



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione

Corso di laurea magistrale in

BIOTECNOLOGIE PER L'ALIMENTAZIONE

QUALITÀ NUTRIZIONALE DEL LATTE BOVINO:
PREDIZIONE DEL PROFILO ACIDICO TRAMITE
CALIBRAZIONI MIR

Relatore: Prof. PAOLO CARNIER

Correlatore: Dott.ssa VALENTINA BONFATTI

Laureanda: BACCAN GIULIA

Matricola: 1036709

ANNO ACCADEMICO 2012/2013

RIASSUNTO

L'interesse dei consumatori per la componente di acidi grassi nel latte è in continuo aumento per i risvolti che questi hanno nella salute umana. Per la misurazione dei FAME viene utilizzata la tecnica della gascromatografia (GLC). Per quanto tale tecnica sia affidabile presenta numerosi problemi pratici, quali la tempistica, reagenti costosi e la necessità di personale specializzato.

Una valida alternativa a tale tecnica potrebbe essere la spettroscopia del medio-infrarosso (MIR): tecnica veloce, pratica e attualmente già in uso per il controllo funzionale nelle bovine iscritte al libro genealogico.

Obiettivo di tale studio era di andare ad effettuare una calibrazione MIR per la predizione del profilo acido da 658 campioni di latte provenienti da altrettante bovine di razza Pezzata Rossa Italiana allevate in 16 aziende del Friuli Venezia Giulia.

Sono stati analizzati i cromatogrammi ottenuti utilizzando la tecnica della gascromatografia a due dimensioni e gli spettri ottenuti mediante tecnica MIR.

I risultati, che hanno preso in considerazione diversi parametri statistici, hanno dimostrato una elevata affidabilità dell'equazione di calibrazione per particolari acidi grassi quali C12:0, C18:1n9 e somme di acidi grassi come gli SFA, gli UFA e i MUFA.

Nello studio è stata anche eseguita una validazione dell'equazione di calibrazione su due differenti subset, che ha portato alla conferma delle predizioni eseguite in calibrazione.

Infine, sono stati fatti dei tentativi per verificare il possibile utilizzo dell'equazione di calibrazione in analisi discriminanti del latte, in modo da valutare il possibile utilizzo della tecnica MIR nel campo industriale oltre che di miglioramento genetico. Si è evidenziata una buona affidabilità dell'equazione di calibrazione per l'analisi discriminante di SFA e UFA, ma non di CLA e ω 3 che presentavano una scarsa predizione già in durante la calibrazione e validazione.

Parole chiave: latte, acidi grassi, MIR, qualità

ABSTRACT

Consumers' interest in the fatty acid composition of milk is increasing, through the consequences that these have on human health. The measurement of FAME requires using gas-liquid chromatography (GLC). Although this method is suitable, has many practical problems, as time-consuming, expensive reagents and need of qualified staff. A viable alternative to this technique could be the mid-infrared (MIR) spectrometry: fast and practice technique, currently in use as a functional control in cows registered in genealogical book.

The objective of this study was to explore the calibration of MIR for the prediction of fatty acid profile in 658 milk samples derive from as much Italian Simmental cows breeding in 16 Friuli Venezia Giulia farms.

Were analyzed the chromatograms obtained using gas chromatography in two dimensions and the spectra obtained by MIR technique.

Results, which taken into account different statistical parameters, showed a high efficiency of calibration equation for some fatty acids, as C12:0, C18:1n9, and some amounts of fatty acids, as SFA, UFA and PUFA.

In the study was also performed a validation of the calibration equation on two different subsets, which has led to the confirmation of the predictions made in calibration.

Finally, attempts were made to verify the possible use of calibration equation in the discriminant analyzes of the milk, in order to assess the possible use of the technique MIR in the industrial field as well as genetic improvement.

The study showed a good reliability of calibration equation for the discriminant analysis of SFA and UFA, but not of CLA and ω 3, which had a poor prediction already during the calibration and validation.

Key word: milk, fatty acids, MIR, quality

SOMMARIO

| | |
|--|-----|
| RIASSUNTO | I |
| ABSTRACT | III |
| SOMMARIO | V |
| 1. INTRODUZIONE | 7 |
| 1.1 Lipidi e acidi grassi | 7 |
| 1.2. Composizione e sintesi del grasso del latte..... | 9 |
| 1.3. Acidi grassi e salute umana | 11 |
| 1.4. Il miglioramento genetico per la produzione del latte | 12 |
| 1.5 Spettroscopia del medio-infrarosso (MIR) | 13 |
| 2. OBIETTIVI | 19 |
| 3. MATERIALI E METODI | 21 |
| 3.1 Animali e campionamento..... | 21 |
| 3.2 Separazione del Grasso..... | 21 |
| 3.3 Determinazione del profilo acidico..... | 22 |
| 3.3.1 Trans-esterificazione degli acidi grassi | 22 |
| 3.3.2 Determinazione gascromatografica a due dimensioni | 22 |
| 3.3.3 Calibrazione del gascromatografo | 23 |
| 3.3.4. Identificazione ed espressione dei risultati | 23 |
| 3.4. Acquisizione spettri MIR | 24 |
| 3.5. Analisi statistica e modello di predizione..... | 24 |
| 4. RISULTATI E DISCUSSIONE | 27 |
| 4.1 Statistiche descrittive | 27 |
| 4.2. Spettri MIR..... | 28 |
| 4.3. Equazioni di calibrazione..... | 28 |
| 4.4 Validazione delle equazioni di calibrazione | 34 |
| 4.5. Analisi discriminante..... | 35 |
| 5. CONCLUSIONI | 39 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 41 |

1. INTRODUZIONE

1.1 Lipidi e acidi grassi

I lipidi sono una classe eterogenea di composti organici naturali che risultano essere insolubili in acqua ma solubili nei solventi non polari aprotici, ossia solventi la cui struttura molecolare non presenta un atomo di idrogeno dissociabile come ione H^+ . Da un punto di vista nutrizionale i lipidi si dividono in lipidi di deposito, con funzione energetica (trigliceridi) e lipidi cellulari, con funzione strutturale (fosfolipidi, glicolipidi e colesterolo).

I componenti fondamentali dei lipidi sono gli acidi grassi, molecole composte da una catena di atomi di carbonio, che prende il nome di catena alifatica o idrocarburica, e da un gruppo carbossilico ad una delle estremità ($-COOH$), che costituisce il gruppo funzionale. Sono stati isolati più di 500 differenti acidi grassi da varie cellule e tessuti (Brown, 2010), che variano in base al numero di atomi di carbonio e quello di doppi legami carbonio-carbonio (grado di insaturazione), presenti sulla catena idrocarburica. In relazione al grado di insaturazione si definiscono saturi (SFA) gli acidi grassi che non presentano doppi legami nella catena alifatica e che hanno, per questo motivo, il maggior numero possibile di atomi di idrogeno; prendono invece 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*: nel primo caso gli atomi di idrogeno si trovano dalla stessa parte rispetto al doppio legame, mentre nel caso degli acidi grassi *trans* si trovano in posizione opposta.

La stereo-isomeria del doppio legame è estremamente importante in quanto influisce sulle caratteristiche chimico-fisiche dei grassi: gli SFA presentano una molecola completamente lineare, e una condizione simile si può notare anche negli UFA di tipo *trans*; per quanto riguarda invece gli UFA di tipo *cis*, il doppio legame introduce nella molecola un ripiegamento, che diventa progressivamente più evidente man mano che aumenta il grado di insaturazione; tale ripiegamento permette un aumento della fluidità delle membrane biologiche e una diminuzione del punto di fusione, cosa che rende gli UFA di tipo *cis* particolarmente importanti da un punto di vista nutrizionale (Chow et al., 2008).

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).

Per quanto riguarda la nomenclatura (Fig.1), gli acidi grassi possono essere indicati oltre che con la loro formula chimica, con una formula abbreviata, col nome comune, oppure col nome IUPAC. La più utilizzata è senza dubbio la formula abbreviata in cui si scrive la lettera C seguita dal numero di atomi di carbonio e quello dei doppi legami, separati da due punti; a tale dicitura si può andare poi ad aggiungere la posizione dei doppi legami, che si scriverà dopo la seconda cifra: la posizione dovrà essere posta tra parentesi o preceduta dal simbolo Δ - qualora il conteggio degli atomi di carbonio inizi dall'estremità carbossilica della molecola, se invece si inizierà a contare dall'estremità opposta si utilizzeranno le lettere n- o ω -; infine si può anche precisare la stereoisomeria dei doppi legami aggiungendo i termini *cis* e *trans* prima della loro posizione.

Invece, il nome IUPAC deriva dal nome della catena carboniosa più lunga che contiene il gruppo carbossilico (si inizia a contare dal carbonio del gruppo funzionale) togliendo al nome dell'alcano di riferimento -o e aggiungendo il suffisso -oico preceduto della parola acido. Se l'acido contiene un doppio legame carbonio-carbonio, l'infisso -an- viene sostituito da -en- e si aggiunge un numero per indicarne la posizione. Infine, se il grado di insaturazione è superiore si inseriscono gli infissi -di-, -tri-, ecc. prima dell'-en- (Atkins, 1992).

Figura 1. Nomenclatura degli acidi grassi.

Acidi grassi saturi (SFA)

| Form. abbreviata | Nome comune | Nome IUPAC | Formula chimica |
|------------------|-------------------|----------------------|--------------------------------------|
| C4:0 | acido butirrico | acido butanoico | $C_4H_8O_2CH_3(CH_2)_2COOH$ |
| C5:0 | acido valerico | acido pentanoico | $C_5H_{10}O_2CH_3(CH_2)_3COOH$ |
| C6:0 | acido caproico | acido esanoico | $C_6H_{12}O_2CH_3(CH_2)_4COOH$ |
| C7:0 | acido enantico | acido eptanoico | $C_7H_{14}O_2CH_3(CH_2)_5COOH$ |
| C8:0 | acido caprilico | acido ottanoico | $C_8H_{16}O_2CH_3(CH_2)_6COOH$ |
| C9:0 | acido pelargonico | acido nonanoico | $C_9H_{18}O_2CH_3(CH_2)_7COOH$ |
| C10:0 | acido caprinico | acido decanoico | $C_{10}H_{20}O_2CH_3(CH_2)_8COOH$ |
| C11:0 | - | acido undecanoico | $C_{11}H_{22}O_2CH_3(CH_2)_9COOH$ |
| C12:0 | acido laurico | acido dodecanoico | $C_{12}H_{24}O_2CH_3(CH_2)_{10}COOH$ |
| C13:0 | - | acido tridecanoico | $C_{13}H_{26}O_2CH_3(CH_2)_{11}COOH$ |
| C14:0 | acido miristico | acido tetradecanoico | $C_{14}H_{28}O_2CH_3(CH_2)_{12}COOH$ |
| C15:0 | - | acido pentadecanoico | $C_{15}H_{30}O_2CH_3(CH_2)_{13}COOH$ |
| C16:0 | acido palmitico | acido esadecanoico | $C_{16}H_{32}O_2CH_3(CH_2)_{14}COOH$ |

| | | | |
|-------|-------------------|----------------------|--------------------------------------|
| C17:0 | acido margarico | acido eptadecanoico | $C_{17}H_{34}O_2CH_3(CH_2)_{15}COOH$ |
| C18:0 | acido stearico | acido ottadecanoico | $C_{18}H_{36}O_2CH_3(CH_2)_{16}COOH$ |
| C19:0 | - | acido nonadecanoico | $C_{19}H_{38}O_2CH_3(CH_2)_{17}COOH$ |
| C20:0 | acido arachico | acido eicosanoico | $C_{20}H_{40}O_2CH_3(CH_2)_{18}COOH$ |
| C22:0 | acido beenico | acido docosanoico | $C_{22}H_{44}O_2CH_3(CH_2)_{20}COOH$ |
| C24:0 | acido lignocerico | acido tetracosanoico | $C_{24}H_{48}O_2CH_3(CH_2)_{22}COOH$ |

Acidi grassi monoinsaturi (MUFA)

| Form. abbreviata | Pos. doppi legami | Nome comune | Nome IUPAC |
|------------------|-------------------|--------------------|-----------------------------|
| C16:1 | 9 | acido palmitoleico | acido cis-9-esadecenoico |
| C18:1 | cis-9 | acido oleico | acido cis-9-ottadecenoico |
| C20:1 | 11 | acido gadoleico | acido cis-9-eicosenoico |
| C22:1 | 11 | acido cetoleico | acido cis-11-docosenoico |
| C22:1 | 13 | acido erucico | acido cis-13-docosenoico |
| C24:1 | 15 | acido nervonico | acido cis-15-tetracosenoico |

Acidi grassi polinsaturi (PUFA)

| Form. abbreviata | Pos. doppi legami | Nome comune | Nome IUPAC |
|------------------|----------------------|--------------------|---------------------------------------|
| 18:2 | 9, 12 | acido linoleico | acido 9,12-ottadecadienoico |
| 18:2 | 9, 11 | acido rumenico | acido 9,11-ottadecadienoico |
| 18:3 | 9, 12, 15 | acido linolenico | acido 9,12,15-ottadecatrienoico |
| 18:4 | 6, 9, 12, 15 | acido stearidonico | acido 6,9,12,15-ottadecatetraenoico |
| 20:4 | 5, 8, 11, 14 | acido arachidonico | acido 5,8,11,14-eicosatetraenoico |
| 20:5 | 5, 8, 11, 14, 17 | acido timnodonico | acido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico |
| 22:5 | 7, 10, 13, 16, 19 | acido clupanodonic | acido 7,10,13,16,19-docosapentaenoico |
| 22:6 | 4, 7, 10, 13, 16, 19 | acido cervonico | acido 4,7,10,13,16,19-docosaesanoico |

1.2. Composizione e sintesi del grasso del latte

Il grasso del latte bovino, che oscilla tra il 33 e 50 g/L, è composto per la maggior parte da trigliceridi, ossia lipidi non polari composti da una molecola di glicerolo, polialcol a tre atomi di C, unita con legami estere a tre acidi grassi; è importante precisare che tali acidi grassi non sono posizionati in maniera casuale, in quanto tale organizzazione influenza il punto di fusione del grasso e la sua digeribilità (Jensen et al., 2002). Tali lipidi si organizzano in una struttura globulare (il cui diametro varia tra <1 e 10 μm) definita dalla presenza di una membrana del globulo di grasso, avente spessore di circa 10 nm e composta principalmente da proteine e fosfolipidi; tale membrana ha il ruolo di

mantenere bassa la tensione superficiale all'interfaccia tra grasso e fase acquosa, prevenendo in tal modo la flocculazione e la coalescenza del grasso e quindi la separazione delle fasi (Mucchetti et al., 2006).

Gli SFA e i MUFA che compongono il latte bovino possono avere due principali origini:

- il 55-60% degli acidi grassi (corta e lunga catena) proviene dai trigliceridi circolanti nel sangue, ossia quei trigliceridi che derivano dalla dieta, dalla biodegradazione e degradazione batterica ruminale o dalla mobilizzazione delle riserve di grasso corporeo; si trovano legati alle lipoproteine a densità molto bassa oppure, in misura modesta, ai chilomicroni; tali trigliceridi giungono alla ghiandola mammaria dove, a livello della membrana basale, vengono idrolizzati dalle lipasi lipoproteiche in acidi grassi e glicerolo;
- la restante parte viene sintetizzata ex-novo nella ghiandola mammaria a partire da acetato e β -idrossibutirrato; tali composti derivano dalla degradazione ruminale dei carboidrati che l'animale assume con la dieta, entrano in circolo superando la parete ruminale e giungono alle cellule dell'epitelio mammario dove vengono attivati dall'Acetil-CoA; a partire da essi, vengono sintetizzati tutti gli acidi grassi a corta e media catena (fino al 50% del C16).

Una volta che gli acidi grassi sono stati sintetizzati, all'interno del reticolo endoplasmatico rugoso avviene la fase finale di esterificazione, in cui si ha la formazione di goccioline più o meno grandi di grasso. Esse giungono alla membrana apicale delle cellule secretorie e vengono rilasciate con un'escrezione di tipo apocrino, ossia avvolte dalla membrana cellulare (Park, 2004).

Sempre all'interno della ghiandola mammaria, SFA e MUFA possono anche subire processi di insaturazione che portano alla produzione dei corrispondenti MUFA e PUFA grazie al complesso enzimatico che include NADPH-citocromo-b5 riduttasi, citocromo b5, acetil-CoA sintetasi e Δ 9-desaturasi. Tali enzimi catalizzano una reazione che porta alla formazione di un doppio legame cis tra il carbonio 9 e il carbonio 10 della catena idrocarburica. Di particolare importanza è il Δ 9-desaturasi che è coinvolto nella formazione dei CLA a partire dall'acido linoleico (Bertoni, 1997).

Il latte presenta una composizione in acidi grassi che varia molto in base a diversi fattori sia di natura ambientale che genetica, in generale, comunque, è estremamente ricco in SFA (70% circa): il componente principale è l'acido palmitico (C16:0), la cui presenza

risulta essere quasi sempre superiore al 30%. L'insieme degli UFA non è molto alta (30%), e tale quantità è colmata in gran parte dall'acido oleico (C18:1 cis n-9), secondo componente principale del latte, e più in generale dai MUFA, che coprono il 25% degli acidi grassi totali (Soyeurt et al., 2006).

1.3. Acidi grassi e salute umana

L'organizzazione mondiale della sanità (WHO) durante la sessantaseiesima assemblea internazionale si è soffermata sulle malattie non trasmissibili e sui collegamenti che queste hanno con la dieta: il diabete, le patologie cardiovascolari e i tumori gastrointestinali sembrano avere una stretta correlazione con gli alimenti che ingeriamo durante la nostra vita. Una delle cinque proposte che sono state formulate da questa organizzazione si basa sul tentativo di ridurre drasticamente dalla propria dieta gli SFA e quelli insaturi di tipo *trans* (che come detto in precedenza si comportano in maniera molto simile) sostituendoli con gli UFA di tipo *cis* (WHO, 2013). Sebbene il congresso si sia svolto recentemente, è già da molti anni che si studia la relazione che intercorre tra il consumo di SFA e l'ipercolesterolemia riconoscendo sempre l'effetto aterogeno di tali acidi grassi.

Il colesterolo è un lipide steroideo che svolge due ruoli estremamente importanti all'interno dell'organismo: componente della membrana cellulare, di cui regola la fluidità e la permeabilità, e precursore degli ormoni steroidei, della vitamina D e dei sali biliari; per essere trasportato nel sangue il colesterolo necessita di lipoproteine che possono essere di due tipologie: LDL (low density lipoproteins) e HDL (high density lipoproteins); le prime hanno un'azione negativa perché facilitano la permanenza del colesterolo nelle arterie, favorendo la formazione di placche aterosclerotiche, al contrario le HDL trasportano velocemente il colesterolo nel fegato dove può essere metabolizzato.

E' stato dimostrato che alcuni SFA, in particolare il C16:0 e altri a lunga catena, vanno ad aumentare la frazione di LDL presente nel sangue (Stoop, 2009).

Al contrario, i MUFA e i PUFA portano ad un aumento della componente HDL presentando quindi un effetto ipocolesterolemizzante; in particolare, è importante ricordare l'acido linoleico (C18:2 n-6,9) e l'acido linolenico (C18:3 n-3,6,9) che sono considerati essenziali nella dieta in quanto non sono sintetizzabili ex novo nell'organismo: il primo è considerato 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.

Un altro gruppo di UFA molto importante per la salute umana è quello dei CLA (coniugati dell'acido linoleico), ossia l'insieme di tutti gli isomeri (ne sono stati individuati almeno 28) dell'acido linoleico caratterizzati dalla presenza di doppi legami coniugati; anche se sono famosi per le loro capacità anticancerogene, i ricercatori (Lock, 2002) hanno anche scoperto che possono ridurre il rischio di malattie cardiovascolari, combattere le infiammazioni e aiutare a ridurre il grasso corporeo e aumentare la massa magra. Jensen et al. (2002) sostiene che il contenuto di CLA nel latte dipenda dalla produzione ruminale e dall'attività della $\Delta 9$ -desaturasi.

Per quanto riguarda gli UFA di tipo trans, all'effetto aterogeno si aggiunge anche un effetto negativo per il metabolismo lipidico: essi si accumulano a livello dei fosfolipidi in tessuti vitali quali cuore, rene e fegato andando a sostituire altri acidi grassi come il C18:2 n-6,9 (acido linoleico) e C20:4 n-5,8,11,14 (acido arachidonico).

1.4. Il miglioramento genetico per la produzione del latte

Il miglioramento genetico delle razze bovine da latte ha avuto fino ad ora due principali obiettivi: l'aumento della quantità di latte prodotto dalle bovine durante la lattazione e il miglioramento della sua qualità. Per anni la selezione si è concentrata principalmente sul primo punto: grazie al programma di miglioramento genetico e produzione, che ha coinvolto tutte le aziende nazionali di bovine da latte iscritte al libro genealogico, si è ottenuto un aumento notevole della quantità di latte prodotta.

Le prime ricerche riguardanti il miglioramento genetico mirato ad aumentare la qualità del latte, invece, si sono viste tra gli anni '80 e '90, quando, una serie di leggi ha fatto aumentare l'interesse per le caratteristiche di tale prodotto e la loro importanza economica. La prima è la legge 169/89 che fissa le caratteristiche minime che deve avere il latte crudo per essere ammesso al consumo diretto, seguita, qualche anno dopo, dal Dpr. 54/97 che va invece ad interessarsi al latte che deve subire trattamenti e trasformazioni. Sempre alla fine degli anni '80 viene introdotto lo schema di pagamento del latte in base alla qualità: vengono presi in considerazione 6 differenti parametri (contenuto di grasso e proteine, carica batterica, numero di cellule somatiche, quantità

di residui e di acqua) e per ciascuno di esso viene fissato un valore medio di riferimento (fascia neutra) e una serie di premi o penalizzazioni a seconda dello scostamento da tale valore. A questi interessi si deve poi aggiungere la necessità di un latte che sia il più adatto possibile alla caseificazione, in quanto più del 70% del latte disponibile in Italia (produzione e importazione) è destinato alla caseificazione. Ultima ma non meno importante motivazione che spinge ad un miglioramento genetico della qualità del latte è il continuo aumento di interesse dal parte del consumatore verso prodotti sempre più sani: il latte è responsabile del 25-35% dei SFA presenti nella dieta umana (Chiliard et al., 2000), che come abbiamo visto risultano essere estremamente dannosi; obiettivo principale per il miglioramento della qualità del latte è l'ottenimento di un prodotto che sia più favorevole per la salute umana: 30% di grassi saturi, 60% di grassi MUFA e 10% di PUFA con un'alta concentrazione dei gruppi ω -3 e CLA (Soyeurt et al., 2006).

L'elemento fondamentale di un programma di miglioramento genetico si basa sulla capacità di poter misurare il carattere quantitativo di interesse, in modo da identificare gli individui che più si avvicinano al modello ideale. Fino ad oggi, non sono stati molti gli studi che si sono basati sulla valutazione del contenuto in acidi grassi, in quanto ricerche di questo tipo richiedono l'utilizzo della gas-cromatografia (GC). Tale tecnica, per quanto sia estremamente precisa, presenta svariati svantaggi (tempi molto lunghi, elevati costi di analisi e necessità di personale specializzato) che la rendono inapplicabile quando l'analisi del profilo acidico deve essere estesa alla totalità di una popolazione bovina per l'ottenimento di valutazioni genetiche degli animali. Studi recenti (Soyeurt et al., 2006; Rutten et al., 2010), hanno dimostrato che un'ottima alternativa all'utilizzo della GC per la misurazione del contenuto in acidi grassi del latte, è l'utilizzo della spettroscopia nel medio infrarosso (spettroscopia MIR). La spettroscopia MIR è una tecnica che permette l'analisi dei costituenti del latte su un numero elevatissimo di soggetti: è sufficiente un campione ridotto per effettuare analisi veloci ed economiche. Inoltre tale tecnica è già utilizzata per il controllo funzionale delle bovine iscritte al libro genealogico e non presenterebbe quindi alcun costo aggiuntivo.

1.5 Spettroscopia del 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 si comportano come onde che viaggiano alla velocità della luce e per questo 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), si indica col simbolo ν (ni) e viene espressa in Hertz (Hz). Lunghezza d'onda e frequenza sono inversamente proporzionali e sono collegate dalla proporzione: $\nu\lambda=c$ (dove c è la velocità della luce pari a $3 \cdot 10^8$ m/s).

In particolare, la radiazione infrarossa è quella radiazione elettromagnetica avente lunghezza d'onda compresa tra $0.78\mu\text{m}$ e $1000\mu\text{m}$ (nello spettro elettromagnetico si trova tra la luce visibile e le microonde, Fig.1); in termini pratici si è soliti dividere questo intervallo in tre regioni distinte: la regione del vicino infrarosso (NIR compresa tra $0.78 \mu\text{m}$ e $3 \mu\text{m}$), medio-infrarosso (MIR tra i $3 \mu\text{m}$ e $60 \mu\text{m}$) e infine il lontano infrarosso (FIR) (Brown, 2010).

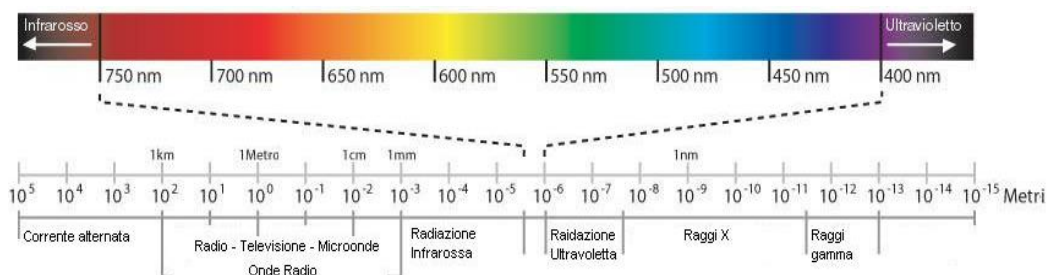


Fig.1 Spettro delle radiazioni elettromagnetiche

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. In altri termini, ciascuna sostanza assorbe in particolari gamme di frequenze nelle bande dell'infrarosso; registrando un tratto di frequenze assorbite, rispetto all'intensità di assorbimento, si ottiene uno spettro infrarosso che permette di creare "un'impronta digitale" della molecola, cioè un grafico di assorbimento dell'energia rispetto alle lunghezze d'onda (Pellizon Birelli, 2006).

Gli strumenti per analisi di spettroscopia infrarossa, indipendentemente dal range spettrale utilizzato, possono essere di due tipologie: dispersivi, in cui è presente un

elemento che disperde sequenzialmente le radiazioni, e quelli a *Trasformata di Fourier*. 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 (noto come 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). Oltre all'interferometro, uno strumento di questo tipo presenta anche una fonte da cui partono i raggi infrarossi e un rilevatore che permette di andare a registrare l'intensità delle diverse lunghezze d'onda.

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 riuscire a predire la composizione sia quantitativa che qualitativa in acidi grassi del latte da uno spettro, è necessario disporre di una equazione di calibrazione, ossia di 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 valori analitici ottenuti con le tradizionali metodiche di laboratorio (GC). Una volta sviluppata l'equazione di calibrazione, sarà possibile ottenere la predizione della composizione del latte di un campione ignoto esclusivamente a partire dal suo spettro. I metodi statistici maggiormente utilizzati per lo sviluppo delle calibrazioni IR sono quelli appartenenti all'analisi multivariata.

L'analisi multivariata si basa sulla creazione di fattori che spiegano le variazioni spettrali, è quindi utile, prima di utilizzare il modello multivariato, applicare agli spettri alcuni algoritmi che escludano il maggior numero possibile di fonti di variabilità irrilevante. L'algoritmo maggiormente utilizzato è la derivata prima che esprime l'entità di variazione della trasmittanza rispetto alla lunghezza d'onda e ha come effetto principale la rimozione della linea di base; la derivata dello spettro ad una lunghezza d'onda w può essere calcolata attraverso la formula $(y_w - y_{w-1}) / (y_w - y_{w-1})$ e risulterà essere simile allo spettro originale, avendo i picchi approssimativamente negli stessi punti, ma con segno invertito (Fig.2).

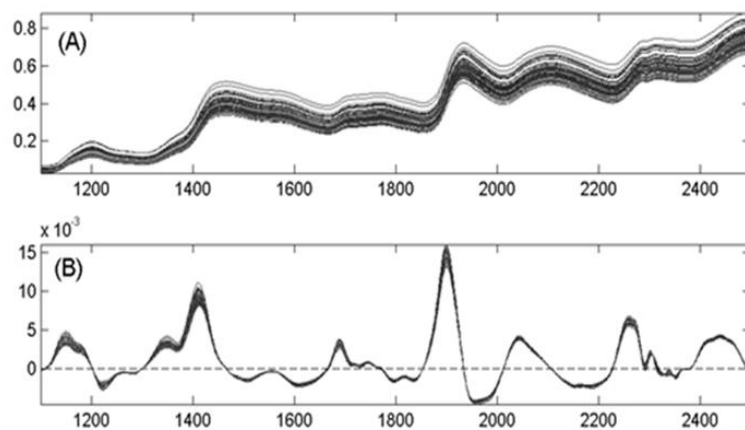


Fig.2 Effetto dell'applicazione della derivata prima sullo spettro originale

Altri metodi matematici che vengono applicati per migliorare la qualità degli spettri e quindi ottenere predizioni più affidabili sono:

- l'MSC (Multiplicative Scatter Correction), che cerca di rimuovere l'effetto della dispersione, linearizzando ciascuno spettro sulla base dello spettro medio;
- L'SNV (Standard Normal Variate) e Detrending due algoritmi che vengono applicati simultaneamente e che servono rispettivamente per ridurre l'effetto dello scattering (ossia il cambio di traiettoria da parte di onde o particelle, a causa della collisione con altre particelle o onde) e per correggere gli effetti della variazione della linea di base (Fig.3).

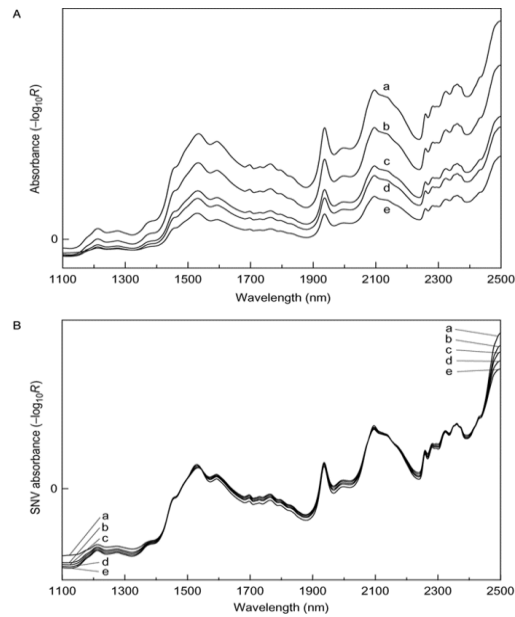


Fig. 3 Effetto dell'applicazione dell'SNV sugli spettri grezzi

Una volta applicata l'analisi multivariata si otterrà un'equazione, la cui precisione può essere testata attraverso una k-fold cross-validation. Tale metodo statistico prevede la suddivisione del dataset in k parti uguali, successivamente si attua la calibrazione con k-1 gruppi e, una volta ottenuta l'equazione, si va a compiere la predizione sul gruppo che non era stato coinvolto nella fase iniziale della calibrazione; ciò viene fatto per k volte, escludendo ogni volta un gruppo differente.

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 calibrazione (Sec e R^2c , rispettivamente) e l'errore standard e il coefficiente di determinazione in cross-validation (SEcv e R^2cv , rispettivamente). I parametri SEc e R^2c trascurano la varianza dei coefficienti di regressione, quindi sono preferibili i valori in cross-validation. Il SEcv indica l'errore medio di predizione, mentre il R^2CV misura la quota parte della varianza della variabile dipendente spiegata dalla regressione. Questi parametri indicano l'efficienza del modello predittivo e forniscono un'idea della sua accuratezza. Sono stati confrontati, al variare dei modelli matematici utilizzati e del range di spettro preso in considerazione, in modo da individuare la situazione che presentava i più alti valori di R^2cv e i più bassi di SEcv. Un ulteriore parametro che è stato 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.

2. OBIETTIVI

Il latte è un componente molto importante per la nostra dieta e la sua composizione, in particolare il contenuto in acidi grassi, assume quindi un ruolo fondamentale per la salute umana. Gli acidi grassi saturi e gli insaturi di tipo *trans* vanno ad aumentare la quantità di lipoproteine di trasporto del tipo HDL, incrementando il rischio di malattie cardiovascolari; al contrario gli acidi grassi insaturi di tipo *cis* aiutano a prevenire i disturbi cardiovascolari e riducono l'incidenza di degenerazioni neoplastiche.

Diversi studi hanno riportato l'esistenza di variabilità genetica del profilo acidico e ciò offrirebbe una nuova opportunità per le strategie di selezione che mirano a produrre latte con maggiori concentrazioni di acidi grassi "sani", soprattutto CLA e Omega 3, e una minore quantità di acidi grassi nocivi per la salute.

Il maggiore ostacolo per il raggiungimento di tale obiettivo è rappresentato dall'impossibilità di estendere le analisi cromatografiche all'intera popolazione a causa degli elevati costi e della difficoltà di applicazione.

Una possibile alternativa alla misurazione diretta dei componenti del latte è la spettroscopia del medio-infrarosso, che risulta essere molto più veloce ed economica. Inoltre, a vantaggio di questa tecnica, c'è il fatto che è attualmente utilizzata per il controllo funzionale genealogico delle bovine da latte e non comporterebbe quindi alcun costo aggiuntivo.

Gli obiettivi di questa tesi sono pertanto i seguenti:

- Sviluppare equazioni di calibrazione MIR per la predizione del profilo acidico del latte;
- Validare le equazioni di calibrazione sviluppate;
- Valutare la possibile applicazione della tecnica MIR nell'analisi discriminante del latte in base al contenuto di SFA, UFA, omega 3 e CLA

3. MATERIALI E METODI

3.1 Animali e campionamento

Questo studio è stato condotto su 658 bovine di razza Pezzata Rossa Italiana allevate in 16 aziende del Friuli Venezia Giulia. I campioni di latte sono stati raccolti tra febbraio e luglio 2013; per ciascuna bovina è stato prelevato dai controllori dell'AAFVG, in concomitanza con il controllo funzionale, un singolo campione di latte consistente in 50 ml proveniente dalla mungitura della mattina. Al momento del prelievo è stata aggiunta ai campioni una dose di conservante (Bronopol, 2-bromo-2-nitropropan-1,3-diol, 0.35 ml, 0.6:100 v/v; Grunenthal Prodotti & Farmaceutici Formenti, Milan, Italy) al fine di ridurre la crescita microbica e il campione è poi stato immediatamente stoccato a -20°C fino al momento dell'analisi.

Il Laboratorio Latte dell'Associazione Allevatori Friuli Venezia Giulia (AAFVG) ha successivamente fornito lo spettro relativo ad ogni singolo campione prelevato, acquisito mediante MilkoScan™ FT 6000 (FOSS, Hilleroed, Danimarca).

3.2 Separazione del Grasso

La separazione del grasso dalle restanti componenti del latte è avvenuta attraverso l'utilizzo di un sistema per l'estrazione accelerata con solvente (Thermo Scientific™ Dionex™ ASE™ 350 Accelerated Solvent Extractor). L'utilizzo di tale tecnica permette di ridurre il consumo di solvente e aumentare la velocità di estrazione: il solvente viene introdotto ad elevata temperatura e pressione all'interno della cella in cui è presente la matrice da sottoporre ad estrazione.

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; per estrarre la maggior quantità possibile di grasso dal campione si è utilizzato un metodo di estrazione specifico per il latte, tale metodo lavora a 120°C e utilizza come solvente una soluzione composta da etere di petrolio e 2-propanolo nel rapporto 2:1.

Una volta avvenuta l'estrazione, la vial contenente il solvente e il grasso è stata sottoposta ad essiccazione sotto flusso di azoto e ad una temperatura di 45°C (Dionex SE 500), in modo da andare ad eliminare completamente il solvente utilizzato per l'estrazione e isolare la sola frazione lipidica del campione. I campioni così essiccati sono

stati infine posti in un deumidificatore per 15-20 minuti al fine di eliminare completamente l'umidità.

3.3 Determinazione del profilo acidico

3.3.1 Trans-esterificazione degli acidi grassi

40 mg di grasso estratto sono stati prelevati e aggiunti di 2 mL di standard interno (methyl 12-trideceonate C13:1 diluito in n-eptano 0.6 mg/mL) e di 100 µL di sodio metossido 1M.

I campioni sono stati agitati per 20 min in modo che avvenisse 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.

3.3.2 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 3.5 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. Il volume di iniezione è stato di 1 µL.

In una gascromatografia a due dimensioni i componenti di una miscela attraversano due differenti colonne: ciascun picco attraversa la prima colonna, rimane intrappolato da una appropriata interfaccia chiamata "modulatore" e successivamente viene rilasciata nella seconda colonna. Il risultato è un cromatogramma che invece di presentarsi sotto forma di 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.

3.3.3 Calibrazione del gascromatografo

Per calibrare lo strumento è stata utilizzata una soluzione di standard di esteri metilici degli acidi grassi (FAME C4-C24, LIPID STANDARD, Nu-chek Prep product n. 463, purezza $\geq 98.5\%$) e 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.

3.3.4. Identificazione ed espressione dei risultati

Per l'identificazione e l'analisi del cromatogramma (Fig. 1) 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, individuati e riconosciuti per confronto con i tempi di ritenzione di quelli presenti nella miscela di standard, e fornisce il corrispondente volume, calcolato in rapporto con lo standard interno. I risultati sono stati espressi sia come rapporto percentuale del volume di ogni singolo acido grasso sulla sommatoria dei volumi di tutti gli acidi grassi presenti nel cromatogramma, sia in grammi, prendendo in considerazione il valore di grasso totale fornito dal controllo funzionale.

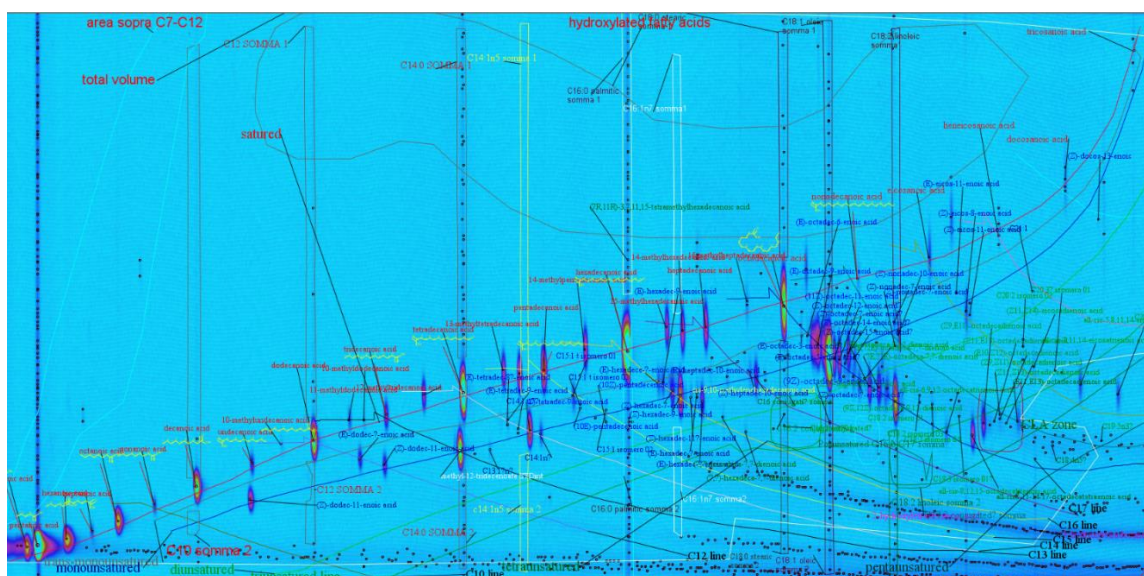


Fig.1 Cromatogramma GCxGC di un campione di latte

A partire dall'insieme di tutti gli acidi grassi che venivano 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 ω 3 che sono stati presi in considerazione per la loro importanza nutrizionale. Sono state considerate anche le somme di tutti gli acidi grassi saturi, degli insaturi (differenziando anche tra mono e poli insaturi), dei C14, C16 e C18 monoinsaturi e, infine, i C18:2. Nelle ultime 4 somme sono stati presi in considerazione tutti gli isomeri e le diverse forme stechiometriche.

3.4. Acquisizione spettri MIR

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 di Padova per essere elaborati.

Gli spettri sono stati modificati usando i modelli matematici SNV, detrending, MSC e la loro combinazione. Inoltre è stata utilizzata la derivata prima come pretrattamento degli spettri. Per quanto riguarda la regione dello spettro presa in considerazione, i migliori risultati sono stati ottenuti prendendo in considerazione solamente l'intervallo di lunghezza d'onda da 1,000 a 3,830 cm^{-1} .

3.5. Analisi statistica e modello di predizione

Lo sviluppo delle equazioni di calibrazione per la predizione delle quantità e delle percentuali degli acidi grassi è stato eseguito attraverso l'uso del software WinISI III (Infrasoft International Inc., State College, PA), utilizzando le procedure di regressione multivariata PLS (Partial Least Square Regression) e MPLS (Modified PLS Regression).

Al termine dell'inverno è stata fatta una prima calibrazione con i campioni analizzati fino a quel momento. Successivamente, invece, sono stati inseriti anche i campionamenti effettuati nel periodo estivo ed è stata eseguita una seconda calibrazione, che è stata messa a confronto con la prima.

La capacità predittiva delle equazioni di calibrazione sviluppate è stata valutata calcolando l'errore standard di calibrazione (SE_C), l'errore standard in cross-validation (SE_{CV}) e il coefficiente di determinazione in cross-validation (R²_{CV}). Mentre SE_{CV} deve risultare il più basso possibile, R²_{CV} è un valore compreso tra 0 e 1, più vicino sarà a 1, maggiore sarà l'efficienza dell'equazione di calibrazione. E' stato poi preso in considerazione anche l'RPD, che in linea teorica a valori superiori a 2 assicurano una elevata efficienza dell'equazione di calibrazione (Williams and Norris, 2001).

Nella seconda parte dello studio è stata eseguita una validazione sull'equazione di calibrazione. Ciò è stato fatto escludendo dalla calibrazione un subset di campioni su cui verrà poi effettuata la predizione, in modo da verificare l'efficienza predittiva dell'equazione. Sono state eseguite due differenti calibrazioni: nella prima, il set di calibrazione era costituito dai soli campioni raccolti in inverno (N=536), mentre il set di validazione era costituito dai campioni raccolti in estate (N=122). Nel secondo caso, invece, il set di calibrazione è stato scelto dopo una analisi delle componenti principali (PCA) per il calcolo delle distanze spettrali. I 536 campioni con le distanze maggiori sono stati inclusi nel set di calibrazione, mentre i rimanenti 122 campioni sono stati inclusi nel set di validazione.

La capacità delle equazioni di calibrazione sviluppate per SFA, UFA, OMEGA 3 e CLA è stata testata infine attraverso un'analisi discriminante. I campioni utilizzati in validazione (N=122) sono stati suddivisi in classi ad alto o basso contenuto di SFA, UFA, OMEGA 3 e CLA. Le soglie di attribuzione all'una o all'altra classe sono state prese in modo tale che il 10% dei campioni osservati presentassero la caratteristica positiva. Per gli SFA, la cui presenza nel latte rappresenta un aspetto sfavorevole, come valore soglia è stato preso il 69%. Per gli altri 3 gruppi, invece, sono stati presi come valori soglia 29% per UFA, 0.9% per OMEGA 3 e 0.59 % per CLA. Una volta ottenuti i valori predetti di SFA, UFA, OMEGA3 e CLA attraverso le rispettive equazioni di calibrazione, è stata calcolata la percentuale di attribuzione corretta alle diverse classi.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Statistiche descrittive

Le statistiche descrittive per il profilo acido dei campioni analizzati sono riportate in

Tab. 1.

Tabella 1. Statistiche descrittive dei campioni analizzati.

| FAME ¹ | N | Media | DS | 1° pctl ² | 99° pctl ³ |
|-------------------|-----|-------|------|----------------------|-----------------------|
| C4:0 | 634 | 3.18 | 0.51 | 1.81 | 4.39 |
| C6:0 | 627 | 2.34 | 0.31 | 1.41 | 3.24 |
| C8:0 | 633 | 1.49 | 0.16 | 1.04 | 1.82 |
| C10:0 | 638 | 3.61 | 0.50 | 2.28 | 4.78 |
| C12:0 | 634 | 4.28 | 0.65 | 2.47 | 5.92 |
| C14:0 | 642 | 13.36 | 1.23 | 9.18 | 15.82 |
| C16:0 | 637 | 32.64 | 3.24 | 25.14 | 39.47 |
| C18:0 | 634 | 6.26 | 1.41 | 3.05 | 10.18 |
| C18:1n7 | 613 | 1.21 | 0.26 | 0.00 | 1.92 |
| C18:1n9 | 635 | 14.87 | 2.48 | 9.76 | 24.45 |
| C18:2n6 | 644 | 1.84 | 0.53 | 0.95 | 3.26 |
| SFA | 629 | 73.11 | 3.58 | 63.93 | 81.08 |
| UFA | 626 | 25.72 | 3.12 | 18.84 | 35.93 |
| MUFA | 632 | 21.67 | 2.83 | 15.82 | 32.40 |
| PUFA | 644 | 3.95 | 0.76 | 2.54 | 6.06 |
| ω3 | 619 | 0.68 | 0.15 | 0.39 | 1.57 |
| ω6 | 641 | 2.50 | 0.64 | 1.42 | 4.21 |
| CLA | 623 | 0.48 | 0.11 | 0.23 | 0.87 |
| C14:1 | 636 | 1.03 | 0.25 | 0.46 | 1.78 |
| C16:1 | 642 | 2.07 | 0.38 | 1.24 | 3.55 |
| C18:1 | 633 | 17.30 | 2.73 | 11.65 | 27.13 |
| C18:2 | 643 | 2.86 | 0.60 | 1.85 | 4.45 |

1 Tutti gli acidi grassi sono espressi in percentuale sul grasso totale; SFA= acidi grassi saturi dal C4 al C24; UFA = acidi grassi insaturi (C10:1 n1 + C12:1 n9 + C12:1 iso + C14:1 + C15:1 cis10 + C16:1 n9 + C16:1 n7 + C17:1 n9 + C17:1 n7 + somma isomeri minori trans del C18:1 + C18:1 trans n9 + C18:1 trans n8 + C18:1 trans n7 + C18:1 cis n9 + C18:1 cis n7 + somma isomeri minori cis del C18:1 + C20:1 n9 + C22:1 cis13 n9 + C24:1 cis15 n9+ C18:2 trans n6 + C18:2 cis n6 + somma degli isomeri minori del C18:2 + C18:3 n6 + C18:3 n3 + C18:2 cis9 trans11 + C18:2 cis11 trans13 + C18:2 trans10 cis12 + C18:2 trans 11 trans 13 + C20:2 n6 + C20:3 cis n6 + C20:4 n6 + C20:3 cis n3 + C20:5 cis n3 + C22:2 n6 + C22:4 n6 + C22:5 n6 + C22:5 n3 + C22:6 n3); MUFA= acidi grassi monoinsaturi; PUFA=acidi grassi polinsaturi; CLA = coniugati dell'acido linoleico (C18:2 cis 9 trans 11+ C18:2 cis 11 trans 13 + C18:2 cis 9 cis11+ C18:2 trans 10 cis 12+ C18:2 cis 11 cis 13+ C18:2 trans 11 trans 13); 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;

²P1= primo percentile

³P99= secondo percentile

Come atteso gli SFA erano la frazione prominente del grasso del latte, con un valore, in media del 73%; i MUFA rappresentavano, invece, il 22% e i PUFA il 4%. Tra gli SFA l'acido grasso maggiormente presente è stato, come atteso, il C16:0 che da solo occupava circa

il 33% dei FAME presenti nei campioni. Tra gli UFA, invece, il più presente è stato il C18:1n9 (acido oleico) che rappresentava circa il 15% del grasso totale. In uno studio precedente condotto su bovine di razza Pezzata Rossa (Gallon, 2011), le percentuali di SFA risultavano inferiori (69%) mentre quelle dei MUFA notevolmente superiori (26%). Una delle possibili cause può essere il periodo di raccolta dei campioni: il campionamento nello studio citato si svolgeva in gran parte nel periodo estivo. Heck et al. (2009) nel loro studio hanno dimostrato che la variazione delle diete delle bovine, nel periodo estivo, porta ad una variazione della composizione del grasso del latte.

4.2. Spettri MIR

In figura 1 sono riportati gli spettri ottenuti dalla lettura di alcuni campioni individuali di latte. Le regioni con maggiore variabilità si trovavano alle lunghezze d'onda intorno a $1,665\text{ cm}^{-1}$, ma soprattutto, nella regione tra $3,000$ e $3,500\text{ cm}^{-1}$. L'intervallo di spettro preso in considerazione, che escludeva la regione oltre la lunghezza d'onda di $3,827\text{ cm}^{-1}$, permetteva una migliore calibrazione, in quanto, la parte di spettro oltre tale lunghezza d'onda, non portava nessuna informazione importante ai fini della calibrazione, e anzi, la sua inclusione nell'equazione ne peggiorava la capacità predittiva.

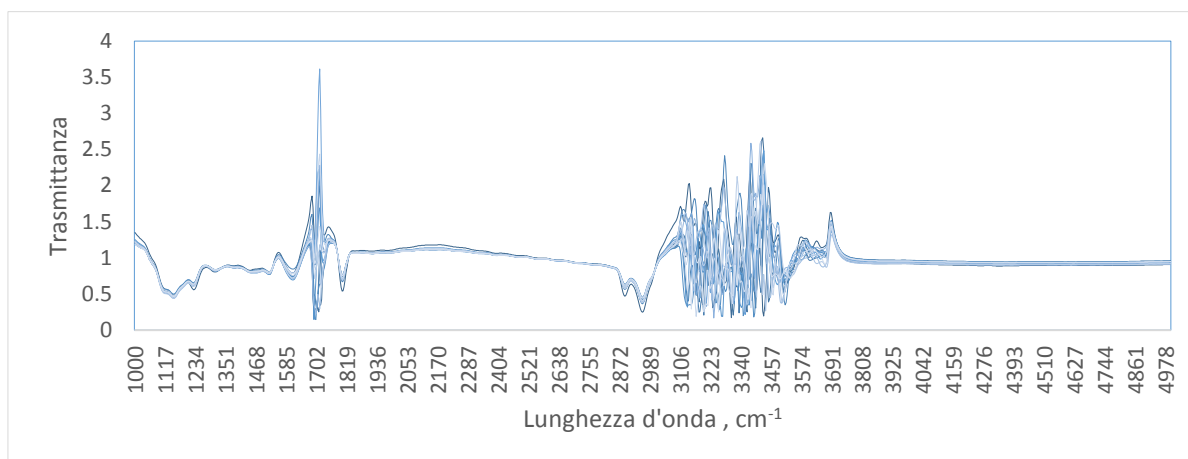


Fig.1 Spettri MIR dei campioni di latte

4.3. Equazioni di calibrazione

In Tab.2 e in Tab.3 sono riportati i parametri statistici delle equazioni di predizione ottenute per i contenuti di acidi grassi espressi, rispettivamente, in g/100g e in g/L di

grasso sviluppate a partire dai soli campioni raccolti in inverno e, successivamente, utilizzando la totalità dei campioni.

Tab.2 Parametri statistici stimati per le equazioni di calibrazione sviluppate per il profilo acido (gli acidi grassi sono espressi in g/100g di grasso) a partire dai soli campioni raccolti in inverno e dal dataset completo

| FAME ¹ | Soli campioni raccolti in inverno | | | | | | Dataset completo | | | | | |
|-------------------|-----------------------------------|-------|------|------|-------------------|------------------|------------------|-------|------|------|-------------------|------|
| | N ² | Media | DS | SEcv | R ² cv | RPD ³ | N | Media | DS | SEcv | R ² cv | RPD |
| C4:0 | 520 | 3.27 | 0.39 | 0.23 | 0.64 | 1.70 | 634 | 3.18 | 0.51 | 0.31 | 0.64 | 1.65 |
| C6:0 | 508 | 2.40 | 0.21 | 0.10 | 0.77 | 2.10 | 627 | 2.34 | 0.30 | 0.19 | 0.61 | 1.63 |
| C8:0 | 517 | 1.51 | 0.14 | 0.06 | 0.82 | 2.33 | 633 | 1.49 | 0.16 | 0.07 | 0.77 | 2.29 |
| C10:0 | 517 | 3.66 | 0.48 | 0.20 | 0.82 | 2.40 | 638 | 3.61 | 0.50 | 0.24 | 0.77 | 2.08 |
| C12:0 | 519 | 4.33 | 0.64 | 0.25 | 0.84 | 2.56 | 634 | 4.28 | 0.65 | 0.27 | 0.82 | 2.41 |
| C14:0 | 525 | 13.44 | 1.21 | 0.65 | 0.70 | 1.86 | 642 | 13.36 | 1.23 | 0.70 | 0.68 | 1.76 |
| C16:0 | 519 | 32.34 | 3.28 | 1.65 | 0.75 | 1.99 | 637 | 32.64 | 3.24 | 1.84 | 0.68 | 1.76 |
| C18:0 | 519 | 6.33 | 1.43 | 0.82 | 0.67 | 1.74 | 634 | 6.26 | 1.41 | 0.80 | 0.69 | 1.76 |
| C18:1n7 | 493 | 1.20 | 0.23 | 0.19 | 0.33 | 1.21 | 613 | 1.21 | 0.26 | 0.20 | 0.39 | 1.30 |
| C18:1n9 | 515 | 14.79 | 2.40 | 0.86 | 0.87 | 2.79 | 635 | 14.87 | 2.49 | 1.01 | 0.84 | 2.46 |
| C18:2n6 | 522 | 1.83 | 0.57 | 0.28 | 0.76 | 2.04 | 644 | 1.84 | 0.53 | 0.28 | 0.72 | 1.89 |
| SFA | 524 | 72.97 | 3.52 | 1.07 | 0.91 | 3.29 | 629 | 73.11 | 3.58 | 1.24 | 0.88 | 2.89 |
| UFA | 519 | 25.59 | 2.90 | 0.89 | 0.91 | 3.26 | 626 | 25.72 | 3.12 | 1.06 | 0.88 | 2.94 |
| MUFA | 517 | 21.49 | 2.56 | 0.90 | 0.87 | 2.84 | 632 | 21.67 | 2.83 | 1.06 | 0.86 | 2.67 |
| PUFA | 524 | 4.00 | 0.76 | 0.39 | 0.74 | 7.08 | 644 | 3.95 | 0.76 | 0.44 | 0.66 | 1.73 |
| ω3 | 504 | 0.71 | 0.15 | 0.08 | 0.73 | 1.88 | 619 | 0.68 | 0.15 | 0.09 | 0.66 | 1.67 |
| ω6 | 524 | 2.50 | 0.68 | 0.34 | 0.75 | 2.00 | 641 | 2.50 | 0.64 | 0.33 | 0.72 | 1.94 |
| CLA | 521 | 0.48 | 0.10 | 0.07 | 0.52 | 1.43 | 623 | 0.48 | 0.11 | 0.08 | 0.43 | 1.38 |
| C14:1 | 517 | 1.04 | 0.25 | 0.20 | 0.36 | 1.25 | 636 | 1.03 | 0.25 | 0.20 | 0.34 | 1.25 |
| C16:1 | 524 | 2.08 | 0.39 | 0.27 | 0.53 | 1.44 | 642 | 2.07 | 0.37 | 0.27 | 0.46 | 1.41 |
| C18:1 | 516 | 17.18 | 2.53 | 0.91 | 0.87 | 2.78 | 633 | 17.30 | 2.73 | 1.06 | 0.85 | 2.58 |
| C18:2 | 525 | 2.87 | 0.61 | 0.30 | 0.75 | 2.03 | 643 | 2.86 | 0.59 | 0.33 | 0.69 | 1.82 |

¹ SFA= acidi grassi saturi dal C4 al C24; UFA = acidi grassi insaturi (C10:1 n1 + C12:1 n9 + C12:1 iso + C14:1 + C15:1 cis10 + C16:1 n9 + C16:1 n7 + C17:1 n9 + C17:1 n7 + somma isomeri minori trans del C18:1 + C18:1 trans n9 + C18:1 trans n8 + C18:1 trans n7 + C18:1 cis n9 + C18:1 cis n7 + somma isomeri minori cis del C18:1 + C20:1 n9 + C22:1 cis13 n9 + C24:1 cis15 n9+ C18:2 trans n6 + C18:2 cis n6 + somma degli isomeri minori del C18:2 + C18:3 n6 + C18:3 n3 + C18:2 cis9 trans11 + C18:2 cis11 trans13 + C18:2 trans10 cis12 + C18:2 tt + C20:2 n6 + C20:3 cis n6 + C20:4 n6 + C20:3 cis n3 + C20:5 cis n3 + C22:2 n6 + C22:4 n6 + C22:5 n6 + C22:5 n3 + C22:6 n3); MUFA= acidi grassi monoinsaturi; PUFA=acidi grassi polinsaturi; CLA = coniugati dell'acido linoleico (C18:2 cis 9 trans 11+ C18:2 cis 11 trans 13 + C18:2 cis 9 cis11+ C18:2 trans 10 cis 12+ C18:2 cis 11 cis 13+ C18:2 trans 11 trans 13); 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;

² Numero di campioni dopo l'eliminazione degli outliers

³RPD= residual predictive deviation =DS/SEcv

Tab.3 Parametri statistici stimati per le equazioni di calibrazione sviluppate per il profilo acidico (gli acidi grassi sono espressi in g/L) a partire dai soli campioni raccolti in inverno e dal dataset completo

| FAME ¹ | Soli campioni raccolti in inverno | | | | | | Dataset completo | | | | | |
|-------------------|-----------------------------------|-------|------|------|-------------------|-------|------------------|-------|------|------|-------------------|-------|
| | N | Media | DS | SEcv | R ² cv | RPD | N | Media | DS | SEcv | R ² cv | RPD |
| C4:0 | 438 | 1.29 | 0.26 | 0.10 | 0.86 | 2.71 | 540 | 1.20 | 0.30 | 0.12 | 0.83 | 2.50 |
| C6:0 | 428 | 0.94 | 0.18 | 0.04 | 0.95 | 4.58 | 528 | 0.91 | 0.20 | 0.07 | 0.88 | 2.86 |
| C8:0 | 437 | 0.59 | 0.11 | 0.02 | 0.96 | 5.16 | 538 | 0.58 | 0.11 | 0.03 | 0.94 | 3.67 |
| C10:0 | 440 | 1.44 | 0.29 | 0.08 | 0.93 | 3.87 | 548 | 1.40 | 0.30 | 0.09 | 0.92 | 3.33 |
| C12:0 | 437 | 1.71 | 0.37 | 0.09 | 0.94 | 4.18 | 546 | 1.67 | 0.38 | 0.10 | 0.93 | 3.80 |
| C14:0 | 437 | 5.28 | 0.96 | 0.26 | 0.93 | 3.75 | 547 | 5.22 | 1.00 | 0.26 | 0.93 | 3.85 |
| C16:0 | 436 | 12.71 | 2.62 | 0.68 | 0.93 | 3.83 | 542 | 12.75 | 2.57 | 0.73 | 0.92 | 3.52 |
| C18:0 | 434 | 24.75 | 0.77 | 0.31 | 0.84 | 2.47 | 544 | 2.45 | 0.75 | 0.34 | 0.80 | 2.21 |
| C18:1n7 | 412 | 0.47 | 0.13 | 0.07 | 0.72 | 1.88 | 520 | 0.47 | 0.12 | 0.80 | 0.59 | 0.15 |
| C18:1n9 | 439 | 5.78 | 1.36 | 0.34 | 0.94 | 4.02 | 541 | 5.80 | 1.39 | 0.37 | 0.93 | 3.76 |
| C18:2n6 | 434 | 0.71 | 0.22 | 0.11 | 0.73 | 1.92 | 550 | 0.70 | 0.21 | 0.12 | 0.69 | 1.75 |
| SFA | 437 | 28.77 | 5.32 | 0.42 | 0.99 | 12.61 | 544 | 28.66 | 5.31 | 0.53 | 0.99 | 10.02 |
| UFA | 433 | 9.96 | 2.02 | 0.31 | 0.98 | 6.61 | 533 | 9.99 | 2.03 | 0.39 | 0.96 | 5.21 |
| MUFA | 437 | 1.55 | 0.35 | 0.16 | 0.78 | 2.15 | 543 | 1.52 | 0.34 | 0.18 | 0.73 | 1.89 |
| PUFA | 431 | 8.40 | 1.81 | 0.30 | 0.97 | 5.93 | 535 | 8.41 | 1.80 | 0.38 | 0.95 | 4.74 |
| ω3 | 427 | 0.28 | 0.07 | 0.03 | 0.79 | 2.18 | 531 | 0.26 | 0.07 | 0.30 | 0.77 | 0.23 |
| ω6 | 439 | 0.96 | 0.27 | 0.15 | 0.70 | 1.81 | 542 | 0.96 | 0.25 | 0.14 | 0.68 | 1.79 |
| CLA | 437 | 0.19 | 0.05 | 0.03 | 0.74 | 1.95 | 538 | 0.18 | 0.60 | 0.04 | 0.91 | 15.00 |
| C14:1 | 441 | 0.41 | 0.12 | 0.08 | 0.58 | 1.54 | 548 | 0.40 | 0.12 | 0.08 | 0.56 | 1.50 |
| C16:1 | 441 | 0.81 | 0.21 | 0.11 | 0.73 | 1.91 | 549 | 0.81 | 0.20 | 0.11 | 0.72 | 1.82 |
| C18:1 | 436 | 6.71 | 1.53 | 0.35 | 0.95 | 4.40 | 541 | 6.73 | 1.54 | 0.40 | 0.93 | 3.85 |
| C18:2 | 435 | 1.12 | 0.27 | 0.12 | 0.80 | 2.23 | 541 | 1.01 | 0.26 | 0.13 | 0.74 | 2.00 |

¹Tutti i campioni sono espressi in grammi: SFA= acidi grassi saturi dal C4 al C24; UFA = acidi grassi insaturi (C10:1 n1 + C12:1 n9 + C12:1 iso + C14:1 + C15:1 cis10 + C16:1 n9 + C16:1 n7 + C17:1 n9 + C17:1 n7 + somma isomeri minori trans del C18:1 + C18:1 trans n9 + C18:1 trans n8 + C18:1 trans n7 + C18:1 cis n9 + C18:1 cis n7 + somma isomeri minori cis del C18:1 + C20:1 n9 + C22:1 cis13 n9 + C24:1 cis15 n9+ C18:2 trans n6 + C18:2 cis n6 + somma degli isomeri minori del C18:2 + C18:3 n6 + C18:3 n3 + C18:2 cis9 trans11 + C18:2 cis11 trans13 + C18:2 trans10 cis12 + C18:2 tt + C20:2 n6 + C20:3 cis n6 + C20:4 n6 + C20:3 cis n3 + C20:5 cis n3 + C22:2 n6 + C22:4 n6 + C22:5 n6 + C22:5 n3 + C22:6 n3); MUFA= acidi grassi monoinsaturi; PUFA=acidi grassi polinsaturi; CLA = coniugati dell'acido linoleico (C18:2 cis 9 trans 11+ C18:2 cis 11 trans 13 + C18:2 cis 9 cis11+ C18:2 trans 10 cis 12+ C18:2 cis 11 cis 13+ C18:2 trans 11 trans 13); 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;

²Numero di campioni dopo l'eliminazione degli outliers

³RPD= residual predictive deviation =DS/SEcv

I valori di R² e SE sono migliorati nettamente in entrambe le calibrazioni quando gli acidi grassi sono stati espressi in g/L di latte anziché in g/100 g di grasso. Questo dipende in parte dal fatto che esiste una stretta correlazione tra il contenuto di specifici acidi grassi e il contenuto di grasso totale (che viene predetto con estrema precisione) e in parte dal fatto che le quantità in g/L sono state calcolate utilizzando il grasso totale predetto in sede di controllo funzionale, ottenuto dallo stesso spettro utilizzato per lo sviluppo delle

calibrazioni presentate in questo studio. È quindi possibile ipotizzare che la predizione che si ottiene per i contenuti dei singoli acidi grassi sia in realtà riconducibile alla predizione del contenuto di grasso totale del latte e per questo motivo si è preferito eseguire le analisi dei risultati solamente sui valori espressi in g/100g di grasso.

La media dei contenuti in SFA e MUFA, nonostante non sia in linea con la bibliografia, non subisce elevate variazioni con l'aggiunta o la sottrazione dei campioni raccolti durante i mesi estivi, e ciò può dimostrare che la differenza con la bibliografia non dipende dal periodo di raccolta dei campioni, come precedentemente supposto.

I primi parametri presi in considerazione sono stati R^2_{cv} e SE_{cv} . Ad un alto R^2_{cv} ha sempre corrisposto un basso SE_{cv} e viceversa. L' R^2_{cv} è risultato, in generale, abbastanza elevato ad eccezione della somma dei CLA e dei C14:1. È importante considerare che anche caratteri che presentano bassi valori di R^2 possono avere un'utilità in campo genetico, in quanto, come dimostrato nello studio da Cecchinato et al. (2009), al fronte di un basso R^2 si possono comunque ottenere correlazioni genetiche elevate. In questo caso, bassi valori di R^2 possono essere dipesi dalla bassa concentrazione in cui erano presenti CLA e C14:1 nel latte: in precedenti studi (Soyeurt et al., 2006) era stata evidenziata una correlazione positiva tra la media percentuale di acidi grassi e l' R^2_{cv} . Come si può però vedere in fig. 2, nel nostro studio non è stata individuata tale correlazione, in quanto alcuni acidi grassi presenti in quantità molto basse sono stati predetti con una accuratezza piuttosto alta. Si può però evidenziare il fatto che gli acidi grassi presenti in alte quantità mostravano sempre R^2_{cv} elevati.

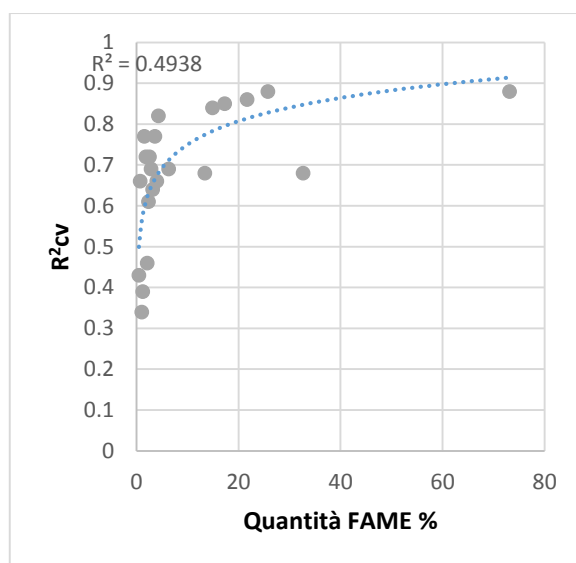


Fig.2 Relazione tra la quantità percentuale di acidi grassi e gli R^2_{cv}

Più in generale, è possibile notare come l'inclusione degli spettri provenienti dai campioni estivi abbia portato ad un abbassamento generale dei valori di R^2 e un innalzamento degli SE e sia stata quindi responsabile del peggioramento della capacità predittiva complessiva. Ciò è dovuto probabilmente al fatto che, durante il trasporto dall'allevamento al laboratorio in cui si sono eseguite le analisi, le temperature non sono state mantenute sufficientemente basse. Se i campioni, oltre ad essere addizionati del conservante, fossero stati sottoposti a catena del freddo probabilmente non si sarebbero osservate variazioni nella capacità predittiva dopo l'aggiunta dei campioni estivi, ed anzi, la loro inclusione avrebbe potuto apportare una maggiore variabilità nel profilo acidico facilitandone la predizione.

Nonostante i valori di R^2_{cv} e SE_{cv} peggiorino con l'aggiunta dei campioni prelevati nei mesi estivi, la qualità dell'equazione risulta comunque migliore di quelle ottenute in precedenti lavori (ad esempio Soyeurt et al., 2006 e De Marchi et al., 2011). Di particolare rilievo sono ad esempio gli SFA, UFA e MUFA che con i loro R^2_{cv} superiori all'80%, insieme al C:12 e C18:1n9, assicurano un ottimo punto di partenza per le analisi discriminanti.

Nei lavori precedentemente citati, invece, i valori di R^2_{cv} non hanno mai superato lo 0.70. Tale miglioramento può essere giustificato dall'utilizzo di un gas cromatografo a due dimensioni, rispetto ad un GC tradizionale, che ha portato ad una maggiore precisione nelle analisi.

Un ulteriore parametro che è stato preso in considerazione è stato l'RPD. Per tutti gli acidi grassi si sono ottenuti RPD superiori a 1, ma, addirittura, per un buon numero di acidi grassi, come ad esempio il C18:1n9 o la somma degli SFA e degli UFA, si sono osservati valori superiori a 2.

Come si può osservare ad elevati valori di R^2 corrispondano elevati valori di RPD, e ciò è un'ulteriore conferma dell'efficienza dell'equazione di calibrazione ottenuta, anche in seguito all'aggiunta dei campioni prelevati nel periodo estivo.

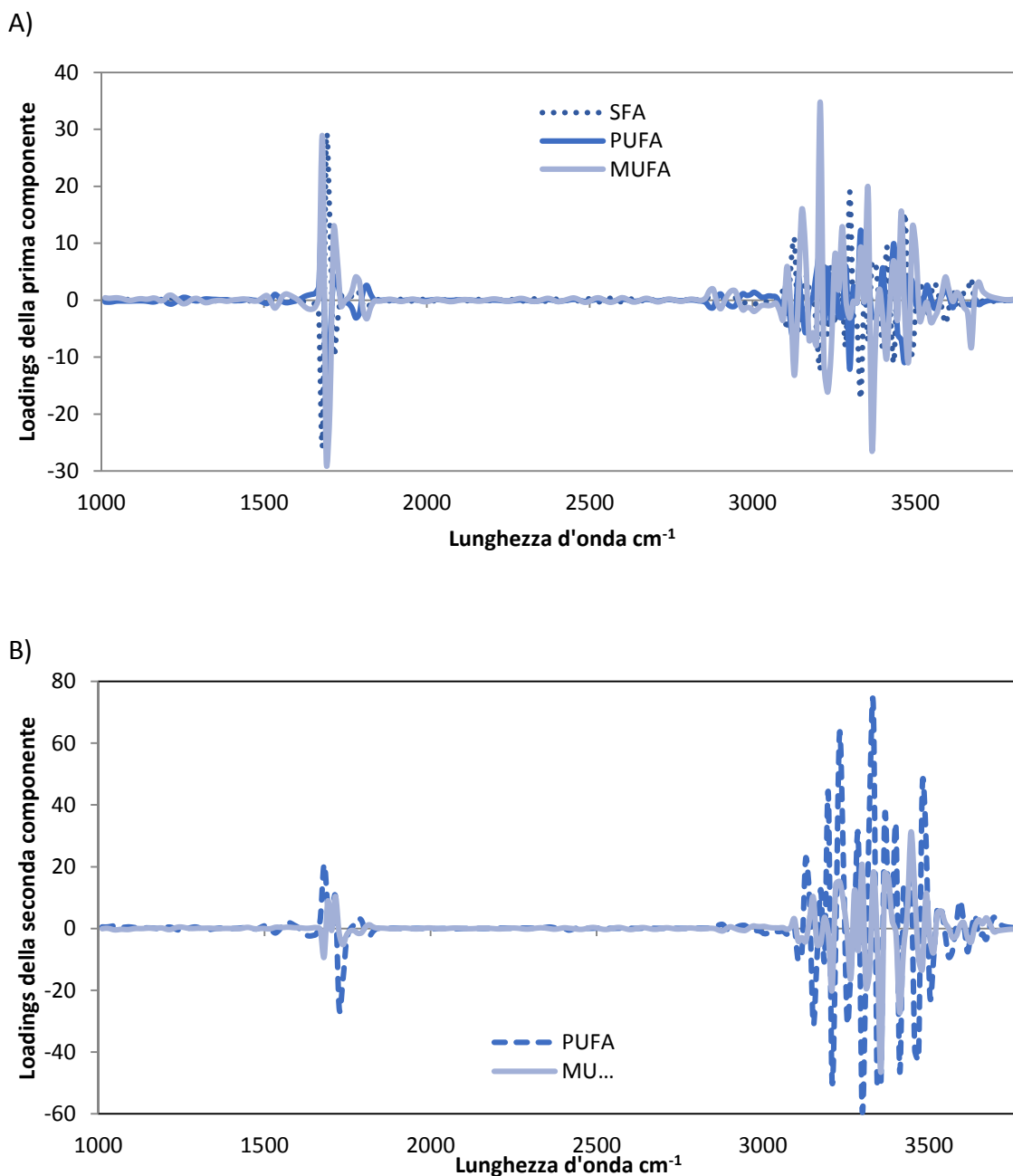


Fig.3 Loading prima componente (A) e seconda componente (B) dei valori in percentuale delle somme degli SFA, PUFA e MUFA

Infine, per verificare le basi molecolari delle predizioni sono stati esaminati i loadings della prima e della seconda componente MPLS, relativi agli SFA, MUFA e PUFA. Sebbene la maggior parte dei picchi siano molto simili in tutti e tre i gruppi di acidi grassi, già nella prima componente si possono osservare picchi caratteristici per gli SFA, soprattutto nella regione tra 3,000 e 3,500 cm⁻¹ che si era già visto essere la regione maggiormente variabile. Per quanto riguarda, invece, i picchi caratteristici in grado di distinguere i PUFA rispetto ai MUFA sono molto più evidenti nella seconda componente MPLS, a causa della scarsa capacità predittiva che l'equazione di calibrazione ha sui PUFA.

4.4 Validazione delle equazioni di calibrazione

La prima validazione, come ci si poteva aspettare osservando il peggioramento che subiva l'equazione di calibrazione dopo l'aggiunta dei campioni estivi, non è risultata sufficientemente affidabile, con R^2 estremamente bassi e rapporti SD O/P eccessivamente alti (Tab.3).

La seconda validazione, eseguita sui 122 campioni estratti in seguito a PCA, ha portato a valori di R^2 accettabili, pur essendo più bassi di quelli che erano stati ottenuti in cross-validation, soprattutto per quanto riguarda il C12:0, il C18:1n9, e le somme di tutti i grassi saturi e gli isomeri del C18:1. Al contrario, in alcuni casi, in particolar modo per quanto riguarda i CLA, i valori di R^2 sono risultati estremamente bassi, sebbene gli SE non si siano mai alzati eccessivamente. Ciò può dipendere dal fatto che alcuni acidi grassi erano presenti in quantità estremamente ridotte. Inoltre, i valori di R^2 avrebbero sicuramente potuto essere più alti, se si fosse riusciti ad ottenere campioni più variabili: nello studio di Coppa et al. (2010), l'utilizzo di bovine selezionate da precedenti studi di alimentazione per l'alta variabilità nella composizione di acidi grassi ha portato a valori estremamente alti di R^2 , soprattutto per quanto riguarda gli SFA (91%). Sempre nello stesso studio, gli autori hanno evidenziato una maggiore efficienza dell'equazione di calibrazione con l'utilizzo di campioni essiccati (l' R^2 per gli SFA in validazione è risultato 95%) piuttosto che campioni di latte fresco.

Per andare a verificare ulteriormente l'efficienza della validazione si può prendere in considerazione il rapporto tra la deviazione standard osservata e quella predetta. Più vicino a 1 si trova tale rapporto, migliore sarà l'efficienza dell'equazione, in fase di validazione.

Osservando la tabella si può notare come, passando dalla prima alla seconda validazione, si ha un abbassamento dei rapporti per ciascun acido grasso o somma di acidi grassi presa in considerazione. Questo conferma il fatto che eseguendo la validazione sui campioni estivi si ha un'efficienza di predizione estremamente bassa.

Tab.4 Parametri statistici stimati nelle due validazioni effettuate: sui campioni prelevati nei mesi estivi (N=122) e su 122 campioni selezionati dopo PCA dal dataset completo

| FAME ¹ | Validazione 1 | | | Validazione 2 | | |
|-------------------|------------------|---------------------|----------------|---------------|--------|----------------|
| | SEP ² | SD O/P ³ | R ² | SEP | SD O/P | R ² |
| C4:0 | 1.04 | 3.27 | 0.03 | 0.39 | 1.50 | 0.62 |
| C6:0 | 0.66 | 3.69 | 0.02 | 0.30 | 1.75 | 0.48 |
| C8:0 | 0.20 | 1.67 | 0.34 | 0.11 | 1.29 | 0.63 |
| C10:0 | 0.47 | 1.35 | 0.44 | 0.29 | 1.19 | 0.67 |
| C12:0 | 0.47 | 1.20 | 0.56 | 0.34 | 1.16 | 0.73 |
| C14:0 | 1.29 | 1.33 | 0.41 | 0.87 | 1.19 | 0.55 |
| C16:0 | 2.85 | 1.44 | 0.25 | 2.41 | 1.16 | 0.49 |
| C18:0 | 1.20 | 1.31 | 0.32 | 0.92 | 1.07 | 0.53 |
| C18:1n7 | 0.37 | 2.40 | 0.03 | 0.21 | 1.33 | 0.40 |
| C18:1n9 | 1.82 | 1.32 | 0.58 | 1.33 | 1.07 | 0.71 |
| C18:2n6 | 0.35 | 1.14 | 0.09 | 0.36 | 1.19 | 0.60 |
| SFA | 2.98 | 1.40 | 0.55 | 2.00 | 1.13 | 0.73 |
| UFA | 3.02 | 1.53 | 0.42 | 1.91 | 1.18 | 0.66 |
| MUFA | 2.46 | 1.47 | 0.49 | 1.73 | 1.14 | 0.65 |
| PUFA | 0.78 | 1.87 | 0.02 | 0.53 | 1.22 | 0.59 |
| ω3 | 0.17 | 1.75 | 0.00 | 0.17 | 1.62 | 0.35 |
| ω6 | 0.48 | 1.27 | 0.03 | 0.44 | 1.17 | 0.59 |
| CLA | 0.22 | 5.50 | 0.02 | 0.12 | 1.75 | 0.23 |
| C14:1 | 0.25 | 1.32 | 0.24 | 0.20 | 1.44 | 0.36 |
| C16:1 | 0.30 | 1.52 | 0.31 | 0.31 | 1.20 | 0.33 |
| C18:1 | 2.22 | 1.42 | 0.51 | 1.48 | 1.05 | 0.71 |
| C18:2 | 0.57 | 1.74 | 0.04 | 0.43 | 1.27 | 0.57 |

Validazione 1: sui 122 campioni prelevati in estate; Validazione 2: sui 122 campioni selezionati attraverso PCA

¹ Tutti gli acidi grassi sono espressi in percentuale: SFA= acidi grassi saturi dal C4 al C24; UFA = acidi grassi insaturi (C10:1 n1 + C12:1 n9 + C12:1 iso + C14:1 + C15:1 cis10 + C16:1 n9 + C16:1 n7 + C17:1 n9 + C17:1 n7 + somma isomeri minori trans del C18:1 + C18:1 trans n9 + C18:1 trans n8 + C18:1 trans n7 + C18:1 cis n9 + C18:1 cis n7 + somma isomeri minori cis del C18:1 + C20:1 n9 + C22:1 cis13 n9 + C24:1 cis15 n9+ C18:2 trans n6 + C18:2 cis n6 + somma degli isomeri minori del C18:2 + C18:3 n6 + C18:3 n3 + C18:2 cis9 trans11 + C18:2 cis11 trans13 + C18:2 trans10 cis12 + C18:2 tt + C20:2 n6 + C20:3 cis n6 + C20:4 n6 + C20:3 cis n3 + C20:5 cis n3 + C22:2 n6 + C22:4 n6 + C22:5 n6 + C22:5 n3 + C22:6 n3); MUFA= acidi grassi monoinsaturi; PUFA=acidi grassi polinsaturi; CLA = coniugati dell'acido linoleico (C18:2 cis 9 trans 11+ C18:2 cis 11 trans 13 + C18:2 cis 9 cis11+ C18:2 trans 10 cis 12+ C18:2 cis 11 cis 13+ C18:2 trans 11 trans 13); 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;

²Errore standard di predizione

³Rapporto tra la deviazione standard osservata e quella predetta

4.5. Analisi discriminante

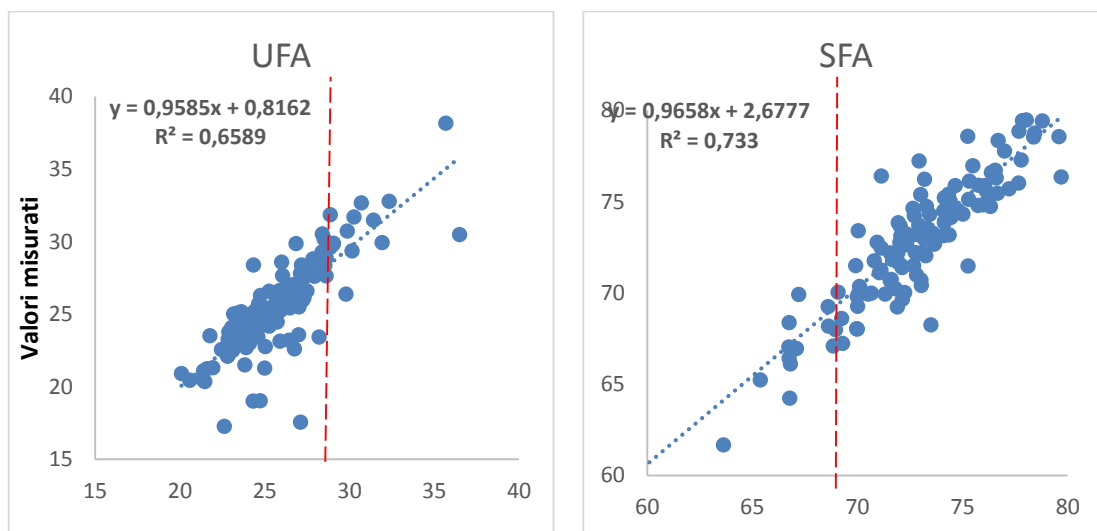
Nella tabella 5 sono riportate le percentuali di appartenenza alle diverse classi, ottenute durante le analisi discriminanti effettuate per gli SFA, UFA, ω3 e CLA.

Tab.5 Percentuali di campioni appartenenti alle differenti classi dell'analisi discriminante: classe degli osservati alti (A), e bassi (B) e classe dei predetti alti (A) e bassi (B) per gli acidi grassi saturi (SFA), acidi grassi insaturi (UFA), $\omega 3$ e CLA

| Classe osservati | Classe predetti | | | | | | | |
|------------------------------|-----------------|------|------|-------|------------|-------|-------|-------|
| | SFA | | UFA | | $\omega 3$ | | CLA | |
| | A | B | A | B | A | B | A | B |
| A | 84.43 | 1.64 | 9.00 | 4.92 | 7.37 | 7.37 | 4.92 | 15.57 |
| B | 4.09 | 9.80 | 0.82 | 85.24 | 2.46 | 82.79 | 6.56 | 72.95 |
| Errore, %¹ | 5.73 | | 5.74 | | 9.83 | | 22.13 | |

¹ Errore di attribuzione dei campioni predetti ad una classe

Per gli SFA si è osservato che l'equazione compieva un errore di attribuzione del 5,73% e che tale errore era in gran parte dato da campioni che, pur presentando valori al di sotto del valore soglia, erano predetti ad elevato contenuto di SFA. Negli UFA, fissando il valore soglia al 29 % l'equazione commetteva un errore del 5,74%, dato soprattutto da campioni a basso contenuto di UFA che venivano però predetti come ad alto contenuto. Più complicato è stato invece nel caso degli $\omega 3$ e dei CLA che, avendo già osservato un R^2 estremamente basso, hanno presentato un errore di assegnazione rispettivamente del 9.83% e del 22.13%.



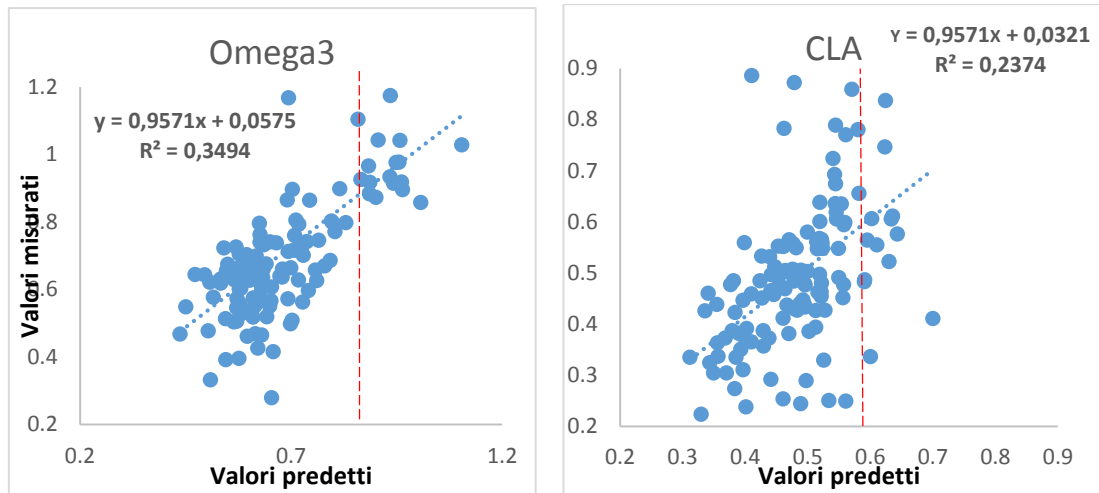


Fig. 4 Relazione tra valori (g/100g di grasso) misurati e predetti in validazione, ottenuta per gli acidi grassi insaturi (UFA), saturi (SFA), CLA e ω 3. La validazione è stata effettuata su 122 campioni, utilizzando le equazioni di calibrazione sviluppate a partire da 536 campioni appartenenti al dataset completo, comprendente sia i campioni prelevati in inverno che quelli prelevati in estate. La linea tratteggiata corrisponde al valore soglia utilizzato per l'analisi discriminante.

5. CONCLUSIONI

Il lavoro ha permesso di sviluppare una buona calibrazione MIRS per la predizione di numerosi acidi grassi o somme di essi, in particolar modo C12:0, C18:1, SFA, UFA e MUFA.

Si è notato un abbassamento dell'efficienza della predizione con l'aggiunta dei campioni estivi rispetto alla calibrazione effettuata sui soli campioni invernali, data probabilmente da una mancata standardizzazione delle temperature durante il trasporto dei campioni. Attraverso la validazione dell'equazione di calibrazione è stato possibile verificare l'efficienza di predizione su campioni che non fossero coinvolti nella calibrazione. Ciò ha confermato una buona efficienza per gli acidi grassi che presentavano già in calibrazione R^2 alti, ma ha evidenziato come alcuni acidi grassi, in particolar modo C16:1, CLA e $\omega 3$, non fosse possibile predirli con sufficiente accuratezza.

Infine, la terza parte dello studio ha permesso di effettuare delle analisi discriminanti su alcune somme di interesse commerciale evidenziando come la spettroscopia MIR potrebbe essere utilizzata nell'industria lattiero-casearia per differenziare il latte a basso contenuto di SFA e ad alto contenuto di UFA; ma risulterebbe invece poco affidabile per la differenziazione di latte in base al contenuto di CLA e $\omega 3$.

L'utilizzo del MIRS da parte delle industrie lattiero-casearie potrebbe, inoltre, essere favorito dal fatto che si tratti di una tecnica di analisi rapida, economica e che necessita di campioni estremamente ridotti.

Questo studio, inoltre, ha fornito al miglioramento genetico un valido strumento di valutazione della qualità in acidi grassi del latte.

E' ipotizzabile che aumentando la variabilità dei campioni e migliorando le tecniche di conservazione dei campioni sarà possibile migliorare la capacità predittiva dell'equazione di calibrazione, in modo da riuscire a predire in modo accurato tutti gli acidi grassi per una parte importante della popolazione della Pezzata Rossa Italiana.

BIBLIOGRAFIA

Atkins P. W., "Chimica generale", *Zanichelli editore*, Bologna, 1992

Bertoni G., "Sintesi a livello mammario dei componenti del latte", *Atti della società Italiana di Buiatria*, vol. XIX, 1997

Bonfatti V., Di Martino G., 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*, 12, 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

Chilliard Y., Ferlay A., Mansbridge R.M. and Doreau M., "Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated FA", *Ann. Zootech.* 49, 2000, pp. 181-205

Coppa M., Ferlay A., Leroux C., Jestin M., Chilliard Y., Martin B., Andueza D., "Prediction of milk fatty acid composition by near infrared reflectance spectroscopy", *International Dairy Journal*, 20, 2010, pp. 182-189

Chow C. K., "Fatty Acids in Foods and their Health Implications, Third Edition", *CRC Press*, 2008

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

De Marchi M., Riovanto R., Penasa M., Cassandro M., "At-line prediction of fatty acid profile in chicken breast using near infrared reflectance spectroscopy", *Meat Science*, 90, 2012, pp. 653-657

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

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

Jensen R. G., "Invited review: the composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000", *Journal of Dairy Science*, 2, 2002, pp. 295-350

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, pp. 163-176

Mucchetti G., Neviani E., "Microbiologia e tecnologia lattiero-casearia, qualità e sicurezza", *Context*, Milano, 2006

Park C.S., Jacobson N.L., "The Mammary gland and lactation", *Dukes' physiology of domestic animals*, *Reece W.O.* 2004, pp. 720-741

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

Rutten M. J. M., Bovenhuis H., Hettinga K. A., van Valenberg H. J. F., van Arendonk J. A. M., "Predicting bovine milk fat composition using infrared spectroscopy based on milk samples collected in winter and summer", *Journal of Dairy Science*, 12, 2009, pp. 6202-6209

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., Dehareng F., Gengler N., McParland S., Wall E., Berry D. P., Coffey M., Dardenne P., "Mid-infrared prediction of bovine milk fatty acids across multiple breeds, production systems, and countries", *Journal of Dairy Science*, 4, 2011, pp. 1657-1667

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., Dardenne P., "Potential estimation of major mineral contents in cow milk using mid-infrared spectrometry", *Journal of Dairy Science*, 6, 2009, pp. 2444-2454

Stoop W.M., "Genetic variation in bovin 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 Cereal Chemists*, St.Paul, MN, 2001

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il Prof. Paolo Carnier per l'opportunità concessami nel prendere parte a questo interessante progetto, alla Dott.ssa Valentina Bonfatti e al Dott. Gianluca Chiarot per la disponibilità costante dimostrata durante questi mesi.

Un ringraziamento particolare a Luca Grigoletto e a tutto lo staff del laboratorio La.Chi. per l'aiuto fornito durante le attività di analisi.

Ringrazio Ilaria Tabarelli per avermi accompagnata in questa avventura.

Grazie a Raffaello, Paola, Roberto, Davide, Marianna e a tutte quelle persone che sono sempre state pazientemente al mio fianco e mi hanno aiutato a raggiungere questo obiettivo.