diverso modo e possono contenere notevoli quote di ridondanza nell'informazione. L'utilizzo della PCA consente di ridurre il numero delle variabili ricorrendo ad un nuovo gruppo di variabili, combinazio-

ne lineare di quelle originali, da utilizzare per la descrizione del campione, dette *componenti principali*. La trasformazione delle variabili è operata in modo tale che le funzioni lineari siano tra loro non correlate (indipendenti se le variabili originali sono normalmente distribuite) e quindi consentano di utilizzare solo quelle che presentano una varianza maggiore (e quindi rappresentano una maggiore porzione della variabilità complessiva del campione).

Il modello di PCA adottato, che tiene conto degli acidi grassi della frazione polare, spiega l'81% della varianza, risultando quindi di buona qualità (30). La distribuzione dei campioni non mostra alcun tipo di raggruppamento, nè in funzione della dieta, nè in funzione del sesso; non si ha cioè una netta differenziazione dei gruppi alimentati con diete diverse. La distribuzione delle variabili, rappresentate come vettori, mostra che l'acido arachidonico è inversamente correlato all'acido oleico e che l'acido stearico è inversamente correlato all'acido linoleico.

Al contrario, la disposizione dei campioni e delle variabili riscontrata dall'analisi della PCA della frazione neutra del grasso della carne di maiale, mostrava un chiaro raggruppamento dei campioni di carne ottenuta da animali alimentati con olio di girasole alto-oleico (O) e con olio di girasole alto-oleico combinato con la vitamina E (OE) (30). Tali risultati sono da attribuire ad una maggiore

Tabella 2 - Principali classi non fosfolipidiche presenti nei lipidi del mangime (mg g^{-1}). I valori, all'interno di ogni gruppo, sono espressi come media dei risultati ottenuti da mangimi in cui il prelievo del lotto coincideva con la preparazione dello stesso e in cui il prelievo è stato effettuato dopo 14 gg

	Composto	C	E	O	OE
Acidi grassi liberi ^a	P	7,95	40,1	73,4	61,7
	O	10,8	60,3	545	396
	L	18,0	82,0	217	166
Monogliceridi ^b	1-S	2,24	2,65	6,70	6,34
	1-O	1,84	4,01	3,26	3,10
Squalene ^c	0,24	0,37	0,34	0,37	
Digliceridi ^d	1,2-PO	0,90	0,64	0,75	1,01
	1,2-PL+1,3-PO	2,81	3,24	2,96	3,60
	1,3-PL	0,87	2,98	1,29	1,80
	1,2-OO	1,19	0,67	1,96	3,62
	1,2-OL+1,3-OO	3,79	3,78	7,81	14,4
	1,2-LL+1,3-OL	5,38	7,41	5,43	8,92
Trigliceridi ^e	1,3-LL	1,69	5,06	1,34	2,50
	PPO	2,66	2,67	0,34	0,78
	PPL	5,75	4,90	0,32	1,14
	POS	0,99	0,83	0,24	0,43
	POO	8,24	6,90	1,99	6,17
	PLO	17,9	14,8	1,38	4,17
	PLL+PoLO	19,7	16,5	0,69	2,56
	SOO	1,51	1,17	0,88	2,62
	OOO	7,08	4,94	4,47	22,8
	SLO	1,91	1,79	0,13	0,34
OLO	16,04	13,46	1,80	7,10	
OLL	18,95	16,40	0,53	3,29	
LLL	11,43	9,92	0,13	0,79	

Dieta C, controllo; dieta E, controllo + 250 mg kg^{-1} di α -tocoferilacetato; dieta O, controllo + 3% di olio di girasole alto-oleico; dieta OE, controllo + 250 mg kg^{-1} di α -tocoferilacetato + 3% di olio di girasole alto-oleico. ^aacidi grassi liberi quantificati come acido oleico; ^bmonoacilgliceroli quantificati come monoilglicerolo; ^csqualene quantificato come squalano; ^ddiacilgliceroli quantificati come 1,2-dioilglicerolo; ^etriacilgliceroli quantificati come 1,2,3-triarachidoilglicerolo. P: acido palmitico; Po: acido palmitoleico; S: acido stearico; O: acido oleico; L: acido linoleico

quantità di $\text{C}_{18:1}$ e $\text{C}_{18:2}$ riscontrata nei campioni appartenenti ai gruppi O ed OE, accompagnata ad una diminuzione degli acidi grassi saturi. Ciò rispecchia il profilo degli acidi grassi della dieta somministrata.

Analisi della componente lipidica totale della carne (lipidogramma)

Poiché la matrice era di origine animale, si è constatata la presenza del colesterolo e della maggior parte dei triacilgliceroli semplici e misti a 44, 46, 48, 50, 52 e 54 atomi di carbonio (30). Si è osservata anche la presenza di diacilgliceroli a 32, 34 e 36 atomi di carbonio. I monoacilgliceroli e gli acidi grassi liberi risultavano assenti. L'assenza dei monogliceridi e degli acidi grassi liberi può essere ricondotta ad una buona qualità e conservazione delle carni e quindi del grasso intra ed extra muscolare. Applicando il test Tukey-Kramer e l'analisi della varianza (ANOVA) non sono state tuttavia evidenziate differenze statisticamente significative tra i 4 gruppi.

L'analisi delle componenti principali (PCA) è stata eseguita sui dati delle percentuali interne dei trigliceridi presenti nei campioni (30). Il modello a 2 componenti, PC1 e PC2, spiega il 71% della varianza dei campioni. Lo score plot evidenzia una separazione fra i campioni (4 maschi e 4 femmine, M e F) ottenuti somministrando olio di girasole alto-oleico rispetto a quelli ot-

Figura 2 - Tracciato GC-FID dei lipidi totali silanizzati del mangime di controllo, C. 1, ac. palmitico; 2, ac. oleico; 3, ac. linoleico; 4, 1-stearina; 5, 1-oleina; 6, tocoferolo; 7, β -sitosterolo; 8, 1-palmitil-2-oleina; 9, 1-palmitil-2-linoleina + 1-palmitil-3-oleina; 10, 1-palmitil-3-linoleina; 11, 1,2-di-oleina; 12, 1-olein-2-linoleina + 1,3-di-oleina; 13, 1,2-dilino- leina + 1-olein-3-linoleina; 14, 1,3-dilino- leina; 15, 1,2-dipalmitin-3-oleina; 16, 1,2-dipalmitin-3-linoleina; 17, 1-pal- mitil-2-oleil-3-stearina; 18, 1-palmitil-2,3-di-oleina; 19, 1-palmitil-2-linoleil-3-oleina; 20, 1-palmitil-2,3-dilino- leina + 1-palmitoil-2-linoleil-3-oleina; 21, 1-stearil-2,3-di-oleina; 22, 1,2,3-trioleina; 23, 1-stearil-2-linoleil-3-oleina; 24, 1- oleil-2-linoleil-3-oleina; 25, 1-oleil-2,3-di-oleina; 26, 1,2,3-trilino- leina; S.I., nonadecanoina; Mn: monoacilglicerolo, Dn: diacilglicerolo, Tn: triacilglicerolo (n=numero atomi di carbonio)

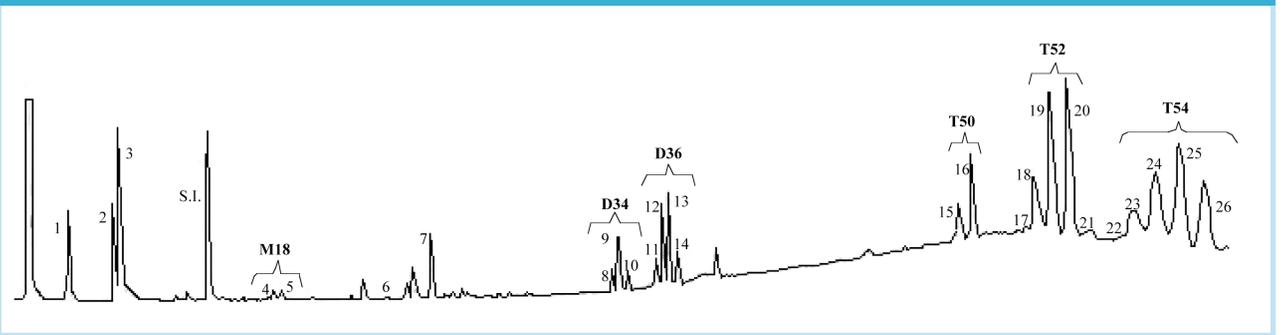
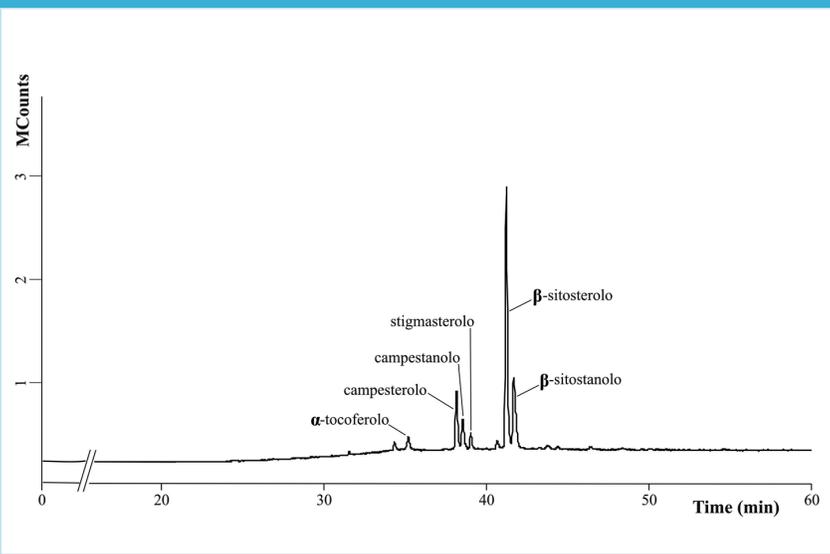


Figura 3 - Tracciato GC-MS dell'insaponificabile estratto dal mangime di controllo



tenuti aggiungendo solo vitamina E. Gli 8 campioni di controllo (4 maschi e 4 femmine) non formano

un gruppo omogeneo e sono 'sparpagliati' in tutti i quadranti. Gli 8 campioni ottenuti dall'alimentazio-

ne con olio di girasole alto-oleico e vitamina E erano posizionati in una zona intermedia fra i rimanenti. L'effetto dovuto alla dieta, in linea con i risultati ottenuti dall'analisi degli acidi grassi della frazione totale della carne, non sembra essere influenzato dal sesso degli animali. La distribuzione delle variabili evidenzia che i campioni appartenenti al gruppo O presentano una maggiore quantità di trigliceridi in cui la posizione 2 è occupata dall'acido oleico. Questo gruppo si distingue da quello formato dai campioni i cui trigliceridi comprendono al massimo un'insaturazione. Si nota inoltre la presenza di alcuni campioni outlier, che si posizionano in quadranti opposti rispetto ai campioni appartenenti allo stesso gruppo.

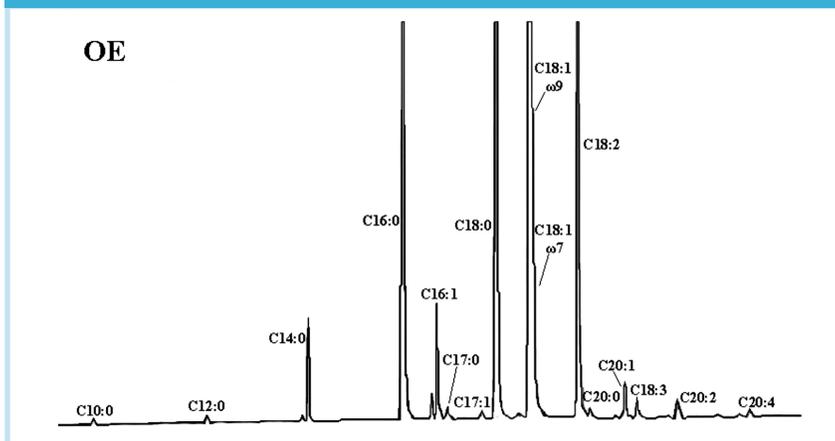
Caratterizzazione delle specie molecolari fosfolipidiche e influenza del regime dietetico

I campioni presi in considerazione al fine di valutare eventuali effetti esercitati dalla tipologia dietetica sulle varie classi fosfolipidiche sono stati 16, per via della complessità dell'analisi. Questi erano stati suddivisi in 4 gruppi da 4 campioni, 2 maschi e 2 femmine, dove ogni gruppo faceva riferimento ad un determinato regime dietetico.

L'analisi quantitativa delle varie classi fosfolipidiche è stata effettuata tramite HPLC ed ELSD, utilizzando curve di calibrazione ottenute da miscele di standard delle classi fosfolipidiche a concentrazioni comprese nel range presente nei campioni. I valori sono espressi in $\mu\text{g g}^{-1}$ relativi alla quota lipidica polare (corrispondente a circa il 4-5% della frazione lipidica totale). Un esempio di cromatogramma ottenuto è riportato in figura 5.

La spettrometria di massa di secondo ordine (Tandem Mass Spectrometry) è stata determinante per confermare l'identificazione delle specie molecolari fosfolipidiche (Fig. 5b). Il plasmalogeno (pPE), la fosfatidiletanolamina (PE), la fosfatidilserina (PS), la sfingomieline (Sph) e la lisofosfatidilcolina (LPC), sono stati rilevati come ione pseudomolecolare $[M+1]^+$. La fosfatidilcolina (PC), oltre che nella forma protonata, è stata rilevata an-

Figura 4 - Tracciato GC-FID del profilo acidico del grasso totale nella carne di maiale cruda. OE, dieta con olio di girasole con aggiunta di vit. E; C n:m (n= numero degli atomi di carbonio; m= numero dei doppi legami)



che come ione pseudomolecolare $[M-15]^+$, che si forma dalla perdita di un gruppo metilico (CH_3) della colina.

La cardiolipina (CL) è stata rilevata nella forma protonata $[M+1]^+$ e come ione pseudomolecolare $[M+23]^+$ e $[M+46]^+$, derivanti rispettivamente dall'addotto con 1 o 2 molecole di sodio.

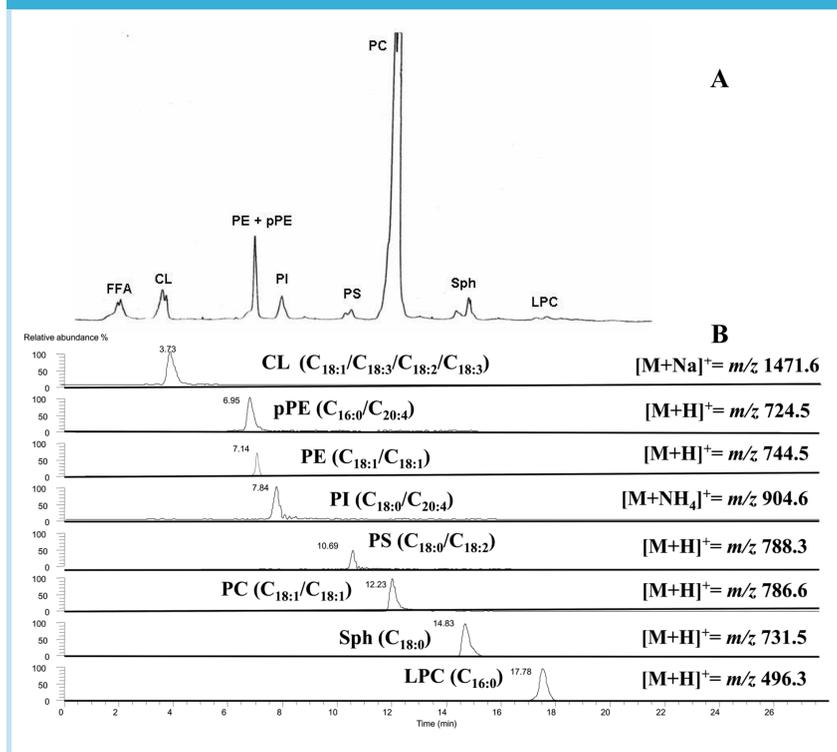
Il fosfatidilinositolo (PI), invece, oltre che nella forma protonata, è stato rilevato come addotto con l'ammonio $[M+18]^+$. Tali risultati sono in linea con lavori precedentemente pubblicati (31, 32), così come le frammentazioni caratteristiche delle varie classi fosfolipidiche (33).

La concentrazione di ciascuna specie molecolare dei fosfolipidi è stata determinata rapportando la composizione percentuale relativa di ciascuna specie, ottenuta tramite

HPLC-ESI-MS-MS, con la concentrazione della corrispondente classe fosfolipidica ottenuta tramite HPLC-ELSD. Con il test di Tukey non si evidenziano differenze significative, al variare della dieta, nella composizione interna delle diverse classi fosfolipidiche. La classe fosfolipidica preponderante è stata sempre la PC (30).

Tuttavia, nonostante la dispersione dei dati all'interno dei singoli gruppi sia molto elevata, i campioni appartenenti ad O ed OE, presentano, rispetto ai relativi gruppi di controllo (C ed E), un incremento percentuale dei livelli di PC e un decremento del contenuto di PS (Fig. 6). Questo andamento potrebbe dipendere dalla via biosintetica di questi fosfolipidi: PC e PS sono interconvertibili attraverso il trasferimento di gruppi metilici e carbossilici, che

Figura 5 - Tracciato HPLC della frazione polare della carne di maiale cruda. A, tracciato ELSD. B, tracciato ESI-MS a ionizzazione positiva; CL, cardioplipina; pPE, plasmalogeno della fosfatidiletanolamina; PE, fosfatidiletanolamina; PI, fosfatidilinositolo; PC, fosfatidilcolina; Sph, sfingomieline; LPC, lisofosfatidilcolina. $C_{n,m}$ = acido grasso (n=numero atomi di carbonio; m=numero dei doppi legami)



avviene in tutte le cellule degli eucarioti (34).

Cardiolipina. La specie molecolare preponderante è, in tutti i gruppi, quella composta dalla combinazione di acidi grassi C_{18:1}/C_{18:3}/C_{18:2}/C_{18:2} o C_{18:1}/C_{18:3}/C_{18:1}/C_{18:3}. Tuttavia i campioni del gruppo O presentano, rispetto agli altri 3 gruppi, concentrazioni maggiori di tutte le altre specie molecolari. Tali differenze sono più evidenti per quanto concerne le specie molecolari contenenti C_{18:2}/C_{18:1}/C_{18:1}/C_{18:0}, C_{18:0}/C_{18:0}/C_{18:0}/C_{18:3} o C_{18:0}/C_{18:1}/C_{18:1}/C_{18:1}, C_{18:2}/C_{18:1}/C_{18:2}/C_{18:0} o C_{16:0}/C_{20:4}/C_{18:1}/C_{18:0}, C_{18:2}/C_{18:1}/C_{18:3}/C_{18:0},

C_{18:3}/C_{18:1}/C_{18:2}/C_{18:1} o C_{16:0}/C_{20:4}/C_{18:3}/C_{18:0}, C_{18:3}/C_{18:1}/C_{18:2}/C_{18:3} o C_{16:0}/C_{20:4}/C_{18:3}/C_{18:2}.

Fosfatidiletanolamina. La specie molecolare contenente 2 molecole di acido oleico è la specie preponderante in tutti i 4 gruppi del disegno sperimentale.

Plasmalogeno della fosfatidiletanolamina. La specie molecolare m/z 752,4 (p_{18:0}/C_{20:4}) è quella maggiormente presente in tutti i campioni. Il gruppo OE si distingue dagli altri gruppi per una minor concentrazione della specie molecolare m/z 756,6 (p_{18:0}/C_{20:2}).

Fosfatidilinositolo. Anche per quanto riguarda il fosfatidilinositolo, la specie molecolare preponderante, contenente la combinazione acida C_{18:0}/C_{20:4}, risulta essere la stessa in tutti i gruppi.

Fosfatidilserina. La specie molecolare preponderante differisce tra i vari gruppi. Nel gruppo C ed O la specie maggiore è quella contenente l'acido stearico e l'acido linoleico, mentre nei gruppi E ed OE è quella con combinazione acida C_{18:0}/C_{18:1}. Solo nel gruppo C c'è una differenza marcata in termini di concentrazione tra la specie m/z 788,3 (C_{18:0}/C_{18:2}) e la specie m/z 790,6 (C_{18:0}/C_{18:1}). Inoltre, i campioni appartenenti alle diete O ed OE, presentano un minor contenuto di tutte le specie molecolari della fosfatidilserina se confrontati con i campioni appartenenti agli altri gruppi.

Fosfatidilcolina. La specie molecolare preponderante, contenente l'acido palmitico e l'acido linoleico, è la stessa in tutti i gruppi, 758,6 (C_{16:0}/C_{18:2}), tranne che nel gruppo O dove la specie maggiore risulta essere m/z 760,6 (C_{16:0}/C_{18:1}). Il gruppo C presenta, rispetto agli altri gruppi, concentrazioni maggiori delle specie molecolari m/z 780,6 (C_{16:0}/C_{20:5} o C_{18:3}/C_{18:2}) e m/z 782,6 (C_{16:0}/C_{20:4}). Il gruppo O presenta un maggior livello di fosfatidilcolina con composizione acida

$C_{18:0}/C_{20:4}$ mentre i gruppi E ed OE si distinguono dagli altri due gruppi per concentrazioni nettamente inferiori delle specie molecolari m/z 806,6 ($C_{18:2}/C_{20:4}$) e m/z 812,6 ($C_{18:0}/C_{20:3}$ o $C_{18:1}/C_{20:2}$ o $C_{18:2}/C_{20:1}$).

Sfingomieline. La specie molecolare m/z 731,5, contenente il $C_{18:0}$, risulta essere la preponderante in tutti i gruppi, a prescindere dal regime dietetico.

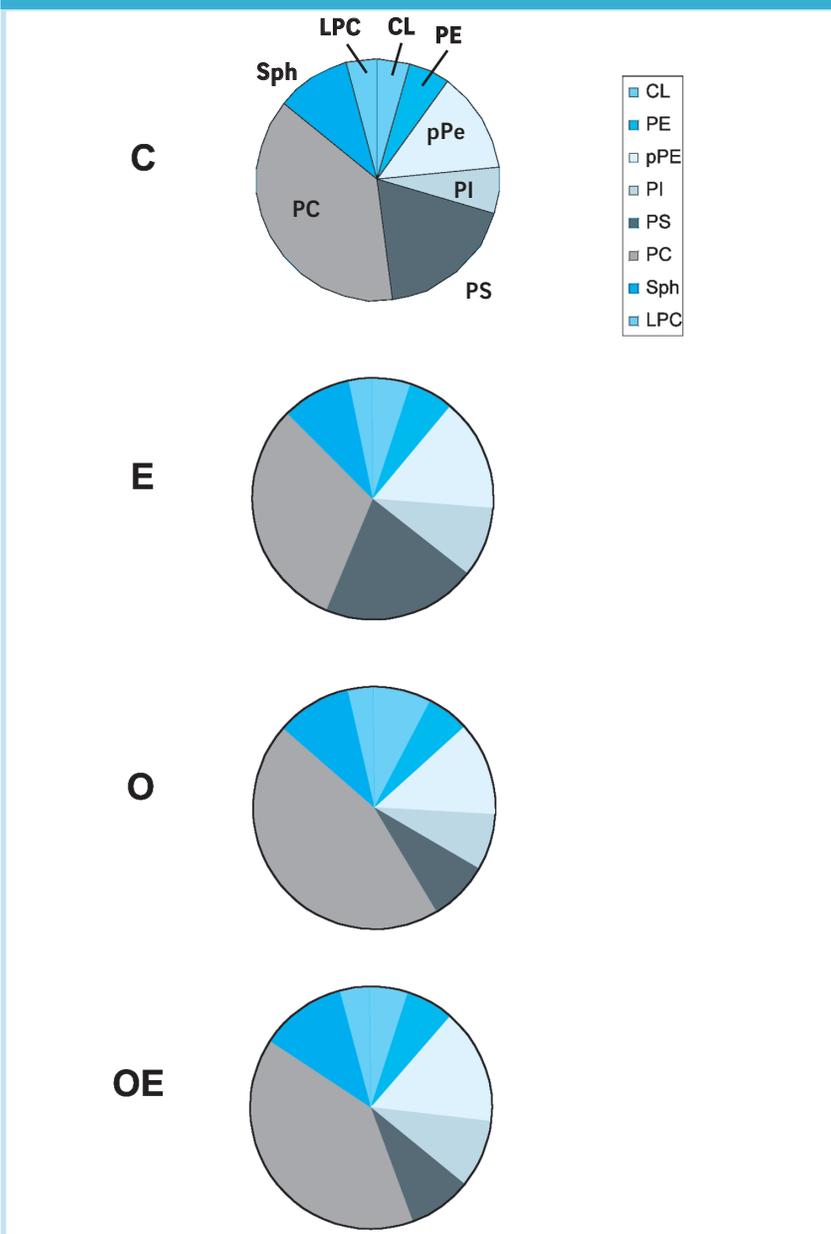
Lisofosfatidilcolina. La specie molecolare preponderante è la stessa in tutti i gruppi (m/z 496,3 contenente l'acido palmitico). I gruppi E ed OE si distinguono dagli altri 2 gruppi per una minore concentrazione della specie molecolare contenente l'acido linoleico.

Contenuto di α -tocoferolo nella carne

I campioni alimentati con mangime arricchito di α -tocoferilacetato presentano valori maggiori di α -tocoferolo libero, se confrontati con i gruppi in cui non vi è stata la supplementazione dietetica con la vitamina: l'incremento, rispetto al gruppo di controllo, era di oltre il 100% per la carne ottenuta utilizzando la dieta E (30).

Tuttavia, questo aumento, così come per i lipidi polari, non risulta essere statisticamente significativo ($P>0,05$), a causa di un'elevata dispersione dei dati all'interno dei quattro gruppi dietetici.

Figura 6 - Composizione percentuale delle classi fosfolipidiche della carne di maiale cruda. CL, cardioplipina; pPE, plasmalogeno della fosfatidiletanolamina; PE, fosfatidiletanolamina; PI, fosfatidilinositolo; PC, fosfatidilcolina; Sph, sfingomieline; LPC, lisofosfatidilcolina. C, dieta di controllo; E, dieta E; O, dieta O; OE, dieta OE



Conclusioni

Le conclusioni che si possono trarre da questo lavoro riguardano 2 aspetti correlati: la formulazione dei

mangimi ed il profilo lipidico della carne ottenuta dalla supplementazione. Per quanto riguarda il primo aspetto, l'integrazione ha portato ad un reale arricchimento rispetto al

mangime di controllo, sia in termini di acido oleico che di α -tocoferilacetato. Nel mangime in cui c'è stata la supplementazione di α -tocoferilacetato, con o senza olio di girasole, si è però registrato un calo del contenuto sia dell' α -tocoferolo che dell' α -tocoferilacetato, durante i 14 giorni che intercorrevano fra la formulazione del mangime e la somministrazione ai maiali, di circa il 10-15%. Questo dimostra che la sosta dei mangimi arricchiti con vitamina E è critica nelle aziende zootecniche ed andrebbe ridotta a pochissimi giorni.

L'effetto della supplementazione dietetica con olio di girasole alto-oleico (3%) e α -tocoferolo acetato su maiali pesanti italiani (*Duroc x Large White*) allevati fino al raggiungimento di 170 kg (peso di macellazione) è risultato evidente solamente sulla composizione della frazione lipidica neutra. Infatti, i triacilgliceroli contenenti acidi grassi saturi (palmitico e stearico) decrementano del 14% circa, mentre quelli contenenti 2 e 3 molecole di acido oleico aumentano rispettivamente del 16 e del 40%.

La frazione dei lipidi polari, ad esclusione della PC, PS e della CL, non sembra essere influenzata dai differenti regimi dietetici. Questo, probabilmente, è dovuto alla regolazione omeostatica che sembra esercitare un ruolo significativo nei maiali macellati a 160-170 Kg, diversamente da quanto riscontrato

in precedenti lavori (35), nei quali i suini oggetto di sperimentazione, appartenevano ad un altro genotipo e venivano macellati ad un peso inferiore (105 kg) (10), o dove i suini, pur essendo macellati ad un peso di 160-170 Kg, non presentavano nello loro diete un rapporto lisina:calorie costante (36). Nei campioni in cui vi è stato l'arricchimento dietetico con l' α -tocoferilacetato, infine si è riscontrato un aumento del contenuto di α -tocoferolo; tale incremento non è tuttavia risultato statisticamente significativo a causa della dispersione del dato.

Ringraziamenti

Questo lavoro è stato finanziato dal Ministero Italiano dell'Università e della Ricerca Scientifica (PRIN2004, prot. 2004077052). Si ringrazia il Gruppo Angelini, Ancona, per il cofinanziamento di una borsa di studio di dottorato di ricerca.

Bibliografia

1. De Winne A, Dirinck P. Studies on Vitamin E and Meat Quality. 3. Effect of Feeding High Vitamin E Levels to Pigs on the Sensory and Keeping Quality of Cooked Ham. *J Agric Food Chem* 1997; 45: 4309-17.
2. Gandemer G. Lipids and meat quality: lipolysis, oxidation, maillard reaction and flavour. *Sci Aliments* 1999; 19: 439-58.
3. Zanardi E, Novelli E, Ghiretti GP, Chizzolini R. Oxidative stability of lipids and cholesterol in salame Milano, coppa and Parma ham: dietary supplementation with vitamin E and oleic acid. *Meat Science* 2000; 55: 169-75.
4. Warnants N, Van Oeckel MJ, Boucque Ch. V. Incorporation of dietary polyunsaturated fatty acids in pork tissue and its implication for the quality of the end products. *Meat Science* 1996; 44: 125-44.
5. Pfalzgraf A, Martin Frigg M, Steinhart H. α -Tocopherol Contents and Lipid Oxidation in Pork Muscle and Adipose Tissue during Storage. *J. Agric. Food Chem.* 1995; 43: 1339-1342.
6. Cameron ND, Enser MB. Fatty acid composition of lipid in Longissimus Dorsi muscle of Duroc and British Landrace pigs and its relationship with eating quality. *Meat Science* 1991; 29: 295-307.
7. Ahn DU, Lutz S, Sim JS. Effect of dietary linoleic acid on the fatty acid composition, storage stability and sensory characteristics of pork loin. *Meat Science* 1996; 43: 291-9.
8. Tikk K, Tikk M, Aaslyng MD, Karlsson AH, Lindahl G, Andersen HJ. Significance of fat supplemented diets on pork quality-Connections between specific fatty acids and sensory attributes of pork. *Meat Science* 2007; 77: 275-86.
9. Kouba M, Enser M, Whittington FM, Nute GR, Wood JD. Effect of high-linolenic acid diet on lipogenic enzyme activities, fatty acid composition, and meat quality in the growing pig. *Journal of Animal Science* 2003; 81: 1967-79.
10. Wood D, Nute GR, Richardson RI, et al. Effects of breed, diet and muscle on fat deposition and eating quality in pigs. *Meat Science* 2004; 67: 651-67.
11. Fernandez X, Monin G, Talmant A, Mourot J, Lebret B. Influence of intramuscular fat content on the quality of pig meat-1. Composition of the lipid fraction and sensory characteristics of *m. longissimus lumborum*. *Meat Science* 1999; 53: 59-65.
12. Raes K, De Smet S, Demeyer D. Effect of dietary fatty acids on incorpo-

- ration of long chain polyunsaturated fatty acids and conjugated linoleic acid in lamb, beef and pork meat: a review. *Anim Feed Sci Technol* 2004; 113: 199-221.
13. Muguerza E, Gimeno O, Ansorena D, Astiasaran I. New formulations for healthier dry-fermented sausages: a review. *Food Science Technol* 2004; 15: 452-7.
 14. Cameron ND, Enser MB, Nute GR, et al. Genotype with nutrition interaction on fatty acid composition of intramuscular fat and the relationship with flavour of pig meat. *Meat Science* 2000; 55: 187-95.
 15. Kanner J. Oxidative processes in meat and meat products: Quality implications. *Meat Science* 1994; 36: 169-89.
 16. Bertelsen G, Jakobsen M, Juncker D, et al. Oxidation, shelf-life and stability of meat and meat products. In *Proceedings of the 46th ICoMST*. 2000: 516-24.
 17. Dirinck P, De Winne A, Casteels M, Frigg M. Studies on Vitamin E and Meat Quality. Effect of Feeding High Vitamin E Levels on Time-Related Pork Quality. *J Agric Food Chem* 1996; 44: 65-8.
 18. Corino C, Oriani G, Pantaleo L, Pastorelli G, Salvatori G. Influence of Dietary Vitamin E Supplementation on "Heavy Pig" Carcass Characteristics, Meat Quality and Vitamin E Status. *J Anim Sci* 1999; 77: 1755-61.
 19. Phillips M, Faustman C, Lynch MP, Govoni KE, Hoagland TA, Zinn SA. Effect of dietary α -tocopherol supplementation on colour and lipid stability in pork. *Meat Science* 2001; 58: 389-93.
 20. Smith JW, Tokach MD, O'Quinn PR, Nelssen JL, Goodband RD. Effects of Dietary Energy Density and Lysine: Calorie Ratio on Growth Performance and Carcass Characteristics of Growing-Finishing Pigs. *J Anim Sci* 1999; 77: 3007-15.
 21. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959; 37: 911.
 22. Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 1957; 226: 497-509.
 23. Boselli E, Caboni MF, Rodriguez Estrada MT, Toschi TG, Daniel M, Lercker G. Photooxidation of cholesterol and lipids of turkey meat during storage and commercial retail condition. *Food Chemistry* 2005; 91: 705-13.
 24. Sweeley CC, Bentley R, Makita M, Wells WW. Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugar and related substances. *Journal of the American Chemical Society* 1963; 85: 2497-507.
 25. Frega NG, Boselli E, Bocci F. *Metodiche analitiche non convenzionali. Olio & Olio* 2002; n. 1-2 anno V.
 26. Christie WW. Preparation of derivatives of fatty acids. In *Lipid Analysis*. The Oily Press, Bridgwater (UK), 2003: 207.
 27. *Norme grassi e derivati "Method C-12, Stazione Sperimentale per le Industrie degli Oli e dei Grassi (SSOG)"* 1976; Milano, Italia.
 28. Hewavitharana AK, Lanari MC, Becu C. Simultaneous determination of Vitamin E homologs in chicken meat by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 2004; 1025: 313-7.
 29. Avalli A, Contarini G. Determination of phospholipids in dairy products by SPE/HPLC/ELSD. *Journal of Chromatography A* 2005; 1071: 185-90.
 30. Boselli E, Pacetti D, Lucci P, Di Lecce G, Frega NG. Supplementation with high-oleic sunflower oil and α -tocopherylacetate: effects on pork meat lipids. *Eur J Lipid Sci Technol* 2008; 110: *in press*.
 31. Pacetti D, Boselli E, Lucci P, Frega NG. Simultaneous analysis of glycolipids and phospholipids molecular species in avocado (*Persea americana* Mill) fruit. *Journal of Chromatography A* 2007; 1150: 241-51.
 32. Zemski Berry KA, Murphy RC. Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry of Glycerophosphoethanolamine Plasmalogen Phospholipids. *Journal of the American Society of Mass Spectrometry* 2004; 15: 1499-508.
 33. Boselli E, Pacetti D, Curzi F, Frega NG. Determination of Phospholipid Molecular Species in Pork Meat by High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and Evaporative Light Scattering Detection. *Meat Science* 2008; 78: 305-15.
 34. Dowhan W. Molecular basis for membrane phospholipid diversity: Why are there so many lipids? *Annu. Rev. Biochem* 1997; 66: 199-232.
 35. Scheeder MRL, Gläser KR, Eichenberger B, Wenk C. Influence of different fats in pig fed on fatty acid composition of phospholipids and physical meat quality characteristics. *Eur J Lipid Sci Technol* 2000; 102: 391-401.
 36. Kuhn M, Pfalzgraf A, Steinhart H. Zur Wirkung verschiedener Futterrestriktionen auf den Gehalt an intramuskulärem Fett sowie das Fettsäurenmuster der Gesamt- und Phospholipide im Muskelgewebe schwerer Mastschweine (>160 kg LM). *Fat Sci Technol* 1995; 3: 118-22.