



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione

Corso di laurea magistrale in
BIOTECNOLOGIE PER L'ALIMENTAZIONE

**SPETTROSCOPIA NEL MEDIO INFRAROSSO
QUALE STRUMENTO PER IL MIGLIORAMENTO
GENETICO DEL PROFILO ACIDICO DEL LATTE**

Relatore: Prof. PAOLO CARNIER

Correlatore: Dott.ssa VALENTINA BONFATTI

Laureanda: ILARIA TABARELLI

Matricola: 1041285

ANNO ACCADEMICO 2013/2014

Ringraziamenti

Desidero ringraziare il Professor Paolo Carnier per l'opportunità concessami nel prendere parte a questo interessante ed importante progetto di ricerca, alla Dott.ssa Valentina Bonfatti e al Dott. Gianluca Chiarot per la grande disponibilità sempre dimostratami e per il prezioso aiuto fornitomi durante la stesura di questa tesi.

Un sentito ringraziamento va a Luca Grigoletto e a tutto lo staff del laboratorio La.Chi. per l'aiuto, la disponibilità e la professionalità dimostrata durante tutta la durata del tirocinio e per le tante cose che ho avuto l'opportunità di imparare.

Un Grazie particolare va a Giulia Baccan, con cui ho condiviso questa esperienza, per l'aiuto reciproco che abbiamo avuto la fortuna di poterci dare e per la nascita di una bella amicizia.

Un ultimo speciale ringraziamento va ai miei genitori, ai miei compagni di Università, alle mie coinquiline, ai miei amici speciali e a tutte le persone che mi vogliono bene e che mi sono state accanto in questi ultimi due anni e senza le quali non sarei la persona che sono ora! Grazie!

SOMMARIO

RIASSUNTO.....	7
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUZIONE	11
1.1 Composizione del grasso del latte	11
1.2 Qualità nutrizionale del grasso del latte.....	11
1.3 Programmi di miglioramento genetico	13
1.4 Metodi di misurazione del contenuto di acidi grassi	14
1.5 Spettroscopia nel medio infrarosso (MIR)	14
1.6 Selezione indiretta	17
2. OBIETTIVI.....	19
3. MATERIALI E METODI	21
3.1 Campionamento	21
3.2 Determinazione del profilo acido.....	21
3.2.1 Separazione del grasso	21
3.2.2 Trans-esterificazione degli acidi grassi.....	22
3.2.3 Determinazione gascromatografica a due dimensioni	22
3.2.4 Lettura ed espressione dei risultati.....	23
3.2.5 Definizione dei caratteri	23
3.3 Acquisizione spettri MIR e calibrazioni	25
3.4 Analisi statistica.....	27
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	29
4.1 Statistiche descrittive	29
4.2 Componenti di varianza e correlazione genetica	31
4.3 Relazione tra capacità predittiva delle equazioni di calibrazione e correlazione genetica tra carattere predetto e carattere misurato	35
5. CONCLUSIONI.....	37
BIBLIOGRAFIA	39

RIASSUNTO

Gli obiettivi di questa tesi erano stimare i parametri genetici dei principali acidi grassi (**FA**) del latte misurati tramite gas-cromatografia e predetti attraverso spettroscopia nel medio infrarosso (**MIR**) e stimare la correlazione genetica tra i principali acidi grassi misurati e predetti attraverso la spettroscopia nel medio infrarosso.

Il presente studio è stato condotto su 768 bovine allevate in 16 aziende del Friuli Venezia Giulia. La composizione del profilo acidico del latte è stata misurata utilizzando un gas-cromatografo a due dimensioni, mentre i dati MIR sono stati ottenuti utilizzando lo spettro derivatizzato nell'intervallo di lunghezze d'onda da 1,000 a 3,830 cm^{-1} . Dopo aver sviluppato l'equazione di calibrazione per la predizione del contenuto in acidi grassi del latte, sono stati stimati i parametri genetici dei principali acidi grassi. I valori di ereditabilità (h^2) stimati per i caratteri misurati risultavano da molto bassi a moderati, infatti andavano da 0.00 a 0.32 con un errore standard che oscillava tra lo 0.00 e lo 0.14. Buoni valori di h^2 sono stati riscontrati per gli acidi grassi saturi (**SFA**) e gli acidi grassi monoinsaturi (**MUFA**) (0.24 e 0.28, rispettivamente), mentre bassi valori sono stati osservati per gli acidi grassi polinsaturi (**PUFA**) (0.04). Il valore di h^2 dei caratteri misurati è risultato superiore rispetto a quello delle rispettive predizioni per i PUFA, C14:0, C14:1 e C16:1, mentre è risultato inferiore per SFA, $\omega 3$, acidi grassi a corta e media catena, C4:0, C6:0, C16:0, C18:0 e coniugati dell'acido linoleico (**CLA**). Per tutti gli acidi grassi insaturi a 18 atomi di carbonio non coniugati, gli $\omega 6$, il C8:0, C10:0 e C12:0 i valori di h^2 stimati nei misurati e nei predetti invece erano molto simili. La correlazione genetica predetto-osservato è risultata superiore al 97% per gli SFA, i MUFA e i PUFA, per gli $\omega 6$, per gli acidi grassi a corta e lunga catena, per i singoli acidi grassi saturi dal C4:0 al C14:0, per gli acidi grassi insaturi a 18 atomi di carbonio non coniugati e per i rapporti SFA/UFA e MUFA/PUFA. La correlazione genetica predetto-osservato, invece, aveva valori tra il 77 e il 89% per gli $\omega 3$, gli acidi grassi a media catena, il C14:1 e il C16:1. La correlazione genetica predetto-osservato aveva valori inferiori al 70% per i CLA, il C16:0 e il C18:0.

Il seguente studio ha permesso di dimostrare come la spettroscopia MIR possa essere proposta come metodica per la predizione del profilo acidico del latte con lo scopo di attuare programmi di selezione genetica.

Il vantaggio più importante di tale tecnica è il fatto che può essere facilmente e immediatamente attuata per le popolazioni di bovine da latte poiché viene già ampiamente utilizzata per i controlli funzionali effettuati mensilmente sulle stesse bovine e quindi esiste già un'acquisizione di routine degli spettri dei campioni di latte individuale.

ABSTRACT

The aims of this study were to investigate genetic parameters of milk fatty acid (**FA**) contents measured and their predictions obtained by mid-infrared spectroscopy (**MIR**) and to investigate the genetic relationship between measures of FA content and MIR predictions.

Individual milk samples were collected from 768 Italian Simmental cows reared in 16 herds located in Friuli Venezia Giulia. FA contents were measured using a two-dimensional gas chromatography. The MIR data were recorded over the spectral range of 3,830 to 1,000 cm^{-1} .

After developing calibration equations to predict FA contents in bovine milk by MIR, the genetic parameters of FA were estimated in this study. Estimates of heritability (h^2) of measured FA ranged from 0.00 to 0.32 with a standard error ranging from 0.00 to 0.14. High values of h^2 were observed for saturated fatty acids (**SFA**) and monounsaturated fatty acids (**MUFA**) (0.24 and 0.28, respectively), while low values were observed for polyunsaturated fatty acids (**PUFA**) (0.04). h^2 estimates for measured FA were larger than those obtained for FA predictions for PUFA, C14:0, C14:1 and C16:1; h^2 estimates for measured FA were lower than those obtained for FA predictions for SFA, ω 3, short chain fatty acids, medium chain fatty acids, C4:0, C6:0, C16:0, C18:0 and conjugated linoleic acid (**CLA**).

Estimated genetic correlations between measures and predictions of FA contents were above 97% for SFA, MUFA, PUFA, ω 6, short and long chain fatty acids, saturated fatty acids from C4:0 to C14:0, unsaturated fatty acids with 18 carbon atoms not conjugated, SFA/UFA and MUFA/PUFA. Estimated genetic correlations between measured and predicted FA relative contents ranged between 77 and 89% for ω 3, medium chain fatty acids, C14:1 and C16:1. Estimated genetic correlations between measures and predictions of FA contents were very low for CLA, C16:0 and C18:0.

Predictions of FA contents provided by MIR techniques can be proposed as indicator traits for the genetic enhancement of FA profile. Breeding strategies for the enhancement of FA contents based on MIR predictions as indicator traits could be easily and immediately implemented for dairy cattle populations where routine acquisition of spectra from individual milk samples is already performed.

1.INTRODUZIONE

1.1 Composizione del grasso del latte

Il grasso del latte contiene principalmente trigliceridi che sono esteri neutri del glicerolo in cui, al posto degli atomi di idrogeno dei gruppi ossidrilici caratteristici del glicerolo, sono presenti le catene di tre acidi grassi.

Gli acidi grassi sono molecole composte da una catena di atomi di carbonio (catena alifatica o idrocarburica) e da un gruppo carbossilico ad una delle estremità. Sono stati isolati più di 500 differenti acidi grassi (Brown, 2010) che variano in base al numero di atomi di carbonio e al numero di doppi legami carbonio-carbonio (grado di insaturazione) presenti sulla catena idrocarburica.

In funzione del grado di insaturazione si definiscono saturi (**SFA**) gli acidi grassi che non presentano doppi legami nella catena alifatica, mentre prendono il nome di acidi grassi insaturi (**UFA**) quelli che presentano uno (monoinsaturi, **MUFA**) o più (polinsaturi, **PUFA**) doppi legami.

In base alla posizione degli atomi di idrogeno associati ai carboni coinvolti nel doppio legame, gli acidi grassi possono essere ulteriormente suddivisi in *cis* e *trans*; mentre nel primo caso gli atomi di idrogeno si trovano dalla stessa parte rispetto al doppio legame, nel caso degli acidi grassi *trans* gli atomi di idrogeno si trovano in posizione opposta.

Infine sulla base della lunghezza della catena alifatica e quindi del numero di atomi di carbonio che la compongono, gli acidi grassi si possono differenziare in composti a corta catena (da 4 a 10 atomi di C), media catena (da 12 a 16 atomi di C) e lunga catena (a partire da 18 atomi di C).

1.2 Qualità nutrizionale del grasso del latte

L'organizzazione mondiale della sanità (**WHO**) durante la sessantaseiesima assemblea internazionale ha puntato l'attenzione su malattie non trasmissibili che sembrano essere correlate con gli alimenti presenti nella nostra dieta come il diabete, le patologie cardiovascolari e i tumori gastrointestinali. Una delle cinque proposte che sono state formulate dal WHO riguarda il tentativo di ridurre drasticamente dalla dieta la quantità di SFA e di UFA di tipo *trans* (correlati all'ipercolesterolemia) andando a sostituirli con UFA di tipo *cis* (WHO, 2013).

Il colesterolo è un importante lipide steroideo che compone la membrana cellulare regolandone fluidità e permeabilità ed inoltre è un precursore degli ormoni steroidei, della vitamina D e dei sali biliari. Esso, per essere trasportato attraverso il sangue, necessita di lipoproteine che possono essere di due tipi: “low density lipoproteins” (**LDL**) che svolgono un’azione negativa poiché facilitano la permanenza del colesterolo nelle arterie provocando la formazione di placche aterosclerotiche, oppure “high density lipoproteins” (**HDL**) che al contrario trasportano il colesterolo al fegato, dove viene metabolizzato. È stato dimostrato che il contenuto di alcuni SFA, in particolare il C12:0, il C14:0 e il C16:0, è correlato positivamente con il contenuto di LDL nel sangue (Stoop, 2009) mentre MUFA e PUFA sono associati alla componente HDL provocando un effetto ipocolesterolemizzante. Tra i PUFA, in particolare, l’acido linoleico (C18:2 n-6,9) e l’acido linolenico (C18:3 n-3,6,9) sono considerati essenziali nella dieta in quanto non sono sintetizzabili ex novo nell’organismo: il primo è il precursore della serie ω -6, mentre il secondo della serie ω -3. L’acido linolenico inoltre può essere trasformato in acido eicosapentanoico (EPA), fondamentale per la sintesi delle prostaglandine di serie 3, e in acido docosaesanoico (DHA) che svolge un’importante funzione strutturale in retina e sistema nervoso centrale. Infine, un altro gruppo di UFA molto importante per la salute umana è quello dei coniugati dell’acido linoleico (**CLA**), i quali sembra possano ridurre il rischio di malattie cardiovascolari, combattere le infiammazioni, aiutare a ridurre il grasso corporeo e aumentare la massa magra e avere capacità anticancerogene (Lock, 2002).

Il latte contiene molti nutrienti fondamentali per la salute umana come vitamine liposolubili, energia e lipidi bioattivi (German and Dillard, 2006), ma il grasso del latte è composto per circa il 70% di SFA, il 25% di MUFA e il 5% di PUFA (Grummer, 1991). Nonostante i prodotti lattiero-caseari contribuiscano solo al 15-25% del grasso totale nella dieta umana, concorrono a circa il 25-35% dei grassi saturi totali (O’Donnel, 1993).

Per tale motivo, il consumo di latte e derivati è stato associato all’aumento del rischio di malattie cardiovascolari, elevata pressione sanguigna, insulino-resistenza e iperlipidemia soprattutto dovuta alla frazione LDL.

Negli ultimi anni perciò l’attenzione del mercato si è focalizzata sempre più sul miglioramento degli aspetti salutari dei prodotti lattiero-caseari e quindi, nello specifico, nel miglioramento del profilo acido del latte. Diverse strategie di miglioramento del profilo acido del latte sono già state valutate e sviluppate. Tra queste la più immediata è stata quella di tipo alimentare, che consiste nell’includere all’interno delle diete delle bovine da latte una quota maggiore di UFA (Noakes et al., 1996).

Un'alternativa potrebbe essere quella del miglioramento genetico delle popolazioni bovine.

1.3 Programmi di miglioramento genetico

È grazie all'applicazione di programmi selettivi, aggiornati di volta in volta con le nuove conoscenze genetiche e genomiche, e il concomitante miglioramento della gestione, dell'alimentazione e della sanità degli animali, che si è assistito, negli ultimi 40 anni, ad un cospicuo aumento quali-quantitativo delle produzioni.

La prima fase di un programma di miglioramento genetico consiste nella definizione delle caratteristiche da migliorare, anche chiamate obiettivi di selezione. In secondo luogo è necessario capire se il carattere obiettivo di selezione sia geneticamente migliorabile, cioè se sia dotato di una sufficiente variabilità genetica e se sia ereditabile. Alcuni ricercatori come Renner e Kosmack (1974), Karijord et al. (1982), Soyeurt et al. (2006, 2007 e 2008), e Stoop et al. (2008) hanno studiato la variabilità individuale dei singoli acidi grassi e i risultati ottenuti hanno suggerito la presenza di una significativa variabilità genetica che dovrebbe essere sufficiente per attuare un programma di selezione finalizzato al miglioramento del profilo nutrizionale del grasso del latte bovino.

L'esistenza di una buona variabilità genetica non è tuttavia sufficiente a rendere attuabile un programma selettivo. È necessario infatti disporre di strategie per l'individuazione dei riproduttori, cioè per la selezione degli animali vera e propria sulla base del loro valore genetico (breeding value, BV). Nel caso delle popolazioni bovine da latte, le stime dei BV dei tori sono basate sulle informazioni fenotipiche delle figlie. Un requisito necessario all'implementazione di uno schema di miglioramento genetico è pertanto avere la possibilità di misurare il fenotipo del carattere obiettivo di selezione a livello di popolazione, ovvero per tutte le bovine in produzione, in modo da ottenere stime di BV dei padri e selezionare quelli con il più alto valore genetico per il carattere da migliorare. In Italia la registrazione dei dati produttivi e riproduttivi dei bovini da latte è affidata all'Associazione Italiana Allevatori (AIA), mentre i dati morfologici ed alcuni dati funzionali sono registrati dalle Associazioni Nazionali Allevatori.

I dati produttivi che vengono attualmente misurati sono tuttavia limitati e non esistono informazioni in merito alla composizione del grasso del latte.

1.4 Metodi di misurazione del contenuto di acidi grassi

Fino ad ora gli studi che riguardano la valutazione del contenuto in acidi grassi nel latte con lo scopo di attuare programmi di selezione sono stati molto limitati a causa della metodica utilizzata che è la gas-cromatografia (GC). Tale tecnica ha il vantaggio di dare risultati estremamente precisi ma presenta anche numerosi svantaggi tra cui tempi di analisi molto lunghi (80 minuti per ciascun campione), elevati costi e soprattutto la necessità di personale specializzato in grado di leggere correttamente i risultati ottenuti.

Infatti una delle difficoltà maggiori consiste nella lettura dei risultati in quanto, per quanto riguarda il latte, i cromatogrammi presentano un numero elevato di picchi, numero di molto superiore a quello di altri prodotti alimentari quali ad esempio la carne, e questo complica la procedura di ottenimento dei dati e allunga le tempistiche di raccolta dei risultati.

Poiché l'analisi del profilo acidico del latte bovino con lo scopo di attuare programmi di selezione genetica deve essere applicata alla totalità di una popolazione bovina per poter stimare il valore genetico degli animali, la gas-cromatografia, che comporta costi, uso di strumentazione e tempi incompatibili con analisi su larga scala, limita le possibilità di ottenere dati fenotipici individuali a livello di popolazione e di attuare interventi selettivi per questi caratteri. Una possibile alternativa alla misurazione diretta dei componenti del latte si basa sullo sviluppo di calibrazioni ottenute sfruttando la spettroscopia nel medio infrarosso (**MIR**).

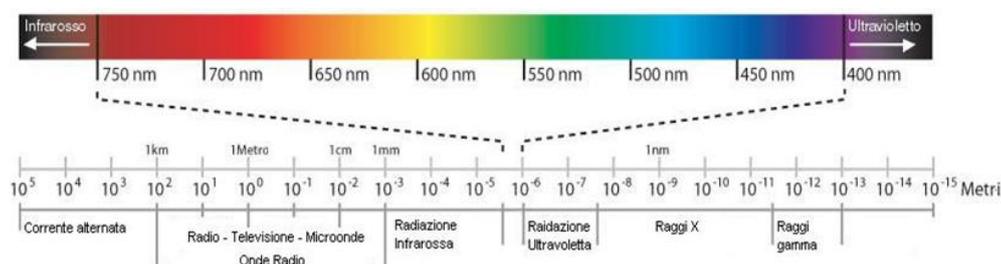
1.5 Spettroscopia nel medio infrarosso (MIR)

Studi recenti (Soyeurt et al., 2006; Rutten et al., 2010) hanno dimostrato che un'ottima alternativa alla gas-cromatografia per la misurazione del contenuto in acidi grassi del latte è l'utilizzo della spettroscopia nel medio infrarosso (MIR). La spettroscopia è il procedimento sperimentale attraverso il quale vengono misurate le frequenze delle radiazioni assorbite o emesse da particolari sostanze.

Le radiazioni elettromagnetiche possono essere descritte in base alla loro lunghezza d'onda e alla frequenza. La prima è la distanza tra due punti minimi (avvallamenti) o massimi (creste), si indica con il simbolo λ (lambda) ed è espressa generalmente in metri o sottomultipli. La frequenza, invece, è il numero di massimi o di minimi che si possono misurare in una unità di tempo (generalmente secondi).

La radiazione infrarossa è quella radiazione elettromagnetica con banda di frequenza dello spettro elettromagnetico inferiore a quella della luce visibile, ma maggiore di quella delle onde radio, ovvero lunghezza d'onda compresa tra 0.78 μm e 1,000 μm (Figura 1). Generalmente tale intervallo viene suddiviso in tre regioni: la regione del vicino infrarosso (NIR compresa tra 0.78 μm e 3.00 μm), quella del medio infrarosso (MIR tra i 3.00 μm e 60.00 μm) e infine quella del lontano infrarosso (FIR) (Brown, 2010).

Figura 1. Spettro delle radiazioni elettromagnetiche



Nella spettroscopia infrarossa, un composto viene irradiato con una radiazione infrarossa che causa il passaggio dei legami covalenti da un livello energetico vibrazionale più basso ad uno più alto. Poiché gruppi funzionali diversi hanno differenti forze di legame, l'energia richiesta per provocare questa transizione varierà da un gruppo funzionale ad un altro. Questo significa che ciascuna sostanza assorbe particolari gamme di frequenze nella banda dell'infrarosso le quali consentono l'ottenimento di uno spettro che permette di creare "un'impronta digitale" del campione, cioè un grafico di assorbimento dell'energia rispetto alle lunghezze d'onda (Pellizon Birelli, 2006).

Gli strumenti utilizzati per fare analisi di spettroscopia infrarossa possono essere di due tipologie: dispersivi, in cui è presente un elemento che disperde sequenzialmente le radiazioni, e quelli a Trasformata di Fourier (**FT**). Al giorno d'oggi vengono utilizzati quasi esclusivamente quelli della seconda tipologia che prevedono un'acquisizione contemporanea su tutto il range spettrale, ossia permettono di registrare contemporaneamente tutto lo spettro IR nell'intera gamma di onde richieste, attraverso un sistema di raccolta delle radiazioni luminose (Interferometro di Michelson, che basa la separazione delle lunghezze d'onda sul tempo, anziché sullo spazio) basato su tre differenti specchi (uno fisso, uno semiriflettente e l'ultimo mobile).

Nel campo della spettroscopia analitica i range spettrali più utilizzati sono il NIR e il MIR. La principale differenza è che l'assorbimento nel medio infrarosso corrisponde alle bande fondamentali delle vibrazioni molecolari, mentre assorbimenti nel vicino

infrarosso corrispondono a sovratoni e combinazioni di queste; ciò comporta che gli spettri NIR siano molto più complicati per la sovrapposizione di più bande e quindi molto meno specifici rispetto agli spettri MIR. Inoltre la diffusione della luce è molto maggiore nella tecnica NIR rispetto al MIR, pertanto gli spettri dei primi saranno molto più influenzabili da fattori che interagiscono con la diffusione della luce, come ad esempio la presenza o meno di acqua. Per questo motivo, la tecnica MIR è quella che viene di norma utilizzata per matrici liquide come il latte. Lo spettro MIR viene quindi messo in relazione con la composizione chimica del campione ed è pertanto possibile ottenere predizioni della composizione di un campione a partire dal suo spettro.

La tecnica MIR permette la predizione dei costituenti del latte su un numero elevatissimo di soggetti poiché è sufficiente una quantità ridotta di campione, le analisi sono veloci ed economiche e dall'acquisizione di un unico spettro è possibile ottenere la predizione di molteplici parametri.

Attualmente, le analisi di routine su cui si basano i controlli funzionali delle bovine da latte sfruttano questa tecnologia per l'ottenimento di predizioni del contenuto di proteina, grasso, urea e, in alcuni casi, di caseina dei campioni individuali di latte. Recentemente, la capacità predittiva del MIR è stata valutata, a livello sperimentale, per le proprietà coagulative, misurate con tecnica lattodinamografica (Cecchinato et al., 2009), per la composizione della proteina (Bonfatti et al., 2011), per il profilo acidico (Soyeurt et al., 2008) e per il contenuto dei principali minerali (Soyeurt et al., 2009). Elevate correlazioni genetiche, tra dati predetti con MIR e quelli misurati, sono state ottenute anche a fronte di capacità predittive in alcuni casi poco soddisfacenti (Cecchinato et al., 2009), tanto che procedure MIR sono già utilizzate per la predizione del profilo acidico a livello di popolazione (Soyeurt et al., 2008). Specifiche calibrazioni MIR, sviluppate per la strumentazione utilizzata nei programmi di controllo funzionale delle popolazioni bovine da latte, permetterebbero di estendere le predizioni anche a caratteristiche complesse, non misurabili su larga scala con le metodiche analitiche di riferimento, quali quelle discusse in precedenza e non presenterebbe quindi nessun costo aggiuntivo di analisi.

Per riuscire a predire la composizione sia quantitativa che qualitativa in acidi grassi del latte esclusivamente a partire da uno spettro, come prima cosa è necessario creare l'equazione di calibrazione, ossia una funzione che possa spiegare statisticamente la relazione esistente tra assorbimento della luce e quantità/tipo di acidi grassi presenti nei campioni analizzati.

Per lo sviluppo di tale equazione è necessario disporre di un sufficiente numero di campioni rappresentativi della popolazione in esame, i loro relativi spettri e i valori analitici ottenuti con le tradizionali metodiche di laboratorio (GC).

La capacità predittiva delle equazioni di calibrazione può essere valutata attraverso diversi parametri. I più utilizzati sono l'errore standard e il coefficiente di determinazione in cross-validation (**SE_{cv}** e **R²_{cv}**, rispettivamente). Il SE_{cv} indica l'errore medio di predizione, mentre il R²_{cv} misura la quota parte della varianza della variabile dipendente spiegata dall'equazione di calibrazione. Questi parametri indicano l'efficienza del modello predittivo e forniscono un'idea della sua accuratezza. Mentre SE_{cv} deve risultare il più basso possibile, R²_{cv} ha un valore compreso tra 0 e 1, più vicino sarà a 1 maggiore sarà la capacità predittiva dell'equazione di calibrazione.

Un ulteriore parametro che va preso in considerazione per stimare l'efficienza della calibrazione è l'RPD, ossia Residual Predictive Deviation oppure Ratio of Prediction to Deviation. Tale parametro corrisponde al rapporto tra la deviazione standard del carattere analizzato e l'errore standard in cross-validation e, in linea teorica, valori superiori a 2 assicurano un'elevata efficienza dell'equazione di calibrazione (Williams and Norris, 2001).

1.6 Selezione indiretta

Le predizioni MIR offrono, secondo la precisione media che le caratterizza, due opportunità: nel caso di precisione elevata, esse rappresentano misure dirette dei fenotipi individuali per le caratteristiche d'interesse; nel caso di precisione modesta, la selezione genetica attuabile potrebbe essere una selezione di tipo indiretto, nella quale cioè l'obiettivo di selezione non è il vero carattere che si vuole migliorare (profilo acidico misurato), ma è un carattere ad esso geneticamente correlato (profilo acidico predetto tramite tecnica MIR). In entrambi i casi, l'esistenza di tali predizioni renderebbe possibile interventi selettivi per il miglioramento genetico delle proprietà tecnologiche e nutrizionali del latte che, ad oggi, non sono praticamente realizzabili.

La spettroscopia MIR è stata valutata quale metodica alternativa per la selezione a favore delle proprietà coagulative del latte (**MCP**) (Cecchinato et al., 2009). Anche nel caso delle MCP, infatti, la selezione diretta è inapplicabile perché la registrazione su larga scala di fenotipi individuali è impossibile in quanto le tecniche disponibili richiedono tempi molto lunghi, mancano dispositivi di misurazione automatizzati e c'è la necessità di personale specializzato.

Come dimostrato da Williams (2003), il coefficiente di determinazione (**R²**) di ogni equazione di calibrazione permette di valutare l'accuratezza della predizione; per quanto riguarda il tempo di coagulazione (**RCT**), i modelli sviluppati da Cecchinato et al. (2009) avevano R² compreso tra 0.61 e 0.69 e permettevano solamente la discriminazione tra valori estremi di RCT, mentre per quanto riguarda la consistenza

del coagulo (**a30**), i modelli non permettevano nemmeno questa discriminazione (R^2 da compreso tra 0.46 e 0.52). Nonostante i valori di R^2 ottenuti per questi due caratteri non siano risultati elevati, è stato dimostrato come tali caratteri potessero comunque essere utilizzati per fare selezione poiché la risposta alla selezione attraverso predizioni MIR sia per RCT che per a30 è risultata essere uguale o leggermente inferiore rispetto alla risposta realizzabile tramite misurazione diretta.

La rilevanza delle predizioni MIR come indicatori utilizzabili nei programmi di selezione basati sul miglioramento delle MCP si basa in gran parte sulla variabilità genetica di tali predizioni e sulla correlazione genetica tra MCP misurate e predette con la tecnica MIR. Nel caso dello studio condotto da Cecchinato et al. (2009), nonostante la capacità predittiva delle MCP fosse limitata, le correlazioni genetiche tra caratteri misurati e predetti erano comunque elevate al punto da consentire una selezione indiretta.

In Belgio sono già state sviluppate e adottate delle curve di calibrazione per la predizione del profilo acidico del latte e sono già stati avviati programmi di miglioramento genetico basati su tali metodiche.

Per la Pezzata Rossa Italiana sono recentemente state sviluppate delle calibrazioni per la predizione del contenuto relativo dei principali acidi grassi del latte. Non si conoscono ancora le correlazioni genetiche esistenti tra i contenuti relativi degli acidi grassi misurati e quelli predetti tramite tecniche MIR. In Italia questo risulta essere il primo tentativo di utilizzo della spettroscopia MIR per la predizione del profilo acidico del latte.

2. OBIETTIVI

Il grasso del latte contiene un'elevata porzione di acidi grassi saturi (circa il 70%), che incrementano il rischio di patologie cardiovascolari. Numerosi studi hanno riportato l'esistenza di variabilità genetica nel profilo acido del latte e questo permette l'attuazione di programmi di selezione con lo scopo di aumentare la frazione di acidi grassi positivi per la salute umana a scapito di quelli dannosi. Il maggior ostacolo al raggiungimento di tale scopo consiste nell'impossibilità di applicare l'attuale metodica di analisi degli acidi grassi del latte (gas-cromatografia) ad un'intera popolazione bovina al fine di stimare il valore genetico degli animali.

Per la Pezzata Rossa Italiana sono già state sviluppate delle calibrazioni MIR per la predizione del contenuto relativo dei principali acidi grassi del latte, ma non si conoscono ancora le correlazioni genetiche esistenti tra i contenuti relativi degli acidi grassi misurati e quelli predetti tramite tecnica MIR. Queste informazioni sono fondamentali per valutare i possibili interventi di miglioramento genetico.

Gli obiettivi di questa tesi perciò sono i seguenti:

- Stimare i parametri genetici dei principali acidi grassi del latte misurati tramite gas-cromatografia e predetti attraverso la spettroscopia nel medio infrarosso;
- Stimare la correlazione genetica tra i principali acidi grassi misurati tramite gas-cromatografia e predetti attraverso la spettroscopia nel medio infrarosso.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Campionamento

Il presente studio è stato condotto su 768 bovine allevate in 16 aziende del Friuli Venezia Giulia. Le bovine erano per la maggior parte (625) di razza Pezzata Rossa Italiana e in minima parte incroci. Tra febbraio e luglio 2013 i controllori dell'Associazione Allevatori Friuli Venezia Giulia (AAFVG, Codroipo, Udine) hanno prelevato per ciascuna bovina due campioni di latte da 50 ml, proveniente dalla mungitura della mattina. A ciascun campione, al momento del prelievo, è stata addizionata una dose di conservante (Bronopol, 2-bromo-2-nitropropan-1,3-diol, 0.35 ml, 0.6:100 v/v; Grunenthal Prodotti & Farmaceutici Formenti, Milano,) al fine di ridurre la crescita microbica. Un campione è stato trasferito al laboratorio del Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione dell'Università di Padova per la determinazione del profilo acidico tramite GC, mentre l'altro è stato avviato all'acquisizione dello spettro MIR presso l'AAFVG.

3.2 Determinazione del profilo acidico

3.2.1 Separazione del grasso

La separazione del grasso dalle restanti componenti del latte è stata effettuata mediante un sistema di estrazione accelerata con solvente (Thermo Scientific™ Dionex™ ASE™ 350 Accelerated Solvent Extractor). Sono state utilizzate specifiche celle di estrazione con diametro di 22 mm riempite con Hydromatrix (terra di diatomee, pH 10, Phenomenex) e 4 ml di campione. È stato utilizzato un metodo di estrazione specifico per il latte che lavora a 120°C e utilizza come solvente una soluzione di etere di petrolio e 2-propanolo in rapporto 2:1.

Una volta avvenuta l'estrazione, la vial contenente grasso e solvente è stata sottoposta ad essiccazione sotto flusso di azoto ad una temperatura di 45°C (Dionex SE 500) con lo scopo di eliminare completamente il solvente utilizzato per l'estrazione e recuperare la sola frazione lipidica. Infine le vial sono state poste per 15-20 min in deumidificatori in modo da eliminare tutta l'umidità residua.

3.2.2 Trans-esterificazione degli acidi grassi

Dalle vial sono stati prelevati 40 mg di grasso e poi aggiunti 2 ml di standard interno (methyl 12-trideconate C13:1 diluito in n-eptano 0.6 mg/ml) e 100 µl di sodio metossido 1M. I campioni sono stati messi in agitazione per 20 min in modo da far avvenire la reazione di trans-esterificazione dei grassi, dopo di che sono stati aggiunti 150 µl di reagente di terminazione (1g di acido ossalico in 30 ml di etere etilico) e 4 ml di acqua deionizzata. Il campione è stato poi centrifugato per 5 min a 4°C e ad una velocità di 5,000 rpm. Infine sono stati prelevati 1.4 ml di surnatante da sottoporre a gas-cromatografia.

3.2.3 Determinazione gascromatografica a due dimensioni

Gli acidi grassi del latte sono stati separati utilizzando un gas-cromatografo 7890 A (Agilent Technologies, USA) dotato di un rivelatore FID, di un iniettore automatico 7693 (Agilent Technologies, USA) e di un software specifico per l'acquisizione dei dati provenienti dall'analisi GCxGC (Gc ChemStation, Agilent Technologies).

Gli acidi grassi sono stati separati con due differenti colonne capillari, la prima di 75 m × 0.18 mm (Supelco Analytical, Bellefonte, PA) mentre la seconda di 3.50 m × 0.25 mm (Agilent technologies).

L'iniettore split e il FID sono stati impostati per operare ad una temperatura crescente che aumenta da 50°C (temperatura di iniezione) a 240°C ed il volume di iniezione è stato di 1 µl.

In una gas-cromatografia a due dimensioni le componenti di una miscela attraversano due differenti colonne: ciascun picco attraversa la prima colonna, rimane intrappolato da un'appropriata interfaccia chiamata "modulatore" e successivamente viene rilasciato nella seconda colonna.

Il risultato è un cromatogramma che, invece di essere costituito da picchi, si presenta come una serie di macchie chiamate "blob" la cui superficie varia in base al volume dell'acido grasso presente nel campione analizzato.

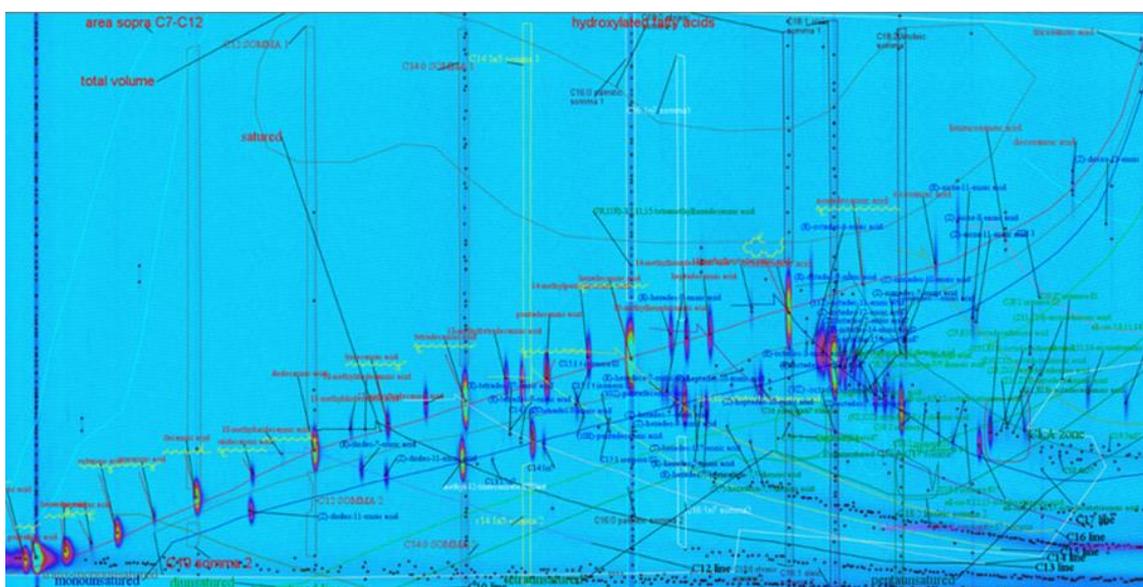
Per calibrare il gas-cromatografo è stata utilizzata una soluzione di standard di esteri metilici degli acidi grassi (FAME C4-C24, LIPID STANDARD, Nu-check Prep product n. 463, purezza ≥ 98.5%) ed inoltre due standard differenti per gli acidi grassi coniugati: methyl 9 cis 11 trans conjugated (purezza > 90%) e methyl 10 trans 12 cis conjugated linoleate (purezza >90%), entrambi forniti dalla Nu-check Prep. A questi si va a sommare il methyl 12-trideconate utilizzato come standard interno. Per preparare le

soluzioni madre degli standard, gli standard degli esteri metilici di ogni singolo acido grasso sono stati disciolti in n-eptano e mantenuti a 4°C fino al momento dell'utilizzo.

3.2.4 Lettura ed espressione dei risultati

Per l'analisi del cromatogramma (Figura 2) è stato utilizzato un software specifico, GC Images 2.2 (Zoex Corporation, Lincoln, NE, USA). Tale programma utilizza un apposito modulo (template) che permette di identificare i singoli acidi grassi del campione, riconosciuti confrontando i tempi di ritenzione con quelli degli acidi grassi presenti nella miscela di standard, e fornisce il corrispondente volume calcolato in rapporto con lo standard interno.

Figura 2. Cromatogramma GCxGC di un campione di latte



3.2.5 Definizione dei caratteri

A partire da tutti gli acidi grassi che sono stati individuati attraverso l'analisi al GC (circa 150), per lo sviluppo delle calibrazioni sono stati presi in considerazione esclusivamente quelli che erano presenti in quantità superiore all'1% (ad esclusione dei CLA e degli $\omega 3$ che sono stati presi in considerazione per la loro importanza nutrizionale).

In particolare, i caratteri studiati sono stati:

- La somma di tutti gli acidi grassi saturi dal C4:0 al C24:0 (SFA), la somma dei monoinsaturi (MUFA) e la somma dei polinsaturi (PUFA);
- La somma di tutti gli acidi grassi $\omega 3$ e quella di tutti gli $\omega 6$;

- La somma di tutti gli acidi grassi con lunghezza della catena compresa tra 4 e 10 atomi di carbonio (**SC_fa**);
- La somma di tutti gli acidi grassi con lunghezza della catena compresa tra 12 e 16 atomi di carbonio (**MC_fa**);
- La somma di tutti gli acidi grassi con lunghezza della catena compresa tra 18 e 24 atomi di carbonio (**LC_fa**);
- Tra gli acidi grassi saturi sono stati considerati singolarmente il C4:0, C6:0, C8:0, C10:0, C12:0, C14:0, C16:0, C18:0;
- Tra gli acidi grassi insaturi sono stati considerati singolarmente il C18:1 n9 e il C18:2 n6;
- La somma dei C14:1 (C14:1n6 trans + C14:1n5 trans + C14:1n7 + C14:1n5 cis + C14:1n) (**C14:1**);
- La somma dei C16:1 (C16:1trans:isomero2 + C16:1n7 trans + C16:1:isomero3 + C16:1n9 + C16:1n7 cis + C16:1cis:isomero1 + C16:1n5 cis + C16:1cis:isomero3) (**C16:1**);
- La somma dei C18:1 (C18:1n15 trans + C18:1n12 trans + C18:1n9 trans + C18:1n7 trans + C18:1n9cis + C18:1n7 cis + C18:1n6 + C18:1n4 cis + C18:1n3 cis + C18:1cis:isomero3) (**C18:1**);
- La somma dei C18:2 (C18:2 trans9 trans12 + C18:2:isomero02 + C18:2 isomero + C18:2trans11cis15 + C18:2n6 + C18:2:isomero1 + C18:2:isomero2 + C18:2:isomero3 + C18:2:isomero4) (**C18:2**);
- La somma degli acidi grassi coniugati dell'acido linoleico (**CLAtot**) (C18:2 cis9 trans11 + C18:2 cis11 trans13 + C18:2 cis9 cis11 + C18:2 trans10 cis12 + C18:2 cis11 cis13 + C18:2 trans11 trans13) e singolarmente il C18:2 cis9 cis11 (**CLA9_11**);
- Il rapporto SFA/UFA e quello MUFA/PUFA;
- Il rapporto tra la somma dei monoinsaturi C14:1 e il corrispettivo saturo C14:0 (**InsC14**);
- Il rapporto tra la somma dei monoinsaturi C16:1 e il corrispettivo saturo C16:0 (**InsC16**);
- Il rapporto tra la somma dei monoinsaturi C18:1 e il corrispettivo saturo C18:0 (**InsC18**).

3.3 Acquisizione spettri MIR e calibrazioni

Presso il Laboratorio Latte dell'AAFVG, tutti i campioni di latte prelevati durante il controllo funzionale sono stati analizzati con un MilkoScanTM FT 6000 (Foss Electric A/S, Hillerod), uno spettrofotometro ad alte prestazioni FTIR (Fourier Transform InfraRed). Tale spettrofotometro usa un interferometro che lavora nella regione del MIR con valori compresi tra 1,000 e 5,000 cm^{-1} e impostato in modalità di trasmittanza. Gli spettri sono stati registrati in un database ed infine inviati all'Università degli Studi di Padova per essere elaborati.

Per predire la composizione sia quantitativa che qualitativa in acidi grassi del latte a partire esclusivamente dagli spettri è stata sviluppata un'equazione di calibrazione nella prima fase del progetto di ricerca. Lo sviluppo di tale equazione è avvenuto attraverso il software WinISI III (Infrasoft International Inc., State College, PA), tramite una regressione multivariata MPLS (modified partial least square regression), utilizzando lo spettro derivatizzato nell'intervallo di lunghezze d'onda da 1,000 a 3,830 cm^{-1} .

In Tabella 1 sono riportati i parametri statistici delle equazioni di predizione ottenute per i contenuti in acidi grassi, espressi in g/100g di grasso, sviluppate utilizzando la totalità dei campioni analizzati.

Dalla Tabella 1 risulta evidente come gli SFA risultassero la frazione prominente del grasso del latte, con un valore in media del 73%, i MUFA invece rappresentassero il 21% e i PUFA il 4%.

In generale R^2 è risultato abbastanza elevato per tutti i caratteri misurati, ad eccezione della somma dei CLA, dei C14:1 e dei C16:1. La capacità predittiva delle equazioni di calibrazione relative alla somma degli SFA, dei MUFA e dei C18:1, così come quelle relative al C10:0 e al C12:0 era buona, con valori di R^2 superiori a 0.8. Anche alcuni acidi grassi presenti in quantità molto basse erano stati predetti con un'accuratezza piuttosto alta, al contrario di quanto riportato in studi precedenti condotti da altri autori (Soyeurt et al., 2006).

Infine per tutti gli acidi grassi si sono ottenuti RPD superiori a 1 e addirittura, per un buon numero di acidi grassi, come ad esempio il C18:1 n9 o la somma degli SFA, dei MUFA e dei C18:1, si sono osservati valori superiori a 2.

Tabella 1. Parametri statistici stimati per le equazioni di calibrazione sviluppate per il profilo acido (gli acidi grassi sono espressi in g/100g di grasso).

FAME ¹	N ²	Media	DS	SEcv	R ² cv	RPD ³
SFA	729	73.42	3.71	1.35	0.87	2.74
MUFA	720	21.28	2.82	0.96	0.88	2.94
PUFA	733	3.84	0.78	0.40	0.73	1.94
ω3	723	0.66	0.16	0.09	0.69	1.80
ω6	740	2.44	0.63	0.33	0.72	1.89
SC_fa	720	11.51	1.41	0.87	0.62	1.62
MC_fa	722	58.91	4.56	2.04	0.80	2.23
LC_fa	731	28.22	4.45	1.91	0.82	2.34
C4:0	734	3.26	0.53	0.31	0.65	1.68
C6:0	722	2.38	0.32	0.18	0.68	1.76
C8:0	736	1.50	0.16	0.08	0.79	2.16
C10:0	739	3.63	0.51	0.22	0.81	2.28
C12:0	737	4.30	0.68	0.27	0.85	2.55
C14:0	740	13.40	1.27	0.67	0.72	1.88
C14:1	733	1.04	0.26	0.20	0.40	1.29
C16:0	738	32.87	3.35	1.80	0.71	1.87
C16:1	744	2.11	0.38	0.28	0.48	1.38
C18:0	739	6.08	1.46	0.81	0.70	1.81
C18:1	728	16.97	2.77	1.00	0.87	2.77
C18:1n9	731	14.53	2.46	0.96	0.85	2.55
C18:2	736	2.77	0.60	0.32	0.72	1.90
C18:2n6	741	1.78	0.52	0.27	0.73	1.94
CLAtot	724	0.46	0.12	0.08	0.48	1.39
CLA9_11	735	0.32	0.08	0.06	0.50	1.41
SFA/UFA	730	2.97	0.50	0.18	0.87	2.77
MUFA/PUFA	742	5.67	1.03	0.64	0.61	1.61
InsC14	735	0.08	0.02	0.02	0.19	1.11
InsC16	739	0.06	0.01	0.01	0.61	1.61
InsC18	735	2.84	0.52	0.30	0.66	1.72

¹Tutti gli acidi grassi sono espressi in percentuale sul grasso totale;

SFA= acidi grassi saturi dal C4 al C24;

MUFA= acidi grassi monoinsaturi;

PUFA=acidi grassi polinsaturi;

SC_fa=acidi grassi a corta catena;

MC_fa=acidi grassi a media catena;

LC_fa=acidi grassi a lunga catena;

C14:1=C14:1n6 trans + C14:1n5 trans + C14:1n7 + C14:1n5 cis + C14:1n;

C16:1=C16:1trans:isomero2 + C16:1n7 trans + C16:1:isomero3 + C16:1n9 + C16:1n7 cis + C16:1cis:isomero1 + C16:1n5 cis + C16:1cis:isomero3;

C18:1=C18:1n15 trans + C18:1n12 trans + C18:1n9 trans + C18:1n7 trans + C18:1n9cis + C18:1n7 cis + C18:1n6 + C18:1n4 cis + C18:1n3 cis + C18:1cis:isomero3;

C18:2=C18:2 trans9 trans12 + C18:2:isomero02 + C18:2 isomero + C18:2trans11cis15 + C18:2n6 + C18:2:isomero1 + C18:2:isomero2 + C18:2:isomero3 + C18:2:isomero4;

CLAtot=coniugati dell'acido linoleico (C18:2 cis9 trans11+ C18:2 cis11 trans13 + C18:2 cis9 cis11+ C18:2 trans10 cis12+ C18:2 cis11 cis13+ C18:2 trans11 trans13);

CLA9_11=C18:2 cis9 cis11;

InsC14=C14:1/C14;

InsC16=C16:1/C16;

InsC18=C18:1/C18;

² Numero di campioni dopo l'eliminazione degli outliers

³RPD= residual predictive deviation =DS/SEcv

3.4 Analisi statistica

I parametri genetici dei caratteri oggetto di studio sono stati stimati tramite analisi bivariate che includevano per ogni acido grasso o somma di acidi grassi il valore misurato e il rispettivo valore predetto. L'analisi è stata effettuata utilizzando un modello lineare che includeva l'effetto random dell'azienda (15 livelli) e l'effetto random dell'animale (effetto genetico additivo). La stima delle componenti di varianza è stata effettuata con il metodo REML (Restricted Maximum Likelihood) utilizzando un animal model tramite l'uso del software VCE (Groenvelde, 1998). Il pedigree utilizzato comprendeva 8,934 animali dei quali 625 con informazione fenotipica.

L'ereditabilità di ciascuna variabile oggetto di studio è stata calcolata nel seguente modo:

$$h^2 = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_a^2 + \sigma_h^2 + \sigma_e^2}$$

dove σ_a^2 è la varianza genetica additiva, σ_h^2 è la varianza allevamento e σ_e^2 è la varianza residua.

La correlazione genetica predetto-misurato è stata calcolata nel seguente modo:

$$r_a = \frac{\sigma_{a1,a2}}{\sigma_{a1} \cdot \sigma_{a2}}$$

dove $\sigma_{a1,a2}$ è la covarianza genetica tra i caratteri 1 e 2 (carattere predetto e misurato, rispettivamente), σ_{a1} e σ_{a2} sono le deviazioni standard genetica additive dei caratteri 1 e 2, rispettivamente.

La correlazione fenotipica predetto-misurato è stata calcolata nel seguente modo:

$$r_p = \frac{\sigma_{p1,p2}}{\sigma_{p1} \cdot \sigma_{p2}}$$

dove $\sigma_{p1,p2}$ è la covarianza fenotipica tra i caratteri 1 e 2 (carattere predetto e misurato, rispettivamente), σ_{p1} e σ_{p2} sono le deviazioni standard fenotipiche dei caratteri 1 e 2, rispettivamente.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Statistiche descrittive

In Tabella 2 sono riportati i valori relativi a media, valore minimo e massimo e coefficiente di variazione (**CV**) per singoli acidi grassi e gruppi di acidi grassi misurati attraverso gas-cromatografia e predetti mediante spettroscopia MIR.

Come atteso, la frazione preminente del grasso del latte era costituita dagli SFA con un valore in media del 73%; i MUFA rappresentavano invece il 21% e i PUFA circa il 4%.

Tra gli SFA l'acido grasso maggiormente presente era il C16:0 che da solo rappresentava circa il 33% dei FAME presenti nei campioni. Tra i MUFA invece il più rappresentato era il C18:1 n9 (acido oleico) con circa il 15%.

Le percentuali di SFA riscontrate da Stoop in uno studio condotto nel 2009 risultavano simili a quelle riscontrate nel nostro progetto di ricerca (74%) mentre l'acido oleico era presente in quantità superiore (18%).

Invece in uno studio condotto su bovine di razza Pezzata Rossa (Gallon, 2011), le percentuali di SFA risultavano inferiori (69%) mentre quelle dei MUFA notevolmente superiori (26%). Questo viene anche dimostrato dal fatto che il C16:0 rappresentava meno del 30% dei FAME, mentre il C18:1 n9 costituiva il 19%. Una delle possibili cause può essere il periodo di raccolta dei campioni: il campionamento nello studio citato si svolgeva gran parte nel periodo estivo ed è stato dimostrato che il cambiamento della dieta delle bovine in tale periodo porta ad una variazione della composizione del grasso del latte (Heck et al., 2009).

Confrontando le medie misurate con quelle predette tramite tecnica MIR, possiamo notare come risultassero molto simili ad eccezione degli SC_fa e MC_fa. Questo dimostra che le calibrazioni da noi sviluppate avevano una buona capacità predittiva per tutti i FAME ad eccezione dei gruppi di acidi grassi sopra citati; gli SC_fa non si sono potuti predire in maniera precisa ($R^2cv=0.62$), mentre gli MC_fa si sono potuti predire con un'accuratezza superiore ($R^2cv=0.80$), ma per entrambi i valori predetti si sono discostati di circa 5 punti percentuali dai valori misurati.

Tabella 2. Statistiche descrittive dei caratteri misurati e predetti mediante spettroscopia MIR.

FAME ¹	Misurato				Predetto			
	Media	CV, %	Minimo	Massimo	Media	CV, %	Minimo	Massimo
SFA	73.55	4	62.68	82.72	73.43	4	59.18	82.10
MUFA	21.22	12	14.47	33.23	21.36	12	15.32	32.53
PUFA	3.83	19	2.22	6.06	3.84	18	2.18	6.38
ω3	0.69	30	0.26	1.64	0.65	19	0.38	1.09
ω6	2.45	25	1.32	4.22	2.44	22	1.07	4.23
SC_fa	16.85	16	10.85	33.40	11.50	10	7.34	14.40
MC_fa	53.82	7	40.53	64.66	58.93	6	45.49	70.11
LC_fa	28.11	14	16.96	41.39	28.15	13	17.23	43.29
C4:0	3.27	17	1.61	5.23	3.26	14	1.72	5.09
C6:0	2.40	14	1.33	3.73	2.38	11	1.42	3.14
C8:0	1.50	10	1.04	1.98	1.50	9	0.92	1.94
C10:0	3.64	13	2.23	5.30	3.62	12	1.83	5.09
C12:0	4.31	15	2.44	6.62	4.30	14	1.95	6.24
C14:0	13.39	9	9.70	16.66	13.37	8	8.51	16.20
C14:1	1.03	25	0.31	2.21	1.03	18	0.29	2.06
C16:0	32.81	10	23.65	41.44	32.95	8	23.62	41.97
C16:1	2.09	18	1.12	3.74	2.10	14	1.17	3.47
C18:0	6.12	23	2.78	11.64	6.05	21	1.60	10.77
C18:1	16.94	15	10.33	28.24	16.98	14	10.48	28.07
C18:1 n9	14.56	16	8.74	25.46	14.56	15	8.69	24.64
C18:2	2.79	21	1.56	4.48	2.78	19	1.32	4.59
C18:2 n6	1.80	28	0.88	3.30	1.78	26	0.64	3.35
CLAtot	0.47	26	0.20	0.90	0.47	19	0.02	0.74
CLA9_11	0.33	26	0.16	0.71	0.32	20	0.05	0.58
SFA/UFA	2.99	16	1.69	4.81	2.97	15	1.07	4.16
MUFA/PUFA	5.67	18	3.16	9.46	5.67	15	3.11	8.73
InsC14	0.08	23	0.03	0.15	0.08	12	0.05	0.13
InsC16	0.06	18	0.04	0.12	0.06	15	0.04	0.10
InsC18	2.86	19	1.47	4.57	2.85	16	1.28	4.10

¹Tutti gli acidi grassi sono espressi in percentuale sul grasso totale;

SFA= acidi grassi saturi dal C4 al C24;

MUFA= acidi grassi monoinsaturi;

PUFA=acidi grassi polinsaturi;

SC_fa=acidi grassi a corta catena;

MC_fa=acidi grassi a media catena;

LC_fa=acidi grassi a lunga catena;

C14:1=C14:1n6 trans + C14:1n5 trans + C14:1n7 + C14:1n5 cis + C14:1n;

C16:1=C16:1trans:isomero2 + C16:1n7 trans + C16:1:isomero3 + C16:1n9 + C16:1n7 cis + C16:1cis:isomero1 + C16:1n5 cis + C16:1cis:isomero3;

C18:1=C18:1n15 trans + C18:1n12 trans + C18:1n9 trans + C18:1n7 trans + C18:1n9cis + C18:1n7 cis + C18:1n6 + C18:1n4 cis + C18:1n3 cis + C18:1cis:isomero3;

C18:2=C18:2 trans9 trans12 + C18:2:isomero02 + C18:2 isomero + C18:2trans11cis15 + C18:2n6 + C18:2:isomero1 + C18:2:isomero2 + C18:2:isomero3 + C18:2:isomero4;

CLAtot=coniugati dell'acido linoleico (C18:2 cis9 trans11+ C18:2 cis11 trans13 + C18:2 cis9 cis11+ C18:2 trans10 cis12+ C18:2 cis11 cis13+ C18:2 trans11 trans13);

CLA9_11=C18:2 cis9 cis11;

InsC14=C14:1/C14;

InsC16=C16:1/C16;

InsC18=C18:1/C18.

Il CV misurato evidenziava una certa variabilità fra gli animali nella composizione del grasso del latte. I valori di CV per i caratteri misurati andavano dal 9% del C14:0 al 28% del C18:2 n6. Un basso CV è stato riscontrato nella maggior parte degli acidi grassi saturi (4%) mentre un alto coefficiente era presente nella maggior parte degli acidi grassi insaturi a 18 atomi di carbonio non coniugati, probabilmente dovuto al fatto che questi ultimi sono maggiormente influenzati dalla dieta e perciò presentano maggiore variabilità fenotipica. CV simili sono stati riportati anche da Stoop (2009). Facendo poi il confronto con i valori predetti, si è potuto notare come la variabilità delle predizioni fosse sempre più bassa di quella dei misurati; questo può essere motivato dal fatto che le calibrazioni, non essendo perfette, predicono difficilmente i valori estremi ottenuti e riducono così la variabilità dei caratteri.

4.2 Componenti di varianza e correlazione genetica

In Tabella 3 sono presenti tutti i valori di varianza genetica additiva, di varianza residua, di ereditabilità (h^2) dei caratteri misurati e predetti con spettroscopia MIR e i valori di correlazione genetica (r_a) stimata tra carattere predetto e misurato.

Per alcuni caratteri (come ad esempio i MUFA, il C14:0 e il C18:1), la varianza genetica additiva dei valori misurati è risultata superiore rispetto a quella dei predetti, mentre per altri (come ad esempio gli SFA, gli MC_fa e il C16:0) è avvenuto il contrario. Questo invece non si è verificato in uno studio condotto da Cecchinato et al. (2009) sulle proprietà coagulative del latte, nel quale tutti i valori di varianza genetica additiva dei caratteri predetti risultavano essere sempre leggermente più bassi rispetto a quelli dei caratteri misurati.

I valori di h^2 stimati per i caratteri misurati risultavano da molto bassi a moderati, infatti andavano da 0.00 a 0.32 con un errore standard che oscillava tra lo 0.00 e lo 0.14. Buoni valori di h^2 sono stati riscontrati per gli SFA e i MUFA (0.24 e 0.28, rispettivamente), mentre bassi valori sono stati osservati per i PUFA (0.04). Allo stesso modo il rapporto SFA/UFA presentava valori di h^2 moderati, mentre il rapporto MUFA/PUFA risultava essere scarsamente ereditabile.

Lo studio condotto da Gallon (2011) mostrava valori di h^2 per SFA e MUFA minori (0.06 per entrambe le somme), mentre maggiori per i PUFA (0.08).

Valori ancora più bassi sono stati presentati da Bobe et al. (2008), tuttavia lo studio è stato basato su campioni di latte ripetuti prelevati da un numero limitato di animali (233), in un unico allevamento con una matrice di parentela di 2 generazioni, che ha portato a grandi errori standard delle stime.

Tabella 3. Varianza genetica additiva (σ^2_a), varianza residua (σ^2_e), ereditabilità (h^2) dei principali acidi grassi e gruppi di acidi grassi misurati e predetti e correlazione genetica (r_a) tra valori misurati e predetti (\pm errore standard).

FAME ¹	Misurato			Predetto			r_a
	σ^2_a	σ^2_e	h^2	σ^2_a	σ^2_e	h^2	
SFA	2.89±0.50	4.50±0.55	0.24±0.03	3.30±0.51	3.63±0.50	0.31±0.03	1.00±0.00
MUFA	2.26±1.02	3.65±0.88	0.28±0.12	1.94±0.78	3.30±0.71	0.27±0.11	1.00±0.00
PUFA	0.02±0.02	0.17±0.01	0.04±0.03	0.00±0.00	0.08±0.00	0.01±0.03	1.00±0.00
ω 3	0.78±0.12	0.75±0.41	0.00±0.00	0.84±0.44	0.23±0.33	0.06±0.03	0.89±5.68
ω 6	0.02±0.99	0.08±0.01	0.05±0.03	0.01±0.93	0.08±0.01	0.05±0.04	1.00±0.00
SC_fa	0.10±0.18	6.11±0.36	0.01±0.02	0.24±0.10	0.49±0.08	0.17±0.07	0.99±0.01
MC_fa	1.28±0.89	8.08±0.93	0.07±0.06	3.14±1.40	5.49±1.27	0.20±0.09	0.77±0.18
LC_fa	3.34±1.57	8.15±1.43	0.19±0.09	3.76±1.54	5.95±1.34	0.25±0.10	0.99±0.04
C4:0	0.01±0.01	0.13±0.01	0.03±0.04	0.03±0.01	0.07±0.01	0.16±0.08	1.00±0.00
C6:0	0.01±0.59	0.05±0.62	0.08±0.05	0.01±0.52	0.03±0.43	0.22±0.08	0.98±0.02
C8:0	0.60±0.19	0.01±0.18	0.23±0.06	0.62±0.16	0.01±0.14	0.29±0.06	1.00±0.00
C10:0	0.04±0.02	0.14±0.02	0.18±0.09	0.05±0.02	0.10±0.02	0.23±0.10	1.00±0.00
C12:0	0.07±0.04	0.26±0.04	0.17±0.10	0.07±0.04	0.21±0.04	0.18±0.11	1.00±0.00
C14:0	0.44±0.14	0.72±0.13	0.29±0.09	0.18±0.06	0.70±0.07	0.15±0.05	0.97±0.06
C14:1	0.02±0.91	0.04±0.83	0.31±0.12	0.00±0.54	0.02±0.51	0.14±0.15	0.86±0.27
C16:0	0.76±0.62	6.01±0.67	0.07±0.06	1.12±0.66	3.98±0.61	0.14±0.08	0.63±0.26
C16:1	0.04±0.02	0.06±0.01	0.27±0.11	0.01±0.01	0.04±0.01	0.17±0.10	0.85±0.13
C18:0	0.20±0.08	1.04±0.09	0.09±0.04	0.23±0.09	0.60±0.09	0.14±0.07	0.68±0.20
C18:1	2.07±0.73	3.28±0.64	0.29±0.10	1.87±0.61	2.98±0.56	0.30±0.10	1.00±0.01
C18:1 n9	1.87±0.49	2.68±0.45	0.32±0.07	1.60±0.40	2.31±0.36	0.32±0.07	1.00±0.00
C18:2	0.02±0.01	0.10±0.01	0.07±0.04	0.01±0.01	0.09±0.01	0.04±0.03	1.00±0.00
C18:2 n6	0.01±0.72	0.05±0.70	0.05±0.03	0.01±0.65	0.05±0.64	0.05±0.03	1.00±0.00
CLAtot	0.79±0.72	0.87±0.82	0.05±0.04	0.86±0.44	0.27±0.40	0.11±0.06	0.30±0.45
CLA9_11	0.33±0.32	0.32±0.36	0.04±0.04	0.27±0.25	0.19±0.26	0.06±0.06	0.10±0.65
SFA/UFA	0.06±0.02	0.12±0.02	0.23±0.09	0.06±0.02	0.08±0.02	0.31±0.10	0.99±0.03
MUFA/PUFA	0.06±0.05	0.36±0.05	0.06±0.05	0.05±0.04	0.24±0.04	0.07±0.06	1.00±0.00
InsC14	0.84±0.36	0.22±0.35	0.25±0.11	0.22±0.95	0.48±0.97	0.24±0.10	0.05±0.40
InsC16	0.41±0.19	0.67±0.17	0.31±0.14	0.32±0.12	0.39±0.10	0.34±0.12	0.95±0.06
InsC18	0.08±0.03	0.12±0.03	0.28±0.11	0.06±0.02	0.07±0.02	0.28±0.10	0.85±0.08

¹Tutti gli acidi grassi sono espressi in percentuale sul grasso totale;

SFA= acidi grassi saturi dal C4 al C24;

MUFA= acidi grassi monoinsaturi;

PUFA=acidi grassi polinsaturi;

SC_fa=acidi grassi a corta catena;

MC_fa=acidi grassi a media catena;

LC_fa=acidi grassi a lunga catena;

C14:1=C14:1n6 trans + C14:1n5 trans + C14:1n7 + C14:1n5 cis + C14:1n;

C16:1=C16:1trans:isomero2 + C16:1n7 trans + C16:1:isomero3 + C16:1n9 + C16:1n7 cis + C16:1cis:isomero1 + C16:1n5 cis + C16:1cis:isomero3;

C18:1=C18:1n15 trans + C18:1n12 trans + C18:1n9 trans + C18:1n7 trans + C18:1n9cis + C18:1n7 cis + C18:1n6 + C18:1n4 cis + C18:1n3 cis + C18:1cis:isomero3;

C18:2=C18:2 trans9 trans12 + C18:2:isomero02 + C18:2 isomero + C18:2trans11cis15 + C18:2n6 + C18:2:isomero1 + C18:2:isomero2 + C18:2:isomero3 + C18:2:isomero4;

CLAtot=coniugati dell'acido linoleico (C18:2 cis9 trans11+ C18:2 cis11 trans13 + C18:2 cis9 cis11+ C18:2 trans10 cis12+ C18:2 cis11 cis13+ C18:2 trans11 trans13);

CLA9_11=C18:2 cis9 cis11;

InsC14=C14:1/C14;

InsC16=C16:1/C16;

InsC18=C18:1/C18.

Al contrario, valori molto più elevati di h^2 sono stati riportati negli studi condotti da Stoop (2009); Mele et al. (2009) hanno ipotizzato che poiché Stoop ha utilizzato solo vacche primipare tra 63 e 263 d di lattazione, una maggiore omogeneità degli effetti ambientali possa essere la principale ragione di questi risultati.

Nello studio condotto da Soyeurt et al. (2007) la predizione della composizione del grasso del latte era stata effettuata mediante spettroscopia MIR; i valori di h^2 delle predizioni riportati in quello studio risultavano in linea con quelli ottenuti nel presente studio per MUFA, C14:0 e C16:0, ma sostanzialmente diversi per SFA, C12:0, C18:0 e C18:1 probabilmente a causa del fatto che sono state prese in considerazione razze diverse e che le predizioni sono state ottenute utilizzando calibrazioni diverse (con diverse capacità predittive).

Valori di h^2 riportati da Mele et al. (2009) per quanto riguarda i singoli SFA, invece, sono risultati molto più bassi rispetto a quelli del presente studio.

Nel presente studio il valore di h^2 dei caratteri misurati è risultato superiore rispetto a quello delle rispettive predizioni per i PUFA, C14:0, C14:1 e C16:1, mentre è risultato inferiore per SFA, ω_3 , SC_fa, MC_fa, C4:0, C6:0, C16:0, C18:0 e CLA totali. Per tutti gli acidi grassi insaturi a 18 atomi di carbonio non coniugati, gli ω_6 , il C8:0, C10:0 e C12:0 i valori di h^2 stimati nei misurati e nei predetti invece erano molto simili.

In uno studio condotto da Cecchinato et al., (2009) sulle proprietà coagulative del latte, i valori di h^2 dei caratteri predetti mediante spettroscopia MIR risultavano sempre più elevati rispetto a quelli stimati per i caratteri misurati analiticamente e questo risultato è stato spiegato da una consistente riduzione della varianza ambientale dei caratteri predetti, la quale ha portato ad un aumento dell'ereditabilità. In uno studio successivo, sempre condotto da Cecchinato et al., (2011) su alcuni caratteri di qualità della carne, la relazione tra i valori di h^2 stimati per i caratteri misurati e quelli stimati per le rispettive predizioni non è risultata invece così chiara.

Per poter fare selezione genetica per un carattere è fondamentale valutare sia la variabilità genetica del carattere stesso ma anche la correlazione genetica tra il carattere obiettivo di selezione (nel nostro caso il profilo acidico predetto tramite tecnica MIR) e il carattere che si vuole effettivamente migliorare (profilo acidico misurato) attuando in questo modo una selezione indiretta.

La correlazione genetica predetto-osservato è risultata superiore al 97% per gli SFA, i MUFA e i PUFA, per gli ω_6 , per gli SC_fa e i LC_fa, per i singoli acidi grassi saturi dal C4:0 al C14:0, per gli acidi grassi insaturi a 18 atomi di carbonio non coniugati e per i rapporti SFA/UFA e MUFA/PUFA. Per questi caratteri, fare selezione indiretta basata sulle predizioni MIR risulta, quindi, una via facilmente percorribile.

La correlazione genetica predetto-osservato, invece, aveva valori tra il 77 e l'89% per gli ω_3 , gli MC_fa, il C14:1 e il C16:1; in questo caso la selezione risulterebbe quindi meno efficiente anche se comunque possibile.

Una selezione basata, invece, sul contenuto predetto di CLAtot o di CLA9_11 risulterebbe problematica poiché questi caratteri presentavano valori di h^2 piuttosto bassi (0.11 e 0.06, rispettivamente) e correlazione genetica predetto-osservato molto ridotta (0.30 e 0.10, rispettivamente). Alla luce di questi risultati, strategie di alterazione della quantità di CLA nel latte, alternative al miglioramento genetico, sembrerebbero più facilmente percorribili, come ad esempio agendo sulla dieta oppure facendo selezione sul rapporto SFA/UFA.

Anche nel caso del C16:0 ed del C18:0 fare selezione non porterebbe a risultati soddisfacenti in quanto presentavano h^2 basse (0.07 e 0.09, rispettivamente) e correlazione genetica predetto-misurato inferiore al 70%. Anche in questo caso la via alternativa potrebbe consistere nel fare selezione sugli SFA oppure sugli MC_fa o gli LC_fa che presentavano risultati molto più promettenti.

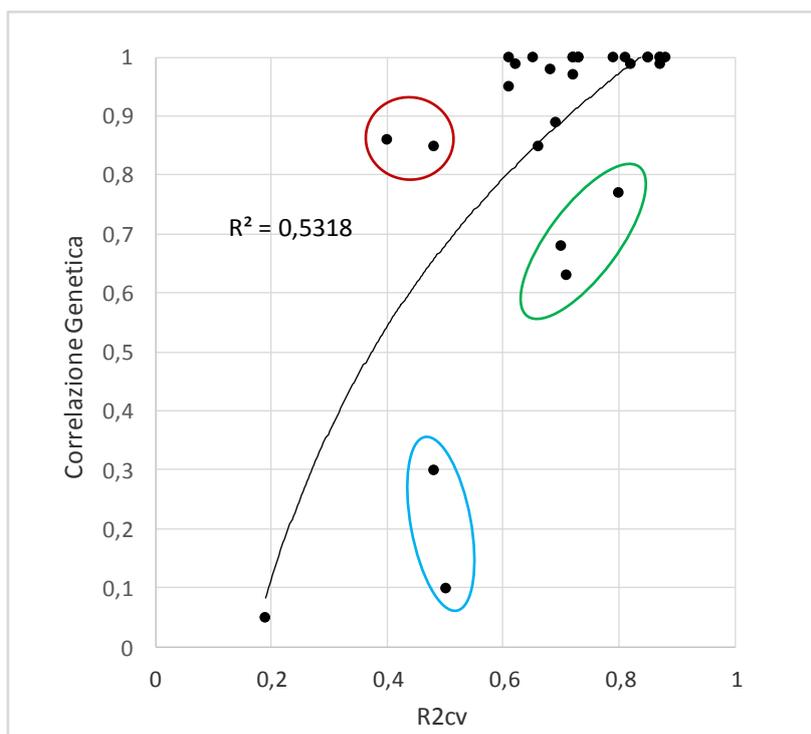
Il presente è solo uno studio preliminare, in cui lo stesso dataset è stato utilizzato sia per la calibrazione che per il calcolo delle correlazioni genetiche predetto-osservato a causa del numero limitato di campioni disponibili, di conseguenza le correlazioni genetiche predetto-osservato possono risultare leggermente sovrastimate.

Appare importante sottolineare come la predizione mediante spettroscopia MIR sia, in caso di programmi di miglioramento genetico, una metodica robusta, nonostante la correlazione genetica predetto-osservato non risulti estremamente elevata, poiché attualmente, con le tecniche analitiche in uso, la selezione risulta impossibile da attuare. Uno dei vantaggi più interessanti di tale tecnica è il fatto che viene già ampiamente utilizzata per i controlli funzionali effettuati mensilmente sulle bovine. Questo porta a non avere per ogni animale solamente un'unica misurazione del carattere obiettivo di selezione ma ad avere una predizione per ogni controllo funzionale al quale l'animale è sottoposto. Questo è un vantaggio soprattutto per quei caratteri che sono poco ripetibili poiché permette di ottenere un'ampia disponibilità di misurazioni.

Inoltre è stato possibile dedurre come la strategia migliore non sia intervenire con la selezione sui singoli acidi grassi ma su gruppi di essi poiché i risultati ottenuti risultano essere molto più incoraggianti.

4.3 Relazione tra capacità predittiva delle equazioni di calibrazione e correlazione genetica tra carattere predetto e carattere misurato

Figura 3. Relazione tra capacità predittiva delle equazioni di calibrazione (R^2_{cv}) e correlazione genetica (r_a) tra carattere predetto e carattere misurato.



----- = CLAtot, CLA9_11
----- = C16:0, C18:0, MC_fa
----- = C14:1, C16:1

In Figura 3 è rappresentato il grafico della relazione tra la capacità predittiva delle equazioni di calibrazione e la correlazione genetica tra carattere predetto e carattere misurato. L'andamento è quello di una curva logaritmica in cui la correlazione genetica appare essere positivamente, anche se debolmente, correlata con R^2_{cv} . Questo però non risulta vero per tutti i caratteri, infatti nell'ovale blu del grafico sono rappresentati i CLA mentre in quello verde sono rappresentati il C16:0, il C18:0 e gli MC_fa, per i quali la correlazione genetica è risultata più bassa rispetto a quella fenotipica. Al contrario, nell'ovale rosso sono rappresentati la somma dei C14:1 e quella dei C16:1 i quali presentavano correlazione genetica molto più alta di quella fenotipica.

Dal grafico quindi è stato possibile dedurre che se R^2_{cv} assume valori superiori a 0,60, la correlazione genetica presenta valori che vanno da medio-alti a molto alti e quindi utili per poter effettuare programmi di selezione indiretta; addirittura con valori di R^2_{cv} superiori a 0,80, la correlazione genetica è risultata prossima a 1,00. Nel caso in cui,

invece, R^2_{cv} sia inferiore a 0.60, non sempre la correlazione genetica risulta sfavorevole e quindi nel caso in cui si voglia fare selezione è sempre utile calcolare non solo R^2 ma anche la correlazione genetica.

Anche nello studio condotto da Cecchinato et al. (2011) sui caratteri di qualità della carne, l'andamento della curva è risultato molto simile a quello del presente studio, presentando comunque alcuni valori che non rispecchiavano la relazione positiva tra correlazione genetica e R^2_{cv} .

I risultati ottenuti nel presente studio sono in linea con quelli riportati anche da Rutten et al. (2010), anche se in quel caso i valori di R^2 in validazione erano tutti molto più bassi rispetto a quelli del presente studio, mostrando di conseguenza uno spostamento della curva verso sinistra.

5. CONCLUSIONI

Il seguente studio ha permesso di dimostrare come la spettroscopia MIR possa essere proposta come metodica per la predizione del profilo acidico del latte con lo scopo di attuare programmi di selezione genetica.

Il vantaggio più importante di tale tecnica è il fatto che può essere facilmente e immediatamente attuata per le popolazioni di bovine da latte poiché viene già ampiamente utilizzata per i controlli funzionali effettuati mensilmente sulle stesse bovine e quindi esiste già un'acquisizione di routine degli spettri dei campioni di latte individuale.

E' ipotizzabile che aumentando la variabilità dei campioni e di conseguenza aggiornando le calibrazioni sarà possibile perfezionare la capacità predittiva dell'equazione di calibrazione e attuare programmi di selezione molto più accurati.

Inoltre, il presente è solo uno studio preliminare in cui lo stesso dataset è stato utilizzato sia per la calibrazione che per il calcolo delle correlazioni genetiche predetto-osservato a causa del numero limitato di campioni disponibili. Di conseguenza le correlazioni genetiche predetto-osservato possono risultare leggermente sovrastimate; è già previsto in uno studio futuro di ampliare la calibrazione includendo un maggior numero di campioni e quindi di stimare la correlazione genetica predetto-osservato utilizzando un dataset diverso da quello che è stato usato per lo sviluppo dei modelli predittivi.

Studi futuri dovranno anche focalizzarsi sull'analisi della correlazione genetica esistente tra i caratteri che si vogliono migliorare e quelli che sono attualmente obiettivi di selezione in modo tale da evitare una possibile interferenza degli uni sugli altri.

BIBLIOGRAFIA

Bobe G., Minick Bormann J.A., Lindberg G.L., Freeman A.E., Beitz D.C., "Short Communication: Estimates of Genetic Variation of Milk Fatty Acids in US Holstein Cows", *Journal of Dairy Science*, 91, 2008, pp. 1209-1213

Bonfatti V., Di Martino G., and Carnier P., "Effectiveness of mid-infrared spectroscopy for the prediction of detailed protein composition and contents of protein genetic variants of individual milk of Simmental cows", *Journal of Dairy Science*, 94, 2011, pp. 5776–5785

Brown W., Poon T., "Introduzione alla chimica organica, terza edizione", Edises, Napoli, 2010

Cecchinato A., De Marchi M., Gallo L., Bittante G., Carnier P., "Mid-infrared spectroscopy predictions as indicator traits in breeding programs for enhanced coagulation properties of milk", *Journal of Dairy Science*, 92, 2009, pp. 5304-5313

Cecchinato A., De Marchi M., Penasa M., Albera A. and Bittante G., "Near-infrared reflectance spectroscopy predictions as indicator traits in breeding programs for enhanced beef quality", *Journal of Animal Science*, 89, 2011, pp. 2687-2695

De Marchi M., Penasa M., Cecchinato A., Mele M., Secchiari P., Bittante G., "Effectiveness of mid-infrared spectroscopy to predict fatty acid composition of Brown Swiss bovine milk", *The Animal consortium*, 2011, pp. 1653-1658

Gallon M., "La variabilità del profilo acidico del grasso del latte bovino: influenza di fattori genetici e non genetici" [Tesi di laurea], Legnaro, 2011, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli studi di Padova

German J. B. and Dillard C. J. "Composition, structure and absorption of milk lipids: a source of energy, fat-soluble nutrients and bio-active molecules", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 92, 2006, pp. 46-57

Grummer R. R., "Effect of feed on the composition of milk fat", *Journal of Dairy Science*, 74, 1991, pp. 3244-3257

Heck J.M.L., van Valenberg H.J.F., Dijkstra j., van Hooijdonk A.C.M., "Seasonal variation in the Dutch bovine raw milk composition", *Journal of Dairy Science*, 92, 2009, pp. 4745-4755

Karijord, Ø., N. Standal, and O. Syrstad "Sources of variation in composition of milk fat", *Z. Tierzücht. Zuchtungsbiol*, 99, 1982, pp. 81-93.

Lock A.L., Garnsworthy P.C., "Independent effects of dietary linoleic and linolenic fatty acids on the conjugated linoleic acid content of cows' milk", *Animal Science Journal*, 74, 2002, pp. 163-176

Mele M., Dal Zotto R., Cassandro M., Conte G., Serra A, Buccioni A., Bittante G, Secchiari P., "Genetic parameters for conjugated linoleic acid, selected milk fatty acids, and milk fatty acid unsaturation of Italian Holstein-Friesian cows", *Journal of Dairy Science*, 92, pp. 392-400

Noakes M., Nestel P. J., Clifton P. M., "Modifying the fatty acid profile of dairy products through feedlot technology lowers plasma cholesterol of humans consuming the products", *The American Journal of Clinical Nutrition*, 63, 1996, pp. 42-46

O'Donnel J. A., "Future of milk fat modification by production or processing integration of nutrition, food science, and animal science", *Journal of Dairy Science*, 76, 1993, pp. 1797-1801

Pellizon Birelli M., Fazio G., "La spettroscopia di assorbimento infrarosso, una tecnica analitica per la caratterizzazione chimico fisica dei materiali", *Enco - Engineering Concrete*, Ponzano Veneto (TV), 2006

Renner, E., and U. Kosmack. "Genetische Aspekte zur Fettsäurezusammensetzung des Milchfettes. 2. Fettsäuremuster der Milch von Nachkommenpopulationen", *Züchtungskunde*, 46, 1974, pp. 217-226

Rutten M. J. M., Bovenhuis H., van Arendonk J. A. M., "The effect of the number of the observations used for Fourier transform infrared model calibration for bovine milk fat composition on the estimated genetic parameters of the predicted data", *Journal of Dairy Science*, 10, 2010, pp. 4872-4882

Soyeurt H., Dardenne P., Dehareng F., Lognay G., Veselko D., Marlier M., Bertozzi C., Mayeres P., Gengler N., "Estimating fatty acid content in cow milk using mid-infrared spectrometry", *Journal of Dairy Science*, 9, 2006, pp. 3690-3695

Soyeurt H., Gillon A., Vanderick S., Mayeres P., Bertozzi C., Gengler N., "Estimation of heritability and genetic correlations for the major fatty acids in bovine milk", *Journal of Dairy Science*, 9, 2007, pp. 4435-4442

Soyeurt H., Dardenne P., Dehareng F., Bastin C., Gengler N., "Genetic parameters of saturated and monounsaturated fatty acid content and ratio of saturated to unsaturated fatty acids in bovine milk", *Journal of Dairy Science*, 9, 2008, pp. 3611-3626

Soyeurt H., Bruwier D., Romnee J. M., Gengler N., Bertozzi C., Veselko D. and Dardenne P., "Potential estimation of major mineral contents in cow milk using mid-infrared spectrometry", *Journal of Dairy Science*, 92, 2009, pp. 2444–2454

Stoop, W. M., J. A. M. van Arendonk, J. M. L. Heck, H. J. F. van Valenberg, and H. Bovenhuis "Genetic parameters for major milk fatty acids and milk production traits of Dutch Holstein-Friesians", *Journal Dairy Science*, 91, 2008, pp. 385-394.

Stoop W.M., "Genetic variation in bovine milk fat composition", PhD thesis, Wageningen University, 2009

WHO, "Follow-up to the Political Declaration of the High-level Meeting of the General Assembly on the Prevention and Control of Non-communicable Diseases", sixty-sixth world health assembly, 27 maggio 2013

William P., Norris K., "Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries", American Association of Chereal Chemists, St.Paul, MN, 2001

Williams P., "Near-infrared technology getting the best out of light", *A Short Course in the Practical Implementation of Near Infrared Spectroscopy for the User*, 1.1 ed. PDKProjects Inc., Nanaimo, Canada, 2003, p. 109