

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Corso di laurea in Scienze e Tecnologie Animali

ANALISI GENETICA DEL TEMPO DI COAGULAZIONE, TEMPO
DI RASSODAMENTO E CONSISTENZA DEL COAGULO
OTTENUTI ATTRAVERSO L'UTILIZZO DI STRUMENTI DI TIPO
MECCANICO E OTTICO IN BOVINE DI RAZZA BRUNA

Relatore:

Dott. Alessio Cecchinato

Laureanda:

Michela Salmaso

Matricola n. 618441

ANNO ACCADEMICO 2011-2012

*A te, cara nonna Veneranda,
che eri la prima a sapere il
risultato di ogni esame e sei
in prima fila oggi e sempre
nel mio cuore.*

ABSTRACT

The aim of the present study was to conduct phenotypic and genetic analysis of rennet coagulation time (RCT, in min), curd-firming rate (k_{20} , in min) and curd firmness (a_{30} , in mm) assessed on an extended testing period using mechanical and near-infrared instruments. Individual milk samples were collected from 913 Brown Swiss cows reared in 63 herds located in Trento Province (Italy). Specifically milk coagulation properties (MCP) were measured using a traditional mechanical device, the Formagraph (FRM; Foss Electric, Hillerød, Denmark) and a NIR-optical device, the Optigraph (OPT; Ysebaert, Frépillon, France), under identical experimental conditions. Extending the analysis by either instrument to 90 min permitted RCT and k_{20} values to be obtained even for late-coagulating milk samples. Milk coagulation properties measured using the OPT differed considerably from those obtained using the FRM, with the partial exception of RCT. The average k_{20} values varied greatly (8,16 vs. 5,36 min for the OPT and the FRM, respectively), as did the a_{45} figures (41,49 vs. 33,66 mm for the OPT and the FRM, respectively). The RCT showed the highest between-instrument correlation coefficient ($r=0,82$), succeeded by a_{30} ($r=0,69$), k_{20} ($r=0,49$) and, at last, by a_{45} ($r=0,41$) with moderate and low correlations. The correlations between k_{20} and a_{45} , and milk yield varied among instruments, as did the correlations between k_{20} , a_{30} , and a_{45} and milk composition, and the correlations between a_{45} and pH. The relative influence of days in milk on k_{20} and a_{45} varied, as did the effect of parity on a_{45} and that of the measuring unit of coagulation meter on k_{20} and a_{30} . From a genetic point of view, the main results were: the estimated genetic parameters of k_{20} on a large field dataset ($h^2=0,212$ and $0,368$ for FRM and OPT; $r_g=0,764$) and, for the first time, of a_{45} ($h^2=0,120$ and $0,309$ for FRM e OPT; $r_g=0,847$). Also genetically RCT showed the highest correlation coefficient ($r_g=0,974$). Results suggest that breeding strategies for the enhancement of coagulation traits must be planned with caution as different results are expected from the FRM and OPT instruments. A possible future perspective, with further development of calibration models based on MIR spectra, should be MIR spectroscopy thanks to small costs of analysis and real time predictions that facilitate the collection of phenotypic data.

RIASSUNTO

L'obiettivo del presente studio è di condurre analisi fenotipiche e genetiche del tempo di coagulazione (RCT, in min), tempo di rassodamento (k_{20} , in min) e consistenza del coagulo (a_{30} , in mm) ottenuti attraverso l'utilizzo di strumenti di tipo meccanico e ottico ed estendendo il tempo di analisi a 90 minuti. In merito sono stati analizzati i campioni individuali di latte di 913 vacche di razza Bruna allevate in 63 aziende zootecniche situate nella provincia autonoma di Trento. In particolare le proprietà coagulative del latte (MCP) sono state misurate da uno strumento meccanico tradizionale, il Formagraph (FRM; Foss Electric, Hillerød, Denmark), e da uno strumento ottico, l'Optigraph (OPT; Ysebaert, Frépillon, France); entrambi presenti nello stesso laboratorio e adoperati dallo stesso tecnico. L'estensione del tempo di analisi, sia per FRM che per OPT, a 90 minuti ha permesso di ottenere valori di RCT e k_{20} anche per i campioni di latte che coagulano più tardi. Le MCP ottenute attraverso l'utilizzo dell'OPT differiscono in modo considerevole da quelle misurate dall'FRM, con la parziale eccezione dell'RCT. I valori medi del k_{20} variano molto (8,16 e 5,36 min, rispettivamente per OPT e FRM), come quelli dell' a_{45} (41,49 e 33,66 mm, rispettivamente per OPT e FRM). L'RCT mostra il coefficiente di correlazione più elevato quando vengono confrontati i suoi valori misurati da entrambi gli strumenti ($r=0,82$), seguito da a_{30} ($r=0,69$), k_{20} ($r=0,49$) ed infine a_{45} ($r=0,41$) con correlazioni moderate e basse. Le correlazioni tra k_{20} e a_{45} , e la quantità di latte sono diverse tra i due strumenti, come le correlazioni di k_{20} , a_{30} e a_{45} con le caratteristiche qualitative e quelle dell' a_{45} con il pH. La relativa influenza dei giorni di lattazione su k_{20} e a_{45} varia tra FRM e OPT, come l'effetto dell'ordine di parto sull' a_{45} e quello dell'unità di misurazione su k_{20} e a_{30} . Dal punto di vista genetico, i risultati più importanti sono: le stime dei parametri genetici di k_{20} in un ampio dataset ($h^2=0,212$ e $0,368$ rispettivamente per FRM e OPT; $r_g=0,764$) e, per la prima volta, di a_{45} ($h^2=0,120$ e $0,309$ rispettivamente per FRM e OPT; $r_g=0,847$). Anche dal punto di vista genetico l'RCT mostra il coefficiente di correlazione più alto ($r_g=0,974$). I risultati suggeriscono che i programmi di miglioramento genetico per le MCP devono essere pianificati sapendo che i valori ottenuti da FRM e OPT sono diversi tra loro. Una possibile prospettiva futura, con ulteriori sviluppi dei modelli di calibrazione basati sugli spettri, potrebbe essere la spettroscopia nel medio infrarosso grazie ai ridotti costi di analisi e alle predizioni in tempo reale che facilitano la raccolta dei dati fenotipici.

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Il settore lattiero-caseario: contesto mondiale, europeo e italiano	1
1.2 Le proprietà coagulative del latte	1
1.2.1 Generalità	1
1.2.2 Parametri genetici	3
1.2.2.1 Ereditabilità	3
1.2.2.2 Correlazioni genetiche e fenotipiche	6
1.3 Latte che non coagula (<i>non coagulating milk</i>)	9
1.4 Metodi di misurazione dell'attitudine alla coagulazione del latte	12
2. OBIETTIVI	15
3. MATERIALI E METODI	17
3.1 Raccolta dati di campo	17
3.2 Analisi sulla qualità del latte	17
3.3 Analisi lattodinamografiche	17
3.4 Analisi statistiche	18
3.4.1 Analisi di regressione	18
3.4.2 Effetti non genetici	19
3.4.3 Ereditabilità e correlazioni genetiche	19
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	21
4.1 Aspetti fenotipici delle proprietà coagulative del latte	22
4.2 Aspetti genetici delle proprietà coagulative del latte	25
5. CONCLUSIONI	29
6. BIBLIOGRAFIA	31
7. APPENDICE A: TABELLE E FIGURE	35

1. INTRODUZIONE

1.1 Il settore lattiero-caseario: contesto mondiale, europeo e italiano

La produzione mondiale di latte è in continuo aumento, anche nei principali paesi importatori (Brasile, Giappone, Messico e Russia) (CLAL, 2012). Nel quadrimestre gennaio-aprile di quest'anno, l'offerta di latte in Europa ha segnato un aumento del 3,45% rispetto allo stesso periodo del 2011; un simile trend positivo (+2,12%) si è verificato anche per le consegne di latte in Italia (CLAL, 2012). Nel nostro paese nel 2011 sono state prodotte circa 11 milioni di tonnellate di latte vaccino e poco più di un milione di tonnellate di formaggio (ISMEA, 2011). Il 51% del latte prodotto in Italia è destinato alla produzione di derivati con certificazioni DOP e IGP, tra i quali si posizionano ai vertici della classifica, per fatturato alla produzione, 2 prodotti DOP: Grana Padano e Parmigiano Reggiano (ISMEA, 2011). Questi ultimi sviluppano da soli il 75% del totale del valore dei formaggi DOP esportati (ISMEA, 2011) segnando nei primi quattro mesi dell'anno un +1,10% (CLAL, 2012): i principali importatori sono Francia, Germania, Regno Unito, ma soprattutto Stati Uniti (CLAL, 2012). L'Italia è al primo posto in Europa per la produzione di formaggi DOP, distanziandosi da Francia e Grecia con un totale di 450.000 tonnellate prodotte (ISMEA, 2011). Le produzioni di Grana Padano e Parmigiano Reggiano si confermano in deciso aumento (+3,2% nel giugno 2012 rispetto allo stesso mese del 2011; CLAL, 2012) e anche i prezzi, in diminuzione dall'inizio dell'anno, si stanno stabilizzando proprio in questi ultimi mesi. Per quanto riguarda i consumi domestici italiani, mentre il consumo di Grana Padano è aumentato del 4,2% tra gennaio e aprile di quest'anno rispetto allo stesso periodo del 2011, il consumo di Parmigiano Reggiano è rimasto quasi invariato. Inoltre sono in aumento i consumi di prodotti lattiero caseari freschi come l'Asiago, la mozzarella e lo yogurt, a differenza del latte che segna una diminuzione del 3,6% (CLAL, 2012).

1.2 Le proprietà coagulative del latte

1.2.1 Generalità

L'efficienza del processo di caseificazione è innanzitutto influenzata dalla qualità del latte descritta dai parametri ordinariamente rilevati durante i controlli funzionali (contenuto di grasso, proteine, caseine, lattosio e cellule somatiche) e nello specifico dalla qualità tecnologica del latte. Quest'ultima è definita dalle proprietà coagulative del latte (MCP) espresse

sostanzialmente da tre parametri: tempo di coagulazione (RCT in min), tempo di rassodamento (K_{20} in min) e consistenza del coagulo (a_{30} in mm), ricavati dai tracciati lattodinamografici.

Il tempo di coagulazione (RCT in min) è il tempo che intercorre tra l'aggiunta del caglio al latte e l'inizio della formazione del coagulo che coincide con l'apertura del tracciato, descrivendo in tal modo la prima fase del processo di coagulazione, durante la quale l'enzima chimosina (*renneting enzyme*) rimuove la parte terminale idrofilica della k-caseina (caseinomacropeptide - CMP-, frammento carbossiterminale 106-109) favorendo, con il passaggio dallo stato colloidale allo stato gel, l'aggregazione delle micelle caseiniche (Kübarssepp et al., 2005; Frederiksen et al., 2011). La seconda fase riguarda l'aggregazione delle micelle caseiniche quando approssimativamente l'85% della K-caseina è idrolizzato (Lucey, 2002), destabilizzato e quindi capace di formare il coagulo finale grazie alla funzione di collante operata da elementi minerali come il calcio e il fosforo. I parametri che descrivono questa fase sono il tempo di rassodamento (K_{20} in min) del coagulo, che rappresenta il tempo necessario al coagulo, dall'inizio della sua formazione, per raggiungere una consistenza tale da determinare un'ampiezza del tracciato di 20 mm, e la consistenza del coagulo (a_{30} in mm) che corrisponde all'ampiezza del tracciato raggiunta dopo 30-31 minuti dall'aggiunta dell'enzima (Ikonen et al., 2004). La rilevazione delle proprietà coagulative del latte termina dopo tale intervallo di tempo poiché, nella produzione casearia a livello industriale, la rottura della cagliata avviene proprio dopo 30-31 minuti dall'aggiunta del caglio al latte (Ikonen et al., 2004).

Un latte caratterizzato da buona reattività al caglio (ridotto RCT), elevata capacità di rassodamento della cagliata e di conseguenza idonea capacità di contrazione ed espulsione del siero è un latte da cui si attende una consistente produzione di materia utile (resa casearia) con qualità desiderabile (Bittante et al., 2002; Ikonen et al., 1999 e 2004) rispetto a un latte con scarse o insufficienti proprietà coagulative (*poorly coagulating milk-PC- e non coagulating milk - NC-*).

Riguardo al miglioramento genetico delle proprietà di coagulazione del latte, le condizioni di base sono buone. L'ereditabilità stimata si attesta su valori compresi tra 0,15 e 0,40 (Ikonen et al., 1999 e 2004; Bittante et al., 2002; Tyrisevä et al., 2004; Cassandro et al., 2008), e le stime di ripetibilità variano da 0,53 a 0,68 indicando che sono sufficienti solo poche misurazioni per animale e lattazione al fine di ottenere stime di valori genetici (*estimated breeding value -EBV-*) attendibili (Ikonen et al., 2004; Cassandro et al., 2008). Tuttavia è difficile ottenere misurazioni

su larga scala delle proprietà coagulative del latte a causa degli alti costi e dei lunghi tempi richiesti dalle analisi di laboratorio (Cecchinato et al., 2011) effettuate con metodi meccanici (Formagraph, CRM, Reometro) o ottici come l'Optigraph. Perciò è stata necessaria l'applicazione della selezione genetica indiretta che sfrutta i caratteri misurati durante i controlli funzionali (quantità di latte, contenuto di grasso, proteine, caseine, lattosio e cellule somatiche) e geneticamente correlati alle proprietà di coagulazione del latte per il miglioramento delle stesse (Ikonen et al., 2004).

La spettroscopia nel vicino (AfiLab-S.A.E Afikim, Afikim, Israel) e medio infrarosso (*Mid infrared spectroscopy* –MIRS-) è stata di recente indicata come possibile tecnica alternativa per la determinazione dell'attitudine del latte alla coagulazione, grazie alla sua facilità d'impiego, al costo ridotto per analisi, ma soprattutto alla stima in tempo reale delle proprietà coagulative del latte a livello individuale (Dal Zotto et al., 2008; De Marchi et al., 2009; Cecchinato et al., 2011; Leitner et al., 2011). Con questi strumenti si potrebbe facilitare la raccolta dei dati fenotipici indispensabili per le valutazioni genetiche degli animali e migliorare le proprietà di coagulazione del latte attraverso selezione genetica diretta (Cecchinato et al., 2011).

1.2.2 Parametri genetici

1.2.2.1 Ereditabilità

L'ereditabilità di un carattere quantitativo definisce quanta parte della varianza fenotipica è varianza genetica additiva in base alla quale si decide sull'opportunità di attuare programmi di selezione genetica. L'ereditabilità è influenzata dal carattere quantitativo, dalla popolazione considerata e dal metodo statistico utilizzato per determinarla. Nello specifico, le proprietà coagulative del latte sono caratterizzate da una varianza genetica additiva compresa tra il 30 e il 40 % (Ikonen et al., 2004) dimostrando il loro potenziale ai fini del miglioramento genetico (Ikonen et al., 1999). I primi studi condotti per determinare l'ereditabilità dei parametri lattodinamografici (RCT, k_{20} , a_{30}) sono finlandesi (Lindström et al., 1984 e Tervala et al., 1985) come finlandese è uno degli studi più approfonditi: Ikonen et al. (2004). In quest'ultimo sono stati analizzati i campioni di latte di 4664 vacche di razza Ayrshire, la più importante in Finlandia (Ikonen et al., 1999). Circa il 13% dei campioni non ha coagulato ($a_{30}=0$) entro i 31 minuti dall'aggiunta dell'enzima (*NC milks*), di conseguenza, a causa dell'alta percentuale rilevata e degli effetti indesiderabili nella produzione casearia, la consistenza del coagulo è stata considerata sia per tutti i campioni in esame che, come il tempo di coagulazione, per i soli

campioni che hanno coagulato (Ikonen et al., 2004). L'ereditabilità stimata per la consistenza del coagulo di tutti i campioni è risultata più alta (0,39) di quella dei soli campioni che hanno coagulato (0,22) confermando la stima del precedente studio (Ikonen et al., 1999) con circa la stessa percentuale di campioni non coagulanti (8%). Allo stesso modo anche in una ricerca su vacche di razza Angler l'ereditabilità per la consistenza del coagulo è dello 0,39 (Oloffs et al., 1992). Tervalta et al. (1985) hanno stimato un'ereditabilità, escludendo il latte di vacche con alta conta cellulare e così gli effetti negativi sulle proprietà coagulative, simile (0,25) a quella dei campioni con valori di $a_{30} > 0$ (Ikonen et al., 2004). Invece si attesta sullo 0,22 l'ereditabilità stimata da Tyrisevä et al. (2004) includendo i campioni di latte che non coagulano, che prende in esame, oltre al latte di vacche di razza Ayrshire, anche quello di vacche di razza Frisona (1,3% di *NC milks* e 12% di *poorly coagulating-PC-milks*, rispetto al 30% prodotto da vacche di razza Ayrshire). Per quanto riguarda il tempo di coagulazione il primo studio a stimarne l'ereditabilità è quello del 1984 di Lindström et al. dove è compresa tra 0,23 (escludendo le vacche affette da mastite) e 0,27. Della stessa entità è la stima riportata da Oloffs et al. (1992) per le vacche di razza Frisona (0,27) e da Ikonen et al. (2004) per i soli campioni che coagulano (0,28). Minori invece risultano le stime di ereditabilità ricavate dagli studi di Ikonen et al. (1999), Tyrisevä et al. (2004) e Tervalta et al. (1985): 0,22; 0,21 e 0,13 rispettivamente. Non è paragonabile a nessuna delle stime precedenti l'ereditabilità del tempo di coagulazione riportata da Oloffs et al. (1992) per la razza Angler (0,39). Le discrepanze che emergono da confronti tra stime di ereditabilità sono conseguenza del ridotto numero di dati e dei modelli statistici che non consideravano tutte le relazioni parentali presenti tra gli animali utilizzati dai primi studi condotti in materia (Lindström et al., 1984; Tervalta et al., 1985; Oloffs et al., 1992). Alcune stime perciò non sono attendibili (Ikonen et al., 1999 e 2004) e questo è confermato dagli alti standard errors associati ad esse. Inoltre nello studio di Oloffs et al. (1992), la varianza genetica additiva di tempo di coagulazione e consistenza del coagulo non è influenzata e perciò non diminuisce in seguito all'inclusione nel modello statistico di genotipi riguardanti le proteine del latte, perché i genotipi considerati non hanno un chiaro effetto sulle proprietà tecnologiche del latte (Ikonen et al., 1999). Invece le stime di ereditabilità riportate da Ikonen et al. (1999) diminuiscono (-20 e -24% per tempo di coagulazione e consistenza del coagulo rispettivamente) in seguito all'aggiustamento dei records per gli effetti dei genotipi di β e κ -caseina e β -lattoglobulina dimostrando che la varianza genetica additiva in queste proprietà tecnologiche è parzialmente dovuta ai polimorfismi delle proteine del latte. Per quanto riguarda le razze da latte italiane

(Frisona, Bruna e Pezzata rossa) le stime di ereditabilità sono riportate principalmente da tre recenti studi (Cassandro et al., 2008; Cecchinato et al., 2011; Bonfatti et al., 2011). Tra questi spicca, per l'ampio dataset considerato (1025 vacche di razza Frisona e 1234 di razza Bruna) e per l'inclusione nelle stime delle informazioni riguardanti campioni di latte che non coagulano, diminuendone l'incertezza, lo studio condotto da Cecchinato et al. (2011). L'ereditabilità stimata per il tempo di coagulazione (0,24 e 0,21 per le vacche di razza Frisona e di razza Bruna rispettivamente) è maggiore di quella stimata per la consistenza del coagulo (0,148 e 0,168 rispettivamente per le vacche di razza Frisona e di razza Bruna). Per quanto riguarda la razza Frisona, le stime di ereditabilità per tempo di coagulazione e consistenza del coagulo sono comparabili a quelle ottenute da Cassandro et al. (2008) escludendo dalle analisi i campioni di latte che non hanno coagulato, con $a_{30}=0$ (10% di NC milks) (Cecchinato et al., 2011). L'ereditabilità stimata per la consistenza del coagulo è risultata più bassa rispetto alle altre stime riportate in letteratura (Oloffs et al., 1992; Ikonen et al., 1999 e 2004; Tyrisevä et al., 2004). Le stime di ereditabilità associate al tempo di coagulazione sono in accordo con quelle presenti negli studi di Ikonen et al. (1999) e Tyrisevä et al. (2004) e più basse rispetto a quelle stimate per le vacche di razza Ayrshire (Lindström et al., 1984; Ikonen et al., 2004) e Angler (Oloffs et al., 1992). Lo studio di Bonfatti et al. (2011) ha stimato l'ereditabilità dei parametri lattodinamografici per la Pezzata Rossa includendo nel modello di stima gli effetti poligenici degli animali e riportando valori per RCT compresi tra 0,23 e 0,29 e per a_{30} di 0,11 e 0,12. Tutte le stime di ereditabilità riportate e confrontate finora derivano da studi in cui le proprietà coagulative del latte sono state misurate attraverso lattodinamografo: Formagraph (N. Foss & Co. A/S, Denmark e Foss Electric, Hillerød, Denmark) in Tervalä et al. (1985) e Ikonen et al. (1999) e *Computerized Renneting Meter* (Polo Trade, Monselice, Italy) in tutti gli altri. In letteratura lo studio più rilevante condotto con l'utilizzo di uno strumento ottico quale l'Optigraph (Ysebaert, Frépillon, France) è estone: Vallas et al. (2010). In questo studio l'ereditabilità stimata per l'RCT si attesta sullo 0,22; mentre per l' a_{30} sullo 0,41. La stima di ereditabilità per l'RCT è simile a quella riportata da Ikonen et al. (2004), ma maggiore rispetto alle altre stime (0,21-0,25) per le razze da latte finlandesi e italiane (Ikonen et al., 1999; Tyrisevä et al., 2004; Cassandro et al., 2008). L'ereditabilità stimata per l' a_{30} è comparabile a quella riportata da Ikonen et al. (1999) (0,40) e da Oloffs et al. (1992) per vacche di razza Angler (0,39), mentre è più alta rispetto alle stime (0,15-0,22) disponibili in letteratura (Ikonen et al., 2004; Tyrisevä et al., 2004; Cassandro et al., 2008). Soltanto due studi hanno riportato le stime di

ereditabilità per il tempo di rassodamento: Tervala et al. (1985), la cui stima è stata calcolata sulla base di 261 campioni di latte di vacche di razza Frisona e Ayrshire ($h^2=0,021$) e Ikonen et al. (1997) con ereditabilità stimate molto elevate (0,54 per vacche di razza Ayrshire e 0,66 per vacche di razza Frisona). L'esclusione dalle analisi statistiche di questo parametro è giustificata dall'alta percentuale di campioni (*NC*, ma anche *PC milks*) che non raggiunge una consistenza del coagulo di 20 mm nei 30 minuti di analisi e dalla stretta correlazione con il tempo di coagulazione e la consistenza del coagulo (Ikonen et al., 2004).

Le proprietà di coagulazione del latte risultano sostanzialmente più ereditabili della quantità di latte (0,09-0,10) (Cassandro et al., 2008; Cecchinato et al., 2011), ma meno ereditabili rispetto ad altre caratteristiche qualitative come proteine, caseine e pH, con la sola eccezione del grasso (Ikonen et al., 2004; Cecchinato et al., 2011).

1.2.2.2 Correlazioni genetiche e fenotipiche

Le proprietà coagulative del latte possono essere migliorate attraverso selezione genetica diretta per le stesse o indiretta favorendo combinazioni alleliche associate a ridotto RCT e buon a_{30} o selezionando per caratteristiche quanti-qualitative rilevate durante i controlli funzionali ordinari, positivamente correlate alle MCP. La selezione indiretta ha finora sempre prevalso su quella diretta a causa dei lunghi tempi di analisi richiesti per la misurazione dei parametri lattodinamografici e così della non proprio agevole raccolta di dati fenotipici.

Tra tempo di coagulazione e consistenza del coagulo la correlazione genetica è negativa ed elevata, un breve RCT è correlato a un alto valore di a_{30} , perché sono parametri misurati in fasi consecutive del processo di coagulazione e l'intervallo di tempo per la loro determinazione è ridotto a 30 minuti. Di conseguenza le correlazioni genetiche stimate di RCT e a_{30} con le altre caratteristiche qualitative sono simili, tranne alcune eccezioni, e di segno opposto. Le correlazioni genetiche di RCT e a_{30} con la quantità di latte e la percentuale di grasso variano da quasi nulle, in particolare per la percentuale di grasso, a moderate attestandosi su valori massimi di 0,30 (Ikonen et al., 1999 e 2004; Cassandro et al., 2008; Vallas et al., 2010; Cecchinato et al., 2011). L'unica eccezione è rappresentata dall'alta correlazione negativa di RCT con la percentuale di grasso (-0,91) riportata da Lindström et al. (1984). Le stime per le correlazioni genetiche di RCT e a_{30} con le percentuali di proteina e caseina divergono tra i due parametri mostrando talvolta risultati contrastanti. Secondo quanto riportato da Lindström et al. (1984), un ridotto tempo di coagulazione è correlato a un alto contenuto di proteine (-0,58 è

la correlazione stimata). In altri studi tale correlazione genetica è positiva (0,49 in Ikonen et al., 1999; 0,22 in Ikonen et al., 2004) o quasi nulla (Tervala et al., 1985; Cassandro et al., 2008; Cecchinato et al., 2011). Allo stesso modo le correlazioni genetiche tra a_{30} e il contenuto di proteina e caseina sono risultate positive nelle ricerche condotte da Cassandro et al. (2008) (0,44 e 0,53 rispettivamente), Vallas et al. (2010) (0,48 tra a_{30} e contenuto di proteina) e Cecchinato et al. (2011) (0,35 e 0,67 per la razza Frisona e 0,05 e 0,18 per la razza Bruna), negative in Ikonen et al. (1999) (-0,24) o nulle (Ikonen et al., 2004). Le differenze riscontrate tra le precedenti correlazioni possono essere attribuite a diversi fattori come la razza considerata, i modelli di stima e i metodi di analisi adottati e gli effetti dei polimorfismi genetici legati alle proteine del latte. Infatti alcune frazioni proteiche sono più strettamente associate alle proprietà tecnologiche del latte rispetto al contenuto totale di caseina (Bonfatti et al., 2011). In particolare in un recente studio di Bonfatti et al. (2011) sulla composizione proteica del latte in vacche Pezzate Rosse α_{s1} e α_{s2} -CN risultano moderatamente e positivamente correlate all'RCT come β -CN che però mostra una correlazione di segno opposto con l'RCT di -0,26, mentre κ -CN è correlato positivamente con a_{30} . Il latte caratterizzato da buone proprietà tecnologiche è dunque geneticamente associato a bassi contenuti di α_{s1} e α_{s2} -CN e ad alti contenuti di β -CN e κ -CN assoluti e come percentuale nella caseina totale. La correlazione positiva stimata tra a_{30} e κ -CN è dovuta all'aumento del contenuto di κ -CN in relazione alla caseina totale associato ($R^2=0,77$) a una diminuzione nella dimensione delle micelle caseiniche che così si aggregano più velocemente formando un coagulo più consistente (Frederiksen et al., 2011). In numerosi studi è stato osservato e provato che, nello specifico, l'allele B della κ -CN ha effetti desiderabili sulle proprietà coagulative del latte e sulla sua composizione proteica rispetto all'allele A (Tervala et al., 1985; Ikonen et al., 1999; Frederiksen et al., 2011). L'allele B della κ -CN, o meglio i genotipi AB e BB della κ -CN, sono associati ad un alto contenuto di κ -CN (Frederiksen et al., 2011) e in media a un ridotto tempo di coagulazione e tempo di rassodamento e a una migliore consistenza del coagulo rispetto al genotipo AA. In Tervala et al. (1985) le differenze tra i genotipi sono risultate significative per il tempo di coagulazione, mentre molto significative ($P<0,001$) per il tempo di rassodamento e la consistenza del coagulo. Tuttavia la mancanza di un metodo rapido e automatico di analisi che permetta di quantificare su larga scala le frazioni proteiche limita l'opportunità di sfruttare le variazioni genetiche della composizione proteica del latte per il miglioramento delle sue proprietà coagulative (Bonfatti et al., 2011).

I maggiori studi in materia (Ikonen et al., 1999 e 2004; Cassandro et al., 2008; Vallas et al., 2010; Cecchinato et al., 2011) hanno osservato interessanti e consistenti correlazioni genetiche delle proprietà di coagulazione del latte sia con le cellule somatiche che con il pH. Un ridotto tempo di coagulazione e un'alta consistenza del coagulo sono di conseguenza associati a un basso contenuto di cellule somatiche e a un basso valore di pH. Cassandro et al. (2008) ha riportato una correlazione genetica tra il tempo di coagulazione e il contenuto di cellule somatiche che si attesta sullo 0,25; valore confermato da Cecchinato et al. (2011) sempre per la razza Frisona. Questi risultati sono in accordo con la correlazione stimata da Ikonen et al. (2004) (0,29) per la razza Ayrshire, ma non con le stime di Lindström et al. (1984), Ikonen et al. (1999) e Vallas et al. (2010) sostanzialmente trascurabili. Per la razza Bruna invece è stata stimata una forte correlazione genetica del tempo di coagulazione e consistenza del coagulo con le cellule somatiche (rispettivamente 0,62 e -0,69), ma con un'ampia incertezza di stima (HPD 95%) (Cecchinato et al., 2011). La correlazione genetica della consistenza del coagulo con le cellule somatiche è moderata e compresa tra -0,33 (a_{30} dei soli campioni che coagulano) e -0,45 (a_{30} di tutti i campioni) in Ikonen et al. (2004) che riporta risultati in linea con le stime di Cassandro et al. (2008) e Cecchinato et al. (2011) per la razza Frisona e più alti rispetto allo studio precedente (Ikonen et al., 1999). Sia il tempo di coagulazione che la consistenza del coagulo presentano una forte correlazione genetica con l'acidità del latte, misurata sia come pH che come acidità titolabile. Nello specifico le correlazioni genetiche riportate da Cassandro et al. (2008) e Cecchinato et al. (2011) per la razza Frisona e per la razza Bruna (Cecchinato et al., 2011) sono più alte rispetto a quelle ottenute da Ikonen et al. (1999 e 2004) e comprese tra 0,74 e 0,94. Nello studio condotto da Vallas et al. (2010) la correlazione genetica tra tempo di coagulazione e pH è comparabile (0,69) con le altre stime presenti in letteratura, mentre è nulla la correlazione che riguarda la consistenza del coagulo. Dalle stime ottenute risulta quindi favorevole per le proprietà tecnologiche del latte la selezione indiretta per una ridotta conta cellulare, un ridotto pH (un latte con valori superiori a 6,85 non coagula secondo quanto riportato nel 1985 da Okigbo et al.) e un'alta acidità titolabile senza ridurre la quantità e la qualità di latte. Inoltre pH e acidità titolabile possono essere misurate più facilmente rispetto ai parametri lattodinamografici (Cassandro et al., 2008).

Anche a livello fenotipico RCT e a_{30} sono moderatamente correlati con il pH. In Ikonen et al. (2004) è riportata una correlazione fenotipica tra RCT e pH più bassa (0,29) rispetto alle stime presenti negli studi di Lindström et al. (1984), Cassandro et al. (2008) e Vallas et al. (2010)

comprese tra 0,52 e 0,61. La più elevata correlazione fenotipica stimata tra a_{30} e pH si attesta sullo 0,46 (Cassandro et al., 2008), mentre le stime di Ikonen et al. (2004) e Vallas et al. (2010) sono rispettivamente -0,18 e -0,15. Le correlazioni fenotipiche dei parametri lattodinamografici con la quantità e le caratteristiche qualitative del latte invece sono trascurabili (Ikonen et al., 2004; Cassandro et al., 2008), eccetto la correlazione tra a_{30} e percentuale di proteine stimata da Cassandro et al. (2008) e Vallas et al. (2010) (rispettivamente 0,23 e 0,45) legata soprattutto al ruolo chiave delle caseine nel processo di coagulazione.

1.3 Latte che non coagula (*non coagulating milk*)

Il latte le cui micelle caseiniche non si aggregano a formare alcun coagulo entro i 30-31 minuti dall'aggiunta dell'enzima coagulante è definito latte che non coagula. Il suo tracciato lattodinamografico risulta piatto poiché, a causa della non aggregazione delle micelle caseiniche, non si apre a formare le due ramificazioni la cui ampiezza determina il valore della consistenza del coagulo che in questo caso è pari a zero ($a_{30}=0$). La presenza del latte che non coagula è una peculiarità della misurazione delle proprietà coagulative del latte perché il processo di coagulazione viene osservato e descritto in un intervallo di tempo ridotto ai 30-31 minuti di analisi attraverso lattodinamografo (Cecchinato et al., 2011). A livello di industria casearia la coagulazione del latte è cruciale sia per la quantità che per la qualità della produzione, di conseguenza è necessario determinare la presenza e sottolineare le cause del latte che non coagula (Frederiksen et al., 2011).

Tra le diverse razze da latte varia molto l'incidenza del latte che non coagula. In particolare secondo quanto riportato da Ikonen et al. (1999 e 2004) e Tyrisevä et al. (2004) la percentuale di vacche di razza Ayrshire che produce latte che non coagula è compresa tra l'8 e il 13%, per la razza Frisona Italiana è del 9,7% (Cassandro et al., 2008), mentre in Tyrisevä et al. (2004) è dell'1,3% per la Frisona Finlandese e per la razza Bruna è del 4% (Cecchinato et al., 2011). La non coagulazione del latte è associata sia a fattori genetici (razza, genealogia, polimorfismi genetici delle proteine del latte) che a fattori ambientali come l'ordine di parto, lo stadio di lattazione e l'allevamento legati a cambiamenti nella composizione del latte (Tyrisevä et al., 2004). Nello studio condotto da Ikonen et al. (2004) l'ereditabilità stimata per la consistenza del coagulo di tutti i campioni (0,39) è risultata maggiore rispetto a quella stimata per la consistenza del coagulo dei soli campioni che coagulano (0,22) suggerendo che il latte che non coagula è in parte causato da fattori genetico additivi. Questa supposizione è supportata dall'ampia

variazione in percentuale di vacche che producono latte che non coagula (da 0 a 47%) tra le figlie di 91 tori. Per alcuni tori quindi circa la metà delle figlie produce latte con caratteristiche non adatte alla produzione casearia (Ikonen et al., 2004). Nello studio precedente (Ikonen et al., 1999) il trend genetico sfavorevole nella consistenza del coagulo durante il 1992 e il 1993 è attribuito al frequente impiego di due riproduttori con un'elevata percentuale di figlie che produce latte che non coagula nell'intera popolazione di vacche di razza Ayrshire. Questo avrebbe avuto un effetto negativo sul livello genetico delle proprietà coagulative. Inoltre la stima del valore genetico (*EBV*) per bovine che producono latte che non coagula è in media più alta per le cellule somatiche rispetto a bovine con un più alto *EBV* per la consistenza del coagulo (Ikonen et al., 2004), dimostrando che i loci che provocano la non coagulazione del latte e l'aumento della conta cellulare sono strettamente associati. Selezionando quindi per un basso valore di cellule somatiche si riduce anche il latte che non coagula. La presenza di alte cellule somatiche o di mastite ha effetti negativi sulle proprietà coagulative essendo associata a latte che non coagula o a latte che coagula più lentamente. Alcune vacche tuttavia, senza evidenti segnali di mastite, producono latte con scarse proprietà tecnologiche o che non forma il coagulo (Tervala et al., 1985). In un recente studio di Frederiksen et al. (2011) non è stata trovata alcuna differenza a livello di proprietà coagulative tra il campione di latte di un singolo quarto e l'intero campione individuale provando che la lenta e la non coagulazione del campione composito non sono causate dalla qualità del latte di un singolo quarto. L'elevata conta cellulare spesso influenza un solo quarto, ma dato che questo non determina il peggioramento qualitativo a livello di latte individuale, il latte che non coagula sembra essere associato a mastiti subcliniche, difficili da individuare e da trattare in tempo utile. Infatti le vacche affette da questo tipo di infiammazione batterica della ghiandola mammaria, senza sintomi evidenti, mostrano una diminuzione nelle percentuali di grasso, proteine e lattosio con ripercussioni negative a livello dei parametri lattodinamografici. In Lindström et al. (1984) la relazione tra presenza di mastiti e basso contenuto di lattosio è dimostrata dall'effetto più evidente della diminuzione del lattosio nel tempo di coagulazione da parte di tutti i campioni analizzati, inclusi quelli con alta conta cellulare. Nello specifico ad ogni aumento di un punto percentuale nel contenuto di lattosio il tempo di coagulazione si riduce di 3,7 minuti (Lindström et al., 1984), mentre con un contenuto di lattosio inferiore al 4% il latte non coagula (Leitner et al., 2011).

Anche i polimorfismi genetici delle caseine, in particolare della κ -caseina, giocano un ruolo importante nel determinare l'attitudine del latte alla coagulazione. L'allele B della κ -caseina ha

effetti favorevoli sulle proprietà di coagulazione del latte poiché è associato a un alto contenuto di κ -caseina correlato a un ridotto diametro delle micelle caseiniche stesse che riescono così ad aggregarsi più velocemente. Il latte che non coagula al contrario è caratterizzato da grandi micelle caseiniche e da una bassa percentuale di κ -caseine sul totale delle caseine. È la variante allelica A della κ -caseina a essere associata a un basso contenuto di κ -caseina e a rappresentare uno dei fattori di rischio per la produzione di latte con scarsa o assente coagulazione (Frederiksen et al., 2011). Infatti, oltre alle quattro bovine con un latte che coagula più lentamente anche due delle quattro bovine con buone proprietà coagulative, presentano il genotipo AA al locus della κ -caseina (Frederiksen et al., 2011).

Uno dei fattori esogeni che influisce sulle proprietà coagulative del latte è l'ordine di parto. I risultati emersi da alcuni studi presenti in letteratura tuttavia sono contraddittori. Infatti l'ordine di parto non ha un effetto statisticamente significativo per Ikonen et al. (1999) e Tyrisevä et al. (2004), mentre in Ikonen et al. (2004) le primipare sono peggiori rispetto alle altre vacche. Questa differenza è attribuita alla più alta percentuale di vacche che producono latte che non coagula tra le primipare (17%) che tra le altre vacche (9%). Con l'aumento dell'ordine di parto aumentano quantità di latte, cellule somatiche e pH, mentre diminuiscono grasso e contenuto di caseina (Ikonen et al., 2004). Lo stadio di lattazione ha un effetto significativo sulle proprietà tecnologiche del latte (Ikonen et al., 2004; Tyrisevä et al., 2004). Queste ultime ottengono i loro migliori risultati durante il primo mese di lattazione e successivamente negli ultimi due mesi senza però raggiungere i livelli osservati a inizio lattazione. Ne deriva che la maggior parte dei campioni che non coagula sia presente durante metà lattazione (Ikonen et al., 2004). Nello studio condotto da Tyrisevä et al. (2004), sempre nella razza Ayrshire, invece la percentuale di latte che non coagula non è associata allo stadio di lattazione. Nella razza Holstein tutti i campioni di latte che non coagulano appartengono a vacche a fine lattazione (Tyrisevä et al., 2004). L'andamento del pH, eccetto per l'ultima parte della lattazione, è simile a quello del tempo di coagulazione e del latte che non coagula, confermando i risultati ottenuti dalle correlazioni stimate. Per quanto riguarda la quantità e la composizione del latte, le proprietà tecnologiche risultano ottimali quando il latte è più concentrato (inizio e fine lattazione) e quindi più ricco di grasso, proteine e caseine (Ikonen et al., 2004). L'effetto allevamento, approfonditamente studiato da Tyrisevä et al. (2004), influenza le proprietà coagulative del latte attraverso la razza allevata, il management e la nutrizione, ma spiega solo l'8% della variazione delle MCP in confronto al 43% a livello di caratteristiche produttive del latte. In particolare è

stata considerata la frequenza nella somministrazione di concentrato (in questo caso avena): vacche a cui viene somministrato concentrato solo due volte al giorno producono in un anno 1000 kg di latte, 30 kg di proteine e 25 kg di grasso in meno rispetto a vacche la cui razione è integrata con concentrato quattro volte al giorno (Tyrisevä et al., 2004). L'aumento del livello energetico della dieta tuttavia non è associato alla diminuzione della percentuale di latte che non coagula, ma all'effetto positivo sul latte con scarsa attitudine alla coagulazione: negli allevamenti con la più alta produzione in kg di proteina la proporzione di *PC milks* è il 18% più bassa rispetto agli allevamenti con la più bassa produzione totale di proteina (Tyrisevä et al., 2004). Oltre allo studio di fattori genetici e ambientali, per capire cosa influenza la presenza e la produzione di latte che non coagula, Frederiksen et al. (2011) hanno affrontato la valutazione dell'effetto dell'unione di *PC o NC milk* a latte con buone caratteristiche tecnologiche. L'aggiunta di quantità sempre maggiori di latte che non coagula danneggia sia il tempo di coagulazione che la consistenza del coagulo del latte con buona attitudine alla coagulazione: effetti significativi si osservano in entrambi le caratteristiche già con il 25% di *NC milks*. Al contrario si assiste a un miglioramento delle proprietà coagulative del latte aumentando la presenza di latte con buone caratteristiche, in relazione al latte che non coagula. Inoltre è stato osservato l'effetto, più interessante per la produzione casearia a livello industriale, dell'unione di un certo numero di campioni di latte che coagulano più lentamente (*PC e NC milk* nella stessa proporzione) a un numero equivalente di campioni con buone proprietà di coagulazione. Un aumento della presenza di *PC milk* dal 75 al 95% sembra non causare effetti negativi indicando che almeno il 25% di latte che coagula deve essere presente per contrastare le scarse caratteristiche coagulative (Frederiksen et al., 2011).

1.4 Metodi di misurazione dell'attitudine alla coagulazione del latte

Per la misurazione dei parametri lattodinamografici che descrivono l'attitudine casearia del latte vengono utilizzati diversi strumenti: meccanici (Formagraph, Reometro, *Computerized Renneting Meter*), ottici (*Optigraph, Near and Mid Infrared Spectroscopy*), a ultrasuoni e a incandescenza. Questi ultimi due sono marginali rispetto agli altri che possono essere così classificati in base all'utilizzo: Formagraph, *Computerized Renneting Meter*, *Optigraph* e Reometro.

Questi strumenti quindi misurano le stesse caratteristiche, ma sfruttano diversi principi di rilevamento. Gli strumenti meccanici o lattodinamografici, tradizionalmente utilizzati per

stimare le proprietà coagulative del latte, si basano sulla misurazione diretta della viscosità del latte per i 30 minuti successivi all'aggiunta dell'enzima coagulante. I cambiamenti fisico chimici del latte, esposto a oscillazioni lineari durante la coagulazione, generano piccole forze che determinano il movimento di un pendolo continuamente registrato dallo strumento. Il segnale rilevato è poi amplificato e determina la formazione di tracciati caratteristici a forma di campana chiamati lattodinamogrammi. Dai tracciati si ricavano informazioni importanti riconducibili a tre parametri: il tempo di coagulazione (RCT in min), il tempo di rassodamento (k_{20} in min) e la consistenza del coagulo (a_{30} in mm). Il tempo di coagulazione è il tempo che intercorre tra l'aggiunta dell'enzima e l'apertura del tracciato, ossia il punto in cui lo strumento registra un cambiamento nella viscosità del latte, corrispondente all'inizio dell'aggregazione delle micelle caseiniche successivo all'idrolisi delle stesse ad opera dell'enzima. Il tempo di rassodamento rappresenta il tempo necessario al coagulo per raggiungere una resistenza meccanica tale da determinare un'ampiezza del tracciato di 20 mm, mentre la consistenza del coagulo corrisponde all'ampiezza del tracciato raggiunta dopo 30 minuti dall'aggiunta dell'enzima. A seconda dei risultati di analisi, il latte viene classificato in base al confronto con sei lattodinamogrammi (da A a F) dove A rappresenta il latte ottimale per la caseificazione con un tempo di coagulazione compreso tra i 12 e i 18 minuti, mentre E e F indicano le tipologie meno desiderabili perché in 30 minuti coagulano in modo insufficiente. Il lattodinamografo è stato programmato per valutare simultaneamente l'attitudine alla coagulazione di dieci campioni di latte.

Di recente sono stati introdotti strumenti di tipo ottico che si basano su tecnologie all'infrarosso. Nello specifico sono due i diversi strumenti ottici utilizzati: lo spettrometro nel medio infrarosso e l'Optigraph. La spettroscopia nel medio infrarosso (MIRS) è stata proposta come un metodo poco costoso per determinare le MCP in modo diretto e su larga scala (De Marchi et al., 2009). Infatti fornisce informazioni in tempo reale analizzando i campioni senza la necessità di indurre la coagulazione. I dati offerti dal suo spettro tuttavia devono essere decodificati attraverso un'equazione di calibrazione determinata in base agli stessi. L'Optigraph è basato su un segnale ottico nel vicino infrarosso e come un lattodinamografo ha un tempo di analisi di minimo 30 minuti e necessita dell'induzione della coagulazione. In particolare utilizza dei rilevatori che registrano l'assorbanza a una singola lunghezza d'onda (280 nm). Durante l'analisi la quantità di luce emessa attraverso il latte diventa gradualmente meno forte a causa dei cambiamenti nella struttura micellare della caseina. L'Optigraph calcola i parametri lattodinamografici in seguito all'acquisizione di particolari punti d'interesse estratti dall'informazione ottica acquisita in

tempo reale. Il tempo di coagulazione in Kürbasepp et al. (2005) viene fatto coincidere con la massima derivazione d'intensità del segnale e, per renderlo comparabile alla stessa misurazione ottenuta con l'utilizzo del Formagraph, è stata sviluppata un'equazione di regressione con coefficiente di regressione pari a 1,784 e un'intercetta di -2,303. Invece per la consistenza del coagulo l'Optigraph fornisce un segnale ottico in volts che dev'essere convertito in mm per confrontarlo con il risultato del Formagraph, attraverso un'equazione che ne facilita la conversione durante l'analisi (Kübasepp et al., 2005). L'output della consistenza del coagulo più che una misura è una predizione sulla base del segnale ottico modificato dai cambiamenti fisico-chimici della materia durante la prima fase della coagulazione.

2. OBIETTIVI

In letteratura sono presenti diversi studi condotti con l'obiettivo di stimare i parametri genetici relativi alle proprietà coagulative del latte misurate attraverso strumenti meccanici (Lindstrom et al., 1984; Ikonen et al., 1999 e 2004; Cassandro et al., 2008; Cecchinato et al., 2011) o, come di recente, ottici (Pärna et al., 2006; Vallas et al., 2010). Invece sono solo due gli studi che mettono a confronto le stime fenotipiche e genetiche delle MCP derivate da entrambi gli strumenti (Kürbasepp et al., 2005; Pretto et al., 2011). Questi ultimi presentano tuttavia due importanti punti critici: il ridotto numero di campioni e le diverse condizioni analitiche cui questi sono sottoposti.

L'obiettivo di questa prova è di condurre analisi genetiche del tempo di coagulazione, tempo di rassodamento e consistenza del coagulo attraverso l'impiego di strumenti meccanici e ottici in bovine di razza Bruna utilizzando un ampio dataset e identiche condizioni sperimentali. Operando nelle stesse condizioni di analisi la differenza fra i due strumenti dovrebbe essere dovuta alla predizione anticipata del tempo di coagulazione da parte dello strumento ottico, almeno quando sono analizzati i campioni di latte che coagulano oltre i 30 minuti dall'aggiunta dell'enzima coagulante (Cipolat Gotet et al., 2012; dati non pubblicati). L'estensione del tempo di osservazione dai 30 minuti standard ai 45 minuti ha permesso la misurazione del tempo di coagulazione per tutti i campioni e del tempo di rassodamento per la maggior parte di essi (Cecchinato et al., 2012; dati non pubblicati) includendo così i campioni di latte che coagulano più lentamente o quelli definiti non coagulanti ($a_{30}=0$).

Il tempo di rassodamento è un parametro lattodinamografico importante a livello di industria casearia perché indica il tempo ottimale per la rottura della cagliata, ma viene raramente preso in considerazione in campo scientifico insieme a tempo di coagulazione e consistenza del coagulo a esso correlati (Ikonen et al., 2004). Questa esclusione è dovuta al fatto che soprattutto nella razza Frisona e in alcune razze Scandinave, caratterizzate da un lento processo di coagulazione, un considerevole numero di campioni non raggiunge un coagulo di 20 mm di consistenza entro i 30 minuti usuali di analisi (Cipolat Gotet et al., 2012; dati non pubblicati). Altra novità in questo studio è la stima dei parametri genetici della consistenza del coagulo a 45 minuti dall'aggiunta dell'enzima, parametro interessante dal punto di vista della ricerca scientifica per definire proprietà di coagulazione del latte più indipendenti.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Raccolta dati di campo

Per il presente studio sono stati analizzati i campioni individuali di latte di 913 vacche di razza Bruna allevate in 63 aziende zootecniche situate nella provincia autonoma di Trento. Le operazioni di campionamento sono state effettuate durante la mungitura della sera tra Aprile 2010 e Febbraio 2011. Con poche eccezioni, per ciascun allevamento sono stati raccolti due campioni individuali di 15 vacche. Dopo la raccolta i campioni sono stati immediatamente posti a una temperatura di 4 °C senza sostanze conservanti. Uno dei due campioni è stato trasportato al Laboratorio di qualità del latte dell'Associazione provinciale allevatori di Trento per analizzarne la composizione, l'altro invece al Laboratorio specializzato nell'analisi delle proprietà coagulative del latte del Dipartimento di Agronomia, Alimenti, Risorse naturali, Animali e Ambiente (DAFNAE) dell'Università di Padova (Legnaro, Padova). Tutti i campioni sono stati analizzati entro 20 ore dalla raccolta. Le informazioni riguardanti gli allevamenti e le vacche sono state fornite dalla Federazione allevatori della provincia autonoma di Trento. L'Associazione nazionale allevatori razza Bruna (ANARB) ha completato il quadro informativo con i pedigree e i record fenotipici per le proprietà coagulative del latte.

3.2 Analisi sulla qualità del latte

Ogni campione individuale è stato analizzato per le percentuali di grasso, proteine e caseine utilizzando lo strumento MilkoScan FT600 (Foss, Hillerød, Denmark). Il conteggio delle cellule somatiche (SCC) è stato ottenuto attraverso il Fossomatic FC counter (Foss, Hillerød, Denmark) e convertito in SCS tramite trasformazione logaritmica (Ali e Shook, 1980) poiché non è distribuito normalmente (Ikonen et al., 1999). Per i campioni destinati alla determinazione delle MCP prima di tale analisi è stata effettuata quella relativa al pH utilizzando un Crison Basic 25 electrode (Crison, Barcellona, Spagna).

3.3 Analisi lattodinamografiche

I parametri lattodinamografici sono stati determinati utilizzando due strumenti operativamente diversi: uno meccanico, il Formagraph (FRM; Foss Electric, Hillerød, Denmark) e l'altro ottico, l'Optigraph (OPT; Yserbarert, Frépillon, France). Entrambi erano presenti nello stesso laboratorio e adoperati dallo stesso tecnico. Ogni campione individuale è stato analizzato

contemporaneamente in ciascuno dei due strumenti, con le stesse condizioni sperimentali (temperatura del latte, concentrazione e tipo di presame). Ogni strumento ha processato dieci campioni per volta, un campione per ogni unità di misurazione del processo di coagulazione (MUCM - measuring unit of coagulation meter -; il pendolo per il Formagraph e i "monochromatons" per l'Optigraph). I campioni di latte (10 ml) sono stati portati a 35 °C e 200 µL di soluzione coagulante (Hansen Standard 160, con 80±5% di chimosina e 20±5% di pepsina; Pacovis Amrein AG, Berna, Svizzera) diluiti all'1,6% (p/V) in acqua distillata per ottenere 0,051 IMCU (*International milk clotting units*)/mL aggiunte ai campioni all'inizio dell'analisi. Gli strumenti quantificano l'ampiezza (in mm) del grafico durante il test; l'OPT registra un dato ogni 6 s, mentre il FRM ogni 15 s. Il periodo di osservazione è stato esteso a 90 minuti dall'aggiunta dell'enzima, ma per gli obiettivi del presente lavoro, sono stati presi in considerazione solo i primi 45 minuti. Per quanto riguarda l'Optigraph, le variazioni rilevate in assorbanza sono state trasformate utilizzando un'appropriata equazione di calibrazione per imitare l'aspetto del grafico offerto a fine analisi dai tradizionali strumenti meccanici (Kürbasepp et al., 2005). In questo modo le proprietà di coagulazione del latte possono essere misurate da entrambi gli strumenti. In particolare sono state registrate le seguenti proprietà tecnologiche: il tempo dall'aggiunta dell'enzima all'inizio dell'aggregazione delle micelle caseiniche (stato gel) in un periodo di tempo di 45 minuti (RCT, min), l'intervallo di tempo tra l'inizio della formazione del coagulo (RCT) e il raggiungimento di 20 mm di ampiezza del grafico (K_{20} , min), la consistenza del coagulo a 30 minuti dall'aggiunta dell'enzima (a_{30} , mm) e per la prima volta a 45 min (a_{45} , mm). Sebbene l'estensione del tempo di analisi abbia permesso la misurazione di RCT e K_{20} per tutti i campioni, quelli che non hanno coagulato entro i 30 minuti ($a_{30}=0$) sono stati classificati come non coagulanti (NC; Ikonen et al., 1999).

3.4 Analisi statistiche

3.4.1 Analisi di regressione

Per comprendere e definire la relazione tra le proprietà tecnologiche del latte, misurate attraverso Formagraph ed Optigraph, è stata utilizzata un'equazione di regressione lineare (SAS, Institute Inc. Cary, NC). L'*F-test* è stato impiegato per spiegare ogni pendenza della retta sul semiasse positivo delle x che devia dall'unità (coefficiente di regressione, $b \neq 1$) e ogni intercetta diversa da zero ($P < 0,05$). Sono state valutate le relazioni tra le diverse proprietà di coagulazione del latte ottenute utilizzando lo stesso strumento e le relazioni tra le stesse e quantità, qualità e

acidità del latte. Le variabili lattodinamografiche (RCT, K_{20} , a_{30} e a_{45}), determinate da Formagraph e Optigraph, sono influenzate da diversi fattori i cui effetti sono stati stimati da un ANOVA attraverso l'utilizzo del seguente modello lineare:

$$y_{ijklm} = \mu + \text{herd}_i + \text{dim}_j + \text{parity}_k + \text{MUCM}_l + e_{ijklm}$$

Dove y_{ijklm} è la caratteristica osservata (RCT, K_{20} , a_{30} o a_{45}) da FRM o OPT; μ è la media complessiva, herd_i è l'effetto fisso di allevamento (i =da 1 a 63), dim_j è l'effetto fisso della classe dei giorni di lattazione (DIM; j =da 1 a 6; classe 1: <60 d, classe 2: da 60 a 120 d, classe 3: da 121 a 180 d, classe 4: da 181 a 240 d, classe 5: da 241 a 300 d e classe 6: >300 d), parity_k è l'effetto fisso dell'ordine di parto (k =da 1 a 4 o più), MUCM_l è l'effetto fisso dell'unità di misurazione della coagulazione da parte dello strumento (l =da 1 a 10) e e_{ijklm} è l'errore casuale residuo.

3.4.2 Effetti non genetici

Nella stima dei parametri genetici (ereditabilità e correlazioni genetiche) delle proprietà coagulative del latte influiscono e quindi vengono incluse fonti di variazione ambientale, oltre agli effetti genetico additivi. Per tutte le caratteristiche il modello ha stimato come fonti di variazione non genetica: gli effetti di allevamento (63 livelli), dei giorni di lattazione (DIM; classe 1:<60 d, classe 2: da 60 a 120 d, classe 3: da 121 a 180 d, classe 4: da 181 a 240 d, classe 5: da 241 a 300 d e classe 6: >300 d), dell'ordine di parto (da 1 a 40 o più) e dei sensori di Formagraph e Optigraph per la continua misurazione durante il processo di coagulazione (10 livelli). Tutti sono importanti fonti di variazione ($P < 0,05$).

3.4.3 Ereditabilità e correlazioni genetiche

I modelli genetici univariati sono stati applicati per la stima della varianza genetica additiva, di ciascuna caratteristica, associata a Formagraph e Optigraph separatamente. In particolare il contesto genetico delle proprietà di coagulazione del latte è stato studiato analizzando i dati attraverso il seguente modello gerarchico:

$$y = Xb + Z_1h + Z_2a + e$$

Dove y è il vettore del record fenotipico con dimensione n ; X , Z_1 e Z_2 sono matrici adeguate per effetti fissi (b) ed effetti casuali (h e a) di allevamento/data di controllo (h) e poligenici genetico additivi (a). Nello specifico b include gli effetti non genetici di DIM, ordine di parto e sensori di misurazione (solo per a_{30} e a_{45}). e è l'errore casuale residuo.

Per la stima delle componenti di (co) varianza e di conseguenza per il calcolo delle correlazioni genetica additive tra i parametri lattodinamografici, valutati tramite Formagraph e Optigraph, sono state condotte una serie di analisi bivariate adeguando il modello genetico univariato. L'applicazione di modelli genetici univariati e bivariati permette di calcolare ereditabilità e correlazione genetica additiva:

$$h^2 = \frac{\sigma_A^2}{\sigma_A^2 + \sigma_H^2 + \sigma_E^2}$$

Dove σ_A^2 , σ_H^2 e σ_E^2 sono rispettivamente varianze genetica additiva, di allevamento/data di controllo e residua.

$$r_A = \frac{\sigma_{A1,A2}}{\sigma_{A1} \cdot \sigma_{A2}}$$

Dove $\sigma_{A1} \cdot \sigma_{A2}$ è la covarianza genetica additiva tra le caratteristiche 1 e 2, σ_{A1} e σ_{A2} sono le deviazioni genetiche additive tra le caratteristiche 1 e 2, rispettivamente.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

Le statistiche relative alle caratteristiche quanti-qualitative del latte oggetto di studio sono riportate in Tabella 4.1. La produzione media giornaliera di latte di 24,36 kg/d ($\pm 8,02$ kg), è in linea con la produzione media nazionale dello scorso anno (23 kg/d; ANARB, 2011), ma inferiore rispetto a quella riportata in precedenti studi che hanno coinvolto la razza Bruna (De Marchi et al., 2009; Cecchinato et al., 2009; Cecchinato et al., 2011). Infatti, in questi ultimi la quantità media giornaliera di latte si attesta sui 28,6 kg/d. La differenza riscontrata è dovuta al fatto che nel presente studio è stato analizzato il latte di vacche di razza Bruna allevate nella provincia di Trento caratterizzata da una zootecnia di montagna in cui l'alimentazione si basa sull'utilizzo prevalente di foraggio verde o fieno di prati e pascoli, mentre nelle ricerche precedenti sono stati considerati allevamenti intensivi delle provincie di Treviso, Venezia, Vicenza e Padova (De Marchi et al., 2009; Cecchinato et al., 2009; Cecchinato et al., 2011). Le percentuali di grasso, proteina e caseina sono sostanzialmente comparabili ai valori medi presenti negli studi precedenti, anche se è da sottolineare la percentuale di grasso (4,23) più elevata rispetto anche alla media nazionale di razza che è del 4% (ANARB, 2011). Le cellule somatiche espresse in SCS (*somatic cell score*), si attestano su un valore medio di 3,03 indicando il buono stato di salute delle mammelle. Queste ultime, insieme alla quantità di latte, mostrano la deviazione standard maggiore, mentre le percentuali di proteina e caseina quella minore.

I valori medi e le deviazioni standard (*SD*) delle proprietà coagulative del latte misurate con Formagraph e Optigraph sono riportati in Tabella 4.2 insieme ai risultati relativi al test di uguaglianza della varianza (Test di Levene). I valori medi ottenuti per il tempo di coagulazione attraverso l'utilizzo di entrambi gli strumenti sono simili (19,95 e 18,91 min, rispettivamente per Formagraph e Optigraph) e maggiori rispetto a quelli misurati con un *Computerized Renneting Meter* (Polo Trade, Monselice, Italia) (15 min) negli studi di De Marchi et al. (2009) e Cecchinato et al. (2009 e 2011) perché l'estensione del tempo di analisi a 90 minuti ha permesso di ottenere valori del tempo di coagulazione per tutti i campioni esaminati. La consistenza del coagulo media ottenuta attraverso l'utilizzo di un *Computerized Renneting Meter* è di 41,7 mm (De Marchi et al., 2009; Cecchinato et al., 2009 e 2011), mentre nel presente è molto più ridotta attestandosi sui 30,09 mm per il Formagraph e 27,23 mm per l'Optigraph. I due strumenti divergono tra loro nelle misurazioni del tempo di rassodamento e della consistenza del coagulo a 45 minuti dall'aggiunta dell'enzima: entrambi infatti risultano notevolmente maggiori quando

sono valutati con l'Optigraph (8,16 min e 41,49 mm, rispettivamente per il k_{20} e l' a_{45}) rispetto a quando sono misurati con il Formagraph (5,36 min e 33,66 mm). Le deviazioni standard delle proprietà tecnologiche del latte, escluso l' a_{45} , sono più alte quando le misurazioni vengono effettuate con l'FRM e questo è statisticamente confermato dal test di Levene. Nello specifico le differenze tra le deviazioni standard ottenute sono significative ($P < 0,001$) per tutti i parametri tranne il k_{20} che, nonostante possieda valori medi notevolmente diversi tra i due strumenti, mostra deviazioni standard simili: motivo per il quale l'ipotesi di uguaglianza della varianza è accettata.

4.1 Aspetti fenotipici delle proprietà coagulative del latte misurate attraverso Formagraph e Optigraph

Le distribuzioni dei parametri lattodinamografici relative a Formagraph e Optigraph sono messe a confronto in Figura 4.1. La distribuzione del tempo di coagulazione, misurato attraverso il Formagraph, si presenta più asimmetrica rispetto a quella relativa allo strumento ottico perché è più alta la frequenza di campioni che coagulano più tardi, in particolare dopo i 30 minuti di analisi. Infatti i campioni che coagulano oltre i 30 minuti (*NC samples*) sono il 6,57% quando viene utilizzato lo strumento meccanico e il 2,3% con l'Optigraph; entrambe queste percentuali sono simili a quella riportata da Cecchinato et al. (2011) (3,5%) utilizzando un *Computerized Renneting Meter* con una concentrazione enzimatica leggermente più elevata (0,061 IMCU/mL). Il tempo di rassodamento, come osservato in precedenza, presenta valori medi che differiscono di molto tra i due strumenti (5,36 min e 8,16 min per il Formagraph e l'Optigraph rispettivamente), ma deviazioni standard molto simili. Di conseguenza le due distribuzioni normali hanno la stessa forma (leptocurtica in relazione alla ridotta deviazione standard) con media diversa. La distribuzione della consistenza del coagulo a 30 minuti è bimodale a causa della presenza dei campioni di latte che non coagulano ($a_{30}=0$) e questo è più evidente con l'utilizzo del Formagraph in cui la percentuale è più alta. L'estensione del tempo di analisi ha portato all'introduzione e allo studio di un nuovo parametro lattodinamografico: la consistenza del coagulo a 45 minuti. Quest'ultimo ha valori medi e deviazioni standard relative a Formagraph e Optigraph che differiscono tra loro maggiormente rispetto alle altre proprietà coagulative (Tabella 4.2). Le distribuzioni normali dell' a_{45} mostrano chiaramente la diversità tra i due strumenti nella sua misurazione (Figura 4.1).

In Figura 4.2 sono riportate le regressioni lineari tra i valori di ciascuna proprietà coagulativa ottenuti con l'utilizzo di entrambi gli strumenti. Dei quattro parametri lattodinamografici osservati, quello che presenta la correlazione più elevata tra le misurazioni derivate da FRM e OPT è il tempo di coagulazione ($r=0,82$) seguito dalla consistenza del coagulo a 30 minuti ($r=0,69$), dal tempo di rassodamento ($r=0,49$) e infine dall' a_{45} ($r=0,41$). Il coefficiente di correlazione per il tempo di coagulazione è in linea con quello riportato da Pretto et al. (2011) ($r=0,879$) in cui però il tempo di coagulazione è relativo ai soli campioni che coagulano. Nello studio di Kübarsepp et al. (2005) il coefficiente di correlazione ottenuto è maggiore rispetto ai precedenti e si attesta sullo 0,973 quando i valori ottenuti con il Formagraph per l'RCT sono messi a confronto sia con i valori originali dell'RCT stimati dall'Optigraph che con quelli corretti attraverso la procedura di calibrazione assistita. L'equazione di regressione lineare stimata nel presente studio è: $RCT_{FRM}=1,09RCT_{OPT} - 0,67$. Il coefficiente di regressione è molto simile a quello stimato da Kübarsepp et al. (2005) successivamente alla calibrazione a carico dello strumento ottico (1,115) mentre è molto minore rispetto a quello riportato da Pretto et al. (2011) (2,141) in cui il valore medio dell'RCT ottenuto dall'OPT è più che dimezzato rispetto a quello dell'FRM perché per i campioni destinati allo strumento ottico è utilizzato un coagulante microbico con un'attività enzimatica di 0,120 IMCU/mL (+135% rispetto all'FRM). L'aumento della concentrazione del coagulante, oltre a migliorare il processo di coagulazione, è necessario secondo Pretto et al. (2011) per ottenere segnali ottici distinti. Infatti, utilizzando per l'OPT lo stesso coagulante e la stessa attività enzimatica dell'FRM, sono drasticamente peggiorati RCT e a_{30} (da 8 a 28,2min e da 29,7 a 5,1 mm rispettivamente) e dei sessanta campioni di latte analizzati metà sono risultati non coagulanti (Pretto et al., 2011). L'intercetta di -0,67 min non differisce significativamente da zero, diversamente da quelle calcolate da Kübarsepp et al. (2005) (-1,12 e -3,66 min rispettivamente per i dati originali e per quelli trasformati) e da Pretto et al. (2011) (+1,16min). Dal diagramma di dispersione (Figura 4.2) le due variabili (RCT_{OPT} e RCT_{FRM}) presentano una forte correlazione positiva fino ai 25 minuti di analisi, oltre le osservazioni tendono a disperdersi e ad allontanarsi dalla retta di regressione. Questo è dovuto alla differenza tra i due strumenti nel numero di campioni che coagulano più tardi. Per quanto riguarda il tempo di rassodamento, la correlazione è più bassa ($r=0,49$) e sia il coefficiente di regressione (0,51) che l'intercetta (-1,15) sono molto più bassi di quanto ci si possa aspettare. Questo spiega i valori medi più elevati per l'Optigraph rispetto al Formagraph. I punti che identificano le osservazioni nel diagramma di dispersione tendono a disperdersi in modo più

accentuato a partire dai 10 minuti, cioè in corrispondenza a elevati valori di k_{20} . Il coefficiente di correlazione per la consistenza del coagulo di 0,69 è intermedio fra quelli calcolati per RCT e k_{20} ed è molto simile alla correlazione stimata da Pretto et al. (2011) ($r=0,66$). La differenza, di circa 3 mm, tra il valore medio ottenuto con l'utilizzo di entrambi gli strumenti (30,09 e 27,23 mm, rispettivamente per FRM e OPT) è ridotta e questo non rispecchia l'elevato valore dell'intercetta (8,96) e il basso coefficiente di regressione (0,76). Nello studio di Kübarsepp et al. (2005) l'equazione di regressione che meglio interpola le osservazioni relative all' a_{30} misurato da FRM (mm) e OPT (V) ($r=0,9617$) è polinomiale: $E_{30} = -0,0357 A_{30}^2 + 2,8795 A_{30} - 5,2991$. Anche in questo studio il diagramma di dispersione sembra seguire una parabola più che una retta, soprattutto nei valori minimi e massimi. Il più basso coefficiente di correlazione è associato al nuovo parametro, l' a_{45} ($r=0,41$) e questo è evidente dalla dispersione delle osservazioni nel grafico corrispondente. I parametri dell'equazione di regressione differiscono di molto dai valori teorici (22,01 e 0,29 rispettivamente per l'intercetta e il coefficiente di regressione).

Le correlazioni stimate tra i parametri lattodinamografici ottenuti utilizzando FRM e OPT e le caratteristiche quanti-qualitative del latte sono riportate in Tabella 4.3. Le correlazioni del tempo di coagulazione misurato attraverso il Formagraph con quantità e qualità del latte sono simili a quelle del tempo di coagulazione ottenuto con l'utilizzo dello strumento ottico. La quantità di latte è moderatamente correlata con l'RCT e con il k_{20} ottenuto con l'utilizzo dell'Optigraph (-0,14 e 0,15 rispettivamente). Le correlazioni della consistenza del coagulo a 30 minuti non sono significative, mentre l' a_{45} misurato con l'OPT mostra una correlazione negativa di -0,19 con la quantità di latte. La percentuale di grasso è associata in modo favorevole a tutte le proprietà coagulative tranne l'RCT. La correlazione è moderata per l' a_{45} (0,17 e 0,33) misurato rispettivamente con Formagraph e Optigraph, per l' a_{30} (0,20) e il k_{20} (-0,31) ottenuto con l'Optigraph. Le percentuali di proteina e caseina non sono favorevolmente correlate con il tempo di coagulazione ottenuto attraverso l'utilizzo di entrambi gli strumenti e in particolare presentano correlazioni positive comprese tra 0,25 e 0,34. Il tempo di rassodamento è negativamente correlato con le percentuali di proteina e caseina e le stime più elevate sono di -0,47 e -0,49 quando i valori del k_{20} sono ottenuti dallo strumento ottico. Anche l' a_{45} , a differenza dell' a_{30} , è favorevolmente correlato alle percentuali di proteina e caseina e presenta forti correlazioni con valori compresi tra 0,40 e 0,51. Tutti i parametri lattodinamografici, escluso l' a_{45} , sono moderatamente e favorevolmente correlati a una buona percentuale di lattosio con stime comprese tra 0,09 e 0,23. Il contenuto di cellule somatiche presenta correlazioni

significative solamente con il tempo di coagulazione con il quale è positivamente correlato (0,14 e 0,18 quando i valori di RCT sono ottenuti rispettivamente con FRM e OPT). Nel caso dell' a_{30} le correlazioni con le cellule somatiche sono simili, ma di segno opposto fornendo così un risultato in sé contraddittorio. Con la sola eccezione della consistenza del coagulo a 45 minuti, le correlazioni relative al pH sono elevate per tutti i parametri confermando che un basso pH facilita la formazione del coagulo.

L'incidenza dei vari effetti inclusi nel modello lineare per spiegare la variazione dei parametri lattodinamografici è riportata in Tabella 4.4. La più importante fonte di variazione per le proprietà coagulative del latte è costituita dalla variabile dei giorni di lattazione. In particolare l'effetto dei giorni di lattazione è più evidente per il tempo di coagulazione, mentre nel caso del tempo di rassodamento e della consistenza del coagulo a 45 minuti è maggiore quando vengono analizzati i valori ottenuti con l'OPT invece che con l'FRM. Per la consistenza del coagulo a 30 minuti l'effetto ha dimensioni più ridotte ed è più elevato quando vengono analizzate le misurazioni eseguite con lo strumento meccanico. L'effetto allevamento è la seconda variabile, in ordine d'importanza, che influenza significativamente le proprietà coagulative comprendendo in sé management, nutrizione, data di prelievo dei campioni (stagione); tutti aspetti specifici e unici per ciascuna azienda. La dimensione dell'effetto è simile per ogni parametro lattodinamografico misurato sia con FRM che con OPT. L'ordine di parto mostra valori significativi solamente quando vengono analizzati RCT e a_{45} ottenuti attraverso l'utilizzo del FRM. L'MUCM (*measuring unit of coagulation meter*) è la variabile associata ai dispositivi di misurazione di FRM e OPT e influisce significativamente su tutte le MCP, escluso l'RCT. In particolar modo incide sulla variabilità dei valori di k_{20} e a_{30} ottenuti con il FRM e su quelli dell' a_{45} (FRM e OPT). L'effetto legato allo strumento di misurazione non dovrebbe incidere molto sulla variabilità delle MCP, perché questo significa che c'è differenza se il campione viene posizionato in un pozzetto invece che in un altro. I coefficienti di determinazione sono moderati e compresi tra 0,14 e 0,30.

4.2 Aspetti genetici delle proprietà coagulative del latte misurate attraverso Formagraph e Optigraph

Il valore medio e l'intervallo di credibilità (HPD95%) delle varianze (genetico additiva, legata all'effetto allevamento e residua) e delle ereditabilità relative alle MCP valutate con FRM e OPT

sono riportati in Tabella 4.5. La Figura 4.3 propone le distribuzioni normali delle ereditabilità delle MCP ottenute con FRM e OPT. Il tempo di coagulazione è moderatamente ereditabile e le sue stime, relative a FRM e OPT, sono molto simili tra loro attestandosi rispettivamente sullo 0,230 e sullo 0,241 con un HPD95% compreso tra 0,10 e 0,40 per entrambi gli strumenti. Queste ultime stime sono paragonabili all'ereditabilità riportata da Cecchinato et al. (2011) (0,210) in cui l'RCT è rilevato per un tempo di analisi di 30 minuti. Graficamente le distribuzioni dell'ereditabilità dell'RCT misurato con FRM e OPT sono molto simili tra loro e quasi sovrapponibili (Figura 4.3). Anche se le ereditabilità stimate sono simili tra loro, le varianze sono del 41,4; 51,1 e 43,5% (rispettivamente per quella genetico additiva, di allevamento e residua) più basse quando l'RCT è determinato con l'OPT piuttosto che con l'FRM. In particolare la varianza genetico additiva dell'RCT misurato dall'FRM per 45 minuti è di $7,09 \text{ min}^2$ ed è più elevata di quella determinata in 30 minuti di analisi da Cecchinato et al. (2009) con l'impiego di un modello lineare ($4,40\text{-}5,48 \text{ min}^2$) e anche di quella presente nello studio di Cecchinato et al. (2011) utilizzando il *right-censored linear model* ($5,38 \text{ min}^2$). Una possibile spiegazione potrebbe essere l'estensione del tempo di analisi che produce una distribuzione normale dell'RCT, misurato con il FRM, più allungata verso destra. Di conseguenza l'assunzione di normalità da parte del *right-censored linear model* può portare a sottostimare il contributo dei campioni che coagulano più lentamente sia nella varianza genetico additiva sia in quella residua. Il tempo di rassodamento determinato dall'OPT presenta una stima di ereditabilità (0,368) del 73,6% più elevata rispetto a quella relativa al k_{20} misurato con il FRM. L'alta ereditabilità stimata è legata a una maggiore varianza genetico additiva e a una minore varianza residua dell'OPT in confronto all'FRM (rispettivamente +48,8% e -33,4%). L'ereditabilità stimata nel presente studio è intermedia tra le uniche due stime riportate in letteratura da Tervalta et al. (1985) e Ikonen et al. (1997). Il grado d'incertezza della stima (HPD 95%) è più ampio (0,15-0,61) per l'ereditabilità del k_{20} ottenuto con l'utilizzo dell'OPT e questo è rilevabile dalla distribuzione in Figura 4.3, in cui l'ereditabilità associata alle misurazioni derivate dall'OPT è più distesa sull'asse delle ascisse rispetto all'ereditabilità stimata in base ai valori dell'FRM. L'ereditabilità stimata per la consistenza del coagulo a 30 minuti è leggermente più bassa rispetto a quella stimata per l'RCT ed è comparabile tra i due strumenti (0,171 e 0,205 rispettivamente per FRM e OPT) come l'HPD95% compreso tra 0,04 e 0,40. La stima riportata da Cecchinato et al. (2011) per l'ereditabilità dell' a_{30} , misurato con il CRM, è molto simile (0,168) a quella del presente studio relativa all'FRM. Anche l'ereditabilità dell' a_{30} , come quella dell'RCT, presenta distribuzioni

normali simili e quasi sovrapponibili per i due strumenti di analisi utilizzati. Come per gli altri parametri prevale sulle altre, in questo caso in maniera evidente, la varianza residua del 14,3% più elevata per il Formagraph rispetto all'Optigraph. Anche la stima della varianza genetica additiva è simile tra i due strumenti, ma del 13,2% più elevata per l'OPT invece che per l'FRM. Mentre la varianza dovuta all'effetto allevamento è molto più elevata (+64,1%) per l'OPT piuttosto che per l'FRM. I risultati riguardanti la consistenza del coagulo a 45 minuti sono estremamente variabili e contraddittori tra FRM e OPT. La stima della varianza genetica additiva dell' a_{45} determinato dall'OPT è circa cinque volte la varianza genetica additiva dell' a_{45} ottenuto con l'FRM. Questo spiega l'ampia differenza tra le due ereditabilità (0,120 e 0,309 rispettivamente per FRM e OPT), anche in termini di intervalli di credibilità (0,02-0,27 nel caso dell'FRM e 0,13-0,51 per l'OPT) come è evidente dalle distribuzioni in Figura 4.3. Anche in questo caso, il grado d'incertezza maggiore è associato all'ereditabilità del parametro ottenuto attraverso l'OPT.

Le correlazioni genetica additiva (r_g) e fenotipica (r_p) tra la stessa proprietà coagulativa derivata da FRM e OPT sono riportate in Tabella 4.6 con i relativi intervalli di credibilità (HPD95%). Le correlazioni fenotipiche stimate variano dalla moderata correlazione dell' a_{45} (0,426) a quella elevata dell'RCT (0,806). Le stime delle correlazioni genetiche sono sempre elevate e comprese tra 0,764 (k_{20}) e 0,974 (RCT). La correlazione genetica tra i valori di a_{30} misurati da FRM e OPT è di 0,917, leggermente più bassa rispetto al corrispondente valore stimato per l'RCT (0,974). Anche le correlazioni genetica additive stimate per k_{20} e a_{45} sono elevate (0,764 e 0,847 rispettivamente), ma a esse è associata un'ampia incertezza di stima (0,315-0,992 e 0,453-0,991). Per quanto riguarda le stime delle correlazioni fenotipiche la più elevata è ancora la correlazione tra i valori di RCT (0,806) seguita da quella dell' a_{30} (0,731). Invece, sempre a livello fenotipico, k_{20} e a_{45} mostrano correlazioni moderate (0,518 e 0,426 rispettivamente). Tutte le correlazioni fenotipiche sono caratterizzate da intervalli di credibilità contenuti.

In Figura 4.4 sono riportati i grafici riguardanti le relazioni tra le classifiche dei riproduttori basate sugli EBV per ogni MCP ottenuta attraverso l'utilizzo di FRM e OPT. La classifica dei riproduttori in base all'RCT è solo marginalmente influenzata dallo strumento utilizzato per determinare il parametro, infatti il coefficiente di correlazione è pari a 0,99. Nonostante k_{20} , a_{30} e a_{45} possiedano coefficienti di correlazione abbastanza elevati (0,87, 0,95 e 0,94 rispettivamente), presentano una ri-classifica (*re-ranking*) più evidente, soprattutto nel caso del

k_{20} . *Re-ranking* significa che un riproduttore con una buona posizione di classifica per un dato parametro, misurato con uno dei due strumenti, non ha una posizione altrettanto buona quando la MCP è determinata dall'altro strumento.

5. CONCLUSIONI

Dai risultati ottenuti emerge che gli aspetti fenotipici e genetici delle proprietà coagulative del latte, derivate dall'utilizzo dello strumento ottico, differiscono da quelli delle MCP ottenute dal Formagraph, con la parziale eccezione del tempo di coagulazione. Infatti le misurazioni dell'RCT derivate dall'OPT sono le uniche ad essere in accordo con quelle ottenute dal FRM, tranne per i valori relativi ai campioni di latte che coagulano più tardi che, in questo studio, comprendono anche gli *NC samples* ($a_{30}=0$) solitamente esclusi dalle analisi statistiche. Dal punto di vista genetico l'utilizzo di tutti i valori di RCT ha aumentato le varianze genetica additiva e residua rispetto ai valori presenti in letteratura, ma le stime di ereditabilità, molto simili tra i due strumenti, sono rimaste quasi invariate. Inoltre, l'estensione del tempo di analisi a 45 minuti ha permesso la misurazione del k_{20} per quasi tutti i campioni oggetto di studio e, per la prima volta, dell' a_{45} ; per entrambi sono stati stimati i relativi parametri genetici. Proprio quando vengono analizzati k_{20} e a_{45} si riscontrano le maggiori differenze tra i valori ottenuti dai due strumenti e tra le stime di varianza, ereditabilità e correlazioni che ne derivano. L'ereditabilità del k_{20} misurato attraverso l'FRM è simile a quella dell'RCT, mentre l'ereditabilità dell' a_{45} è moderata per l'OPT e molto bassa per l'FRM. Per quanto riguarda le correlazioni fenotipiche e genetiche, i due parametri sono associati alle stime più basse. L' a_{30} presenta valori e stime intermedi tra RCT e k_{20} sia sul piano fenotipico che genetico; da sottolineare è la distribuzione bimodale delle sue misurazioni, più accentuata per l'FRM, dovuta alla presenza dei campioni di latte con $a_{30}=0$. Le stime delle correlazioni fenotipiche delle MCP, ottenute da FRM e OPT, con le caratteristiche quanti-qualitative del latte variano tra le MCP stesse e all'interno di ognuna (in maniera più contenuta per l'RCT). Anche l'incidenza dei giorni di lattazione, dell'ordine di parto e dell'MUCM non è della stessa entità per tutte le MCP, eccetto per l'effetto allevamento.

In conclusione, è necessario considerare i diversi principi di funzionamento e di conseguenza i diversi risultati di FRM e OPT per l'impostazione e l'attuazione di programmi di miglioramento genetico delle MCP. Inoltre nella selezione genetica delle bovine il cui latte è destinato alla caseificazione potrebbe giocare un ruolo determinante, per i diversi vantaggi ad esso associati (ridotti costi di analisi, predizioni in tempo reale e facilitazione nella raccolta di dati fenotipici), la spettroscopia nel medio infrarosso (MIRS). Infatti, seguendo il percorso tracciato da alcuni studi precedenti (De Marchi et al., 2009 e Cecchinato et al., 2009), lo sviluppo di affidabili

modelli di predizione delle MCP dagli spettri, sulla base delle misurazioni ottenute da FRM o OPT, produrrebbe una svolta nella selezione diretta delle MCP su larga scala.

6. BIBLIOGRAFIA

- Aleandri R., Schneider J. C. and Buttazzoni L. G. 1989. Evaluation of milk for cheese production based on milk characteristics and Formagraph measures. *J. Dairy Sci.* 72:1967-1975.
- Ali A. K. A. and Shook G. E. 1980. An optimum transformation for somatic cell concentration in milk. *J. Dairy Sci.* 63:487-490.
- Bittante G., Marusi M., Cesarini F., Povinelli M. and Cassandro M. 2002. Genetic analysis on milk rennet-coagulation ability in Italian Holstein cows. . 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, August 19-23, 2002, Montpellier, France.
- Bonfatti V., Cecchinato A., Gallo L., Blasco A. and Carnier P. 2011. Genetic analysis of detailed milk protein composition and coagulation properties in Simmental cattle. *J. Dairy Sci.* 94:5183-5193.
- Cassandro M., Comin A., Ojala M., Dal Zotto R., De Marchi M., Gallo L., Carnier P. and Bittante G. 2008. Genetic parameters of milk coagulation properties and their relationships with milk yield and quality traits in Italian Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 91:371-376.
- Cecchinato A., De Marchi M., Gallo L., Bittante G. and Carnier P. 2009. Mid-infrared spectroscopy predictions as indicator traits in breeding programs for enhanced coagulation properties of milk. *J. Dairy Sci.* 92:5304-5313.
- Cecchinato A. and Carnier P. 2011. *Short communication*: statistical models for the analysis of coagulation traits using coagulating and noncoagulating milk information. *J. Dairy Sci.* 94:4214-4219.
- Cecchinato A., Penasa M., De Marchi M., Gallo L., Bittante G. and Carnier P. 2011. Genetic parameters of coagulation properties, milk yield, quality, and acidity estimated using coagulating and noncoagulating milk information in Brown Swiss and Holstein-Friesian cows. *J. Dairy Sci.* 94:4205-4213.
- Dal Zotto R., De Marchi M., Cecchinato A., Penasa M., Cassandro M., Carnier P., Gallo L. e Bittante G. 2008. Reproducibility and repeatability of measures of milk coagulation properties and predictive ability of mid-infrared reflectance spectroscopy. *J. Dairy Sci.* 91:4103-4112.

- De Marchi M., Fagan C. C., O'Donnell C. P., Cecchinato A., Dal Zotto R., Cassandro M., Penasa M. and Bittante G. 2009. Prediction of coagulation properties, titratable acidity, and pH of bovine milk using mid-infrared spectroscopy. *J. Dairy Sci.* 92:423-432.
- Frederiksen P. D., Andersen K. K., Hammershøj M., Poulsen H. D., Sørensen J., Bakman M., Qvist K. V. and Larsen L. B. 2011. Composition and effect of blending noncoagulating, poorly coagulating, and well-coagulating bovine milk from individual Danish Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 94:4787-4799.
- Harzia H., Kilk K., Jöudu I., Henno M., Kärt O. and Soomets U. 2012. Comparison of the metabolic profiles of noncoagulating bovine milk. *J. Dairy Sci.* 95:533-540.
- <http://www.anarb.it/> (Associazione nazionale allevatori di razza Bruna). Statistiche dell'anno 2011-Produzioni.
- <http://www.clal.it/> Il mercato del latte.
- <http://www.ismea.it/>
- Ikonen T., Ojala M. and Syväoja E.-L. 1997. Effects of composite casein and β -lactoglobulin genotypes on renneting properties and composition of bovine milk by assuming an animal model. *Agric. Food Sci. Finland* 6:283-294.
- Ikonen T., Ahlfors K., Kempe R., Ojala M. and Ruottinen O. 1999. Genetic parameters for the milk coagulation properties and prevalence of noncoagulating milk in Finnish dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:205-214.
- Ikonen T., Morri S., Tyrisevä A.-M., Ruottinen O. and Ojala M. 2004. Genetic and phenotypic correlations between milk coagulation properties, milk production traits, somatic cell count, casein content, and pH of milk. *J. Dairy Sci.* 87:458-467.
- Kübarsepp I., Henno M., Kärt O., and Tupasela T. 2005. *Acta Agric. Scand. Section A.* 55:145-148.
- Lindström U.B., Antila V. and Syväjärvi J. 1984. A note on some genetic and non-genetic factors affecting clotting time of Ayrshire milk. *Acta Agric. Scand.* 34:349-355.
- Leitner G., Lavi Y., Merin U., Lemberskiy-Kuzin L. and Katz G. 2011. Online evaluation of milk quality according to coagulation properties for its optimal distribution for industrial applications. *J. Dairy Sci.* 94:2923-2932.
- Lucey J. A. 2002. Rennet coagulation of milk. In H. Roginski, J. W. Fuquay, PF Fox (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Pp. 286-293. *Academic Press*, Vol 1.

- Okigbo L.M., Richardson G.H., Brown R.J. and Ernstrom C.A. 1985. Coagulation properties of abnormal and normal milk for individual cow quarters. *J. Dairy Sci.* 68:1893-1895.
- Oloffs K., Schulte-Coerne H., Pabst K., and Gravert H.O. 1992. Die bedeutung der proteinvarianten für genetische in der käseereitauglichkeit der milch. *Züchtungskunde.* 64:20-26.
- Pärna E., Vallas M., Kaart T., Kübarsepp I., Kiiman H. and Pärna K. 2006. Genetic improvement of milk coagulation properties. 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, August 13-18, 2006, Belo Horizonte, MG, Brasil.
- Pretto D., Kaart T., Vallas M., Jõudu I., Henno M., Ancilotto L., Cassandro M. and Pärna E. 2011. Relationships between milk coagulation property traits analyzed with different methodologies. *J. Dairy Sci.* 94:4336-4346.
- Tervala H.-L., Antila V. and Syväjärvi J. 1985. Factors affecting the renneting properties of milk. *Meijeritieteellinen Aikakauskirja XLIII* 1;16-25.
- Tyrisevä A.-M., Vahlsten T., Ruottinen O. and Ojala M. 2004. Noncoagulation of milk in Finnish Ayrshire and Holstein-Friesian cows and effect of herds on milk coagulation ability. *J. Dairy Sci.* 87:3958-3966.
- Vallas M., Bovenhuis H., Kaart T., Pärna K., Kiiman H. and Pärna E. 2010. Genetic parameters for milk coagulation properties in Estonian Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 93:3789-3796.

7. APPENDICE A: TABELLE E FIGURE

Tabella 4.1. Statistiche descrittive della quantità e delle caratteristiche qualitative del latte¹
(n=913)

Caratteristica ²	Media	SD	P1	P99
Quantità di latte, kg/d	24.36	8.02	8.50	45.00
DIM, d	196	135	12	656
Grasso, %	4.23	0.70	2.66	6.15
Proteina, %	3.71	0.42	2.86	4.72
Caseina, %	2.89	0.32	2.26	3.68
SCS, unità	3.03	1.88	-0.56	7.86

¹P1 = 1° percentile; P99 = 99° percentile.

²SCS = somatic cell score, $\log_2(\text{SCC}/100,000) + 3$.

DIM = giorni di lattazione.

SD = standard deviation (deviazione standard)

Tabella 4.2 Statistiche descrittive delle proprietà coagulative del latte ottenute attraverso l'utilizzo di Formagraph (FRM) e Optigraph (OPT) (n= 913)

Caratteristica ¹	Formagraph		Optigraph		Test di uguaglianza della varianza ²
	Media	DS	Media	DS	
RCT, min	19.95	5.81	18.91	4.40	***
k ₂₀ , min	5.36	3.12	8.16	2.97	ns
a ₃₀ , mm	30.09	11.34	27.23	10.80	***
a ₄₅ , mm	33.66	8.43	41.49	11.54	***

¹RCT = tempo di coagulazione di tutti i campioni (inclusi quelli che coagulano dopo i 30 minuti dall'aggiunta dell'enzima); k₂₀ = tempo di rassodamento (include anche i campioni che raggiungono i 20 mm di consistenza del coagulo dopo i 30 minuti dall'aggiunta dell'enzima); a₃₀ = consistenza del coagulo a 30 minuti (esclusi i 47 e i 18 campioni che coagulano dopo i 30 minuti dall'aggiunta dell'enzima, rispettivamente per Formagraph e Optigraph); a₄₅ = consistenza del coagulo a 45 minuti.

² Test di Levene: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ^{ns} non significativo.

Tabella 4.3 Correlazioni stimate tra le proprietà coagulative del latte,ottenute attraverso l'utilizzo di Formagraph (FRM) e Optigraph (OPT), e le caratteristiche quanti-qualitative del latte

Caratteristiche ¹	RCT, min		k ₂₀ , min		a ₃₀ , mm		a ₄₅ ,mm	
	FRM	OPT	FRM	OPT	FRM	OPT	FRM	OPT
Quantità di latte, kg/d	-0.14 ^{***}	-0.14 ^{***}	-0.02 ^{ns}	0.15 ^{***}	0.04 ^{ns}	-0.04 ^{ns}	-0.06 ^{ns}	-0.17 ^{***}
Grasso, %	0.02 ^{ns}	0.04 ^{ns}	-0.08 ^{**}	-0.31 ^{***}	0.07 [*]	0.20 ^{***}	0.17 ^{***}	0.33 ^{***}
Proteina, %	0.27 ^{***}	0.36 ^{***}	-0.18 ^{***}	-0.47 ^{***}	0.04 ^{ns}	0.13 ^{***}	0.40 ^{***}	0.50 ^{***}
Caseina, %	0.25 ^{***}	0.34 ^{***}	-0.18 ^{***}	-0.49 ^{***}	0.06 ^{ns}	0.15 ^{***}	0.41 ^{***}	0.51 ^{***}
Lattosio, %	-0.22 ^{***}	-0.23 ^{***}	-0.19 ^{***}	-0.09 ^{**}	0.15 ^{***}	0.14 ^{***}	0.09 ^{**}	0.05 ^{ns}
SCS, unità	0.14 ^{***}	0.18 ^{***}	0.03 ^{ns}	-0.06 ^{ns}	-0.07 [*]	0.10 ^{**}	0.007 ^{ns}	0.01 ^{ns}
pH	0.41 ^{***}	0.39 ^{***}	0.27 ^{***}	0.33 ^{***}	-0.35 ^{***}	-0.42 ^{***}	-0.07 [*]	-0.29 ^{***}

¹RCT = tempo di coagulazione; k₂₀ = tempo di rassodamento; a₃₀ = consistenza del coagulo a 30 minuti; a₄₅ = consistenza del coagulo a 45 minuti.

P* < 0.05; *P* < 0.01; ****P* < 0.001; ^{ns} non significativo.

Tabella 4.4 Incidenza¹ dei vari effetti inclusi nel modello lineare per l'analisi della varianza delle proprietà coagulative del latte ottenute attraverso l'utilizzo di Formagraph (FRM) e Optigraph (OPT)²

Oggetto	RCT, min		k ₂₀ , min		a ₃₀ , mm		a ₄₅ , mm	
	FRM	OPT	FRM	OPT	FRM	OPT	FRM	OPT
Allev.	3.29 ^{***}	2.87 ^{***}	1.37 [*]	1.67 ^{**}	2.06 ^{***}	2.19 ^{***}	3.87 ^{***}	2.13 ^{***}
DIM	22.25 ^{***}	25.19 ^{***}	3.35 ^{**}	13.84 ^{***}	6.75 ^{***}	4.27 ^{***}	4.96 ^{***}	17.78 ^{***}
OP	2.71 ^{**}	2.22 ^{ns}	0.23 ^{ns}	2.52 ^{ns}	1.02 ^{ns}	0.52 ^{ns}	4.12 ^{**}	0.79 ^{ns}
MUCM ³	0.84 ^{ns}	0.53 ^{ns}	2.43 ^{**}	1.62 ^{ns}	2.59 ^{**}	0.85 ^{ns}	2.86 ^{***}	2.26 ^{**}
R ² , %	0.30	0.29	0.14	0.19	0.20	0.18	0.28	0.25
RMSE ⁴	5.11	3.88	3.03	2.80	12.09	10.81	7.50	10.51

¹Valori del test di Fisher e *P*-value.

²RCT = tempo di coagulazione; k₂₀ = tempo di rassodamento; a₃₀ = consistenza del coagulo a 30 minuti; a₄₅ = consistenza del coagulo a 45 minuti.

³MUCM = measuring unit of coagulation meter (unità di misurazione dello strumento -pendolo-)

⁴RMSE = root mean square error.

P* < 0.05; *P* < 0.01; ****P* < 0.001; ^{ns} non significativo.

Tabella 4.5 Valori medi e intervalli di credibilità (HPD95%) delle varianze (genetico additiva, legata all'effetto allevamento e residua) e delle ereditabilità relative alle proprietà coagulative del latte valutate con Formagraph e Optigraph

Caratteristica ¹	Parametro	Formagraph		Optigraph		$\Delta\%$ ⁴
		Mediana ₂	HPD95% ³	Mediana ²	HPD95% ³	
RCT, min						
	σ_a^2	7.09	3.12; 13.02	4.16	2.01; 7.32	-41.4
	σ_h^2	4.34	2.52; 7.41	2.12	1.17; 3.63	-51.1
	σ_e^2	19.44	14.46; 23.65	11.00	8.37; 13.29	-43.5
	h^2	0.230	0.10; 0.41	0.241	0.12; 0.41	+4.8
k ₂₀ , min						
	σ_a^2	2.10	0.74; 4.33	3.13	1.29; 5.52	+48.8
	σ_h^2	0.29	2.52; 7.40	0.36	0.07; 0.82	+26.9
	σ_e^2	7.54	5.73; 9.06	5.02	3.12; 6.71	-33.4
	h^2	0.212	0.07; 0.41	0.368	0.15; 0.61	+73.6
a ₃₀ , mm						
	σ_a^2	21.03	5.01; 46.23	23.82	5.94; 49.52	+13.2
	σ_h^2	6.42	1.85; 13.57	10.54	5.08; 19.44	+64.1
	σ_e^2	95.33	74.01; 114.2	81.67	61.01; 100.3	-14.3
	h^2	0.171	0.04; 0.36	0.205	0.05; 0.40	+19.9
a ₄₅ , mm						
	σ_a^2	8.37	1.74; 19.84	38.11	16.36; 67.22	+355.4
	σ_h^2	12.54	7.78; 20.02	9.80	4.57; 18.32	-21.9
	σ_e^2	49.0	39.38; 57.34	75.34	52.33; 96.87	+53.9
	h^2	0.120	0.02; 0.27	0.309	0.13; 0.51	+157.5

¹RCT = tempo di coagulazione di campioni che coagulano entro 45 minuti dall'aggiunta dell'enzima; k_{20} = tempo di rassodamento di campioni che raggiungono i 20 mm di consistenza del coagulo entro i 45 minuti dall'aggiunta dell'enzima; a_{30} = consistenza del coagulo a 30 minuti; a_{45} = consistenza del coagulo a 45 minuti.

²Median = mediana della densità marginale posteriore del parametro.

³HPD95% = intervallo di credibilità.

⁴Mediana della densità marginale posteriore della differenza tra componenti di varianza e ereditabilità per le proprietà coagulative del latte ottenute attraverso l'utilizzo di Formagraph e Optigraph.

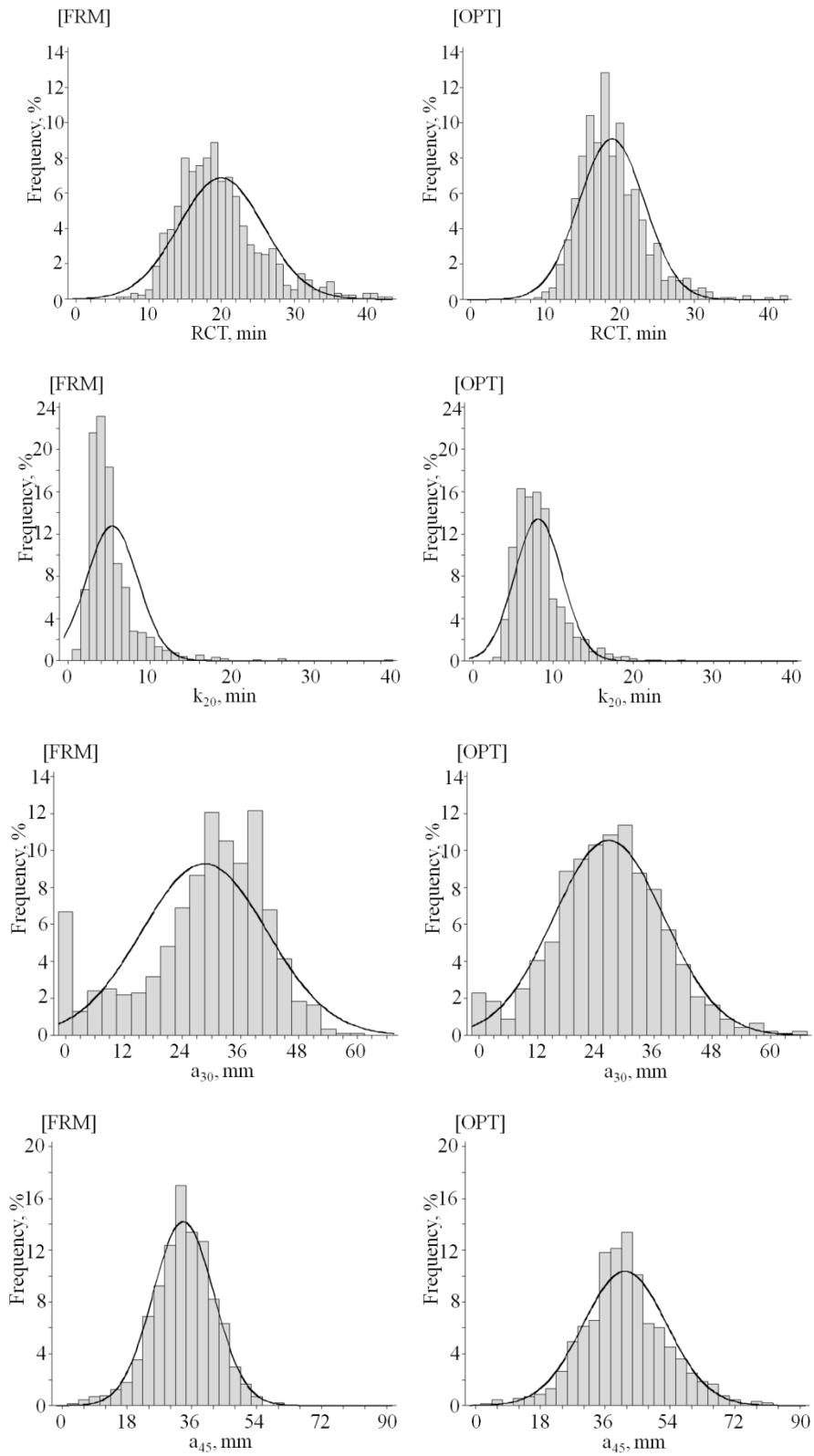
Tabella 4.6 Correlazioni genetica additive (r_g) e fenotipiche (r_p) tra la stessa proprietà coagulativa ottenuta attraverso l'utilizzo di Formagraph e Optigraph

Caratteristica ²	r_g		r_p	
	Mediana	HPD95%	Mediana	HPD95%
RCT, min	0.974	0.896; 0.997	0.806	0.779; 0.831
k_{20} , min	0.764	0.315; 0.992	0.518	0.462; 0.571
a_{30} , mm	0.917	0.610; 0.992	0.731	0.693; 0.764
a_{45} , mm	0.847	0.453; 0.991	0.426	0.359; 0.491

¹Mediana = mediana della densità marginale posteriore; HPD95% = intervallo di credibilità.

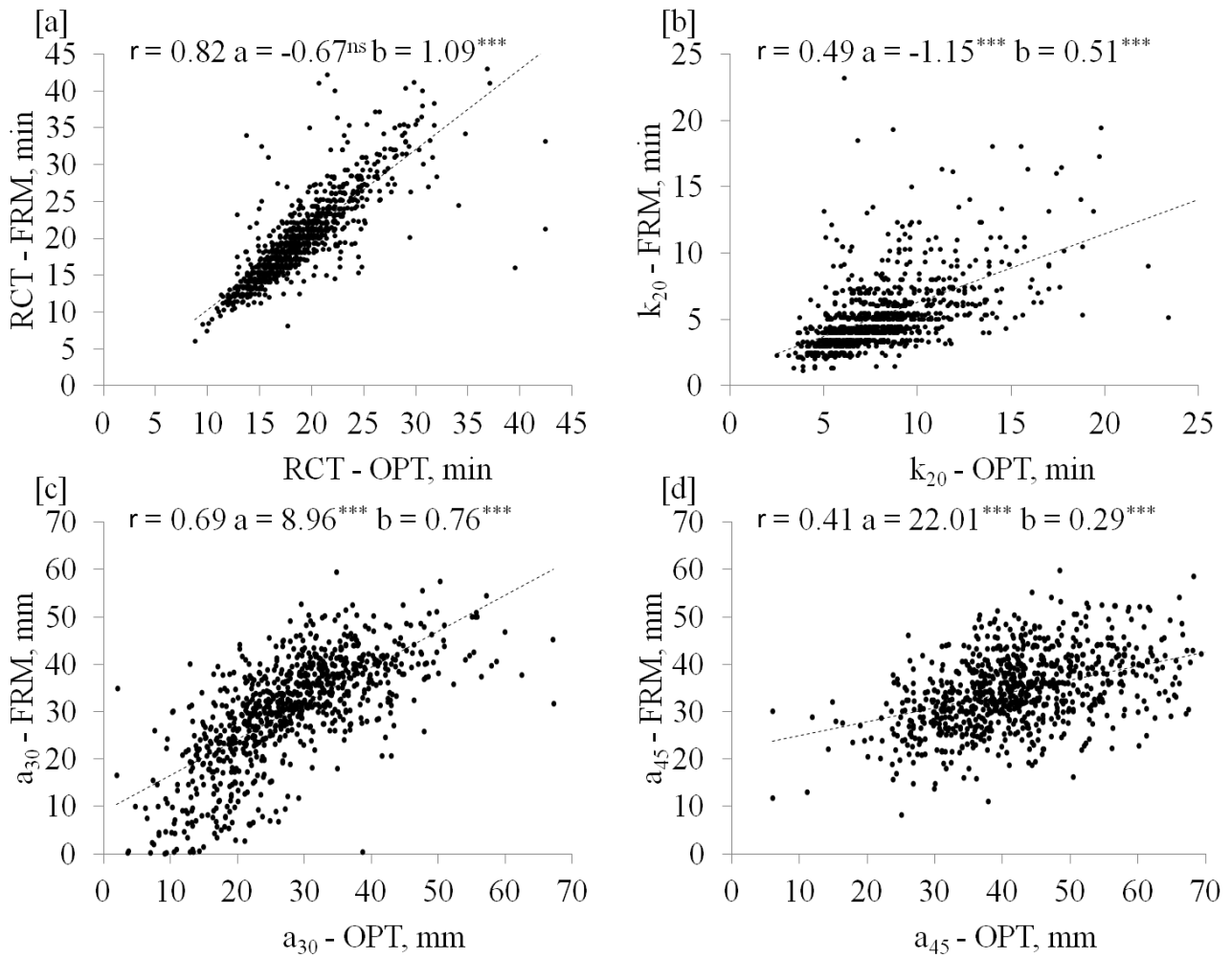
²RCT = tempo di coagulazione di campioni che coagulano entro 45 minuti dall'aggiunta dell'enzima; k_{20} = tempo di rassodamento di campioni che raggiungono i 20 mm di consistenza del coagulo entro i 45 minuti dall'aggiunta dell'enzima; a_{30} = consistenza del coagulo a 30 minuti; a_{45} = consistenza del coagulo a 45 minuti.

Figura 4.1



Distribuzione del tempo di coagulazione (RCT, min), tempo di rassodamento (k_{20} , min), consistenza del coagulo a 30 (a_{30} , mm) e a 45 minuti (a_{45} , mm) ottenuti attraverso l'utilizzo di Formagraph (FRM) e Optigraph (OPT). Per a_{30} è riportata la frequenza dei valori nulli relativi ai campioni che non coagulano entro i 30 minuti.

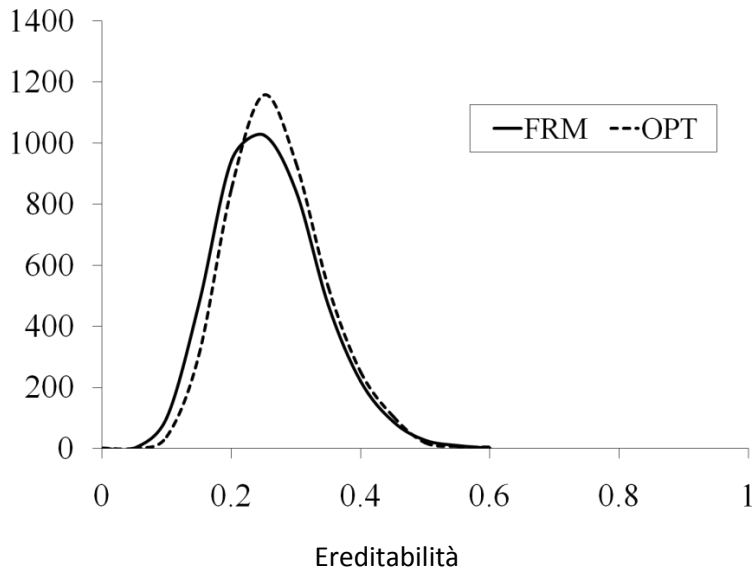
Figura4.2



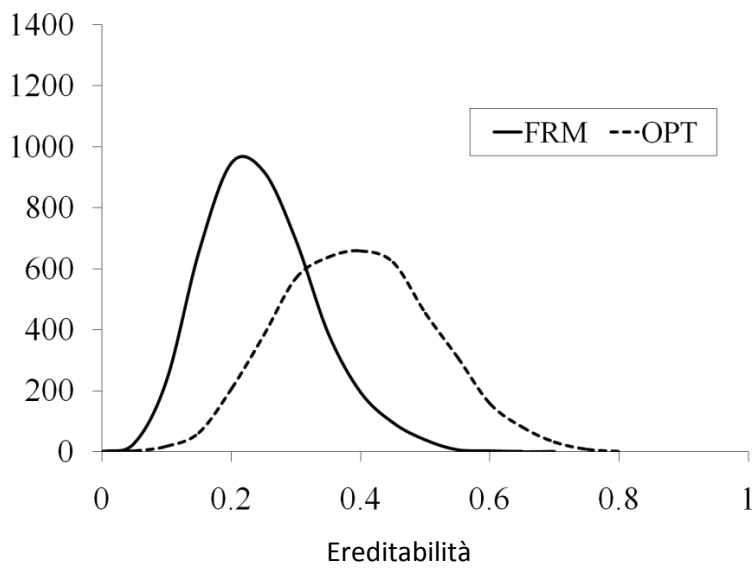
Regressioni lineari tra i valori di ciascuna proprietà coagulativa ottenuti con l'uso di Formagraph e Optigraph: [a] tempo di coagulazione (RCT, min), [b] tempo di rassodamento (k_{20} , min), [c] consistenza del coagulo a 30 min (a_{30} , mm), e [d] consistenza del coagulo a 45 min (a_{45} , mm). L' *F*-test è stato impiegato per spiegare ogni pendenza della retta diversa da 1 e ogni intercetta diversa da 0 ($P < 0.05$).

Figura 4.3

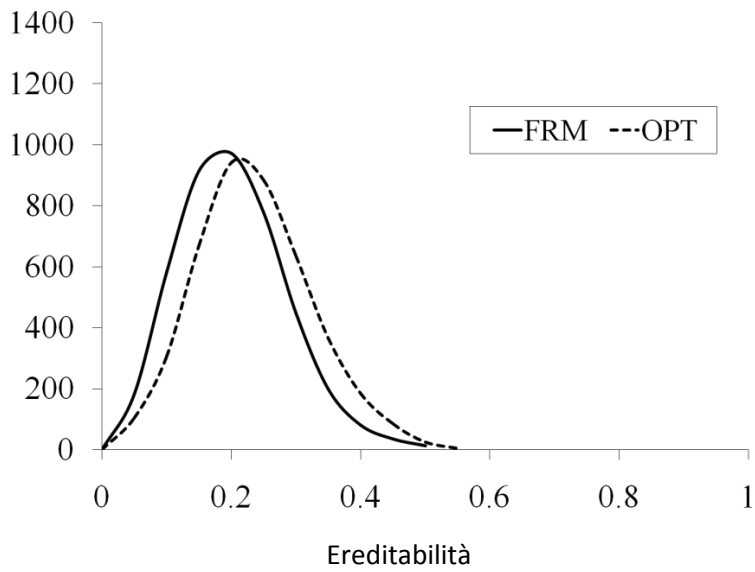
[RCT]



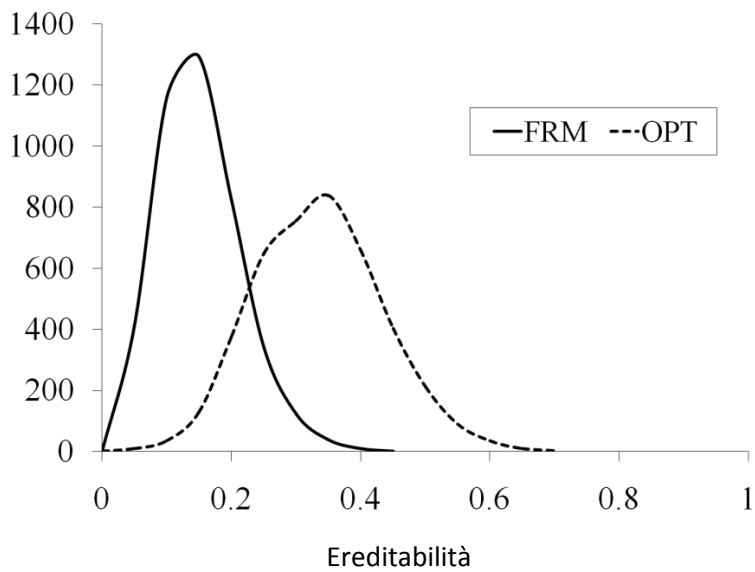
[k₂₀]



[a₃₀]

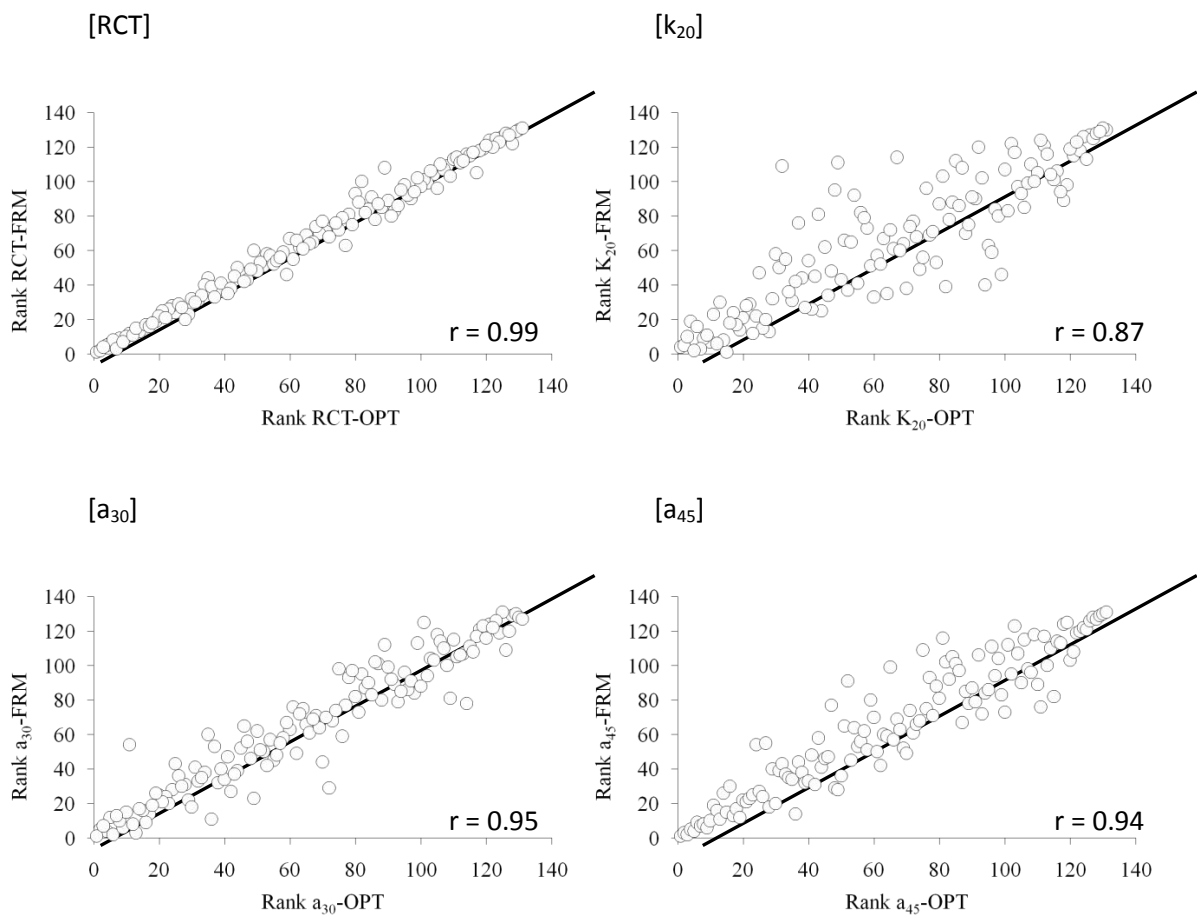


[a₄₅]



Distribuzioni delle ereditabilità stimate per le misurazioni del tempo di coagulazione dei campioni che coagulano in 45 minuti dall'aggiunta dell'enzima [RCT, min], tempo di rassodamento misurato nei 45 minuti dall'aggiunta dell'enzima [k₂₀, min], consistenza del coagulo a 30 minuti [a₃₀, mm], e consistenza del coagulo a 45 minuti [a₄₅, mm] valutati da Formagraph(FRM) e Optigraph(OPT).

Figura 4.4



Relazioni tra le classifiche dei riproduttori basate sugli *EBV* per ogni per ogni misurazione del tempo di coagulazione dei campioni che coagulano in 45 minuti dall'aggiunta dell'enzima [RCT, min], tempo di rassodamento misurato nei 45 minuti dall'aggiunta dell'enzima [k₂₀, min], consistenza del coagulo a 30 minuti [a₃₀, mm], e consistenza del coagulo a 45 minuti [a₄₅, mm] valutati da Formagraph (FRM) e Optigraph (OPT).

