

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE DEGLI ALIMENTI, NUTRIZIONE ANIMALE E
SICUREZZA ALIMENTARE -SANASA

Ciclo XXV

Settore Concorsuale di afferenza: 07/G1

Settore Scientifico disciplinare: AGR/18

STRATEGIE ALIMENTARI ATTE A INCREMENTARE IL CONTENUTO DI
OMEGA3 E CLA DEL LATTE

Presentata da: Dott. Nicola Pancioli

Coordinatore Dottorato

Relatore

Chiar.mo Prof. Roberto Rosmini

Chiar.mo Prof. Andrea Formigoni

Esame finale anno 2013

INTRODUZIONE	5
I LIPIDI NEL LATTE	8
ACIDI GRASSI	9
ORIGINE E SINTESI DEL GRASSO	10
METABOLISMO RUMINALE	12
DIGESTIONE E ASSORBIMENTO DEI LIPIDI	14
LA FORMAZIONE DI ACIDI GRASSI BATTERICI	16
CLASSIFICAZIONE DEI GRASSI IN FUNZIONE DEI LORO EFFETTI A LIVELLO RUMINALE	16
ACIDI GRASSI OMEGA3 E LORO PROPRIETA' NUTRACEUTICHE	19
REGOLAZIONE DEL PROCESSO INFIAMMATORIO	19
PREVENZIONE DEL DIABETE	22
PREVENZIONE DELLE MALATTIE CARDIOVASCOLARI	23
FATTORI CHE INFLUENZANO IL CONTENUTO DI OMEGA3 NEL LATTE	24
I CLA	27
BIOSINTESI DEI CLA	28
ASPETTI NUTRIZIONALI E PROPRIETA' NUTRACEUTICHE DEI CLA	29
EFFETTI FISIOLGICI	30
COMPOSIZIONE CORPOREA	30
METABOLISMO LIPIDICO EPATICO	32
CARCINOGENESI	33
INFIAMMAZIONE E SISTEMA IMMUNITARIO	35
METABOLISMO LIPIDICO E ATROSCLEROSI	36
INSULINO RESISTENZA E DIABETE	37
SALUTE DELLE OSSA	38
FATTORI CHE INFLUENZANO IL CONTENUTO IN CLA DEL LATTE	39
EFFETTI DELL'INTEGRAZIONE LIPIDICA NELL'ALIMENTAZIONE DEI RUMINANTI	42
FERMENTAZIONI RUMINALI	44
RISPOSTE PRODUTTIVE	45
PRODUZIONE DI LATTE	47
COMPOSIZIONE DEL LATTE	48
RIPRODUZIONE	49
PRINCIPALI FONTI LIPIDICHE UTILIZZATE NELL'ALIMENTAZIONE DEI RUMINANTI	52
SEME DI LINO	52
OLIO DI LINO	52
SOIA ESTRUSA	53
OLIO DI SOIA	55
OLIO DI PESCE	57
ACIDO STEARICO	58
SUPPLEMENTI MICROINCAPSULATI NELL'ALLEVAMENTO DELLA VACCA DA LATTE	60
LIVELLO DI INSATURAZIONE DELLA DIETA	61
PARTE SPERIMENTALE	63
FASE 1: INCREMENTO DI OMEGA3	69
RICERCA 1	69
RICERCA 2	77

<u>FASE 2: INCREMENTO DI OMEGA3 E CLA</u>	<u>83</u>
RICERCA 3	83
RICERCA 4	90
RICERCA 5	95
<u>FASE 3: INCREMENTO DI OMEGA3 E CLA SENZA PENALIZZARE I TITOLI DI GRASSO</u>	<u>100</u>
RICERCA 6	101
<u>CONCLUSIONI</u>	<u>119</u>
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	<u>121</u>

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni, e soprattutto nei paesi industrializzati, i consumatori hanno cominciato a prestare un interesse crescente nei confronti della propria dieta. L'attenzione non è rivolta solamente a soddisfare le proprie esigenze nutrizionali con il consumo di alimenti salubri, ma sempre più spesso è richiesto che i cibi apportino componenti che possano svolgere effetti positivi sulla salute o sulla prevenzione dell'insorgenza di alcune malattie; quando questi elementi sono ben rappresentate si parla di alimenti cosiddetti "funzionali".

Le opportunità di ricerca in campo nutrizionale nell'analisi del rapporto tra un alimento o componente alimentare e il miglioramento dello stato di salute e del benessere, oppure la riduzione del rischio di malattia, costituiscono la sfida più impegnativa per la comunità scientifica di oggi e di domani.

Il concetto di alimenti funzionali ebbe origine in Giappone negli anni '80; le autorità sanitarie di questo Paese riconobbero la necessità di migliorare la qualità della vita parallelamente all'incremento dell'aspettativa di vita di un numero crescente di anziani, per poter controllare i costi sanitari. Fu introdotto quindi il concetto di alimenti specificamente sviluppati per favorire la salute o ridurre il rischio di malattie. Gli alimenti funzionali, consumati nell'ambito di una dieta e di uno stile di vita equilibrato, offrono grandi potenzialità nel miglioramento della salute e/o nel contribuire alla prevenzione di determinate malattie. Tra gli alimenti funzionali troviamo quindi cibi che contengono minerali, vitamine, acidi grassi o fibre alimentari, e quelli addizionati con sostanze biologicamente attive, quali ad esempio alcuni principi attivi di origine vegetale, molecole antiossidanti e batteri probiotici. In generale quindi, un alimento può essere considerato funzionale se dimostra in maniera soddisfacente di avere effetti positivi su una o più funzioni specifiche dell'organismo, che vadano oltre gli effetti nutrizionali normali, in modo tale che sia rilevante per il miglioramento dello stato di salute e di benessere e/o per la riduzione del rischio di malattia.

È un fatto ampiamente riconosciuto che oggi sia possibile ridurre il rischio di malattie e conservare la propria salute e il benessere con uno stile di vita sano, che include anche una dieta corretta. Le continue conferme dell'importanza di alimenti come frutta, verdura e cereali integrali e le più recenti ricerche sugli antiossidanti alimentari e sulle combinazioni di sostanze protettive presenti nelle piante hanno favorito ulteriori sviluppi del mercato degli alimenti funzionali in Europa. Anche le tendenze demografiche e i cambiamenti socio-economici determinano la necessità di avere a disposizione alimenti dotati di maggiori proprietà benefiche. L'aumento dell'aspettativa di vita, che ha portato alla crescita del numero degli anziani e al desiderio di un miglioramento della qualità della vita, e il conseguente aumento dei costi sanitari, hanno spinto governi, ricercatori, professionisti del settore sanitario e industria alimentare a cercare un modo per gestire più efficacemente tali cambiamenti.

Esiste già un'ampia scelta di alimenti a disposizione del moderno consumatore, ma attualmente gli sforzi sono concentrati sull'identificazione di alimenti funzionali potenzialmente capaci di migliorare salute e benessere e ridurre il rischio, o ritardare l'insorgenza, di gravi patologie quali le malattie cardiovascolari (CVD), il cancro e l'osteoporosi. Abbinati a uno stile di vita sano, gli alimenti funzionali possono dare un contributo concreto alla salute e al benessere.

Altro tema d'importanza cruciale è la comunicazione dei benefici salutistici ai consumatori al fine di fornire le conoscenze necessarie per una scelta informata. Nell'Unione Europea (UE) non esiste una legislazione armonica sui claims nutrizionali (health claims), il che significa che vengono regolamentati a livello nazionale. In base all'attuale quadro normativo, la sfida per i Paesi membri consiste nel comunicare messaggi che evitino qualsiasi riferimento alla riduzione del rischio di malattia, anche qualora tali affermazioni siano avvalorate da prove scientifiche.

La legislazione europea in materia di etichettatura, vieta di attribuire a qualsiasi alimento la proprietà di prevenire, trattare, o curare una malattia dell'uomo o di fare riferimento a tali proprietà. In assenza di una direttiva in merito, gli Stati membri dell'Unione Europea hanno applicato varie interpretazioni della legislazione esistente in materia di etichettatura. Allo stesso tempo, vi è ampio consenso sul fatto che gli health claims debbano essere correttamente formulati per tutelare il consumatore, promuovere il commercio e favorire la ricerca accademica e l'innovazione nell'industria alimentare. Nella maggior parte dei Paesi dell'UE, esperti del settore, autorità disciplinari, gruppi di consumatori e scienziati hanno collaborato per definire le norme di validazione scientifica, comunicazione e presentazione degli health claims.

In seguito al crescente interesse per il concetto di alimenti funzionali e per gli health claims, l'Unione Europea ha realizzato un'azione concertata della commissione europea sulla Functional Food Science in Europe. Il programma è stato coordinato dall'International Life Sciences Institute Europe, con l'obiettivo di stabilire e sviluppare un approccio scientificamente fondato sulle evidenze richieste a sostegno dello sviluppo di prodotti alimentari che possono avere effetti benefici su una specifica funzione biologica, migliorando lo stato di salute e il benessere di una persona e/o riducendo il rischio di malattia. Il documento finale è stato pubblicato sul British Journal of Nutrition e sottolinea come gli alimenti funzionali debbano comunque restare «alimenti», come tradizionalmente li conosciamo, e dimostrare la loro efficacia nelle quantità normalmente consumate nella dieta. Funzionale può essere un alimento integrale naturale, un alimento cui è stato aggiunto un componente, o un alimento da cui è stato eliminato un elemento con mezzi tecnologici o biotecnologici. Può anche trattarsi di un alimento in cui è stata modificata la natura di uno o più componenti, o la biodisponibilità di uno o più elementi, o una qualsiasi combinazione di queste possibilità. Può essere destinato alla popolazione in genere o a gruppi specifici di persone che

possono essere definiti, per esempio, in base all'età o alla costituzione genetica.

Tuttavia, gli alimenti che rivendicano proprietà salutistiche devono tenere in considerazione il valore dietetico globale, compresa la quantità e la frequenza di consumo, ogni potenziale interazione con altri costituenti alimentari, qualsiasi impatto sul metabolismo e i potenziali effetti negativi, tra cui i rischi di allergia e intolleranza.

Uno degli alimenti di origine animale più studiati è il latte, che è un alimento fondamentale per il bambino come per l'uomo in età adulta.

Tra i componenti biologicamente attivi naturalmente presenti, e con cui è possibile arricchire il latte, notevole importanza rivestono gli acidi grassi della serie Omega3 e i CLA (coniugati dell'acido linoleico). E' stato dimostrato come i CLA abbiano attività anticancerogena e ipocolesterolemica, stimolino il sistema immunitario e prevengano l'insorgenza del diabete e delle malattie croniche non trasmissibili (Smit et al., 2010) (Mcguire and Mcguire, 2000). Le malattie croniche non trasmissibili rappresentano uno dei principali rischi per la salute dell'uomo a livello globale. Le malattie cardiovascolari, il cancro, il diabete e i disturbi respiratori cronici, sono responsabili della maggior parte dei decessi nel mondo occidentale. Secondo l'OMS circa l'80% delle malattie cardiovascolari e del diabete di tipo 2 potrebbero essere prevenute eliminando alcuni fattori di rischio comuni come l'alimentazione scorretta.

Il consumo di grassi del latte è stato oggetto di numerose critiche a causa del suo contenuto in alcuni acidi grassi saturi, che sarebbero responsabili di elevare il livello di colesterolo plasmatico associato a lipoproteine di bassa densità. Quest'aspetto è di notevole importanza, dato che i derivati del latte possono apportare da un 25% a un 60% de totale di acidi grassi saturi che l'uomo consuma giornalmente. Il grasso del latte contiene acidi grassi potenzialmente aterogenici se consumati in eccesso come l'acido laurico (C12:0), il miristico (C14:0) e il palmitico (C16:0); contiene inoltre acidi grassi benefici come quelli a corta catena, l'acido linoleico coniugato (*cis9 trans11* C18:2, CLA) e l'acido vaccenico (*trans11* C18:1, AV) che hanno proprietà anti tumorali ed effetti positivi sulla composizione dei lipidi plasmatici nonché sulla funzione cardiovascolare. I ruoli svolti dagli acidi grassi Omega3, invece, si manifestano nella regolazione dei processi infiammatori, nella prevenzione del diabete e delle malattie cardiovascolari.

I LIPIDI NEL LATTE

I lipidi sono un gruppo di sostanze che si trovano nei tessuti vegetali e animali e sono formati da carbonio, idrogeno e ossigeno; occasionalmente possono contenere fosforo, azoto e zolfo. Costituiscono un gruppo di sostanze eterogenee che hanno due caratteristiche principali: sono insolubili in acqua e solubili in solventi organici. A causa della loro insolubilità nelle soluzioni acquose, nel plasma per esempio, sono trasportati in associazione con speciali proteine formando delle particelle lipoproteiche. Gli acidi grassi (AG) trasportati nel plasma all'interno di chilomicroni e lipoproteine ad alta, bassa e molto bassa densità (HDL, LDL, VLDL) raggiungono la ghiandola mammaria e gli altri tessuti, dove vengono utilizzati per la formazione del grasso del latte (Champe et al., 2005).

Un metodo per classificare lipidi si basa sul fatto che siano saponificabili (se formano saponi con sodio e potassio) o insaponificabili:

- *saponificabili*: acidi grassi, gliceridi, fosfogliceridi, sfingolipidi, glicolipidi, cere;
- *insaponificabili*: steroidi, terpeni, prostaglandine.

I lipidi presenti nei vegetali da un punto di vista funzionale possono essere di tipo:

- *strutturale*; formano parte delle membrane strutturali e degli strati superficiali di protezione delle foglie delle piante;
- *di riserva*; sono i lipidi che si trovano nella frutta e nei semi; la maggior parte di questo tipo di lipidi sono sotto forma di trigliceridi.

Circa il 60% dei lipidi del latte viene prodotto dalla ghiandola mammaria a partire da acidi grassi provenienti dal circolo ematico, mentre il restante 40% viene sintetizzato *ex novo* dalle cellule della mammella partendo da acetato e β -idrossibutirrato (Cocchi M., Frega N.G., 2005). Da ciò deriva che la biosintesi dei lipidi del latte è influenzata sia dagli acidi grassi introdotti con la dieta dell'animale, sia da quelli sintetizzati *ex novo* a partire dall'acetato e dal butirrato.

Il latte bovino contiene in media dal 3,5 al 4,5% di grassi, rappresentati principalmente da: trigliceridi (98-99%), fosfolipidi (0,5-1%) e steroli (0,2-0,5%). Il grasso del latte in genere contiene un'alta percentuale (il 70% circa del totale) di acidi grassi saturi (AGS), acidi grassi monoinsaturi (AGMI per un 25-26% circa) e piccole quantità di acidi grassi polinsaturi (AGPI 3-3,5% circa).

In molte specie animali la composizione in acidi grassi del latte riflette fortemente quella della dieta, i ruminanti sono un'importante eccezione, in quanto i lipidi alimentari sono ampiamente modificati dal metabolismo batterico del rumine; una delle principali modificazioni ruminanti è la bioidrogenazione degli acidi grassi insaturi.

Si stima che il grasso del latte dei ruminanti contenga oltre 400 diversi acidi grassi, e ciò è dovuto in gran parte all'ampia formazione di intermedi del metabolismo lipidico che avviene nel rumine (Jensen, 2002).

La dieta può influenzare notevolmente la popolazione batterica e i processi microbici che si svolgono nel rumine e di conseguenza può avere effetti importanti sulla quantità e la composizione in acidi grassi del latte.

ACIDI GRASSI

Gli acidi grassi sono molecole formate da una catena idrocarburica lineare che termina con un gruppo carbossilico (-COOH) e si differenziano per la lunghezza della catena carboniosa (tra 4 e 22 atomi di carbonio), e per il numero dei doppi legami.

La maggior parte degli AG, tanto nelle diete come nell'organismo, presenta fra i 16 e i 18 atomi di carbonio.

Secondo il numero dei doppi legami, si classificano in:

- *Acidi Grassi Saturi (AGS)* se non presentano doppi legami;
- *Acidi Grassi Monoinsaturi (AGMI)* se presentano un doppio legame;
- *Acidi Grassi Polinsaturi (AGPI)* se presentano due o più doppi legami.

Mentre i lipidi in cui prevale la presenza di AGS sono solitamente solidi a temperatura ambiente, quelli più insaturi e/o a corta catena sono liquidi, avendo un punto di fusione più basso; essi inoltre sono più reattivi chimicamente ovvero più instabili alle reazioni con l'ossigeno. Quando c'è un doppio legame nella catena carboniosa, si possono presentare due forme di AG a seconda della disposizione nello spazio degli atomi di idrogeno legati agli atomi di carbonio del doppio legame:

- *cis*: quando i due atomi di idrogeno sono nello stesso lato del doppio legame (la maggior parte degli AG che si trovano in natura sono di questo tipo);
- *trans*: quando si trovano su lati opposti.

Gli AGPI si possono classificare in quattro famiglie a seconda di dove si trova il primo doppio legame nella catena incominciando a contare gli atomi di carbonio dall'estremo del gruppo metilico: n-3 (Omega3), n-6 (Omega6), n-7 (Omega7), e n-9 (Omega9).

Gli acidi grassi della famiglia n-7 si sintetizzano a partire dall'acido palmitico (C16:0) mentre quelli della famiglia n-9 lo fanno a partire da acido stearico (C18:0). Gli acidi grassi di queste due famiglie non sono considerati essenziali, dal momento che possono essere sintetizzati dall'organismo. Viceversa, gli AG delle serie n-3 e n-6 si considerano essenziali e vitali per la salute perché non possono essere sintetizzati dagli organismi e, pertanto, devono essere assunti attraverso gli alimenti.

L'acido linoleico (C18:2) appartiene alla famiglia n-6, mentre l'acido linolenico (C18:3) appartiene alla famiglia n-3. Dalla trasformazione di un AG di una famiglia si possono generare solo AG della stessa famiglia; per esempio un AG della famiglia n-3 non può convertirsi a uno della famiglia n-6 e viceversa. Gli acidi linoleico e linolenico, così come altri AGPI, formano parte di varie membrane cellulari e hanno un ruolo importante nel trasporto dei lipidi e nell'attività di alcuni enzimi lipoproteici. Inoltre questi AG sono i precursori della sintesi degli eicosanoidi che includono: prostaglandine, trombossani e leucotrieni. Gli eicosanoidi sono sostanze ormonali che regolano molte funzioni fisiologiche come la coagulazione sanguinea, la pressione venosa, la contrazione della muscolatura liscia e la risposta immunitaria. Questi AG essenziali sono anche la fonte di altri AG importanti quali l'acido eicosapentaenoico (EPA), l'acido idrossieicosatrienoico (DPA) e l'acido docosaesanoico (DHA). L'EPA è il precursore delle prostaglandine della serie n-3, dei trombossani e dei leucotrieni della serie n-5. Il DHA si pensa giochi un ruolo importante nella funzione cerebrale e retinale. L'EPA e l'idrossieicosatrienoico hanno un effetto modulatore nella produzione di eicosanoidi a partire dall'acido arachidonico (Jeffrey et al., 2001).

La composizione dei fosfolipidi di membrana viene continuamente modificata in risposta a stimoli esterni, in funzione della dieta e dell'età dell'animale (Moran, 1994). Questi cambiamenti comportano delle conseguenze a livello funzionale: alcuni enzimi con azione a livello di membrana risentono del cambiamento nella composizione in acidi grassi, ad esempio l'adenilato ciclasi, la 5-nucleotidasi e la Na⁺/K⁺ ATPasi (Murphy, 1990; Brenner, 1984). Il meccanismo attraverso cui le membrane lipidiche sono in grado di modulare l'attività degli enzimi o la funzionalità dei recettori non è stato ancora del tutto chiarito, ma la modificazione della fluidità di membrana (Acta et al., 1988) e le modifiche acido grasso-dipendenti della struttura dei complessi proteici di superficie (Murphy, 1990), sembrano essere le ipotesi più accreditate. Gli acidi grassi polinsaturi sono quindi dei costituenti fondamentali delle membrane cellulari e ne condizionano la funzionalità. Se presenti in basse concentrazioni, le membrane tendono ad incorporare le catene lineari di acidi grassi saturi, che le rendono meno fluide. Questa condizione rende le cellule e i tessuti più sensibili ad agenti esterni lesivi, come i raggi UVA, raggi X, batteri e virus (Mussa P.P., 1997).

Attraverso un'opportuna assunzione di acidi grassi della serie Omega3 con la dieta, è possibile ottenere un loro aumento a livello cellulare e tissutale, con positive ricadute sulle funzioni cellulari.

ORIGINE E SINTESI DEL GRASSO

Come detto in precedenza, circa il 60% dei lipidi del latte è prodotto dalla ghiandola mammaria a partire da acidi grassi provenienti dal circolo ematico, mentre il restante 40% viene sintetizzato *ex novo* dalle cellule della mammella partendo dall'acetato e dal β -idrossibutirrato di origine ruminale (Chilliard and Ferlay 2004). Per questo motivo, la biosintesi dei lipidi del latte è influenzata dagli

acidi grassi introdotti con la dieta dell'animale, da quelli mobilizzati dalle riserve corporee e da quelli sintetizzati *ex novo* a partire dai substrati ruminanti.

Gli acidi grassi preformati vengono utilizzati direttamente dalla ghiandola mammaria per la sintesi di grasso, e derivano da lipoproteine circolanti e da acidi grassi non esterificati (AGNE); questi ultimi provengono rispettivamente dall'assorbimento dei lipidi a livello intestinale e dalla mobilitazione delle riserve di grasso corporeo (Barber et al. 1997). Nei ruminanti, gli acidi grassi del latte che provengono dalla circolazione derivano prevalentemente dall'assorbimento di acidi grassi alimentari e da acidi grassi microbici. Tuttavia, quando le bovine sono in bilancio energetico negativo, il contributo degli acidi grassi mobilizzati aumenta in proporzione diretta alla portata del deficit energetico (Bauman and Griinari 2001). L'abilità del tessuto mammario a utilizzare trigliceridi provenienti dalle lipoproteine plasmatiche, è determinata dall'attività della lipoproteina lipasi (LPL). La capacità di captare i trigliceridi è generalmente ben correlata alla loro concentrazione plasmatica (Chilliard et al., 2001). Nei ruminanti, la biosintesi degli acidi grassi avviene prevalentemente nel tessuto adiposo e nella ghiandola mammaria, mentre il fegato è maggiormente impegnato nella sintesi di glucosio (Vernon and Flint, 2007); al contrario di ciò che avviene nei monogastrici, dove l'attività biosintetica è svolta in massima parte proprio dal fegato.

Gli acidi grassi possono essere prodotti con due diversi meccanismi a livello cellulare:

- *sintesi citoplasmatica*: via principalmente utilizzata dai tessuti a intensa attività metabolica;
- *sintesi mitocondriale*: completa la precedente.

Gli acidi grassi con catene fino a 16 atomi di carbonio vengono sintetizzati dal citoplasma con un processo metabolico che utilizza due enzimi (Chilliard et al., 2001): uno catalizza la formazione di malonil-CoA dall'acido acetico, l'altro catalizza la condensazione ciclica del malonil-CoA con molecole di β -idrossibutirrato e/o di acetato (Barber et al., 1997). Il processo può proseguire o con la sintesi mitocondriale, come avviene in molti tessuti, o mediante l'allungamento della catena attraverso successive condensazioni che determinano la formazione di catene di acidi grassi con massimo 14 o 16 atomi di carbonio, come avviene nella ghiandola mammaria (Poore et al., 1991).

La ghiandola mammaria infatti non può sintetizzare *ex novo* acidi grassi con più di 16 atomi di carbonio; può invece utilizzare acidi grassi a media e lunga catena derivanti dal circolo ematico, sui quali può intervenire l'enzima stearoil-CoA desaturasi introducendo un doppio legame in posizione $\Delta 9$. In altri tessuti invece l'acido palmitico può essere allungato fino all'ottenimento di catene con 22 atomi di carbonio.

Cellule secretorie mammarie totalmente differenziate, esprimono un'alta attività della $\Delta 9$ desaturasi che converte l'acido stearico in acido oleico (*cis* 9 C18:1) (Kinsella, 1972). Circa il 40% del dell'acido stearico assorbito dalla ghiandola mammaria è desaturato, contribuendo così per oltre il

50% dell'acido oleico che si ritrova nel grasso del latte (Enjalbert et al., 1998). Inoltre, l'acido vaccenico (*trans11* C18:1) formato nel rumine e assorbito nell'intestino, può essere desaturato per formare acido rumenico, cioè: *cis9,trans11* C18:2, che è il principale isomero dell'acido linoleico coniugato (CLA) nel latte vaccino.

La sintesi di acidi grassi, l'assorbimento e la desaturazione, contribuiscono a creare un pool di acidi grassi disponibili a essere esterificati col glicerolo per formare trigliceridi, che costituiscono il 97-98% dei lipidi totali del latte. La distribuzione asimmetrica degli acidi grassi sulla molecola di glicerolo, influenza le proprietà fisiche del grasso del latte diminuendo il suo punto di fusione (ad esempio l'esterificazione preferenziale degli acidi grassi a catena corta e dell'acido oleico in posizione n-3) (Palmquist et al., 1993).

Il contenuto del latte in acidi grassi Omega3 è prevalentemente legato alla disponibilità intestinale, che però è fortemente limitata dai processi di bioidrogenazione ruminale. Infatti, i grassi subiscono un intenso metabolismo a livello ruminale e vi sono grandi differenze tra il profilo in acidi grassi della dieta e quello che si ritrova nell'intestino. I due principali processi che si verificano nel rumine sono l'idrolisi dei trigliceridi (lipolisi) e la bioidrogenazione degli acidi grassi insaturi (Bauman and Griinari, 2003). I batteri sintetizzano AG *ex novo* a partire da precursori carboniosi, quindi i lipidi che arrivano al duodeno sono composti da AG di origine dietetica e microbica.

METABOLISMO RUMINALE

La popolazione microbica del rumine è in grado di degradare e fermentare carboidrati e proteine per produrre acidi grassi volatili (AGV); i più importanti sono l'acetato, il propionato e il butirrato; acetato e butirrato sono i precursori degli acidi grassi a corta e media catena. Nel rumine avviene un intenso metabolismo lipidico microbico; la prima trasformazione cui vanno incontro i lipidi quando raggiungono il rumine è l'idrolisi dei legami esteri di trigliceridi, fosfolipidi e glicolipidi: passaggio cardine per la bioidrogenazione degli AG. Questo è un processo extracellulare e porta alla liberazione di glicerolo, che è rapidamente metabolizzato dai batteri ruminali in AGV. La lipolisi di glicolipidi, fosfolipidi e trigliceridi della dieta, conduce alla liberazione di acidi grassi che in larga misura vengono idrogenati. In breve, gli acidi grassi polinsaturi (AGPI) sono prima isomerizzati e poi idrogenati. Ad esempio, l'acido linoleico (*cis9, cis12* C18:2) è isomerizzato a coniugato dell'acido linoleico (CLA: *cis9, trans11* C18:2) e poi idrogenato in primo luogo ad acido *trans* vaccenico (*trans11* C18:1), quindi ad acido stearico (C18:0).

Una grande quantità di acidi grassi monoinsaturi a 18 atomi di carbonio si trova nel contenuto duodenale. La bioidrogenazione ruminale, definita anche come la scomparsa degli acidi linoleico e linolenico tra la bocca e il duodeno, è un processo molto esteso: riguarda mediamente l'80% dell'acido linoleico e il 92% dell'acido linolenico. La minor idrogenazione dell'acido linoleico può

essere spiegata in parte con una sua incorporazione nei batteri, ma è anche probabilmente dovuto ad una diversa via biochimica di idrogenazione (Doreau and Ferlay, 1994). In questo processo gli acidi grassi insaturi liberati dalla lipolisi vengono trasformati in forme sature dai microrganismi ruminanti attraverso l'idrogenazione, che è dovuta alla natura "tossica" degli AGI su molti batteri ruminanti. Le due popolazioni batteriche responsabili di queste reazioni sono generalmente indicate come "popolazione A" e "popolazione B", per effetto delle diverse vie metaboliche (Kemp and Lander, 1983). La popolazione A satura gli acidi linoleico ed α e γ linolenico ad acido vaccenico, mentre la popolazione B termina la sequenza di idrogenazione riducendo l'acido vaccenico ad acido stearico. Per ottenere la bioidrogenazione completa degli AGPI sono generalmente richiesti batteri di entrambi i gruppi. Sebbene il gruppo A contenga molti batteri che possono idrogenare gli acidi grassi polinsaturi a *trans* C18:1, solo poche specie appartenenti al gruppo B possono idrogenarlo ad acido stearico (Harfoot, 1994). Il primo passaggio, catalizzato dall'enzima linoleico isomerasi, è l'isomerizzazione del doppio legame in posizione *cis12* dell'acido linoleico (*cis9, cis12* C18:2) ad acido rumenico (RA: *cis9, trans11* C18:2). L'enzima linoleico isomerasi si trova legato alla membrana batterica ed è molto selettivo, poiché riconosce solo dieni con una stechiometria del tipo: *cis9, cis12*. Il secondo passaggio, che avviene molto velocemente, è l'idrogenazione del doppio legame *cis* del diene coniugato che porta alla formazione di acido vaccenico (*trans11* C18:1). Il passaggio finale è quindi l'idrogenazione dell'acido vaccenico ad acido stearico (C18:0). In questo caso la cinetica di reazione è lenta, e ciò consente all'acido vaccenico di sfuggire al processo di bioidrogenazione, di accumularsi nel rumine per poi essere assorbito e desaturato nella ghiandola mammaria per azione della $\Delta 9$ desaturasi. Anche i doppi legami coniugati degli acidi α -linolenico (*cis9, cis12, cis-15* C18:3) e γ - linolenico (*cis-6, cis9, cis12* C18:3) subiscono nel rumine un'iniziale isomerizzazione con la formazione di trieni coniugati, tra cui il più importante è l'acido ottadecatrienoico coniugato, che con successiva idrogenazione è ridotto a AV e poi ad acido stearico (C18:0).

L'acido vaccenico rappresenta quindi un intermedio comune nella bioidrogenazione degli acidi α e γ linolenico e dell'acido linoleico (Bauman and Grinari, 2000). Eventuali variazioni della popolazione batterica ruminale possono modificare il normale processo di bioidrogenazione e di conseguenza la composizione acidica del grasso del latte. Ad esempio, una riduzione del pH ruminale induce variazioni nella popolazione batterica e modifica i prodotti finali della fermentazione. I batteri cellulolitici come il *Butyrivibrio fibrisolvens* sono i principali responsabili della bioidrogenazione ruminale. La somministrazione di diete caratterizzate da un basso rapporto foraggi/concentrati, promuovendo una riduzione di pH ruminale, determinano una riduzione del rapporto dei batteri cellulolitici a favore di propionici, lattici o amilolitici. In coltura cellulare continua si è visto che ad

un pH di 5,75 la resa di crescita di *Butyrivibrio fibrisolvens* era il 75% del suo optimum, mentre a pH di 5,5 il batterio non sopravviveva (AbuGhazaleh and Jenkins, 2004). Queste condizioni possono portare a una riduzione del grasso del latte, detta anche “sindrome del latte magro” o “milk fat depression” (MFD); gli studi sulle cause della MFD hanno visto per esempio che questa condizione è spesso associata a un aumento di acidi grassi C18:1. Studi più approfonditi hanno evidenziato che in casi di MFD il *trans10* C18:1 sostituisce il *trans11* C18:1. Sono state proposte diverse ipotesi sui meccanismi che portano alla produzione del *trans10* C18:1 (Bauman and Griinari, 2000). La più plausibile di queste prevede l’azione di una specifica *cis9, trans10* isomerasi batterica, che porterebbe alla formazione dei doppi legami coniugati *trans10, cis12*. Questa ipotesi è confermata dal fatto che la somministrazione di diete a basso contenuto di fibra inducono un aumento della concentrazione di *trans10, cis12* CLA nel latte. Nel passaggio successivo, la riduzione del legame in posizione 12 porta alla formazione del *trans10* C18:1. La MFD è associata a cambi della popolazione batterica ruminale e, in particolare, aumenti di *trans10, cis12* CLA sono stati correlati ad aumenti di *Megasphaera elsdenii* (Palmonari et al., 2010).

DIGESTIONE E ASSORBIMENTO DEI LIPIDI

La quantità di lipidi che entra nel duodeno dei ruminanti spesso supera la quantità ingerita, e l’incremento è maggiore con diete ad alto contenuto di foraggi. Le secrezioni gastriche dell’abomaso causano la disintegrazione delle cellule batteriche e protozoarie arrivate dal rumine, quindi i lipidi che lasciano il rumine sono prevalentemente acidi grassi liberi (85-90%) e fosfolipidi (10-15%), che costituiscono parte delle membrane delle cellule microbiche. Nel rumine, la maggior parte degli acidi grassi liberi si trova sotto forma di sali di potassio, sodio o calcio a causa del pH quasi neutro (6,0–6,8) del liquor ruminale. Dopo aver attraversato le condizioni acide (pH 2) dell’abomaso, i sali di acidi grassi si dissociano e gli acidi grassi liberi possono essere assorbiti sulla superficie di piccole particelle di ingesta. Il processo di bioidrogenazione che subiscono gli acidi grassi a lunga catena è graduale: C18:3 → C18:2 → *trans11* C18:1 → C18:0; C18:1 → C18:0; C16:1 → C16:0.

Ad ogni passaggio uno specifico acido grasso subisce l’idrogenazione o esce dal rumine. La stima media dei tassi orari di bioidrogenazione per C16:1, C18:1, *trans11* C18:1, C18:2 e C18:3 è la seguente (Moate et al., 2004):

C16:1	C18:1	<i>trans11</i> C18:1	C18:2	C18:3
39,3 %/h	27,4 %/h	22,8 %/h	87,6 %h	244 %/h

Gli acidi grassi liberi sono costituiti prevalentemente da acidi grassi saturi (80-90%), rappresentati per circa due terzi dall’acido stearico e per circa un terzo da acido palmitico.

Le concentrazioni di lipidi nella bile dei ruminanti sono nell'ordine di 1400 mg/100 ml, la fosfatidilcolina ne rappresenta circa l'80%. I principali acidi grassi presenti nella fosfatidilcolina della bile di pecora, con valori simili nelle vacche, sono i seguenti: palmitico 36%; stearico 9,8%; oleico 27,9%; linoleico 6,6%; linolenico 4,9%; *cis*9, *trans*11 C18:2 4,7%; *cis*9, *trans*11, *cis*-15 C18:3 1,4% (Christie, 2003).

Anche se evidente, l'attività della lipasi pancreatica nei ruminanti è molto minore rispetto ai monogastrici; per quanto riguarda le fosfolipasi pancreatiche, la fosfolipasi A₁ idrolizza i legami esteri in posizione sn-1 della fosfatidilcolina e rilascia principalmente acidi grassi saturi, mentre la fosfolipasi A₂ idrolizza i legami esteri in posizione sn-2 e rilascia in maggior parte acidi grassi insaturi. L'attività di queste due fosfolipasi è fortemente inibita dalle condizioni acide del duodeno (pH 2-3,5) e del digiuno prossimale (pH 3,6-4,2). Un'apprezzabile idrolisi dei fosfolipidi inizia solo quando le ingesta raggiungono il medio-digiuno (pH 4,7-6,0) e continua in tutto il digiuno distale (pH 6-7,6).

Prima che possa verificarsi qualsiasi assorbimento, i lipidi di origine esogena o endogena legati alle particelle di cibo, devono essere trasferiti alla fase di micelle solubili, e la funzione dei costituenti biliari in questo trasferimento è particolarmente importante nei ruminanti. In generale, la capacità di assorbire acidi grassi a 16-18 atomi di carbonio è maggiore di quella osservata nei non ruminanti. Nel duodeno dei ruminanti, gli acidi grassi sono assorbiti principalmente come acidi grassi liberi, mentre nei monogastrici, i lipidi vengono emulsionati e raggiungono il duodeno come trigliceridi e fosfolipidi. La lipasi pancreatica agisce sui trigliceridi rilasciando due acidi grassi in posizione sn-1 e sn-3 e dunque residua un monogliceride con l'acido grasso in posizione sn-2; questi composti formano delle micelle coi sali biliari e vengono quindi assorbiti sia come AG liberi sia come monogliceridi. Dopo la riesterificazione nelle cellule intestinali il trasporto avviene prevalentemente come VLDL attraverso la linfa nei mammiferi e attraverso il sistema portale negli uccelli (Doreau et al., 1988).

La digeribilità degli acidi grassi dipende dalla lunghezza della catena, ma non differisce tra i 16C e i 18C, con valori rispettivamente del 79% e 77%. Inoltre sembra essere inferiore per acidi grassi con 20C o 22C, anche se i dati disponibili sono pochi. Dalla letteratura sappiamo che la digeribilità media di acidi grassi a 18C si attesta su valori del 77%, 85%, 83%, e 76% rispettivamente per 0, 1, 2, o 3 doppi legami (Doreau and Chilliard, 1997). Questi risultati richiedono però due osservazioni: in primo luogo i valori per C18:3 sono di scarsa precisione a causa delle piccole quantità che raggiungono il duodeno; secondo, i valori per C18:1 combinano diversi isomeri, la cui quota dipende dalla natura degli acidi grassi alimentari. Per lo stesso acido grasso, la digeribilità varia a seconda della posizione nella molecola di glicerolo: è maggiore quando gli AGS sono esterificati in posizione

sn-2 rispetto alle posizioni sn-1 o sn-3, forse perché gli acidi grassi liberi apolari sono meno facilmente assorbibili rispetto agli sn-2 monogliceridi (Doreau and Chilliard, 1997).

LA FORMAZIONE DI ACIDI GRASSI BATTERICI

I batteri ruminali possono sintetizzare e/o incorporare AG attraverso le loro membrane cellulari (Demeyer and Doreau, 1999). Quando c'è una grande quantità di AG liberi disponibili, la capacità d'incorporazione supera quella di sintesi, mentre il contrario accade in assenza di lipidi aggiunti (Bauchart et al., 1990). I batteri ruminali si caratterizzano per avere un'alta proporzione di AGS nella loro composizione, soprattutto C16:0 e C18:0, che provengono sia dall'incorporazione dei lipidi dietetici che dalla sintesi *ex novo*. Inoltre, gli AG batterici contengono vari AG mono (es. *trans10* C18:1, *trans11* C18:1) e AG poliinsaturi C18 (es. *cis9*, *trans11* C18:2, *trans11* C18:2, *trans10*, *cis12* C18:2, *trans11 cis-15* C18:2) (Katz and Keeney, 1966) derivati dalla bioidrogenazione degli AG dietetici linoleico e linolenico (Katz and Keeney, 1966).

I batteri ruminali si caratterizzano per avere una gran quantità di AG a catena dispari ramificata nelle membrane lipidiche (C15:0, iso C15:0, anteiso C15:0, C17:0, iso C17:0, anteiso C17:0) (Bas et al., 2003). Gli acidi grassi saturi *iso* e *anteiso* sono stati trovati anche in funghi, molluschi e fitoplancton, ma sono generalmente presenti in elevate quantità nei batteri (Harwood and Russell, 1984). Gli isomeri C15 sono solitamente i più abbondanti nei batteri e il rapporto *iso/anteiso* può essere utilizzato come indicatore della moltiplicazione batterica nel rumine.

Oltretutto sembra che i batteri siano capaci di sintetizzare (*ex novo*) AG ramificati di catena pari (soprattutto iso C14:0 e iso C16:0) (Bas et al., 2003). Jenkins (1992) ha stimato che la sintesi di lipidi microbici è di 15 g/kg di sostanza organica digerita nel rumine libero da grassi. Approssimativamente l'85-90% di AG che lasciano il rumine sono AG liberi e il 10-15% sono fosfolipidi microbici.

I protozoi non sono capaci di produrre CLA e *trans11* C18:1 da soli, però possono influire sulla disponibilità di AG per l'animale. Si è osservato che i protozoi incorporano preferenzialmente CLA e *trans11* C18:1 nelle loro membrane; alcuni protozoi cigliati sono ritenuti selettivamente nel rumine, andando a interferire sul flusso duodenale e di conseguenza sulla concentrazione in carne e latte (Jenkins et al., 2008).

CLASSIFICAZIONE DEI GRASSI IN FUNZIONE DEI LORO EFFETTI A LIVELLO RUMINALE

Un modo per classificare i lipidi utilizzati nelle razioni dei ruminanti è basato sulle possibili interazioni che possono avere con il microbiota ruminale. In particolare si considerano due aspetti: l'influenza sulla digeribilità degli altri nutrienti della razione, e la resistenza alla bioidrogenazione.

Secondo questi criteri possiamo classificare i grassi come reattivi o inerti a livello ruminale.

Reattivi: i grassi della razione possono subire modifiche a livello ruminale, già spiegate anteriormente, come la lipolisi e la bioidrogenazione. Questi processi hanno il potere di interferire con le fermentazione ruminali e ridurre la digeribilità di altri nutrienti. La frazione più suscettibile a quest'azione è la fibra. Generalmente gli AG insaturi deprimono maggiormente la digeribilità della fibra di quanto non facciano gli acidi grassi saturi. Fra i grassi più reattivi a livello ruminale si includono gli oli di semi oleaginosi (cotone, soia, colza, girasole ecc.), i grassi di origine animale come il sego e lo strutto (anche se sono meno reattivi per essere ricchi in AGS) e i sottoprodotti con un contenuto in grasso elevato. I grassi reattivi subiscono il processo di bioidrogenazione da parte dei microrganismi ruminali e in quantità modeste hanno poca influenza sulla modificazione del profilo di AGI del latte, dal momento che gli AGI devono essere addizionati in determinate forme resistenti alla bioidrogenazione per poter aumentare il grado di insaturazione del latte (Kennelly, 1996).

Inerti: anche detti protetti o by-pass, comprendono un gruppo di prodotti specifici per ruminanti, caratterizzati per avere un minimo effetto inibitorio sul metabolismo dei batteri gram positivi e protozoi e con poco o nessun effetto negativo sulla digeribilità del resto dei componenti della razione. Questa protezione si ottiene senza che vi sia un peggioramento apparente della digeribilità intestinale degli acidi grassi; in tal senso, l'utilizzo di questi grassi potrebbe modificare il profilo degli AG del latte e dei tessuti (Mateos et al., 1995). Anche se sono considerati inerti ai livelli utilizzati, possono ancora essere idrolizzati se sono trigliceridi o idrogenati se sono insaturi, sebbene questo processo si svolga lentamente. I grassi inerti esistenti nel mercato corrispondono principalmente a due grandi gruppi: i saponi di calcio e i grassi idrogenati. Un vantaggio importante di questo tipo di grassi è la loro natura solida, che ne permette un utilizzo in piccole aziende senza ricorrere a installazioni *ad hoc* per liquidi o direttamente in stalla, nel carro miscelatore o nella razione. I saponi di calcio derivano dalla saponificazione degli AG liberi con ioni di calcio; a pH normali del ruminale rimangono infatti indissociati, sono insolubili nel liquido ruminale e pertanto sono inerti. Nell'abomaso il pH raggiunge valori molto bassi (2,0-2,5) quindi i saponi si dissociano liberando calcio e AG che vengono assorbiti nell'intestino. I saponi di calcio permettono che una maggior quota di AGI raggiunga l'intestino tenue e fanno sì che la digeribilità intestinale degli stessi aumenti. Anche se nella maggior parte dei casi questi saponi di calcio non influenzano il metabolismo ruminale, occasionalmente, come conseguenza di un pH ruminale basso o di una grande quantità di AGI nel sapone, può verificarsi la dissociazione del sale, influenzando così il metabolismo microbico ruminale e il tasso di idrogenazione degli AG presenti (Demeyer and Doreau, 1999). Tra gli aspetti negativi dell'utilizzo dei saponi bisogna annoverare la scarsa appetibilità e il loro alto contenuto in calcio (10-15% circa) (Chouinard et al., 1998). La maggior parte dei saponi disponibili nel mercato si produce a partire da AG distillati di palma, anche se esiste la possibilità di produrre saponi con oli di altre origini (cocco,

pesce, girasole ecc.). Si è osservato che utilizzando saponi di acido linoleico nelle diete di ovini non si aumentava il flusso di AGI nel duodeno (Fotouhi and Jenkins, 1992). Chouinard et al., (1998) hanno notato che l'aggiunta di AGI in forma di saponi di calcio nelle diete di bovine da latte non aumentava la quantità di questi AGI nel latte, quindi hanno concluso che non vi era una effettiva protezione degli AGI alla bioidrogenazione ruminale.

Il processo per il quale si ottengono grassi idrogenati consiste nel saturare i doppi legami di diverse fonti lipidiche per elevarne il punto di fusione e ridurre la reattività nel rumine. Le principali fonti lipidiche utilizzate per la produzione di grassi idrogenati sono le oleine di palma e il sego. Il problema nell'utilizzare questo tipo di grassi è che l'idrogenazione porta a una riduzione della digeribilità intestinale degli AG a lunga catena. Fra i principali vantaggi dei grassi idrogenati si ricorda la maggiore stabilità ai processi ossidativi, una migliore appetibilità e la maggiore concentrazione in acidi grassi rispetto ai saponi (Mateos et al., 1995).

Altre strategie di protezione si basano sull'utilizzazione di capsule protettive, costituite da proteine trattate con formaldeide, (per esempio la caseina), che protegge gli AGI della bioidrogenazione. Scott et al., dimostrarono che un pull di parti uguali di olio di lino e caseina trattato con formaldeide non veniva attaccato dalle fermentazioni batteriche, infatti si notava un incremento di acidi grassi polinsaturi del latte (Scott et al., 1971). Altra possibilità consiste nel modificare chimicamente gli AGI per trasformarli nelle forme che resistono alla bioidrogenazione, come le ammidi. Questa strategia si basa sul fatto che le ammidi hanno un basso tasso di degradazione batterica dovuta a un blocco del gruppo carbossilico libero necessario affinché la bioidrogenazione si completi.

ACIDI GRASSI OMEGA3 E LORO PROPRIETA' NUTRACEUTICHE

Gli acidi grassi Omega3 sono così chiamati, perché il primo doppio legame si trova sul terzo carbonio della catena contando a partire dal gruppo metilico. In relazione alla posizione del doppio legame rispetto al metile terminale, gli acidi grassi insaturi possono venire divisi in serie: Omega9 oleica, Omega7 palmitoleica, Omega6 linoleica, Omega3 linolenica. Le ultime due serie sono essenziali per l'organismo perché devono essere fornite con la dieta in quanto i sistemi di desaturazione non riescono ad introdurre doppi legami molto vicini al metile terminale (Simopoulos, 2002). Grazie all'azione della $\Delta 9$ desaturasi, gli animali sono in grado di sintetizzare completamente la famiglia Omega9, il cui precursore è l'acido oleico. Al contrario, gli acidi linoleico (Omega6) e l'acido α -linolenico (Omega3), non possono essere sintetizzati in quanto mancano le necessarie desaturasi, e devono essere forniti attraverso la dieta. I più importanti AGPI Omega3 sono l'EPA e il DHA; i benefici derivati da questi acidi grassi sono basati sulla convincente relazione inversa osservata fra loro consumo e diminuzione del rischio di malattie cardiovascolari ed in particolare delle coronaropatie. Le raccomandazioni delle autorità internazionali per quanto riguarda l'assunzione di EPA e DHA vanno da 200 a 650 mg/g (Nishida et al., 2007).

Gli effetti biologici di EPA e DHA sono diversi, comprendendo effetti sulle lipoproteine, pressione sanguigna, funzione cardiaca, funzione endoteliale, reattività vascolare ed elettrofisiologia cardiaca, ed importanti effetti antiplastrinici ed antinfiammatori (Calder, 2004).

REGOLAZIONE DEL PROCESSO INFIAMMATORIO

La prima risposta che l'organismo mette in atto contro un'infezione o un danno è l'infiammazione, che ha il compito di iniziare il processo immunologico di eliminazione del patogeno e/o delle tossine e riparare, poi, il danno tissutale. Tali reazioni, però, devono essere coordinate e controllate. La risposta infiammatoria fa parte della normale ed innata risposta immunitaria, ciononostante, quando l'infiammazione si sviluppa in maniera incontrollata, essa può divenire una condizione patologica vera e propria. Risulta chiara quindi l'importanza dell'ottimizzazione, più che della massimizzazione della risposta immunitaria. Quando ha inizio una risposta infiammatoria, vengono attivate le fosfolipasi di membrana e la cellula lesa libera gli acidi grassi a 20 atomi di carbonio dalla membrana fosfolipidica, che verranno poi metabolizzati per produrre i diversi tipi di eicosanoidi. Gli eicosanoidi sono molecole immunoregolatrici esercitanti un effetto locale di breve durata ormone-simile; essi includono le prostaglandine, i leucotrieni, le prostaciline e i trombossani. Tali sostanze non possono essere immagazzinate nell'organismo, ma vengono sintetizzate a seconda della necessità a partire dagli acidi grassi polinsaturi che sono presenti nei fosfolipidi di membrana. La quantità ed il tipo di eicosanoidi sintetizzati dipende dalla disponibilità e tipologia degli acidi grassi precursori, nonché dall'attività di due sistemi metabolico-enzimatici, quali la ciclossigenasi e la lipossigenasi (Sumida et

al., 1993). I composti ottenuti dagli acidi grassi Omega3 sono molto meno pro-infiammatori rispetto a quelli che si ottengono dal metabolismo dell'acido arachidonico (Lands, 1989). Oltre a produrre differenti famiglie di eicosanoidi, gli acidi grassi Omega3 e Omega6 sono in competizione tra loro per gli enzimi che attuano tale conversione (Schoenherr and Jewell, 1997); infatti, all'aumentare degli acidi grassi Omega3 corrisponde una riduzione della quota di acidi grassi Omega6 metabolizzata.

Il collegamento tra acidi grassi e risposta infiammatoria è da ricercarsi anche nella composizione dei fosfolipidi di membrana delle stesse cellule infiammatorie. Le cellule infiammatorie solitamente contengono un'elevata quantità di acido arachidonico ed una bassa quota di acidi grassi della serie Omega3, soprattutto di acido eicosapentanoico (EPA). La principale funzione dell'acido arachidonico è quella di essere il substrato per la sintesi di mediatori chimici appartenenti alla famiglia degli eicosanoidi. In presenza di un focolaio infiammatorio aumenta la quota di eicosanoidi derivati dall'acido arachidonico e infatti tali eicosanoidi sono stati ritrovati nel sangue e nei tessuti di pazienti affetti da traumi, scottature e in varie patologie che comportano disordini infiammatori (Tilley et al., 2001). L'acido arachidonico può essere liberato dalle membrane cellulari ad opera delle fosfolipasi, soprattutto dalle fosfolipasi A2. Una volta libero, l'acido arachidonico viene utilizzato come substrato dagli enzimi che sintetizzano gli eicosanoidi.

La via metabolica dell'acido arachidonico che sfrutta l'enzima ciclossigenasi (COX) dà origine alla serie 2 delle prostaglandine (PG) e dei trombossani. Fisiologicamente esistono due isoforme dell'enzima ciclossigenasi (COX): COX-1 e COX-2, e quest'ultima in particolare viene indotta dalle cellule infiammatorie ed è responsabile della elevata produzione di prostaglandine da parte delle stesse cellule che si ritrovano nel sito infiammatorio. Le PG sono formate nelle cellule attraverso processi specifici; ad esempio, a seguito dell'attivazione di monociti e macrofagi sono prodotte in quantità elevata le PGE₂ e le PGF_{2α}; i neutrofili liberano una quantità minore di PGE₂; i mastociti inducono la produzione di PGD₂.

In particolare, le PGE₂ derivanti dall'acido arachidonico, hanno un marcato effetto pro-infiammatorio ed inducono febbre, aumento della permeabilità vascolare e vasodilatazione, aumentando la sensazione dolorifica e l'edema causati da altre sostanze, quali l'istamina e la bradichinina. Inoltre, le PGE₂ promuovono la liberazione delle IgE dai linfociti B, cioè le stesse immunoglobuline che si liberano durante i processi allergici.

Per quanto riguarda i leucotrieni, della serie B4 in particolare, ricordiamo che essi aumentano la permeabilità vascolare, sono vasocostrittori, aumentano il flusso ematico locale, manifestano una potente azione chemiotattica per i leucociti, inducono il rilascio degli enzimi lisosomiali, aumentano i processi ossidativi e stimolano la produzione di TNF- α , (tumor necrosis factor alfa) interleuchina-1 e

interleuchina-6. Per tali motivi, i leucotrieni sono considerati mediatori naturali pro-infiammatori (Calder, 2003).

Gli acidi grassi Omega3 intervengono nella modulazione del processo infiammatorio contrastando l'eccessiva azione pro-infiammatoria dei derivati dell'acido arachidonico. Innanzitutto, un aumento della quantità di acidi grassi Omega3 presenti nelle cellule comporta una diminuzione della quota di acido arachidonico nelle membrane delle cellule infiammatorie; ciò si traduce in una minore disponibilità di substrato per la sintesi degli eicosanoidi derivati dall'acido arachidonico. L'azione di contrasto non si limita a una semplice riduzione del substrato disponibile, infatti gli Omega3 competono con l'acido arachidonico utilizzando le stesse vie metaboliche, facendo cioè da substrato per gli stessi enzimi.

Attraverso la via metabolica della ciclossigenasi, dall'EPA origina la serie 3 delle prostaglandine e dei trombossani, mentre per mezzo della 5-lipossigenasi abbiamo la serie 5 dei leucotrieni. Nonostante gli enzimi utilizzati siano gli stessi che intervengono nel metabolismo dell'acido arachidonico, i prodotti che si ottengono sono notevolmente diversi, e queste sostanze sono considerate biologicamente meno potenti rispetto agli analoghi sintetizzati a partire dall'acido arachidonico.

Secondo alcune ricerche condotte su colture di monociti, EPA e DHA sono in grado di inibire la produzione di citochine pro-infiammatorie, come l'interleuchina (IL) 1 β ed il TNF α (Calder, 1997), e di IL-6 e IL- 8 in colture di cellule endoteliali venose (De Caterina et al., 1995), determinando inoltre una minore presenza di IL-2 accompagnata da una ridotta attivazione dei linfociti T (Rossetti et al., 1995).

Il riconoscimento del fatto che EPA e DHA abbiano proprietà antinfiammatorie (Calder, 2006), suggerisce che un aumento del loro apporto alimentare, attraverso una correzione del rapporto tra acidi grassi Omega6 ed Omega3 della dieta (rapporto che, nelle società occidentali, a causa delle odierne abitudini alimentari, è spesso eccessivamente sbilanciato a favore degli acidi grassi Omega6), possa ridurre incidenza e gravità di alcune malattie infiammatorie croniche.

Alcune delle più importanti cause di morte e di malattia cronica nell'uomo sono caratterizzate da una esagerata risposta infiammatoria e da una eccessiva produzione di citochine ed eicosanoidi infiammatori. Tra queste patologie croniche ricordiamo la malattia polmonare cronica ostruttiva, l'artrite reumatoide, l'osteoartrite, la cachessia e l'IBD. Inoltre, esistono molte altre importanti patologie nelle quali i meccanismi infiammatori svolgono un ruolo significativo, come ad esempio malattie neurodegenerative, morbo di Alzheimer, allergie e diabete. Delle chiare associazioni tra il rischio di insorgenza di queste malattie e lo sbilanciamento del rapporto tra acidi grassi Omega3 ed Omega6 non sono ancora state trovate, però molti ricercatori hanno riconosciuto un effettivo ruolo

degli acidi grassi Omega3 nel circoscrivere l'eccessiva risposta infiammatoria nelle malattie precedentemente elencate (Calder, 2006).

A causa del drammatico aumento dell'incidenza delle malattie su base allergica nel corso degli ultimi decenni, sono stati condotti numerosi studi volti ad individuare una valida via per il trattamento e la prevenzione di queste patologie. E' stato ad esempio dimostrato che il supplemento della dieta con acidi grassi Omega3 durante la gravidanza, può modificare la risposta infiammatoria e ridurre il rischio di insorgenza di allergie infantili (Dunstan et al. 2003). E' stato anche dimostrato che il consumo di acidi grassi Omega3 può essere associato ad una diminuzione del rischio di sensibilizzazione e di rinite allergica (Hibbeln et al., 2007). Per contro, è giusto ricordare come sia ancora oggetto di discussione nel mondo scientifico, il ruolo che gli acidi grassi Omega3 svolgono complessivamente nella prevenzione e nel trattamento delle malattie allergiche.

L'artrite reumatoide è una malattia infiammatoria cronica caratterizzata da infiammazione delle articolazioni che si manifesta con tumefazione, dolore, deficit funzionale, osteoporosi e lesioni muscolari. Le lesioni articolari sono caratterizzate da infiltrazione di macrofagi, plasmacellule e linfociti T a livello delle sinoviali, e da proliferazione di sinoviociti. Biopsie sinoviali da pazienti affetti da questa patologia hanno evidenziato elevati livelli di TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e fattori stimolanti lo sviluppo di macrofagi e granulociti (Feldmann and Maini, 2003). Gli studi condotti sugli effetti degli acidi grassi Omega3 in pazienti affetti da artrite reumatoide, hanno evidenziato una diminuzione della produzione di IL-1 ed un miglioramento dei risultati clinici (Calder, 2006).

PREVENZIONE DEL DIABETE

Sia il diabete insulino-dipendente che quello non insulino-dipendente vengono considerati dei disordini con una componente infiammatoria, poiché diverse citochine infiammatorie sono implicate nei processi che portano alla distruzione delle isole di Langerhans nel diabete di tipo 1 (Palmer et al., 1989). Alcuni studi epidemiologici hanno evidenziato che in pazienti con diabete di tipo II, si registrano aumenti di marcatori dell'infiammazione come F2-isoprostani derivati dall'acido arachidonico, IL-6, TNF α e proteina C-reattiva, tutti elementi che normalmente aumentano in corso di processi infiammatori (Gopaul et al., 1995; Pradhan et al., 2001). Anche in questo tipo di disordini, dunque, gli acidi grassi Omega3 potrebbero avere degli effetti benefici.

Numerosi studi hanno evidenziato come la composizione degli acidi grassi della dieta sia in grado di influenzare il profilo in acidi grassi dei fosfolipidi che costituiscono la membrana dei muscoli scheletrici. Andersson et al., attraverso uno studio basato sulla somministrazione per tre mesi di due diete differenti nella composizione in acidi grassi ad altrettanti gruppi di persone, hanno messo in evidenza attraverso i rilievi biotipici, che la composizione in acidi grassi dei lipidi della membrana della cellula muscolare riflette la composizione in acidi grassi della dieta (Andersson et al., 2002).

Questo risultato è importante in quanto il muscolo scheletrico ha un ruolo fondamentale nel metabolismo energetico dell'organismo, influenzando sull'ossidazione degli acidi grassi e sull'assorbimento del glucosio insulino-stimolato (DeFronzo et al., 1981; Cortright et al., 1997). La composizione in acidi grassi dei fosfolipidi del muscolo scheletrico è stata messa in relazione con la sensibilità periferica all'insulina, e con l'obesità in numerose popolazioni (Clare et al., 1998; Kriketos et al., 1996). Un aumento dell'apporto di EPA e DHA porta ad una maggiore fluidità di membrana, nonché all'aumento del numero dei recettori per l'insulina e dell'azione insulinica (Lichtenstein and Schwab, 2000), risultando quindi efficace nel contrastare il fenomeno dell'insulino-resistenza, e delle sue più dirette conseguenze. Infatti, la riduzione dell'azione dell'insulina, oltre a provocare diabete mellito di tipo II e obesità, determina una serie di alterazioni metaboliche che possono essere predisponenti a patologie cardiovascolari, quali ipertensione ed alterazioni coronariche. L'insieme di queste alterazioni rientra oggi nella definizione di sindrome cardiometabolica.

PREVENZIONE DELLE MALATTIE CARDIOVASCOLARI

Per quanto riguarda il ruolo degli acidi grassi Omega3 nel controllo delle malattie cardiovascolari, è stata ampiamente dimostrata una relazione inversa tra il consumo di acidi grassi Omega3 e la mortalità causata da tali patologie. Questa relazione può essere spiegata da numerose azioni biologiche degli acidi grassi Omega3, che favoriscono effetti antitrombotici, antiaterogenici, antiaritmici (Reiffel and McDonald, 2006), oltre ad intervenire nella regolazione della pressione e dei livelli di colesterolo e trigliceridi ematici. Numerosi studi hanno messo in evidenza come un regolare consumo di fonti di acidi grassi Omega3, sia in grado di ridurre dal 30 al 60% la mortalità dovuta a malattie cardiovascolari (He et al., 2004).

I primi effetti biologici degli acidi grassi Omega3 descritti in letteratura sono stati quelli relativi all'influenza di questi composti sull'aggregazione delle piastrine. Il meccanismo di tali effetti si ritiene sia legato ad una modificazione della struttura di membrana delle piastrine (Hornstra et al., 1986), nonché ad una diminuzione della loro attività pro-coagulante (Nordoy and Goodnight, 1990) ed al tipo di eicosanoidi prodotti dalle piastrine stesse (Goodnight, et al., 1982). Si ritiene che la minore incidenza di coagulopatie piastrino-indotte, in persone che assumono una dieta ricca di acidi grassi Omega3, sia dovuta ai trombossani che originano dagli acidi grassi stessi, i quali avrebbero un potere di aggregazione delle piastrine molto basso (Kris-Etherton et al., 2002). L'azione antitrombotica degli acidi grassi Omega3 è dovuta al fatto che l'EPA, sostituendosi all'acido arachidonico, genera, per attacco della ciclossigenasi, composti omologhi a quelli prodotti dall'acido arachidonico, cioè trombossano A2 e PGI₂, ma con differenti proprietà biologiche: il trombossano A3 (TxA3) è sostanzialmente privo dell'attività proaggregante e vasocostrittrice tipica del trombossano

A2, e la prostaglandina I3 (PGI3) mantiene in gran parte le proprietà antiaggreganti e vasodilatanti della PGI₂ (prostaciclina). Come conseguenza di questi effetti, il consumo di dosi adeguate di acidi grassi Omega3 prolunga il tempo di sanguinamento e fornisce un'efficace e significativa protezione antitrombotica (Von Schacky and Weber, 1985).

Un'altra importante funzione biologica svolta dagli acidi grassi Omega3 consiste nella riduzione della concentrazione plasmatica dei trigliceridi, essenzialmente attraverso una riduzione nella sintesi delle lipoproteine ricche in trigliceridi (VLDL), anche se non sembra esistere una influenza favorevole degli acidi grassi Omega3 sui livelli plasmatici delle frazioni HDL e LDL (Hung et al., 2003).

Inoltre, la capacità degli acidi grassi Omega3 di influenzare la fluidità, e quindi la funzionalità, delle membrane cellulari, rappresenta probabilmente la base della loro azione antiaritmica. Infatti, la fluidità della membrana condiziona l'azione di molte proteine di membrana, tra le quali quelle dotate di un ruolo di canale o di carrier specifico. Sembra infatti dovuta ad un'azione esercitata sui canali del sodio, la capacità degli acidi grassi Omega3 di determinare una iperpolarizzazione della membrana sarcolemmatica, che antagonizza efficacemente l'insorgenza di pericolose aritmie (Katz, 2002).

FATTORI CHE INFLUENZANO IL CONTENUTO DI OMEGA3 NEL LATTE

Il riconoscimento delle proprietà benefiche degli acidi grassi Omega3 ha determinato un notevole aumento nella richiesta e nel consumo di questi acidi grassi, anche in conseguenza delle raccomandazioni da parte dei medici ad incrementarne l'assunzione quotidiana.

L'apporto di acidi grassi Omega3 può essere incrementato attraverso il consumo di alimenti che naturalmente ne contengono elevate quantità, come il pesce, o attraverso l'assunzione di capsule contenenti olio di pesce.

Un'altra strategia per aumentare il consumo di acidi grassi Omega3 consiste nell'arricchimento in tali acidi grassi di alimenti che normalmente non ne contengono quantità significative. Sono state sviluppate due strade per ottenere questo arricchimento. La prima di esse prevede l'aggiunta di olio di pesce a prodotti quali yogurt o latte. La seconda via consiste invece nella somministrazione agli animali da reddito di diete arricchite con acidi grassi Omega3, al fine di aumentare la concentrazione di questi acidi grassi nei prodotti che dagli animali si ottengono. Il vantaggio dell'arricchimento di alimenti comuni consiste nel fatto che i consumatori non sono costretti a modificare le proprie abitudini alimentari per aumentare l'apporto di acidi grassi Omega3. D'altro canto però, il livello di arricchimento in acidi grassi Omega3 che si può ottenere è limitato da diversi fattori, tra i quali quelli di ordine tecnologico e quelli legati alla conservabilità ed alle proprietà organolettiche degli alimenti.

È stato rilevato in generale che il latte prodotto da vacche alimentate con diete a base di foraggi, soprattutto se freschi, contiene una maggiore quantità di acidi grassi Omega3, se comparato con quello prodotto da vacche alimentate con diete a base di mais, o comunque ricche di concentrati (Chilliard and Ferlay, 2004). Ciò è dovuto all'elevato contenuto di acido α -linolenico (ALA) dell'erba fresca. In uno studio in cui vacche in lattazione sono state alimentate con semi di lino interi, è stata osservata una maggiore produzione latte, accompagnata da un incremento nel contenuto di acidi grassi Omega3, nonché da una diminuzione del rapporto tra acidi grassi Omega6 ed Omega3 (Petit et al., 2004). Altri studi hanno riportato che un apporto di 200–400 g/g di ALA (acido alfa linolenico, C18:3n3) da semi di colza e/o semi di lino estrusi accresce significativamente il livello di ALA nel grasso del latte (Focant et al., 1998). Livelli ancora più elevati di ALA nel latte, sono stati ottenuti in uno studio in cui le vacche ricevevano 410 g/g di olio di semi di lino microincapsulato (Goodridge et al., 2001). Uno studio basato sull'aggiunta alla dieta di bovine in lattazione di semi di colza macinati ha evidenziato una modificazione favorevole del profilo degli acidi grassi del latte, senza peraltro determinare alcun calo della produzione latte. Il latte risultò arricchito di AGMI a 18 atomi di carbonio, compreso l'acido vaccenico, di CLA, ed ancora degli acidi grassi Omega3, mentre si osservò una diminuzione della concentrazione degli acidi grassi a media e corta catena (Chichlowski et al., 2005). È importante sottolineare come, quando vengono impiegati oli vegetali come fonti di acidi grassi Omega3, l'incremento di questi nel latte si concretizzi principalmente in un aumento del contenuto in ALA, ma non di EPA e DHA.

In uno studio che ha previsto la supplementazione alimentare con olio di tonno in vacche da latte allevate al pascolo, si è osservato che il trattamento triplicava la concentrazione totale degli acidi grassi Omega3, compresi EPA e DHA, rispetto al gruppo di controllo (Kitessa et al., 2004). Un altro lavoro basato sulla supplementazione della dieta di bovine da latte con olio di pesce microincapsulato, mise in evidenza una diminuzione della produzione latte e del contenuto proteico del latte, contemporaneamente ad un aumento del suo contenuto in acidi grassi Omega3 (Lacasse et al., 2002). Un altro studio ha valutato l'uso di un sottoprodotto della raffinazione dell'olio di semi di soia, mettendo in evidenza come questo tipo di supplemento non influisse sulla produzione e la qualità del latte, ma garantisse una migliore condizione corporea nelle vacche trattate. In questo studio il latte risultò più ricco di acidi grassi a lunga catena, compresi i CLA, ma non risultò alcun aumento della percentuale di ALA (Boken et al., 2005). Nel corso di un'altra prova precedente l'impiego di olio di pesce e olio di semi di girasole, si ebbe come risultato un aumento della concentrazione nel latte di CLA e di acidi grassi Omega3, parallelamente ad una diminuzione del tenore proteico e lipidico, senza alcuna influenza sulla produzione latte (Shingfield et al., 2006). Risultati incoraggianti furono ottenuti in uno studio basato sulla somministrazione di un supplemento

costituito da olio di pesce e sali di calcio di palma, da soli o in combinazione con olio di semi di soia o semi di soia estrusi. Tutti i trattamenti determinarono un aumento della concentrazione di CLA, EPA e DHA, mentre non si registrarono significative variazioni della produzione di latte e del suo contenuto lipidico (Allred et al., 2006).

I CLA

Il termine CLA (conjugated linoleic acid) si riferisce ad un gruppo di isomeri posizionali e geometrici dell'acido linoleico (*cis9, cis12* C18:2), caratterizzati dalla presenza di due doppi legami coniugati, diversi dai classici legami metilenici presenti nella struttura dell'acido linoleico; gli isomeri posizionali identificati finora sono quelli 7/9, 8/10, 9/11, 10/12, 11/13 e 12/14; per ogni isomero posizionale sono possibili 4 paia di isomeri geometrici (*cis, cis, trans, cis; cis, trans; trans, trans;*). Quindi, il termine CLA include un totale di 24 isomeri posizionali e geometrici dell'acido linoleico (Kramer et al., 2004).

Questi acidi grassi furono individuati per la prima volta da Pariza (1985) in uno studio sulle componenti procancerogene della carne bovina sottoposta a cottura alla griglia, egli notò che a differenza di altri acidi grassi *trans* nocivi per la salute umana, questi acidi grassi dienoici *trans*, derivati dall'acido linoleico (C18:2 n-6) mostravano proprietà anti-cancerogene anziché pro-cancerogene. Successivamente fu identificato l'isomero *cis9, trans11* come il principale isomero nel grasso dei ruminanti, rappresentando dal 75 al 90% del totale dei CLA (Pariza and Hargraves, 1985); venne proposto per questo isomero il nome di "acido rumenico" data la sua presenza esclusiva nei ruminanti (Lock and Bauman, 2004).

A questa scoperta è seguito un gran numero di ricerche sugli effetti dei CLA sulla salute umana, che prevedevano l'impiego di singoli isomeri ad alto grado di purezza o miscele di isomeri in diverse proporzioni, sia in prove in vivo (su animali da laboratorio) che in vitro (su colture di cellule umane o animali). Tali studi hanno evidenziato che i CLA influiscono su diversi aspetti della salute umana, quali la composizione corporea, la carcinogenesi, i disturbi cardiovascolari, l'insulino resistenza e il diabete, la funzione immunitaria (Pariza et al., 2001).

La maggior parte degli studi volti a valutare gli effetti dei CLA sulla salute umana è stata condotta utilizzando prodotti sintetizzati chimicamente, contenenti una miscela di *cis* e *trans* isomeri, in diverse proporzioni. Studi più recenti sono invece stati effettuati usando singolarmente il *cis9, trans11* e il *trans 10, cis12* in forme altamente purificate. I risultati ottenuti in seguito all'utilizzo di miscele sono in contrasto con quelli osservati nel caso dei singoli isomeri e ciò suggerirebbe che i due isomeri abbiano effetti diversi sulla fisiologia dell'organismo e sui meccanismi cellulari che ne sono alla base.

La principale fonte di CLA nell'alimentazione occidentale deriva dalla carne dei ruminanti e dai loro prodotti lattiero caseari. Attualmente, il latte intero contiene una media del 3,5% di acidi grassi e di questi lo 0,5% circa è rappresentato da CLA. Per l'uomo una porzione di latte intero (227 ml) e una porzione di formaggio di 30 g/giorno possono fornire 90 mg di CLA. Utilizzando 600 g/giorno come valore medio di ingestione di cibo in un adulto medio, 90 mg/giorno di CLA rappresenterebbe lo

0,015% della dieta e purtroppo questo valore rappresenta solo il 25% della più bassa dose efficace nel ridurre l'incidenza del cancro nei ratti di laboratorio. Per questa ragione è utile cercare di aumentare il contenuto di CLA nel latte e nella carne. Il contenuto medio di CLA nel latte e prodotti lattiero caseari è mediamente pari allo 0,53% del grasso (range 0,34- 1,07%) e l'isomero *cis9, trans11* rappresenta dal 79% al 94% del totale di CLA del latte. Chiaramente dobbiamo ricordare la grande variabilità del contenuto in CLA legata a diversi fattori, come la razza dell'animale, l'età e la dieta; quest'ultimo è forse il fattore più importante ed anche il più facile da manipolare al fine di migliorare il contenuto in CLA dei prodotti lattiero caseari. Per fare alcuni esempi, il latte prodotto da animali al pascolo ha un più alto contenuto di CLA rispetto al latte di bovine alimentate con insilato (Elgersma, 2003). I CLA nel latte sono piuttosto stabili, vi è tuttavia una significativa riduzione (circa il 21,8%) tra campioni di latte crudo e UHT (da 10,18 a 7,96 mg/grammo) (Costa et al., 2011). Il contenuto totale di CLA nel latte o prodotti lattiero caseari varia da 3,4 a 10,7 mg/grammo di grassi totali. Nel caso del latte di pecora, i campioni individuali possono variare da 17,8 a 56,5 mg/grammo di grasso. Le concentrazioni più elevate di CLA nei prodotti lattiero caseari ovini si trovano nel formaggio bianco in salamoia (35,6 mg/grammo), seguita da yogurt (29,5 mg/grammo) (Meraz-Torres, 2012). È importante notare che, confrontando i profili acidici di formaggi ottenuti con diverse tecniche produttive, sono state evidenziate differenze significative nei profili degli AG, ma non nel livello di CLA. Questo suggerisce che i fattori coinvolti nel processo di caseificazione, come il trattamento termico e/o l'aggiunta di fermenti lattici, o la maturazione, in genere non influiscono sul contenuto di CLA. Tuttavia, questi fattori potrebbero influenzare i processi lipolitici che si verificano durante la lavorazione del latte, che determinano le variazioni di composizione in acidi grassi (Prandini et al., 2007).

BIOSINTESI DEI CLA

I coniugati dell'acido linoleico originano mediante due processi, il primo è la bioidrogenazione che avviene a livello ruminale (di cui abbiamo già trattato), il secondo è la sintesi endogena che avviene in vari tessuti dell'organismo. La sintesi endogena dei CLA, a partire dall'acido vaccenico, è considerata la principale via di formazione di questi isomeri nelle bovine in lattazione, e forma la maggior parte dei CLA presenti nel grasso del latte (Dhiman et al., 2005).

Basandosi su ricerche che descrivevano i substrati dell'enzima $\Delta 9$ -desaturasi, denominato Stearoil-CoA-Desaturasi (SCD), nei microsomi del fegato di ratto (R T Holman, 1981), Parodi (1994) ipotizzò che l'acido rumenico potesse derivare anche da una sintesi dei tessuti animali. In questi studi venne evidenziato come la SCD fosse in grado di desaturare la maggior parte degli isomeri *trans* C18:1, tranne quelli contenenti il doppio legame in posizione $\Delta 8$, $\Delta 9$, $\Delta 10$. Inoltre, vennero definiti come substrati preferenziali per l'enzima SCD gli acidi grassi saturi a 16, 17 e 18 atomi di carbonio.

La reazione catalizzata dalla $\Delta 9$ desaturasi introduce un doppio legame in posizione *cis* tra il carbonio 9 e 10 di un acido grasso. I principali substrati per la $\Delta 9$ desaturasi sono steroil CoA e palmitoil CoA. Tuttavia il range di acil CoA saturi o insaturi che possono essere utilizzati come substrati è ampio, incluso il *trans11* C18:1 (Pollard et al., 1980).

La regolazione di questo enzima è stata largamente studiata nel fegato dei roditori e i risultati indicano che l'espressione genica e la quantità di enzima sono regolati da fattori dietetici quali glucosio e AGPI e dagli ormoni come insulina, glucagone e ormone tiroideo (Ntambi and Miyazaki, 2004).

Il fatto che la sintesi endogena sia una importante fonte di acido rumenico nel grasso del latte dei ruminanti è stato dimostrato per esempio con infusione abomasale di acido vaccenico (12,5 g/giorno a vacche in lattazione), e si è notato un incremento del 31% nel contenuto di acido rumenico nel grasso del latte (Griinari et al., 2000).

Corl et al. (2002) hanno dimostrato che il *trans-7, cis-9* CLA (che rappresenta il 3-16% del totale dei CLA nel grasso dei ruminanti) è ottenuto quasi esclusivamente mediante la sintesi endogena utilizzando sia l'acido sterculico che il *trans10, cis12* CLA per inibire la $\Delta 9$ desaturasi (Corl et al., 2002; Baumgard et al., 2002). Essi hanno inoltre scoperto che nel liquor ruminale il *trans-7, cis9* è presente in concentrazione al limite della rilevazione.

ASPETTI NUTRIZIONALI E PROPRIETA' NUTRACEUTICHE DEI CLA

La diversa composizione in acidi grassi presenti nel latte dei ruminanti (acidi grassi saturi a corta e media catena, ramificati, mono e polinsaturi, acidi grassi coniugati *cis* e *trans*, ecc.), rappresenta un aspetto importante per la salute del consumatore. I prodotti lattiero-caseari forniscono infatti il 25-60% del consumo totale di grassi saturi in Europa, il che li rende da decenni, obiettivo delle critiche dei dietologi a causa degli effetti negativi sulla salute, attribuiti all'eccessivo consumo di acidi grassi saturi. D'altro canto, la potenziale immagine negativa degli acidi grassi saturi dovrebbe essere bilanciata col fatto che gli AGS C12-C16, che si pensa abbiano effetto aterogenico, lo esercitano solo se consumati in quantità eccessive, e che il C18:0 non ha effetto aterogenico.

Sono stati pubblicati dati circa le quantità stimate di ingestione di CLA in diverse popolazioni, a partire da quelle in cui il consumo di carne e prodotti lattiero caseari è quasi nullo fino a quelle australiane in cui il consumo in CLA è di circa 1500 mg/giorno (Parodi, 1994). In Gran Bretagna è di circa 400-600 mg/giorno, in Italia l'ingestione media di CLA è stata stimata intorno a ai 300 mg/giorno, negli Stati Uniti è di 52 e 137 mg/giorno per uomini e donne rispettivamente (Parodi, 2003).

Tuttavia, l'ingestione media di CLA non è indicativa della quantità assoluta di CLA disponibile per un individuo, a causa della conversione endogena di *trans-AV* in CLA che avviene anche nell'uomo

attraverso l'enzima SCD1. E' stato stimato che circa il 20% del *trans*-AV potrebbe essere convertito in CLA (Kuhnt et al., 2006).

Il raggiungimento di un apporto giornaliero di CLA di 3 g, ossia il livello al quale sono previsti effetti benefici sulla salute, non è assicurato dall'ingestione degli alimenti naturali non arricchiti. Questo obiettivo sarebbe invece raggiungibile attraverso l'aumento della concentrazione di CLA nel latte, e quindi nei prodotti lattiero-caseari, grazie alla manipolazione delle diete destinate agli animali. Ip (1997) ha proposto un'assunzione giornaliera di CLA pari a 3 g per una efficace protezione antitumorale nell'uomo (Ip et al., 1997). Parodi (2003) ha modificato questa stima, basandosi sulla considerazione che l'uomo ha una discreta capacità di desaturare l'acido vaccenico ad acido rumenico (Parodi, 2003). L'autore ha proposto che, moltiplicando per 1,4 la quantità di CLA assunta con la dieta, si possa avere una valutazione accurata del totale di CLA ingerito, includendo anche la quota di acido vaccenico desaturato. La stima di Parodi riduce così a 700-800 mg/giorno l'assunzione di CLA che, implementata dalla quota di acido vaccenico desaturato dall'organismo, rappresenta l'apporto necessario alla prevenzione delle patologie precedentemente menzionate.

EFFETTI FISIOLGICI

Gli effetti fisiologici attribuiti ai CLA sono numerosi, negli ultimi anni sono stati studiati tra gli altri effetti come l'inibizione della carcinogenesi, il miglioramento della risposta immunitaria, la riduzione dell'aterosclerosi (Pariza et al., 2001).

La maggior parte di questi studi hanno previsto la somministrazione di miscele di isomeri di CLA che contenevano la maggior parte di *cis9,trans11* e *trans10,cis12* CLA in quantità approssimativamente uguali.

Recenti evidenze indicano che numerosi effetti biologici dei CLA sono dovuti all'azione separata del *cis9,trans11* e *trans10,cis12*. E' anche probabile che alcuni effetti siano indotti e/o migliorati da questi isomeri agendo sinergicamente.

COMPOSIZIONE CORPOREA

L'aumento della popolazione in sovrappeso e obesa nel mondo è oggi tema di grande dibattito e ricerca. Nel Regno Unito i due terzi della popolazione adulta è classificata come in sovrappeso o in stato di obesità (Hirani e Mindell, 2008). In Italia oltre il 30% della popolazione adulta è in sovrappeso e circa l'8% è obesa; ciò corrisponde a circa 15 milioni di persone in sovrappeso e a 4 milioni di adulti obesi (Gallus et al., 2006). L'obesità è condizione che predispone a quadri patologici multifattoriali, in gran parte caratterizzati dalla coesistenza con diabete tipo II, insulino resistenza e malattie cardiovascolari. Più recentemente l'obesità è stata riconosciuta come uno stato di

infiammazione cronica, a causa dei livelli anormali di molecole infiammatorie circolanti, tra cui TNF α , leptina e IL-6 che vengono secrete dal tessuto adiposo (Forsythe et al., 2008).

L'induzione di cambiamenti nella composizione del grasso corporeo è attualmente uno degli aspetti più studiati dei CLA. Park et al. (1997) furono i primi a segnalare che una dieta a base di CLA poteva alterare la composizione corporea (Park et al., 1997). Una dieta di controllo e una dieta arricchita con CLA furono somministrate a topi svezzati di 6 settimane d'età per 4-5 settimane. Al termine dello studio gli animali nutriti con CLA mostravano una riduzione significativa del grasso corporeo associata ad una maggiore massa magra rispetto agli animali di controllo.

Attualmente, diverse prove in vivo e prove complementari in vitro ci dicono che gli effetti dei CLA sulla composizione corporea dovrebbero essere considerati alla luce dell'interazione fra adipociti, il principale sito di stoccaggio dei grassi, e le cellule muscolari scheletriche, il sito principale di combustione dei grassi (Atkinson, 1999).

Sembra ormai chiaro come sia il *trans*10, *cis*12 CLA, l'isomero che induce il cambiamento della composizione corporea (De Deckere et al., 1999). La riduzione dell'assorbimento degli acidi grassi, a sua volta, sembra essere dovuta agli effetti dei CLA sulla SCD (Lee et al., 1998).

Tsuboyama-Kasaoka et al. (2000) hanno studiato gli effetti dei CLA sulla riduzione della massa grassa, indotta mediante apoptosi del tessuto adiposo di topi alimentati con dieta contenente 1% di CLA (miscela di isomeri con circa il 40% di *trans*10, *cis*12 CLA) (Tsuboyama-Kasaoka et al., 2000). Il *trans*10, *cis*12 CLA è stato capace di indurre apoptosi anche in colture di adipociti 3T3-L1 del topo (A E Brodie, 1999). Al contrario Azain (2000) ha riferito che una dieta con 0,25% o 0,50% di CLA per 5 settimane a ratti Sprague-Dawley ha ridotto le dimensioni cellulari degli adipociti ma non il numero (Azain et al., 2000). Quindi l'induzione di apoptosi da CLA nel tessuto adiposo potrebbe essere dipendente dalla specie, visto che è stata riscontrata nel topo ma non nel ratto. Azain condusse la sua prova con una dieta al 7% di grassi, mentre Buisson (2000) utilizzò una dieta al 40% di grassi e non ottenne risultati, suggerendo quindi che in alcune circostanze l'effetto dei CLA potrebbe essere sopraffatto da una dieta troppo ricca di grassi (Buisson et al., 2000).

I promettenti risultati da studi in vivo come in vitro, hanno portato a un grande aumento del numero di ricerche e studi tesi a investigare l'effetto dei CLA sulla composizione corporea di persone normopeso, sovrappeso e obesi.

In prove condotte su soggetti in sovrappeso e obesi, a cui è stato fornito 1,7g-6,8 g/giorno di una miscela costituita da 50% di CLA per periodi compresi fra le 4 e le 104 settimane, si è osservato come non ci sono stati cambiamenti significativi nell'indice di massa grassa, (Malpuech-Brugère et al., 2004). In altri studi invece si è vista una riduzione del 3-15% dell'indice di massa grassa (Risérus et al., 2004). È interessante notare come in un altro studio su soggetti in sovrappeso, che hanno

ricevuto 3,2 g di 50:50 CLA al giorno per un periodo di 6 mesi, si sia dimostrato come queste persone abbiano avuto una minore tendenza ad ingrassare ed una riduzione del 4% del IMG rispetto ai controlli (Watras et al., 2007). Whigham et al. (2007) concludono un lavoro di meta-analisi affermando che i CLA, alla dose di 3,2 g/giorno, producono una modesta perdita di peso nell'uomo di circa 0,09 Kg/settimana (Whigham et al., 2007). Onakpoya et al., (2012) in una recente meta-analisi asseriscono che in persone sovrappeso e obese non ci sono evidenze di un cambiamento della composizione corporea in risposta a lunghi trattamenti (> 6 mesi) con integrazione di CLA (Onakpoya et al., 2012).

È chiaramente un tema di ricerca molto aperto, anche perché ci sono solo tre studi che hanno utilizzato prodotti caseari naturalmente arricchiti in CLA per investigare gli effetti sulla composizione corporea (Tricon et al., 2006; Brown et al., 2011; Desroches et al., 2005). E' inoltre interessante notare che, mentre gli studi su animali hanno spesso valutato gli effetti dei CLA sul guadagno di peso durante l'arco della vita, la maggior parte degli studi condotti sull'uomo tende ad investigare gli effetti dei CLA sulla perdita di peso o di grasso solo negli adulti e per periodi comunque limitati.

EFFETTI SUI MUSCOLI SCHELETRICI

Gli effetti dei CLA sul muscolo scheletrico sono stati poco studiati rispetto a quelli sugli adipociti; per questo appare corretto utilizzare in questo caso l'espressione "possibili effetti". L'evidenza di effetti specifici dei CLA sul muscolo è infatti limitata al risultato che l'attività della CPT (Carnitina Palmitoil transferasi) muscolare è aumentata nel muscolo scheletrico di topi alimentati con CLA, che potrebbe portare a sua volta ad una maggiore beta-ossidazione (Kennedy et al., 2006).

Pariza et al. (2000) hanno evidenziato che la massa muscolare può essere conservata o migliorata come risultato di modifiche indotte dai CLA nella regolazione e/o azione del Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) e dell'Interleuchina-1 (IL-1), citochine che influenzano profondamente il catabolismo del muscolo scheletrico, nonché la funzione immunitaria (Pariza et al., 2000).

METABOLISMO LIPIDICO EPATICO

I CLA mostrano diversi effetti sul metabolismo lipidico epatico. Lee et al. (1998) hanno riscontrato che i CLA (miscela in parti uguali di *trans*10,*cis*12 e *cis*9,*trans*11) riducono la secrezione di apolipoproteina B in colture cellulari Hep-G2 di epatoma umano. Il *trans*10,*cis*12 inibisce anche l'espressione e l'attività epatica di SCD (Lee et al., 1998; Bretillon et al., 1999).

C'è una buona documentazione sulle differenze di specie nell'accumulo di lipidi nel fegato indotto da CLA. I topi alimentati con diete integrate con CLA sviluppano fegati ingrossati, apparentemente dovuto ad accumulo di lipidi (Belury and Kempa-Steczko, 1997), mentre criceti alimentati con diete

integrate con CLA sviluppano ipertrofia epatica, che non è dovuta ad un accumulo di lipidi. In contrasto, ratti (Azain et al., 2000) o suini alimentati con supplementi a base di CLA non mostrano nessuna evidenza di accumulo lipidico o di aumento del peso del fegato. Risulta quindi importante comprendere le basi molecolari di queste differenze nelle risposte fisiologiche.

CARCINOGENESI

L'attività biologica dei CLA fu scoperta a causa dei suoi effetti inibitori sulla carcinogenesi epidermica chimicamente indotta nei topi, e le successive ricerche hanno ampliato questa constatazione includendo altri modelli di carcinogenesi nei roditori. Il meccanismo biochimico con cui i CLA inibiscono la carcinogenesi non è ancora noto, ma potrebbero comportare effetti sul metabolismo dell'acido linoleico (Banni et al., 1999b) e della vitamina A. Banni et al. (1999a) riportano come il *cis9, trans11* C18:2, oltre a modulare l'incorporazione dell'acido arachidonico, induca anche l'aumento di retinolo (vitamina A) nei tessuti (Banni et al., 1999a). E' dimostrato che i CLA competono con l'acido linoleico riducendo la formazione di acido arachidonico, precursore di eicosanoidi che partecipano al processo di carcinogenesi. I CLA, infatti, possono competere con l'acido linoleico, dando origine ad altri acidi a lunga catena che mantengono la coniugazione e interferiscono con la sintesi degli eicosanoidi e delle prostaglandine .

Nella maggior parte degli studi, il *cis9, trans11* CLA non ha inibito la crescita tumorale, mentre il *trans10, cis12* CLA ha dimostrato il suo effetto inibitorio in studi che usavano linee cellulari tumorali di uomo e di topo. Tuttavia, il *cis9, trans11* CLA si è dimostrato più potente del *trans10, cis12* CLA quando entrambi gli isomeri sono stati testati su linee cellulari di colon (Palombo et al., 2002). Vi sono prove di un'azione sinergica del *cis9, trans11* e *trans10, cis12* nell'inibizione della carcinogenesi (Ip et al., 2000). E' possibile che entrambi gli isomeri possano influenzare il metabolismo dell'acido linoleico in modo da ridurre la carcinogenesi mammaria nel ratto (Banni et al., 1999a), così come esercitare effetti biochimici separati e individuali.

Complessivamente, su studi che utilizzavano modelli animali, l'isomero purificato *cis9, trans11* ha ridotto la carcinogenesi in 6 casi, e non ha avuto alcun effetto in altri due (Kelley et al., 2007). Analogamente, il *trans10, cis12* CLA ha diminuito la carcinogenesi in 6 studi, ma l'ha aumentata in altri due. Nel topo il gene *erbB2/her2* era sovraespresso solo con la somministrazione di *trans10, cis12* (Ip et al., 2007). McCrorie et al. (2011) hanno suggerito di essere prudenti nella somministrazione di integratori contenenti *trans10, cis12* CLA in soggetti a rischio di manifestare il cancro al seno nei quali il gene *erbB2/her2* è sovraespresso (come osservato nel 20-30% dei casi di tumore al seno umani), considerando invece che i supplementi contenenti *cis9, trans 11* CLA possono essere sicuri ed efficaci nella prevenzione proprio del cancro al seno (McCrorie et al., 2011).

Inoltre i livelli nella dieta e quelli sierici di CLA erano significativamente più bassi in casi di tumori al seno post-menopausa rispetto ai controlli, suggerendo così un effetto protettivo (Aro et al., 2000). In diversi modelli sperimentali, soprattutto in prove su animali e in vitro, è stata riportata l'attività antitumorale dei CLA, potenziali effetti benefici sono stati individuati in vari organi come il colon o la prostata e in particolare per la ghiandola mammaria. E' stato visto che inducendo tumori mammari nei ratti con potenti agenti cancerogeni, come il dimetilbenzene, i CLA della dieta inibiscono lo sviluppo del tumore e della crescita. Inoltre questi effetti si verificano a concentrazioni anche molto basse (0,1% della dieta) rispetto a altri AGPI identificati come antitumorali (Ip et al., 1991). I CLA hanno un duplice effetto nella comparsa del tumore mammario: in primo luogo, l'esposizione a CLA prima dell'insorgenza, durante lo sviluppo della ghiandola, rende il tessuto un bersaglio meno sensibile alle trasformazioni neoplastiche indotte da cancerogeni (Ip et al. 1994); in secondo luogo, con un'esposizione ai CLA per 20 settimane, dopo una fase iniziale, si nota una diminuzione significativa dell'incidenza dei tumori (32-60% in meno) e della crescita tumorale (Ip et al., 1995). Le proprietà inibenti la crescita tumorale dei CLA nei roditori, fanno di questi composti dei candidati unici per interferire contro il cancro al seno a livello di tumore primario e/o a livello di ricadute metastatiche, ritardandone la presentazione. Sono quindi molto importanti ulteriori studi riguardanti l'assunzione di CLA e il rischio di carcinoma mammario o tra l'assunzione dei CLA e la sopravvivenza del cancro al seno. Esistono pochi studi che hanno dato risultati inconsistenti sulla relazione tra assunzione di CLA e rischio di tumore al seno nell'uomo. Questo potrebbe essere conseguenza della difficoltà ad ottenere stime precise dell'apporto dietetico di CLA. E' interessante notare che l'assunzione media di CLA nell'uomo è stata stimata a circa 0,2 g/giorno (Voorrips et al., 2002) o 0,12 g/giorno (Larsson et al., 2009). Ciò rappresenta lo 0,1-0,2% del totale dei lipidi alimentari. Sulla base dell'assunzione richiesta nei ratti (0,5-1% della dieta in peso), la quantità media stimata dell'assunzione nell'uomo è probabilmente troppo bassa per evitare la crescita tumorale e quindi, a prevenire potenzialmente lo sviluppo del cancro al seno e delle metastasi. Bougnoux et al. (2010) hanno revisionato i dati in letteratura relativi agli effetti degli acidi grassi polinsaturi e la risposta al trattamento nel cancro al seno, cercando di individuare una corretta integrazione alimentare adiuvante al trattamento. Tra i vari nutrienti, l'acido rumenico e l'acido docosaesaenoico (DHA) hanno fatto emergere il loro potenziale per aumentare l'efficacia del trattamento del cancro senza effetti collaterali aggiuntivi. Il World Cancer Research Fund & Association for International Cancer Research ha pubblicato nel 2007 un rapporto con le evidenze disponibili sulla relazione fra consumo di latte e cancro; la relazione si conclude affermando che probabilmente il latte protegge contro il cancro colon-rettale e che ci sono delle limitate evidenze che il formaggio ne possa essere un fattore predisponente; inoltre

ci sono prove limitate che il consumo di latte possa avere un effetto positivo contro il cancro alla vescica.

In definitiva si può concludere che per poter chiarire appieno le proprietà anti cancerogene dei CLA nell'uomo siano necessarie ulteriori ricerche.

INFIAMMAZIONE E SISTEMA IMMUNITARIO

Anche il sistema immunitario è influenzato dai CLA. I primi effetti sono stati segnalati quando si è visto che i CLA aggiunti in diete per polli e ratti miglioravano la risposta immunitaria riducendo gli effetti catabolici della risposta immunomediata (Cook et al., 1993). L'inclusione di CLA nella dieta ha dimostrato di poter aumentare la produzione di immunoglobulina nei linfociti splenici di ratto (Yamasaki et al., 2000) e di ridurre l'istamina antigene-indotta e rilascio di PGE₂ in cavie sensibilizzate (Whigham et al., 2001).

Un recente studio ha evidenziato le proprietà dei CLA nell'attenuazione della dermatite allergica nei topi. Ad un gruppo di topi è stato applicato topicamente del grasso di latte bovino arricchito in CLA, o veniva somministrato per via orale. Entrambe le modalità hanno dimostrato una significativa soppressione della dermatite allergica; si evidenziano infatti minori manifestazioni cliniche, dei punteggi istologici inferiori, una ridotta infiltrazione di cellule infiammatorie e livelli di Ig E allergene specifiche circolanti minori, comparati con i trattamenti con grasso di latte non arricchito (Kanwar et al., 2011).

La supplementazione con CLA è stata anche collegata ad un miglioramento della iper-reattività delle vie aeree negli asmatici (MacRedmond et al., 2010).

Anche studi realizzati in vitro hanno mostrato gli effetti antinfiammatori dei CLA. In uno studio realizzato con macrofagi di topo, i CLA erano associati ad una minore espressione del m-RNA nei mediatori infiammatori cicloossigenasi-2, TNF α , e minore produzione di PGE₂, IL-6 e IL-1 β (Yu et al., 2002). Ratti obesi sottoposti ad una dieta con 1,8% di un mix di CLA per 8 settimane, hanno mostrato una minore espressione del TNF α m-RNA, senza alcuna modificazione di altri marker dell'infiammazione (Noto et al., 2007). In suini alimentati con il 2% della dieta contenente un mix di CLA per 14 giorni, è stata osservata una riduzione nell'espressione di m-RNA, una riduzione delle citochine proinfiammatorie, e un aumento delle citochine antiinfiammatorie. Topi alimentati con lo 0,5% di CLA della dieta per 3 settimane, raggiungevano livelli plasmatici di TNF α inferiori, se comparati con topi alimentati con diete di controllo (Butz et al., 2007). Tuttavia topi alimentati con lo 0,5% di *trans*10, *cis*12 C18:2 per 14 giorni, hanno mostrato di indurre la trascrizione di citochine proinfiammatorie nel tessuto adiposo (LaRosa et al., 2006).

Gli studi in umana sono finora contrastanti, la maggior parte delle ricerche che mostrano un aumento dei mediatori dell'infiammazione. Tre studi con individui sottoposti ad integrazione con un mix di

CLA a dosi di 4,2 a 6,4 g/giorno, per periodi dalle 12 alle 16 settimane, hanno evidenziato un aumento nei livelli plasmatici di proteina C-reattiva (CRP) (Steck et al., 2007; Smedman et al., 2005; Tholstrup et al., 2008). Tuttavia in prove che utilizzavano prodotti caseari naturalmente arricchiti in *cis9, trans11* CLA a dosi di 1,4-2,6 g/giorno per 4-6 settimane, non si sono visti aumenti plasmatici della concentrazione di CRP o di altri mediatori infiammatori (Yasui et al., 2007; Desroches et al., 2005).

METABOLISMO LIPIDICO E ATEROSCLEROSI

L'aterosclerosi è un processo progressivo che interessa le medie e piccole arterie, dove si verifica l'accumulo di lipidi all'interno delle cellule infiammatorie, l'adesione e l'aggregazione piastrinica, la proliferazione cellulare e il deposito di calcio (Toomey et al., 2003).

Diverse sperimentazioni condotte in conigli, criceti e topi hanno conto il ruolo dei CLA nel modulare il metabolismo lipidico ed avere un impatto sulla regressione delle placche aterosclerotiche indotte dal colesterolo (Mitchell and McLeod, 2008). In conigli alimentati con una miscela di isomeri di CLA in ragione dello 0,1-1% della dieta, per un periodo che andava dalle 13 alle 22 settimane, è stata notata una riduzione nella deposizione di colesterolo in aorta e una significativa riduzione delle lesioni aterosclerotiche già formate (Kritchevsky D. et al., 2002). Ci sono state inoltre promettenti risposte in uno studio che ha valutato un apporto di CLA 80:20 (*cis9,trans11* C18:2 e *trans10,cis12* C18:2) dove si è vista una marcata regressione delle lesioni aterosclerotiche in topi apoE. Inoltre, un effetto opposto dei due isomeri è stato riscontrato in uno studio dove il *cis9, trans11* C18:2 diminuiva l'area delle lesioni aterosclerotiche mentre il *trans10, cis12* C18:2 ne determinava l'aumento (Arbonés-Mainar et al., 2006).

È da sottolineare che molte sperimentazioni in vivo che hanno suggerito effetti protettivi antiaterogenici, hanno previsto dosi di CLA molto maggiori di quelle realizzabili nella dieta umana. Nonostante le varie indagini, i precisi meccanismi attraverso i quali i CLA influenzino il metabolismo lipidico e il tessuto adiposo non sono ancora completamente chiariti. Tuttavia, si ritiene che i CLA modulino il dispendio energetico, l'apoptosi, l'ossidazione degli acidi grassi, la lipolisi e la lipogenesi (House et al., 2005).

Weldon et al. (2004) hanno dimostrato che i CLA agiscono ostacolando la formazione di placche aterosclerotiche mediante l'attivazione dei PPARs (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors).

In alcuni studi, l'utilizzo di CLA ha determinato una notevole diminuzione del livello plasmatico della frazione LDL del colesterolo e un aumento della frazione HDL; si è registrata inoltre una sovra espressione dei recettori per le frazioni HDL, con la finalità di favorire l'afflusso di colesterolo alle cellule, e una diminuzione dell'infiammazione a livello vascolare, che determina un minor rischio di trombosi (Fruchart et al., 2001).

Altre prove hanno dimostrato che la supplementazione con preparazioni commerciali di CLA può avere un impatto negativo sul profilo lipidico ematico. Ad esempio, è stata osservata una significativa riduzione delle HDL con 3,4 g/giorno di *trans10,cis12* in individui obesi con sindrome metabolica ed in soggetti sani che hanno ricevuto una integrazione della propria dieta con 0,7- 1,4 g/giorno di una miscela di CLA (Risérus et al., 2002; Mougios et al., 2001). Al contrario, altri studi hanno mostrato un effetto positivo dei CLA somministrati a dosi di 3 g/giorno (miscela 80:20 di *cis9,trans11* e *trans10,cis12*), dove si è visto un abbassamento dei trigliceridi a digiuno e una diminuzione delle VLDL, in soggetti sani (Noone et al., 2002). Il consumo di cibi arricchiti con 26,8 g/giorno di CLA ha portato ad un significativo effetto positivo sulla concentrazione delle HDL ed un abbassamento significativo delle LDL (Wanders et al., 2010).

I prodotti lattiero caseari che sono naturalmente arricchiti in CLA sono anche maggiormente ricchi in *trans* vaccenico (*trans*-C18:1), hanno contenuti inferiori di AGS e leggermente superiori in AGPI Omega3 rispetto ai prodotti caseari convenzionali, a causa delle strategie alimentari impiegate per l'arricchimento (Jones et al., 2005). E' stato suggerito che il consumo di acidi grassi *trans* alteri il profilo lipidico abbassando i livelli di HDL e aumentando quelli di LDL (Lichtenstein et al., 1999). E' quindi poco chiaro se il contenuto di *trans* vaccenico dei prodotti naturalmente arricchito di CLA possa contrastarne i potenziali effetti benefici sul profilo lipidico.

E' inoltre ipotizzabile che gli effetti antiaterosclerotici dei CLA osservati in studi animali possa essere causa di meccanismi diversi dagli effetti sui lipidi, ad esempio effetto antinfiammatorio.

INSULINO RESISTENZA E DIABETE

Oltre al potenziale anti aterogenico, anti obesità e alle proprietà antiinfiammatorie, anche gli effetti dei CLA sul diabete sono stati oggetto di studio. Il diabete può essere causato da una carenza di insulina (tipo I), da una insulino-resistenza (tipo II) o da entrambe. L'aumento delle persone in sovrappeso o obese va di pari passo all'aumento del numero di individui affetti da diabete di tipo II, caratterizzato da insulino resistenza, e si verifica come effetto di tessuto adiposo in eccesso. E' stato dimostrato che una riduzione del 5% del peso corporeo diminuisce la resistenza all'insulina nei soggetti sovrappeso ed obesi (Brown and McIntosh, 2003; Taylor and Zahradka, 2004; Belury et al., 2003).

Molti studi che hanno utilizzato mix di CLA, suggeriscono una certa differenza d'azione fra i diversi isomeri di CLA. In studi sui topi, alimentati con una dieta ricca di *trans10,cis12* CLA si induceva insulino resistenza, mentre con il *cis9, trans11* CLA migliorava il metabolismo lipidico senza indebolire l'azione dell'insulina (Moloney et al., 2007). Durante un test di tolleranza endovenosa al glucosio, topi supplementati con *cis9, trans11* CLA eliminavano il glucosio più velocemente rispetto ai controlli, e ai topi supplementati con *trans10, cis12* CLA (De Roos et al., 2005).

Attualmente, le proprietà antidiabetiche dei CLA sull'uomo non possono essere pienamente determinate, dal momento che pochi studi sono effettuati con misurazioni rigorose dell'insulino resistenza come il clamp euglicemico-iperinsulinemico (che misura la quantità di glucosio necessario per compensare un aumento del livello di insulina senza causare ipoglicemia) o il test di tolleranza al glucosio, che prevede in pazienti a digiuno una dose di 75 grammi di glucosio per via orale in cui i livelli di glucosio nel sangue vengono misurati nelle successive due ore. Infatti, la maggior parte dei risultati sulle proprietà antidiabetiche dei CLA derivano da studi che hanno previsto la misurazione del glucosio a digiuno, nel plasma o nel siero, o la misurazione dell'insulina. Non bisogna quindi sorprendersi che molti studi non mostrino particolari effetti della supplementazione con CLA (MacRedmond et al., 2010; Noone et al., 2002) o del consumo di prodotti arricchiti in CLA (Raff et al., 2008; Tricon et al., 2006) su glucosio e insulina. Tuttavia, in alcuni studi l'integrazione con una miscela di CLA ha mostrato effetti benefici sull'insulino resistenza nei soggetti sani di sesso maschile (Eyjolfson et al., 2004) e soggetti con diabete di tipo II (Belury et al., 2003).

Diversi studi suggeriscono che l'isomero *trans10,cis12* CLA sia quello biologicamente attivo e che esso determini la diminuzione di peso nei soggetti con diabete tipo II (Belury et al., 2003). Si è osservato che durante la perdita di peso, il *trans10,cis12* CLA è responsabile di una cascata di azioni, che hanno inizio dalla regolazione dell'espressione dei PPAR γ e dei suoi bersagli, aventi come obiettivo finale l'inibizione dell'assorbimento e del metabolismo sia del glucosio che degli acidi grassi (Brown et al., 2004). Vari studi hanno dimostrato che, a livello cellulare, i principali bersagli dei CLA sono dei recettori nucleari, mentre l'effetto sul metabolismo del glucosio è secondario e mediato da fattori, come i co-attivatori 1 dei PPAR γ , che vengono controllati dai recettori nucleari (Hammarstedt et al., 2003).

Un altro meccanismo con cui i CLA determinano una riduzione dell'iperinsulinemia è la sensibilizzazione dell'adiponectina, un ormone di recente scoperta secreto dagli adipociti che accresce la sensibilità all'insulina (Nagao et al., 2003).

SALUTE DELLE OSSA

Il tessuto osseo si rinnova continuamente attraverso il riassorbimento (rimaneggiamento) di osso esistente e la formazione di nuovo osso (rimodellamento). Una delle conseguenze del basso turnover osseo o del rimodellamento è lo sviluppo di osteoporosi, particolarmente in donne occidentali in menopausa. In Italia la prevalenza di osteoporosi fra donne e uomini sopra i 60 anni è di circa il 23% per le donne e di circa il 15% per gli uomini (Crepaldi et al., 2007). Le strategie tese ad attenuare il calo della massa ossea sono molto importanti, e gran parte della ricerca si è concentrata sull'assunzione di Calcio, vitamina D, proteine e vitamina K (Lanham-New, 2008). Tuttavia, altri

nutrienti tra cui i CLA , sono stati al centro della ricerca, grazie alle comprovate delle influenze sulla massa ossea e sul metabolismo (Watkins and Seifert, 2000).

Diversi studi hanno dimostrato che supplementando ratti con CLA diminuiva la PGE₂ (Kelly and Cashman, 2004). Questa prostaglandina è un importante fattore del metabolismo osseo, sia nella formazione che nel riassorbimento. La produzione di PGE₂ aumenta in menopausa la perdita di massa ossea a causa della carenza di estrogeni (Prentice et al., 2006). I CLA possono anche stimolare l'assorbimento di Ca, rendendolo così più disponibile per la formazione di osso (Kelly and Cashman, 2004).

Al contrario, Brown et al. (2011) non riportano alcun cambiamento nel contenuto minerale osseo con soggetti alimentati con una dieta arricchita di CLA, sebbene la durata dello studio fosse solo di 56 giorni, un periodo insufficiente per osservare cambiamenti significativi nella mineralizzazione dell'osso (Brown et al., 2011). Attualmente l'unico studio in campo umano che dimostra un'associazione positiva fra supplementazione di CLA (5 g/giorno) e risposta del tessuto osseo, ha riscontrato una riduzione dei marker di riassorbimento osseo ed un aumento dell'indice di massa magra (Pinkoski et al., 2006).

I risultati degli studi condotti negli animali sono promettenti, ma l'estrapolazione dei dati da animale a uomo continua a essere difficile, a causa delle differenze nelle quantità di CLA usati.

FATTORI CHE INFLUENZANO IL CONTENUTO IN CLA DEL LATTE

I fattori che possono influenzare il contenuto di CLA nel grasso del latte possono essere sia dietetici che fisiologici. E' possibile raggruppare i fattori dietetici in quattro categorie in relazione al potenziale meccanismo d'azione.

La prima categoria comprende l'apporto con la dieta di acidi grassi polinsaturi (AGPI), che fungono da substrato alla produzione ruminale di CLA e AV. Tali AGPI si trovano nella dieta principalmente come costituenti di oli vegetali (ed eventualmente olio di pesce).

La seconda categoria consiste nei fattori dietetici che condizionano i batteri ruminali coinvolti nella bioidrogenazione degli acidi grassi, agendo direttamente o per mezzo di cambiamenti dell'ambiente ruminale. Per esempio, modificando il rapporto foraggi/concentrati della dieta si influenza il grado di bioidrogenazione dei AGPI precedentemente indicati.

La terza categoria include fattori della dieta che comportano la combinazione di substrati lipidici e modificazione del tasso di bioidrogenazione ruminale. Lock e Garnsworthy (2003) hanno dimostrato come l'ingestione di erba fresca da parte delle vacche raddoppi il contenuto di CLA nel latte e come questo non si spieghi completamente in termini di somministrazione di AGPI (Lock and Garnsworthy, 2003). Altri fattori o componenti dei foraggi potrebbero dunque promuovere la produzione di CLA nel latte.

La quarta categoria è quella rappresentata dai supplementi alimentari contenenti CLA o AV. Questi vengono generalmente protetti dalla bioidrogenazione ruminale, tipicamente con sali di calcio o formaldeide.

Si è osservato che l'aggiunta di oli vegetali alle diete di vacche da latte determina un aumento della concentrazione di CLA nel grasso del latte (Kelly et al., 1998). In particolare gli oli contenenti elevate quantità di acido linoleico sono quelli che determinano le risposte maggiori con un incremento dose-dipendente del contenuto di CLA nel latte: l'acido linoleico agirebbe come inibitore competitivo della bioidrogenazione dell'acido vaccenico (Polan et al., 1964). E' stato dimostrato chiaramente come gli acidi grassi insaturi non protetti, inducano una depressione sulla produzione di latte e subiscano una elevata idrogenazione nel rumine (Secchiari et al., 2003).

Un metodo per minimizzare questo effetto consiste nella somministrazione di sali di calcio di acidi grassi; in questo modo la maggior parte degli acidi grassi attraversa inalterata il rumine, e solo una porzione di essi venga idrogenata.

Sono stati inoltre osservati incrementi nella concentrazione di CLA nel latte in seguito ad aggiunta di olio o farina di pesce alla dieta delle vacche da latte (Chouinard et al., 1998). Ahnadi et al. (2002) hanno dimostrato che con l'aggiunta di olio di pesce sia incrementata la produzione ruminale di *trans*-11 C18:1 AV, ed è quindi probabile che l'incremento del CLA sia il risultato della ridotta conversione di acido vaccenico ad acido stearico (Ahnadi et al., 2002).

Un altro fattore che può promuovere delle variazioni nelle concentrazioni di CLA del latte è l'utilizzo di agenti ionofori che inibiscono la crescita di batteri gram-positivi, molti dei quali sono batteri coinvolti nella bioidrogenazione ruminale, compreso il *Butyrivibrio fibrisolvens*. Fellner et al. (1997) hanno osservato che l'aggiunta di ionofori inibisce la bioidrogenazione dell'acido linoleico, determinando una diminuzione delle concentrazioni di acido stearico ed un aumento di quelle di C18:1 nel contenuto ruminale; questa supplementazione porterebbe ad un'incompleta idrogenazione dell'acido linoleico, favorendo un accumulo di acido vaccenico (Fellner et al., 1997).

Anche la maturazione del foraggio è un fattore che influisce sulla quantità di CLA nel grasso del latte. Diete contenenti foraggi giovani risultano aumentare i CLA rispetto a diete che contengono foraggi più maturi (Mel'uchová et al., 2008). Il livello di CLA del latte è più alto in primavera ed in autunno e più basso nelle altre stagioni. Tuttavia, la composizione quali-quantitativa della frazione lipidica dei foraggi verdi non può spiegare completamente l'influenza da essi esercitata sul livello di CLA nel latte. Si ritiene a questo proposito molto probabile che alcuni effetti sinergici tra i substrati lipidici e altri componenti proprio dell'allevamento estensivo possano alterare la idrogenazione ruminale dei lipidi. Cambiamenti nelle quantità di foraggi complessivamente somministrati, determinano effetti variabili sul contenuto di CLA nel latte. Le alterazioni della quota assunta

dovrebbero riguardare evidentemente il rifornimento di substrati e il cambiamento di ambiente ruminale. Entrambi questi fattori contribuiscono a un cambiamento nel processo di bioidrogenazione ruminale. In aggiunta, l'utilizzazione di diete carenti di energia incrementerebbe la disponibilità di CLA e AV per la mobilitazione dei depositi adiposi: l'importanza di questo incremento sarebbe correlata al bilancio energetico negativo (Griinari and Bauman, 1999).

La quantità di CLA nel grasso del latte può aumentare anche con l'aggiunta di supplementi a base di CLA alla dieta. I primi studi di questo tipo furono realizzati su bovine in lattazione, infondendo i supplementi per via abomasale al fine di by-passare i processi di fermentazione ruminale (Lor and Herbein, 1998) Gli studi citati stabilirono che i supplementi a base di CLA incrementano in maniera dose-dipendente il tenore di CLA nel grasso del latte.

Esistono comunque tecnologie finalizzate alla protezione dei supplementi dalle alterazioni ad opera dei batteri ruminanti (Doreau et al., 1997). I supplementi presenti sul mercato contengono diversi isomeri CLA e tutti vengono trasferiti al grasso del latte (Chouinard et al., 1999). Questo tipo di aggiunte però, così come un certo numero di strategie alimentari, quali ad esempio diete ricche di concentrati, scarse di fibra o aggiunte di oli vegetali, provocano una riduzione nella secrezione di grasso nel latte. Questo fenomeno è generalmente indicato come sindrome del latte magro o *milk fat depression* (MFD).

La riduzione nella percentuale di grasso del latte è stata strettamente collegata a un incremento di acidi grassi *trans* C18:1 nel grasso del latte. Le analisi dettagliate sugli isomeri *trans* degli acidi grassi hanno rivelato che la riduzione del grasso del latte è specificamente dovuta ad un incremento di *trans10* C18:1. Griinari et al. (1998) hanno proposto che la MFD indotta dalla dieta fosse causata da *trans10* C18:1 o da metaboliti connessi.

Può risultare interessante mettere in evidenza le differenze relative al contenuto in CLA nel grasso e nel latte, tra bovine appartenenti a razze differenti, a parità di regime alimentare. Differenze sostanziali nel contenuto di acido rumenico sono state evidenziate, a parità di regime dietetico, anche nel grasso del latte di animali appartenenti alla medesima razza. La variazione tra individui è principalmente collegata al flusso di *trans11* C18:1 ed alla quantità e attività dell'enzima $\Delta 9$ desaturasi. La composizione della dieta può influenzare l'attività tissutale della $\Delta 9$ desaturasi: infatti, alcuni studi hanno stabilito che l'espressione del gene di questo enzima è regolata in modo specifico dall'insulina e dai PUFA (Corl et al., 2002).

EFFETTI DELL'INTEGRAZIONE LIPIDICA NELL'ALIMENTAZIONE DEI RUMINANTI

Le razioni tradizionalmente impiegate nell'alimentazione dei ruminanti a base di foraggi, cereali, farine di estrazione e sottoprodotti, apportano quantità di lipidi relativamente modeste e in genere contenute entro il 3-3,5% della sostanza secca. Il contenuto in lipidi delle diete può essere aumentato utilizzando specifici supplementi che si possono classificare a seconda dell'origine (fonti animali, vegetali e misti) dei grassi o dei trattamenti cui sono stati sottoposti (ad esempio salificazione o idrogenazione).

I grassi di origine animale si possono classificare in grassi polinsaturi (predominano negli animali marini), grassi insaturi (soprattutto nei volatili), moderatamente insaturi (per esempio nei suini), o grassi saturi (tipico dei bovini), nonché misti dei precedenti. Allo stesso modo, tra i grassi vegetali, gli oli dei semi provenienti da girasole, mais o soia, sono più insaturi di quelli dell'olio di oliva, palma o cocco. Un terzo gruppo di lipidi d'interesse crescente è formato da sottoprodotti industriali la cui materia prima originale è il grasso. In questo gruppo ci sono le oleine (residui della raffinazione dei grassi commestibili), le lecitine (gomme dei processi di raffinazione industriale), i grassi di frittura (risultanti dal riciclaggio di grassi commestibili), e i distillati provenienti dall'industria del glicerolo (Mateos et al., 1995).

I foraggi in genere hanno un contenuto in lipidi che varia dal 2% al 6% della sostanza secca, e sono composti soprattutto da glicolipidi e fosfolipidi; il contenuto in lipidi nei concentrati è generalmente più alto di quello dei foraggi e la maggior parte di essi sono presenti sotto forma di trigliceridi.

Tra gli AG dei foraggi abbondano l'acido linoleico (C18:2) e l'acido linolenico (C18:3), mentre i semi di oleaginose utilizzati nei concentrati contengono soprattutto acido linoleico (C18:2) e oleico (C18:1).

Nei sottoprodotti dell'industria animale e della raffinazione dell'olio vegetale i lipidi predominanti sono i trigliceridi, mentre i sali di calcio sono costituiti da AG liberi.

In generale gli oli vegetali e marini (soprattutto l'olio di pesce) sono considerevolmente più insaturi rispetto ai grassi di origine animale, questo è dovuto alla presenza di quantità variabili di acido linoleico, linolenico e oleico (che è quantitativamente l'AG grasso più presente nella maggior parte dei grassi naturali). Gli oli di pesce inoltre hanno una concentrazione significativa di acidi altamente insaturi come il C20:5 (EPA) e il C22:6 (DHA).

Nel grasso di origine animale, la proporzione di acidi grassi saturi (AGS) è maggiore rispetto agli insaturi; sono soprattutto presenti AG saturi di alto peso molecolare come l'acido palmitico (C16:0) e l'acido stearico (C18:0), e in minor quantità l'acido laurico (C12:0) e il miristico (C14:0). Questa è la ragione per cui questi grassi si presentano duri e compatti.

Le principali fonti di acido linolenico sono i semi di lino e i foraggi verdi; per esempio l'insilato di loietto contiene fino a un 60% di acido linolenico in percentuale sul totale degli AG (Dewhurst and King, 1998), mentre le principali fonti di acido linoleico sono la soia e i semi di girasole.

Le richieste energetiche delle bovine da latte durante le prime settimane dopo il parto superano gli apporti forniti con la dieta. Per incrementare la concentrazione energetica della razione senza rischio di provocare acidosi si possono utilizzare dei supplementi lipidici. Come accennato, le diete convenzionali per le bovine da latte senza grassi aggiunti o senza ingredienti ricchi in grassi contengono meno del 3% dei grassi, espressi in termini di estratto etereo sulla sostanza secca. In generale, l'apporto totale di grassi non dovrebbe oltrepassare il 6-7% della sostanza secca (Bauman et al., 2003). La somministrazione di diete con concentrazioni eccessive di lipidi può determinare riduzioni dell'ingestione di sostanza secca, anche se i grassi utilizzati hanno un basso effetto a livello ruminale. Jenkins (1993) ha sviluppato alcune linee guida che hanno permesso di orientarsi sulla quantità massima di grasso da supplementare nelle diete delle vacche da latte, l'autore ha valutato diverse variabili della dieta (NDF, ADF, PG, lipidi utilizzati come supplementi in termini di % del grasso totale aggiunto, % AGPI e % AGI) per studiare le risposte produttive alla grassatura delle diete. Secondo questo lavoro la migliore predizione della produzione di latte si otterrebbe utilizzando il rapporto degli AGI del grasso in rapporto alla percentuale di ADF della dieta; in particolare la produzione del latte sarebbe inversamente proporzionale a questo rapporto dimostrando che il fattore principale che limita la produzione di latte utilizzando diete ricche di grassi sono i problemi legati alla depressione di digeribilità della fibra indotta dagli acidi grassi insaturi .

La quantità ottimale di grasso da includere nelle diete delle vacche da latte dipende però da molti fattori come: il tipo di grassi, la composizione della dieta, lo stato di lattazione, l'ambiente, il livello di produzione del latte e il tipo di alimentazione.

Da un punto di vista produttivo, Jerred et al. (1990) e Chilliard (1993) hanno osservato che il supplemento con lipidi all'inizio della lattazione non ha un effetto positivo sulla produzione di latte né sul bilancio energetico delle bovine, in quanto l'ingestione alimentare si riduce all'aumentare della densità energetica della razione (Chilliard, 1993; Jerred et al., 1990). Dopo il picco di lattazione, Chilliard (1993) ha osservato che la supplementazione di grassi nella dieta non influenza positivamente l'aumento di peso né il BCS (Body Condition Score), ma aumenta la produzione di latte. Da un punto di vista produttivo, studi recenti suggeriscono che la grassatura delle diete utilizzate nel preparto può essere una strategia che influisce positivamente sia sull'involutione uterina dell'animale sia sull'entità della mobilitazione delle riserve energetiche. Il periodo attorno al parto è associato a un maggior rischio di problemi metabolici ed è ampiamente accettato il fatto che

le strategie nutrizionali adottate nel periodo di asciutta influenzano lo stato metabolico della seguente lattazione.

Moore et al. (2006) studiarono qual'era il miglior momento per iniziare il supplemento con Megalac (grasso ruminoprotetto che combina distillati dell'olio di palma e calcio) in diete di vacche da latte e valutare il rendimento riproduttivo delle prime 14 settimane postparto. I quattro trattamenti utilizzati erano: 1) controllo senza grasso aggiunto 2) supplementazione con Megalac dal 28° giorno preparto 3) supplementazione con Megalac dal giorno del parto 4) supplementazione con Megalac dal 28° giorno postparto (Moore et al., 2006). Gli animali supplementati nel preparto con Megalac hanno presentato maggiori concentrazioni plasmatiche di prostaglandine durante i primi 12 giorni postparto rispetto alle bovine appartenenti alle altre tesi. Le prostaglandine sono essenziali nel determinare il ripristino di un'ottimale involuzione uterina nell'immediato post-parto; anche l'immunocompetenza degli animali alimentati con Megalac nel periodo di asciutta è apparsa migliorata, alla luce del fatto che le vacche trattate hanno presentato meno problemi di mastiti, ritenzioni di placenta e metriti nei primi 10 giorni postparto.

Andersen et al. (2008) hanno studiato l'influenza del supplemento con grassi saturi o insaturi (semi di lino) sullo stato metabolico di vacche da latte (Andersen et al., 2008). Le bovine che avevano ricevuto le diete con grassi saturi e insaturi hanno presentato maggiori concentrazioni plasmatiche di acidi grassi non esterificati (AGNE) nel preparato rispetto alle bovine del gruppo di controllo. All'inizio della lattazione la concentrazione di grasso nel tessuto epatico e i livelli plasmatici di AGNE sono stati inferiori nelle bovine alimentate con acidi grassi saturi rispetto agli altri due gruppi. Questo lavoro e altri in bibliografia suggeriscono che la grassatura della razione nel preparto con AGS possa essere una buona strategia per limitare la mobilizzazione delle riserve per la seguente lattazione. Pertanto, l'utilizzo di determinati acidi grassi nel preparto può avere effetti positivi al livello riproduttivo e metabolico del postparto.

FERMENTAZIONI RUMINALI

La grassatura delle diete delle bovine da latte può ridurre la digestione della fibra fino al 50% (Jenkins, 1993; Doreau e Chillard, 1997). L'inibizione ruminale delle fermentazioni della fibra può essere in parte compensata da una maggiore utilizzazione nel cieco che, tuttavia, non bilancia completamente quanto perso a livello ruminale (Jenkins, 1993). Quest'azione dei grassi sui metabolismi della frazione fibrosa, fa sì che la digestione ruminale di materia organica si riduca, nonostante la digeribilità dell'amido non venga modificata. La riduzione della digeribilità dei carboidrati strutturali, provoca il decremento della produzione di idrogeno e degli AGV, modificandone al contempo la composizione. Ciò determina un incremento nelle proporzioni di acido

propionico e una riduzione di acetico, butirrico e della relazione acetico/propionico (Jenkins 1993). Anche il metabolismo azotato nel rumine viene alterato dalla supplementazione con lipidi; ad esempio, l'infusione di olio di lino nel rumine di pecora riduce la degradazione della proteina, determinando una diminuzione della concentrazione di ammoniaca e un aumento del flusso di azoto alimentare al duodeno (Ikwuegbu e Sutton, 1982). Risultati analoghi si sono osservati quando si sono alimentate pecore con olio di mais o lecitina (Jenkins and Fotohui, 1990).

In generale si può affermare che gli effetti dei lipidi sull'utilizzazione ruminale della fibra dipendono da:

- quantità di grasso somministrato con la dieta: gli effetti negativi sulla digeribilità della fibra sono contenuti quando i livelli di lipidi sono inferiori al 4-5% della sostanza secca della razione;
- gli AGPI generano più problemi che i saturi (Palmquist and Jenkins, 1980; Jenkins, 1993), con eccezione degli olii di pesce, che tendono a incrementare la digeribilità (Doreau and Chilliard, 1997);
- i grassi hanno effetti negativi inferiori se utilizzati in diete ricche di fieno piuttosto che in diete basate sull'impiego di insilato di mais (Smith et al., 1993);
- i saponi di calcio, i trigliceridi e le ammidi hanno un effetto inibitorio inferiore rispetto agli AG liberi.

Si sono formulate diverse ipotesi per spiegare il meccanismo attraverso il quale i lipidi interferiscono con le fermentazioni ruminali, e tra questi due sono quelli maggiormente accreditati; un primo meccanismo è quello legato alla formazione di una pellicola che ostacolerebbe l'attacco dei batteri ruminali alle particelle di foraggio, limitandone la digestione; i grassi inoltre, hanno un effetto antimicrobico, dato dimostrato, *in vitro*, osservando l'inibizione della crescita batterica (Galbraith et al., 1972); questo effetto è svolto specialmente dagli AGI non esterificati, tossici per i batteri gram positivi (cellulosolitici), per i batteri metanogeni e per i protozoi ruminali (i quali contribuiscono alla cellulolisi) (Palmquist, 1996). Si crede che questi effetti negativi dei grassi siano dovuti all'azione citotossica sulla funzionalità della membrana della cellula procariote (Jenkins, 1993).

Palmquist (1996) suggerì che l'effetto negativo degli AGI sulla digestione ruminale potesse minimizzarsi se la dieta conteneva livelli alti di foraggio, vista la capacità di quest'ultimo di promuovere la funzionalità ruminale. Si è anche osservato che somministrando AGPI sotto forma di semi interi, si hanno effetti minimi sulla fermentazione, dal momento che il tasso di diffusione degli AGI da questo tipo di alimenti è molto ridotto, il che diminuisce il loro tempo di esposizione ai microorganismi ruminali.

RISPOSTE PRODUTTIVE

I supplementi lipidici aumentano la densità energetica della razione e, posto che le bovine si alimentano per coprire i loro fabbisogni energetici, spesso si osserva una riduzione dell'ingestione di

sostanza secca quando i grassi rimpiazzano i carboidrati come fonte di energia (NRC, 2001). I meccanismi per i quali i grassi possono deprimere l'ingestione di sostanza secca non sono chiari e si giustificano con varie argomentazioni (Allen, 2000):

- effetto di riempimento ruminale: i grassi riducono la fermentazione ruminale e la digeribilità della fibra (Palmquist and Jenkins, 1980; Chalupa et al., 1986) contribuendo al riempimento del rumine e alla diminuzione del tasso di passaggio;

- liberazione di ormoni intestinali: si è osservato che, tramite supplementazione alimentare, i grassi aumentano le concentrazioni postprandiali di colecistochinone. L'effetto ipofagico del colecistochinone avviene per azione diretta sui recettori del centro della sazietà, e per un aumento della distensione gastrica e l'inibizione del suo svuotamento mediante un'azione periferica a livello intestinale;

- ossidazione dei grassi del fegato: la grassatura determina un aumento delle concentrazioni plasmatiche di acidi grassi non esterificati (AGNE) cui consegue un aumento della loro captazione e ossidazione nel fegato. Un maggiore tasso di ossidazione degli AG nel fegato genera, attraverso una specifica stimolazione del vago, uno stimolo del centro di sazietà (Orbach and Andrews, 1973). Nonostante sia opinione diffusa che la grassatura inibisca l'assunzione di alimenti, alcuni studi hanno osservato risposte opposte (Pantoja et al., 1996; Skaar and Grummer, 1989). Le ragioni per cui l'ingestione aumenti aggiungendo grassi alla dieta, possono essere dovute al fatto che metabolizzare diete ricche in grassi determini un minor incremento calorico.

Per esempio, sostituendo i cereali della razione con lipidi, si determina una riduzione della produzione di propionato. Realizzando infusioni intraruminali di propionato in vacche da latte, si è osservato che l'ingestione di sostanza secca si riduce in una proporzione maggiore rispetto a quando si infonde acetato. Il meccanismo secondo il quale il propionato riduce l'ingestione di SS sembra essere dovuto ad un incremento della secrezione di insulina (Allen, 2000).

Uno dei vantaggi nell'utilizzare grassi nella razione è aumentare la densità energetica. Senza dubbio, qualunque aumento della densità energetica può avere poco effetto sull'ingestione dell'energia se si accompagna a riduzione di consumo. Allen (2000) analizzò gli effetti della supplementazione con i grassi sull'ingestione di SS per differenti tipi di fonti lipidiche, utilizzando dati di studi in cui si comparavano diverse matrici o si valutavano differenti percentuali di grasso aggiunto. L'analisi della regressione rivelò che non c'erano differenze sull'ingestione di SS tra fonti di grassi simili, quindi raggruppò le fonti di grassi in quattro categorie: semi di oleaginose, grassi animali, AG idrogenati e trigliceridi, e saponi di calcio. Nel caso dell'addizione di AG da semi di oleaginose, si osservò un effetto quadratico sull'ingestione della SS con un minimo approssimativamente del 2% di AG aggiunti. L'ingestione di SS non si modificò all'aggiungere AG in forma di grassi idrogenati. Nei

casi in cui si usarono saponi di calcio, in 11 delle 24 comparazioni si osservarono diminuzioni numeriche. L'ingestione di SS è diminuita del 2,5% per ogni unità percentuale di sapone calcico che si è aggiunto alla razione, che equivale a due volte la depressione che si osservò aggiungendo grasso animale. La quantità massima di AG aggiunti variò dal 5% al 6,2% della SS della dieta per le diverse categorie di grassi. Se questa percentuale viene sommata a quella che avevano le diete di partenza, la percentuale di AG variò dal 7 al 9% della SS, che è al vertice del massimo tipicamente incluso nelle diete delle vacche da latte (circa il 5,5-6% degli AG totali). Quando le analisi si restrinsero a diete con un contenuto totale in AG uguale o minore del 6%, si osservò che l'aggiunzione di AG di grassi idrogenati e di semi di oleaginose determinò un effetto quadratico sull'ingestione della SS, con un minimo di circa 2,3-3% di AG aggiunti. I grassi animali e i saponi di calcio risultarono linearmente negativi, e l'effetto dei saponi di calcio fu di nuovo maggiore rispetto a quello del grasso animale non processato. Questi dati dimostrano che esistono differenze definite tra gli effetti dei differenti AG sull'ingestione di SS.

PRODUZIONE DI LATTE

La risposta in termini di produzione di latte alla supplementazione con grassi, può essere influenzata da diversi fattori, come la dieta, lo stato di lattazione, il bilancio energetico, la composizione di grasso e la quantità di grasso aggiunto (Côtés et al., 2010).

In una revisione estesa, Chillard (1993) indicò che la risposta media in produzione di latte dovuta alla supplementazione con grassi (incremento medio di un 4,5% di estratto etereo nella razione) durante l'inizio della lattazione fu di 0,31 kg/giorno, non significativamente diversa dai controlli. Se la supplementazione con grassi cominciasse poco dopo il postparto, sarebbe lecito aspettarsi un intervallo temporale non breve prima di osservare una risposata concreta in termini produttivi (Kim et al., 1991; Jerred et al., 1990). La risposta in produzione durante il picco di lattazione (incremento medio dell'estratto etereo del 3,6% nella razione) fu di 0,71 kg/giorno, significativamente diversa dai controlli. Durante le fasi media e finale della lattazione, la risposta fu di 0,65 kg/giorno, anch'essa statisticamente significativa rispetto ai controlli.

Considerando invece la quantità di grasso supplementata, la produzione di latte si comporta seguendo una linea comune (Jenkins, 1998):

- Fase 1: in questa fase la produzione aumenta per effetto di una maggior densità energetica della dieta.
- Fase 2: non aumenta la produzione, dato che l'energia addizionale della dieta si vede contrastata da effetti negativi del supplemento lipidico, come la riduzione della digeribilità della dieta, la riduzione dell'ingestione di SS e la bassa digeribilità intestinale del supplemento.

- Fase 3: questi effetti negativi dominano sull'incremento dell'apporto energetico, producendo una riduzione della produzione.

Tutte le fonti lipidiche si comportano in questo modo, anche se possono differenziarsi nel grado di risposta e nei livelli di grasso che corrispondono a ciascuna fase. I grassi insaturi tenderanno ad avere una fase 1 e 2 più ridotte se comparate con i grassi saturi aggiunti, nella stessa proporzione, alla dieta. L'inclusione di lipidi fino a un 6-8% della dieta in base alla SS generalmente incrementa la produzione di latte (Sutton, 1989), anche se la risposta massima raramente supera i 3,5 kg di latte al giorno.

COMPOSIZIONE DEL LATTE

L'effetto dell'inclusione alimentare di grassi sulla composizione del latte e la sua componente lipidica, varia considerevolmente, per cui è difficile prevedere con precisione cosa succederà in termini di concentrazione di grasso in risposta ad un particolare supplemento. In generale, quantità moderate di grassi saturi, saponi di calcio e grassi incapsulati, tendono a non avere effetto o ad aumentare solo leggermente le concentrazioni di grasso nel latte. Indubbiamente una quota lipidica nella dieta molto elevata, determina frequentemente una diminuzione nel contenuto in grasso del latte. Se eseguiamo una distinzione fra i tipi di grasso, supplementando la dieta con grassi saturi si può aumentare la percentuale di grasso del latte fino a un 5,1%, ma, integrando con grassi insaturi, la diminuzione può arrivare al 8% rispetto ai gruppi di controllo (Chichlowski et al., 2005).

Si pensa che l'inibizione della sintesi di grasso nel latte sia dovuta ad alterazioni nei processi di bioidrogenazione ruminale, che causano la produzione di AG *trans* intermedi, capaci di ridurre l'attività trascrizionale dei geni codificanti gli enzimi lipogenici, come l'acetil CoA carbossilasi e AG sintasi nella ghiandola mammaria (Peterson et al., 2003).

Anche se la percentuale di proteina normalmente diminuisce, la produzione totale di proteina rimane costante o incrementa, dato che il grasso supplementato tende ad avere un effetto positivo sulla produzione quantitativa di latte. Esistono varie teorie che spiegano la diminuzione della concentrazione di proteina nel latte quando si aggiungono grassi alla razione (Cant et al., 1993):

- gli acidi grassi sono tossici per i batteri ruminali, per cui riducono il flusso di azoto batterico, quindi l'apporto di amminoacidi all'intestino tenue;
- la supplementazione non determina un aumento in produzione della proteina giornaliera nella stessa proporzione dell'aumento in produzione di latte, pertanto la percentuale di proteina diminuisce per diluizione;
- con l'aggiunta di grassi alle diete aumenta il flusso energetico alla ghiandola mammaria, per cui si richiede un minor flusso sanguigno alla ghiandola per sintetizzare lo stesso volume di latte.

Questo minor flusso di sangue riduce l'apporto di amminoacidi e la sintesi di proteina nella ghiandola stessa, determinando una minor percentuale di proteina lattea.

In una recente meta-analisi (2012), Rabiee e collaboratori hanno revisionato e analizzato 38 prove sperimentali (contenenti 86 comparazioni) per meglio comprendere gli effetti della supplementazione lipidica su produzione e composizione del latte, vista la grande variabilità dei risultati delle singole prove, a volte contraddittori (Rabiee et al., 2012). In questo studio, le fonti lipidiche utilizzate nelle varie prove sono state classificate in 5 gruppi di grassi: sego, sali di calcio di palma, semi di oleaginose, grassi cristallizzati e altri saponi di calcio. L'ampia gamma di risposte ai differenti grassi utilizzati, mostra l'effetto marcatamente variabile ai diversi trattamenti. Tuttavia, tenendo conto dell'alta eterogeneità per tutte le variabili studiate, è stato osservato che: la produzione di latte, la percentuale di grasso e la sua produzione aumentano; l'assunzione di sostanza secca e la percentuale di proteina nel latte diminuisce; la produzione totale di proteina non è significativamente influenzata dall'assunzione di grassi.

RIPRODUZIONE

La supplementazione della dieta delle vacche da latte con fonti lipidiche influisce positivamente sul rendimento riproduttivo delle bovine: si verifica di norma un aumento del numero e della dimensione dei follicoli ovarici, un aumento delle concentrazioni plasmatiche di progesterone, una riduzione della secrezione di prostaglandine, un aumento della vita media del corpo luteo e un miglioramento della fertilità (Mattos et al., 2000). Il grasso aggiunto alla dieta può aiutare a mitigare lo stato energetico negativo di cui soffre la vacca durante il periodo postparto. Staples et al. (1998) realizzarono un'estesa revisione sugli effetti dei grassi della razione sulla riproduzione.: in 11 di 20 studi esaminati trovarono miglioramenti nel tasso di concepimento al primo intervento o nel tasso di concepimento globale.

Il meccanismo attraverso il quale il grasso modifica positivamente la riproduzione non si conosce con esattezza ma sono state proposte varie ipotesi (Staples et al., 1998):

- *Effetto sullo stato energetico*: il grasso aumenta la densità energetica della razione, per tanto, se gli animali mantengono l'ingestione e la produzione, si ridurrà il bilancio energetico negativo che ha a sua volta un effetto negativo sulla fertilità.
- *Effetto sulla steroidogenesi*: una seconda ipotesi è che le vacche alimentate con grassi aggiunti alle diete, abbiano maggiori concentrazioni di progesterone in circolo, ormone necessario per l'impianto e la nutrizione dell'embrione appena formato. Il corpo luteo che si forma a partire dal follicolo dominante ovulato rimane nell'ovaio durante tutta la gestazione per sintetizzare progesterone. Una maggior concentrazione di progesterone plasmatico è stata associata a

migliori tassi di concepimento. Staples et al. (1998) osservarono che le vacche alimentate con grassi (sego, saponi di calcio, grassi idrogenati o semi interi di cotone) avevano concentrazioni più elevate di progesterone plasmatico in comparazione alle vacche di controlli. Ciò è dovuto a una riduzione del tasso di scomparsa del progesterone nel sangue (Hawkins et al., 1995) o a una maggior concentrazione di colesterolo nel sangue (precursore della sintesi di progesterone). Pertanto il miglioramento osservato aggiungendo grassi alle diete può essere dovuto a una maggior disponibilità di progesterone che migliora la sopravvivenza embrionaria.

- *Effetti sull'insulina:* gli effetti della supplementazione con grassi sulla concentrazione plasmatica di insulina sono vari. Nella maggior parte dei casi in cui si aggiungono grassi alle diete, la concentrazione di insulina diminuisce (Staples et al., 1998). Spicer et al. (1993) osservarono che le cellule della granulosa bovina tendevano a produrre meno "insulin grow factor" IGF quando veniva aggiunta insulina. Dato che l'IGF è un potente stimolatore delle cellule della granulosa, l'inibizione dell'insulina stimola positivamente lo sviluppo follicolare (Spicer et al., 1993).
- *Effetto sulla secrezione di prostaglandine PG:* nell'apparato riproduttivo delle bovine, il tessuto uterino è la principale fonte di sintesi delle prostaglandine.

Gli AGI di 20 atomi di carbonio come il C20:3, il C20:4 e il C20:5, sono substrati per la sintesi di PG della serie 1, 2 e 3 rispettivamente. L'acido linoleico può essere desaturato e allungato fino ad arachidonico (C18:4), che è un precursore immediato per le PG della serie 2, come la PGF2alfa. Nei mammiferi, l'acido arachidonico è il principale substrato per la sintesi di PG. L'acido linolenico può essere desaturato e allungato ad acido eicosapentoico (C20:5), che serve da precursore per la sintesi di PG della serie 3, come la PGF3alfa. Gli stessi enzimi elongasi e desaturasi, convertono questi due AG ad acido arachidonico ed eicosapentoico. Ciò significa che un aumento nell'apporto di AG della serie n-3 diminuisce la produzione di PG della serie 2, e aumenta la produzione di PG della serie 3. Le PG della serie 3 hanno meno attività biologica delle PG della serie 2, quindi in caso di diminuzione di PG della serie 2 potremo mantenere il corpo luteo e mantenere la gravidanza, riducendo così la mortalità embrionaria e migliorando la fertilità. Burke et al. (1997) e Mattos et al. (2002) osservarono che vacche alimentate con farina di pesce avevano una regressione più lenta del corpo luteo e una minor capacità uterina di secernere PGF2alfa.

- *Deficienza di Ag essenziali:* un ultimo meccanismo proposto è che la supplementazione lipidica potesse alleviare una deficienza in AG essenziali (C18:2 e C18:3) in bovine ad alta produzione. Si è osservato che deficienze in AG essenziali riducono l'efficacia riproduttiva in animali non ruminante. Sanchez e Block (2002), utilizzando un sottomodello sviluppato da CPM.Dairy Model, suggerirono che la quantità di C18:2 escreta in 45,5 l di latte al giorno eccedeva la

quantità di questo AG proveniente dalla dieta. Per tanto, le fonti di grasso che apportano AG essenziali addizionali possono minimizzare la necessità di mobilitare AG essenziali dai tessuti, proteggendo così la sua integrità funzionale.

PRINCIPALI FONTI LIPIDICHE UTILIZZATE NELL' ALIMENTAZIONE DEI RUMINANTI

SEME DI LINO

Il seme di lino e le farine derivanti dal processo di estrazione dell'olio di lino sono materie prime di scarso utilizzo nel nostro paese. I principali produttori sono India, Argentina e Canada (FEDNA, 1999). Il consumo è aumentato nei paesi sviluppati come fonte di AG n-3 dovuto ai suoi possibili effetti benefici sui processi immunitari e sulla salute cardiovascolare nell'uomo.

Comparata con altre oleaginose, la proteina del lino è di buona qualità, è scarsa in lisina (la metà della soia) e treonina, e relativamente ricco in metionina e triptofano, infatti si complementa bene con quella delle leguminose. Nei ruminanti, la degradabilità della proteina del seme è alta (80%), riducendosi nelle farine a livelli che varino tra il 55-65%, in funzione del trattamento termico operato durante l'estrazione dell'olio.

Il seme di lino contiene un 30% di olio; la frazione grassa è altamente insatura (l'85% di acidi grassi insaturi naturali C18), con una relazione saturi/insaturi simile a quella della colza. La caratteristica differenziale del seme di lino sulle altre oleaginose è il suo alto contenuto in acido α -linolenico (C18:3: 51%). La ricchezza in C18:3 del seme si sfrutta per produrre prodotti arricchiti in AG n-3 di maggior valore commerciale. Per questo il prezzo di mercato del seme di lino è superiore a quello che ci si aspetterebbe dal suo valore nutrizionale. Un'altra caratteristica molto apprezzata del seme di lino è per l'aspetto che del mantello vacche e vitelli, che appare brillante e lucido. I prodotti derivanti dal seme di lino sono di facile manipolazione, anche se non sono raccomandabili periodi di stoccaggio lunghi dovuti al rischio d'irrancidimento della sua frazione lipidica. Focant et al. (1998) hanno dimostrato come la somministrazione di 200-400 g/giorno di acido alfa linolenico da semi di colza e/o semi di lino estrusi accresca significativamente il livello di acido alfa linolenico nel grasso del latt. Goodridge e Ingalls (1998) hanno ottenuto livelli ancora maggiori di ALA nel latte in uno studio in cui le vacche ricevevano 410 g/giorno di olio di semi di lino microincapsulato, mentre Ponter et al., (2006) hanno rilevato un contenuto di ALA doppio rispetto al gruppo di controllo nel latte di animali riceventi semi di lino estruso.

OLIO DI LINO

I vantaggi dell'utilizzo di olio di lino sono legati alle ricche proprietà nutrizionali. L'olio di lino è infatti costituito per lo più da trigliceridi di acidi grassi polinsaturi essenziali, acido alfa linolenico in particolare (40 volte maggiore rispetto agli altri olii).

L'olio si ottiene dalla spremitura a freddo di semi di lino precedentemente essiccati o tostati. Uno dei problemi dell'olio di semi di lino è la difficoltà nella conservazione, questo tipo di olio infatti tende a ossidarsi molto facilmente. La microincapsulazione ne prolunga il periodo di conservazione.

L'olio di lino è composto per il 50% da acido alfa linolenico, per il 25% da acido linolenico, per il 10-18% da acido oleico e per la restante parte da acidi grassi saturi (5-10%).

Olio di lino aggiunto a diete per bovine da latte può essere utile anche per aumentare l'ossigenazione cellulare quindi fornire migliori performance produttive, inoltre aiuta a limitare l'infiammazione in condizioni artritiche e può contribuire a calmare gli animali nervosi.

La supplementazione di olio di lino nelle diete di bovine da latte porta a cambiamenti nella composizione del grasso del latte. L'addizione nelle razioni di vacche in lattazione di olio di lino incrementa, infatti, sia gli Omega3 sia i CLA del grasso del latte (Demeyer e Doreau, 1999; Dhiman, 2000, Chillard et al.2001).

Il forte interesse nell'utilizzo di olio di lino nell'alimentazione di vacche da latte è, infatti, proprio dovuto agli effetti sul profilo acidi del grasso del latte: l'acido linolenico contribuisce all'aumento degli acidi grassi della serie Omega3 e promuove l'incremento dei CLA; allo stesso tempo determina un decremento degli acidi grassi saturi del grasso del latte (Chilliard et al., 2007).

Nei ruminanti, un'alimentazione con alte concentrazioni di olii vegetali ha la proprietà di inibire le fermentazioni ruminali (Jenkins, 1993, Machmuller et al, 1998). Studi recenti hanno dimostrato come diete caratterizzate da un alto rapporto foraggi:concentrati (65:35) e supplementate con olio di lino al 3%, determinino un aumento della digeribilità della (Ueda et al., 2003).

SOIA ESTRUSA

Gli alimenti proteici come la soia contengono generalmente una frazione più o meno elevata di proteina ruminodegradabile (RDP), ovvero quella frazione proteica che una volta ingerita viene degradata dai batteri ruminali per la sintesi della proteina microbica: la parte non ruminodegradabile (RUP) o bypass attraversa i prestomaci senza essere attaccata dai batteri e viene digerita normalmente a livello gastro-intestinale. La proteina by-pass è uno strumento attraverso cui è possibile modulare la produzione di latte e la proteina del latte, grazie al maggior controllo sugli aminoacidi assorbiti dall'organismo ed in particolare quelli essenziali: poiché nel rumine gli aminoacidi della RDP vengono fermentati, non è infatti possibile essere certi che i fabbisogni di aminoacidi essenziali vengano adeguatamente soddisfatti.

Per incrementare la frazione by-pass della soia, si può ricorrere a determinati trattamenti, tra cui in particolare l'estrusione. Si tratta di un processo in cui i semi di soia, previa macinatura, vengono sottoposti a temperature e pressioni elevate per pochi minuti, seguite da una fase altrettanto rapida di raffreddamento. I vantaggi dell'estrusione della soia, oltre a migliorarne le caratteristiche igienico sanitarie, a prolungarne la conservabilità e ad inattivarne i fattori antinutrizionali eventualmente presenti, aumenta in modo significativo la frazione bypass della proteina. Tutto questo avverrebbe in assenza di modificazioni importanti dell'attività fermentativa ruminale a carico delle altre

componenti alimentari. Il mantenimento della temperatura entro determinati livelli massimi evita inoltre l'innesco della reazione di Maillard, che porterebbe alla formazione di composti azotati indigeribili.

La letteratura scientifica riporta da molti anni un effetto positivo della soia estrusa sulla produzione di latte. Già nel 1983, in un lavoro di Van Dijk et al., in cui si poneva a confronto la soia estrusa con semi di soia non trattati, si evidenziò un aumento, seppur non significativo, della quantità di latte prodotto (Van Dijk et al., 1983); successivamente Chouinard et al. (1997) e Neves et al. (2007), hanno confermato gli aumenti produttivi, in questo caso significativi, derivanti dall'utilizzo di soia estrusa. Anche la sostituzione di una parte consistente di farina di estrazione di soia con soia estrusa favorisce la produzione di latte (Solomon et al., 2000)(Dhiman et al., 1999; Schingoethe et al., 1988; Solomon et al., 2000). Secondo Drackley e Schingoethe (1985), la somministrazione di un mix composto da soia e girasole estrusi determinerebbe inoltre una curva di lattazione più persistente rispetto a quanto accade per la soia in farina. L'effetto positivo sulla produzione si è inoltre manifestato anche valutando la soia estrusa in relazione ad altri alimenti, quali ad esempio l'olio di pesce (Whitlock et al., 2002) oppure i semi di girasole (Anderson et al., 1984). Gli aumenti produttivi, compresi tra 0,8-8,3 kg/giorno, sono in molti casi attribuibili ad un incremento dell'ingestione di sostanza secca.

Di notevole interesse è il riscontro dell'aumento della concentrazione di CLA (coniugati dell'acido linoleico) in seguito all'inclusione di soia estrusa nella razione. Le concentrazioni di CLA nel latte in pratica raddoppiano in seguito all'ingestione di soia estrusa rispetto a una razione di controllo (Bailoni et al., 2004; Whitlock et al., 2002; Ramaswami et al., 2001; Solomon et al., 2000; Dhiman et al., 1999).

La soia estrusa sembrerebbe inoltre diminuire la percentuale di grasso del latte: si tratta di variazioni comprese tra 0,10 -0,5%, in alcuni casi significative (Neves et al., 2007; van Dijk et al., 1983) in altri no (Solomon et al., 2000; Dhiman et al., 1999; Chouinard et al., 1997). Fino a pochi anni fa si riteneva che alti livelli di grasso forniti con la dieta fossero la causa della riduzione della percentuale di grasso del latte, agendo attraverso un'alterazione della digestione della fibra; attualmente invece si è visto che è proprio l'aumento dei CLA a livello mammario a determinare il calo del grasso del latte, attraverso l'inibizione a livello subcellulare dell'attività di una proteina necessaria per la lipogenesi: tra tutti i CLA, tuttavia il CLA *trans10*, *cis12* è maggior il responsabile di questo fenomeno.

Oltre agli effetti sulla qualità e sul profilo acidico del latte, i PUFA alimentari hanno dimostrato di poter agire anche sui meccanismi che regolano la fertilità: la letteratura riporta infatti un generale miglioramento dei parametri riproduttivi in seguito all'aggiunta di grassi polinsaturi alla razione, tra cui l'aumento del tasso di concepimento al primo servizio, aumento del tasso di gravidanza e

aumento dei casi di ripresa precoce della ciclicità ovarica (Mendoza et al., 2008; Ambrose et al., 2006; McNamara et al., 2007).

OLIO DI SOIA

I vantaggi dell'utilizzo di olio di soia sono legati alla sua ricchezza in acido linoleico (acido grasso essenziale), al fatto che è liquido in un ampio range di temperatura, al suo buon apporto di fosfolipidi, antiossidanti e steroli.

L'olio di soia è ottenuto dai semi oleosi, che vengono puliti ed essiccati a circa il 10% di umidità, sbucciati e scheggiati prima dell'estrazione con solvente (isoesano o esano) mediante un processo di percolazione o immersione. L'olio/solvente è separato dalla farina/solvente, in seguito il solvente è rimosso da entrambe le frazioni e recuperato per il riutilizzo. Poi l'olio subisce un processo di raffinazione. Può essere ottenuto anche per pressione, ma questo è un processo meno comune.

L'olio è ricco di acido linoleico (54%, range 50-57%) e acido oleico (24%, range 18-25%), ma contiene anche acido palmitico (11%, range 10-13%), stearico (4%) e linolenico (7%), con tracce di altri acidi grassi. Oggi, attraverso l'ingegneria genetica si sta tentando di produrre soia con diverse composizioni di acidi grassi, compreso olio ricco in acido laurico come alternativa all'olio di cocco e di semi di palma, o oli con meno acido palmitico e stearico (Gunstone 2003). L'olio di soia può essere convertito in un materiale semisolido mediante idrogenazione parziale.

Veira et al. (2001) testarono l'effetto della somministrazione di olio di soia al 3% sull'assunzione totale di sostanza secca, digeribilità apparente, produzione e composizione di latte utilizzando 30 vacche di razza Holstein (Veira et al., 2001). L'effetto dell'olio di soia su velocità e grado di digestione ruminale fu determinato mediante nylon-bags incubate nel rumine di vacche fistolate. Notarono che l'olio di soia diminuiva la digeribilità apparente dell'ADF di 9 unità percentuali, dal 52,8% al 43,6%, ed anche la degradabilità dell'NDF diminuì del 20%, dal 44,3% al 36,6%. L'aggiunta di olio di soia causò una lieve riduzione (circa il 5%) nell'assunzione di sostanza secca, nella produzione di latte e nella percentuale di proteina. L'effetto maggiore si ebbe sulla percentuale e sulla produzione totale di grasso, che durante il periodo di trattamento calò di 0,20 kg/giorno, pari a una riduzione del 23%.

Boken et al. (2005), in seguito alla somministrazione di un sottoprodotto della raffinazione dell'olio di semi di soia, hanno registrato come questo tipo di supplemento non abbia interferito con la quantità e la composizione del latte (percentuali di lipidi e di proteine), ma garantisse una migliore condizione corporea delle vacche trattate (Boken et al., 2005).

C'è una grande differenza tra l'uso di semi integri di soia, dove gli effetti sul metabolismo ruminale sono ridotti, e l'utilizzo di olio dove la riduzione dell'attività cellulolitica del rumine è pronunciata, come si è visto nello studio sopra citato e in altri lavori (Bateman and Jenkins, 1998).

Gli effetti dei grassi insaturi e degli oli sulla digestione della fibra nel ruminante sono stati ben documentati (Palmquist and Jenkins 1980). Griinari et al. (1998) dimostrarono che quando le vacche vengono alimentate utilizzando oli insaturi, l'inibizione diretta della sintesi del grasso del latte può derivare dalla produzione di acidi grassi parzialmente idrogenati, in particolare dall'acido vaccenico. In un recente studio Jacobs et al. (2011) hanno realizzato una prova col fine di valutare gli effetti di diversi acidi grassi insaturi non protetti sull'espressione della SCD1 (Stearoyl CoA-desaturasi1) e SCD5 (Stearoyl CoA-desaturasi 5) nella ghiandola mammaria di vacche da latte. Sono state effettuate biopsie dal tessuto mammario ed analizzate per l'espressione di m-RNA di SCD1 e SCD5 utilizzando la real-time PCR quantitativa. La razione è stata implementata con olio di colza, olio di soia o olio di lino per aumentare il flusso alla ghiandola mammaria rispettivamente di C18:1 *cis*9, C18:2 *cis*9,*cis*12 e C18:3 *cis*9,*cis*12,*cis*15. L'enzima SCD ha un ruolo fondamentale nella mammella, in quanto inserisce un doppio legame in posizione Δ 9 di miristoil-, palmitoil-, e stearoil-CoA. Converte quindi acidi grassi saturi in acidi grassi monoinsaturi introducendo un doppio legame tra gli atomi di carbonio 9 e 10 nella catena di carbonio saturata, ma può anche catalizzare la desaturazione di un ampio spettro di acidi grassi monoinsaturi, compreso il C18:1 *trans*11 per formare il *cis*9,*trans*11 CLA (Ntambi and Miyazaki 2004). L'aumento dell'attività della SCD è quindi di grande interesse per incrementare il contenuto in acidi grassi benefici del latte. In questo studio le vacche alimentate con aggiunta di olio di soia hanno mostrato una significativa diminuzione dell'espressione della SCD1 (una riduzione del 55%), comparata con quelle che hanno ricevuto olio di colza e olio di lino. Invece l'espressione mammaria di SCD5 non è cambiata fra i diversi gruppi, indicando che SCD5 e SCD1 sono regolati in modo diverso. In linea con questa osservazione, è stato dimostrato che l'espressione mammaria di m-RNA di SCD1 tende ad essere ridotta in vacche sottoposte a infusione intravenosa di *trans*10,*cis*12 CLA, mentre non sono osservati effetti nell'espressione mammaria di SCD5 (Gervais et al. 2009).

Allred et al. (2006) hanno riscontrato un aumento della concentrazione di CLA, EPA e DHA in seguito all'impiego di olio di pesce e sali di calcio di olio di palma, da soli o in combinazione con olio di semi di soia o semi di soia estrusi. Altri autori avevano evidenziato come tutti gli oli vegetali contenenti ALA o acido linoleico rappresentino, sebbene con alcune differenze, un buon substrato per la produzione di CLA. Dhiman et al. (2000) notarono che le razioni arricchite con olio di soia (4%) determinano un aumento dei CLA del 2%, mentre et al. (1998) riportano che aggiungendo alla dieta olio di arachidi, di girasole o di lino si ottiene un incremento della quota di CLA nel grasso del latte. Dhiman et al. (2005) dimostrarono come l'olio di lino non aumenti la concentrazione di CLA quanto l'olio di soia.

OLIO DI PESCE

Gli acidi grassi Omega3 (così come gli Omega-6) sono acidi grassi essenziali dato che non possono essere sintetizzati dai mammiferi in adeguate proporzioni. Esistono tre isomeri che formano gli acidi grassi Omega3: ALA (C18:3 α -linoleico), EPA (C20:5) e DHA (C22:6). Inoltre EPA e DHA sono sintetizzati a partire dall'acido α -linoleico. L'olio di pesce deve essere bypassato per provvedere a concentrazioni adeguate di EPA e DHA. Questo è di notevole vantaggio dato che la sintesi di EPA e DHA nell'uomo è minima. L'acido α linoleico è naturalmente presente nei cloroplasti delle foglie delle piante verdi. In soggetti debilitati come diabetici e ipertesi, così come bambini prematuri, si ha carenza di EPA e DHA. Attar-Bashi et al (2007) hanno visto come l'uomo sintetizzi DHA e ALA per ossidazione perossisomiale (Attar-Bashi et al., 2007). I benefici degli acidi grassi Omega3 sono vari, i più citati sono il loro potere nel prevenire malattie cardiovascolari, parti prematuri, cancro, ed è essenziale per promuovere la crescita nei bambini. Ruxton (2004) notò che un abbassamento del consumo di Omega3 può causare disturbi mentali come depressione, demenza e aumentare il rischio di Alzheimer. Oh (2005) notò che la ragione più importante per utilizzare olio di pesce è il beneficio cardiovascolare; mentre i benefici del consumo di Omega3 sono chiari, le dosi per raggiungere questi vantaggi non lo sono. Witsuba (2005) stabilì che l'ingestione di EPA e DHA per l'uomo in generale è di solo 0,1-0,2 g/giorno. L'FDA non ha ufficialmente stilato un valore minimo giornaliero, ha stabilito però che non più di 3 g/giorno di olio di pesce dovrebbero essere consumati con la dieta o supplementati. Per contro ai benefici appurati degli Omega3, un limite massimo è stato posto per il potere di aumentare il tempo di coagulazione e le LDL, così come può essere dannoso per il profilo glicemico nei diabetici. Ruxton (2004) stabilì che da 1 a 4 pasti di pesce a settimana (450 mg di EPA e DHA) sia adeguato, mentre Oh (2005) trovò un minimo di un pasto di pesce a settimane come quantità sufficiente per ridurre infarto cardiaco del 52% (Ruxton et al., 2004). L'American Heart Association suggerisce 1 g di olio di pesce al giorno per pazienti con malattie coronariche, mentre uno studio ha dimostrato che da 2 a 4 g/giorno può significativamente ridurre l'ipertrigliceridemia. Witsuba (2006) ha riportato che da 0,10 a 0,65 g/giorno è sufficiente per raggiungere effetti benefici. Sebbene gli effetti positivi degli Omega3 nell'uomo siano chiari, non lo sono negli animali da reddito. Idealmente, gli animali non dovrebbero essere negativamente interessati, l'efficienza del trasferimento di Omega3 dovrebbe essere alto, e neanche il sottoprodotto di per se non dovrebbe esserlo (Wistuba et al., 2006). Witsuba et al. (2005) notarono che supplementando con olio di pesce delle vacche che non avevano una dieta a base mais, la loro media di ingestione decresceva, ma ciò non aveva effetto su una dieta a base frumento. Inoltre, Giesey et. al (2002) notarono che la MFD era spesso causata dalla supplementazione con olio di pesce. Un potenziale effetto degli Omega3 è il loro effetto sul sistema immunitario (Giesey et al., 2002).

ACIDO STEARICO

L'acido stearico (C18:0) è presente sotto forma di gliceride in quasi tutti gli oli e i grassi animali e vegetali,; per fare alcuni esempi il grasso di maiale ne contiene tra 9-15%, il burro di cacao tra il 33-38%, l'olio di soia il 4%.

Industrialmente si ottiene principalmente con due metodi a partire da prodotti ricchi in acido stearico:

- i seghi o altri prodotti grassi (grasso d'ossa, grassi vegetali) vengono idrolizzati per ottenere gli acidi grassi liberi, successivamente si separano gli acidi saturi dagli acidi insaturi per pressione. Il prodotto ottenuto costituisce la stearina, che contiene in genere dal 40 al 45% di acido stearico e dal 50 al 55% di acido palmitico accanto a piccole quantità di acido oleico. La separazione delle miscele di acidi grassi si può effettuare anziché per pressione, per cristallizzazione da solventi (metanolo);
- idrogenazione di oli ricchi di acidi con 18 atomi di C, seguita (o preceduta) da idrolisi. Con questo metodo si possono ottenere prodotti contenenti dal 75 al 90% di acido stearico.

In entrambi i metodi gli acidi greggi si possono sottoporre a distillazione frazionata: ciò permette di migliorare il contenuto in acido stearico del prodotto finale.

L'acido stearico si presenta come un solido cristallino, in squamette madreperlacee, di consistenza cerosa, untuose al tatto (Villavecchia and Eigenmann, 1975).

I grassi della dieta, come evidenziato in precedenza, sono idrolizzati ampiamente nel ruminale da enzimi microbici prodotti principalmente da diverse classi di batteri (dei quali la meglio conosciuta è *Anaerovibrio lyophilica*) ma anche da protozoi. Questi enzimi sono lipasi, galattosidasi e fosfolipasi, e portano alla formazione di acidi grassi liberi senza composti intermedi come mono e digliceridi. L'idrogenazione si verifica sull'acido grasso libero. Pertanto è necessario che la lipolisi sia già avvenuta in precedenza. Il primo passo è un'isomerizzazione e il prodotto finale dell'idrogenazione degli acidi grassi a 18C è l'acido stearico. Tuttavia, quando sono disponibili grandi quantità di acido linoleico, l'idrogenazione si arresta prima di questo passaggio finale, portando alla formazione di vari isomeri *cis* e *trans*.

Quindi la composizione degli acidi grassi che lascia il ruminale è molto diversa dalla composizione degli acidi grassi della dieta (Doreau and Chilliard 1997). Come conseguenza del metabolismo ruminale, i lipidi che entrano nel piccolo intestino sono rappresentati da acidi grassi altamente saturi, principalmente acido palmitico e stearico.

Già negli enterociti ci sono delle desaturasi degli acidi grassi, infatti la frazione microsomiale ottenuta dalla mucosa del piccolo intestino dei ruminanti contiene desaturasi in grado di convertire acido stearico in oleico. Si stima che oltre il 10% dell'acido stearico che entra nella mucosa

intestinale dei ruminanti sia desaturato ad acido oleico prima di arrivare nel sistema linfatico (R Bickerstaffe, A R Johnson, 1972).

A livello mammario troviamo la stearoil-CoA desaturasi (SCD) che gioca un ruolo centrale nel metabolismo degli acidi grassi catalizzando l'inserzione di un doppio legame in posizione *cis*- $\Delta 9$ in un largo spettro di acidi grassi a media e lunga catena. I substrati dell'enzima sono molteplici, ma quelli che manifestano una maggiore specificità sono l'acido palmitico e l'acido stearico che sono convertiti rispettivamente in acido palmitoleico e oleico.

L'incorporazione degli acidi grassi monoinsaturi nei glicolipidi della membrana cellulare diminuisce la temperatura di passaggio dallo stato solido alla fase liquido-cristallina e fornisce alle membrane la fluidità necessaria (Heinemann and Ozols, 2003). L'acido palmitoleico e l'acido oleico sono i composti maggiormente rappresentati nei fosfolipidi di membrana, quindi la SCD è responsabile del rapporto acidi grassi saturi/insaturi nella composizione dei trigliceridi e della membrana fosfolipidica, svolgendo un ruolo chiave nel definire la fluidità delle membrane cellulari e regolare le interazioni tra due cellule contigue (Kim and Ntambi, 1999).

L'acido oleico è inoltre il principale deputato a mantenere il giusto grado di fluidità per la secrezione del latte. La ridotta disponibilità di acido stearico per la sintesi di acido oleico, potrebbe di conseguenza compromettere la fluidità del latte, con conseguente depressione del grasso.

Bickerstaffe e Johnson (1972) hanno osservato una diminuzione del 29% della concentrazione di grasso del latte, quando la SCD è stata inibita da infusione endovenosa per 14 giorni di acido sterculico in capre in lattazione, e Corl et al. (2001) hanno osservato una diminuzione del 9% del grasso del latte con 4 giorni di infusione abomasale di olio sterculico in bovine in lattazione.

Diete causanti MFD sono state associate ad una mancanza di sintesi endogena di acido oleico per la formazione di trigliceridi (Lor and Herbein 2003). Il ruolo della sintesi endogena di acido oleico come possibile passaggio nella sintesi di trigliceridi e nel mantenimento della fluidità del latte è ben noto (Kinsella 1972). Inoltre, la sostituzione di isomeri *trans* dell'acido oleico potrebbe aumentare il punto di fusione della materia grassa e inibire ulteriormente la secrezione di grasso nel latte (Chilliard et al., 2001). Lor et al. (2005) hanno suggerito che una combinazione di alto livelli di *trans* C18:1, insieme ad una ridotta disponibilità di acido stearico, potrebbe inibire la secrezione di grasso per l'incapacità della ghiandola mammaria di mantenere un'adeguata fluidità del latte.

Timmen e Patton (1988) hanno sottolineato che la necessità di liquidità del globulo di grasso del latte richiede che la maggior parte degli acidi grassi siano esterificati in trigliceridi in combinazioni che abbiano un punto di fusione pari o inferiore a 39°C, la temperatura corporea della vacca. Questa selettività indica che l'esterificazione è diretta a produrre i trigliceridi richiesti indipendentemente dalle variazioni degli acidi grassi della dieta (Timmen and Patton, 1988). Potrà cioè cambiare la

quantità di trigliceridi, ma non la loro struttura. Poiché gli AG da C4:0 a C10:0 hanno un punto di fusione relativamente basso, si pensa siano utilizzati alternativamente con l'acido oleico in posizione sn-3 come i principali regolatori della fluidità del latte durante la fase finale della sintesi dei trigliceridi.

Il mantenimento del punto di fusione del latte sotto i 39-40°C suggerisce che la ghiandola mammaria sia in grado di secernere solo materia grassa con fluidità adeguata e che la MFD potrebbe essere un risultato di adeguamento che segue la impossibilità di secernere latte con un più alto punto di fusione (Gama et al., 2008).

SUPPLEMENTI MICROINCAPSULATI NELL'ALLEVAMENTO DELLA VACCA DA LATTE

La microncapsulazione in matrici lipidiche è una tecnica che permette agli olii (vegetali come di pesce) di preservare a lungo le caratteristiche nutrizionali di questi grassi ad elevata insaturazione. Gli acidi grassi ad elevato grado di insaturazione sono facilmente ossidabili per azione di luce, calore ed agenti ossidanti. La microincapsulazione previene l'irrancidimento ossidativo di questi oli mantenendone a lungo le caratteristiche nutrizionali.

LIVELLO DI INSATURAZIONE DELLA DIETA

Come già detto, la produzione dei CLA è collegata al tipo di acidi grassi presenti nella dieta delle bovine ed alla capacità di bioidrogenazione ruminale degli stessi.

Fattori da considerare sono:

- il tipo e la quantità di acidi grassi poliinsaturi apportati con la dieta (foraggi e mangimi);
- i trattamenti tecnologici applicati ai mangimi ricchi di olii;
- gli apporti e le caratteristiche qualitative della fibra apportata con le razioni;
- le risposte di adattamento del microbiota ruminale, (in particolare i batteri cellulolitici), all'esposizione agli acidi grassi insaturi.

In generale, sarebbe di grande utilità la messa a punto di un modello di previsione della quantità di CLA nel latte considerando i fattori citati; la disponibilità di questo strumento potrebbe consentire di controllare in maniera razionale la produzione di latte arricchito di CLA.

La produzione di latte naturalmente arricchito di nutrienti funzionali rappresenta una tappa fondamentale del percorso di valorizzazione di questo alimento per il consumatore.

A tale scopo è stato messo a punto dalla sezione zootecnia del Dipartimento Di Scienze Mediche Veterinaria dell'Università di Bologna, un indice di insaturazione della dieta (LID) che esprime la quantità (g) di Iodio capace di saturare la quantità (g) di acidi grassi insaturi ingeriti con la dieta giornalmente, insomma un indice che esprime la quantità di acidi grassi insaturi ingeriti dalla bovina con la dieta e capaci di interagire con i microorganismi ruminali, sottoposti al fenomeno della bioidrogenazione.

Per ottenere questo indice è necessario effettuare un'analisi quali-quantitativa degli acidi grassi presenti nella razione.

La quantità di AG presenti nella razione se espressa in % sul tot degli AG verrà trasformata in grammi/giorno, in base al contenuto in estratto etereo della razione e al rapporto acidi grassi/estratto etereo. Ogni acido grasso (in grammi) sarà moltiplicato per il fattore IV (indice di Iodio) AOCS corrispondente e il valore in LID sarà dato dalla sommatoria di tutti gli AG presenti.

Il foglio di calcolo prevede la possibilità di aggiungere la quota di LID derivante dal supplemento aggiunto, basterà digitare l'apporto in grammi di supplemento (apporto in acidi grassi del supplemento noti) e avremo il LID complessivo della dieta base più il supplemento. Questo ci ha permesso di capire fino a che livello di insaturazione potevamo spingerci per incrementare la quota di CLA nel latte e senza incorrere in problemi quali milk fat depression. Si è considerato un valore di LID pari a 1000 oltre il quale il rischio di incorrere in questi problemi.

In tale maniera si è potuto procedere all'identificazione di un livello massimo al quale si può avere un certo flusso di acidi grassi dalla dieta nel latte (con un'opportuna standardizzazione del trasferimento e mantenimento di un certo livello di CLA nel latte).

PARTE SPERIMENTALE

SCOPO DELLA TESI

Obiettivo delle ricerche svolte è stato quello di individuare, in condizioni sperimentali controllate e nelle comuni realtà di allevamento, le possibili strategie alimentari atte ad aumentare le concentrazioni di Omega3 e CLA del latte vaccino senza penalizzarne i titoli di grasso.

Come noto, infatti, le strategie alimentari che permettono di elevare il contenuto di CLA e Omega3 prevedono una modificazione degli apporti lipidici della razione che, di frequente, predispongono ad una flessione indesiderata dei titoli lipidici del latte fino al punto di renderlo inadatto alla commercializzazione.

I lavori svolti possono essere distinti in 3 parti :

- ricerche che hanno avuto l'obiettivo principale di incrementare gli acidi grassi della serie Omega3;
- esperienze tese a incrementare le concentrazioni di CLA;
- esperimento teso a incrementare i livelli di Omega3 e CLA senza penalizzare il titolo di grasso del latte.

MATERIALI E METODI

Le prove sono state condotte presso la stalla didattico-sperimentale dell'Azienda Universitaria di Bologna (AUB) e in stalle "commerciali" per verificare le risposte nelle comuni condizioni operative. Le analisi sui foraggi, i mangimi e i latti, sono state in gran parte condotte presso i laboratori del servizio di zootecnia del Dipartimento di Scienze Medico Veterinarie.

Per lo sviluppo delle razioni sperimentali si è posta attenzione particolare al profilo in acidi grassi dei vari alimenti e, per evitare eccessive flessioni dei titoli lipidici, la formulazione delle diete sperimentali ha tenuto conto dell'apporto in foraggi (in genere superiore al 45% della sostanza secca), della presenza complessiva di acidi grassi insaturi valutati con l'indice di insaturazione della dieta (LID < a 1000-1100), della presenza di acidi linoleico e linolenico.

L'indice di insaturazione della dieta (LID) è un modello messo a punto dalla sezione di zootecnia del Dipartimento ed esprime la quantità di Iodio capace di saturare la quantità di acidi grassi insaturi ingeriti con la dieta giornalmente; in altri termini il LID è un indice che esprime la quantità di doppi legami presenti negli acidi grassi insaturi ingeriti dalla bovina con la dieta.

ANALISI

Le analisi dei vari campioni di alimenti e delle razioni sono state effettuate presso il laboratorio della sezione di zootecnia del Dipartimento Scienze Mediche Veterinarie della Facoltà di Medicina Veterinaria (Ozzano Emilia - Bologna). Le metodiche utilizzate sono riportate nel testo della AOAC (Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis) e adattate per rispondere ai parametri di sicurezza della Comunità Europea.

Nel laboratorio sono adottate procedure operative standard (SOP) che rispettano i criteri e le metodiche base dell'AOAC e della Comunità Europea.

Ciascun campione, prelevato in maniera tale da poter essere considerato rappresentativo, una volta pervenuto in laboratorio, è stato pesato in un recipiente precedentemente tarato su bilancia tecnica e essiccato in stufa a ventilazione forzata a 65°C per il tempo necessario a raggiungere un peso costante. Una volta estratto dalla stufa il recipiente è stato nuovamente pesato al fine di determinare il contenuto di sostanza secca (Martillotti et al., 1985). Il campione è stato quindi macinato in un mulino per foraggi con griglia a porosità di 4 mm e successivamente macinato ulteriormente in mulino Cyclotec (Cyclotec Sample Mill 1093, Tecator) con griglia a porosità di 1.00 mm in linea con i requisiti delle metodiche ufficiali. Gli strumenti venivano puliti al termine della macinazione di ciascun campione, per evitare eventuali contaminazioni in grado di falsare il risultato analitico. Sul campione macinato è stato determinato il contenuto di umidità residua ponendone una quota in stufa a 103 – 105°C per quattro ore. In questo modo si determina la percentuale di umidità non eliminata con l'essiccazione a 65°C ed anche l'umidità ambientale propria del laboratorio. Questa determinazione permette in seguito di correggere i valori di peso del campione necessari per altre analisi. Estratti dalla stufa, i contenitori con il campione sono stati posti all'interno di essiccatori volti ad impedire o comunque a ridurre il contatto con l'umidità dell'ambiente. In seguito sono state determinate le ceneri gregge (metodica CEE n.L 155/20 del 12/07/71), che rappresentano il residuo ottenuto per incenerimento e calcinazione a 550°C, e il contenuto in proteina grezza (metodo Kjeldahl), cioè il contenuto di azoto negli alimenti con risultato espresso come N x 6,25.

La determinazione della fibra neutro detersa (NDF) è stata condotta seguendo la metodica di Van Soest e Robertson (1980). La fibra al detergente neutro è il residuo che si ottiene dopo il trattamento idrolitico con una soluzione di un detergente in ambito neutro; il trattamento rimuove i carboidrati solubili (NDS) rappresentati da zuccheri, pectine, acidi organici, sostanze azotate proteiche e non proteiche, lipidi e sali minerali solubili mentre lascia come residuo i costituenti fibrosi delle pareti cellulari vegetali (NDF) e cioè cellulosa, emicellulose, lignina, cutina e i costituenti minerali.

L'ADF è invece il residuo che si ottiene dopo il trattamento idrolitico con una soluzione di detergente in ambiente acido. Questo metodo consente di determinare un residuo fibroso costituito da cellulosa,

lignina, cutina, prodotti di Maillard, tannini, pectine e sostanze minerali insolubili in ambiente acido. La differenza tra NDF e ADF dà una stima delle emicellulose. Il procedimento, pressoché identico a quello dell'NDF ma con una soluzione diversa e senza l'uso di enzimi o sodio solfito, costituisce un passaggio preparatorio per la determinazione della lignina acido detersa (ADL) secondo Van Soest.

I campioni di unifeed sono stati analizzati utilizzando la metodica NIRS (Foss NIRSystem 5000, Foss) come descritto da Brogna et al. (2009). Ciascun campione è stato inserito in una celletta successivamente inserita nello strumento. Al momento della lettura, che prevedeva la copertura della regione visibile compresa tra 1098 e 2500 nm, è stato creato uno spettro specifico, registrato come logaritmo di $1/R$ (dove R indica la rifrazione). Questi spettri, sono stati generati da letture continue a intervalli di 8 nm. Ciascuna lettura per ciascun intervallo prevedeva l'impiego di 173 differenti lunghezze d'onda. L'analisi matematica degli spettri è stata effettuata con il software WinISI II (versione 1.5, Infrasoft International, Port Matilda, PA, USA).

LATTE

I dati relativi alla quantità di latte prodotto nella stalla sperimentale per singolo capo sono stati rilevati quotidianamente dall'impianto computerizzato (AFIFARM) presente in sala di mungitura tramite un dispositivo di riconoscimento individuale. La produzione è stata rilevata ogni giorno in entrambe le mungiture.

Un'aliquota è stata analizzata mediante Milk-O-Scan (Foss Electric Hillerod, Denmark) per la determinazione di lipidi, proteine, lattosio, urea, caseina e cellule somatiche.

L'altra aliquota è stata congelata e successivamente analizzata per la determinazione degli acidi grassi mediante gas-cromatografia.

I dati invece relativi alla quantità di latte prodotto nelle stalle esterne per singolo capo sono stati rilevati solamente nei giorni di campionamento. Un'aliquota è stata analizzata mediante Milk-O-Scan (Foss Electric Hillerod, Denmark) per la determinazione di lipidi, proteine, lattosio, urea, caseina e cellule somatiche, l'altra aliquota è stata congelata e successivamente analizzata per la determinazione degli acidi grassi mediante gas-cromatografia.

Il metodo utilizzato per l'estrazione della fase lipidica dal latte è quello proposto da Folch et al. (1957) che permette di estrarre in maniera rappresentativa i grassi dal latte, per poi metilarli e separarli con tecniche gascromatografiche. Al termine dell'analisi è stata ottenuta una separazione degli acidi grassi componenti la fase lipidica del latte, identificati tramite comparazione con i tempi di ritenzione di uno standard noto; la quantificazione di ogni singolo acido grasso è stata ottenuta normalizzando a 100 l'area di ogni picco.

Estrazione secondo il metodo Folch: Dopo aver scongelato il campione di latte in acqua tiepida (25°C) ed averlo agitato vigorosamente al fine di ottenere un campione omogeneo, con una pipetta

graduata prelevare 30 ml di latte (la metodica originale prevede l'uso di 25 ml, ma, essendo un latte con basso contenuto di grasso abbiamo preferito lavorare su un volume maggiore) e trasferirli in una bottiglia con tappo a vite da 250 ml.

Aggiungere, con un cilindro graduato, 100 ml di una soluzione di cloroformio-metanolo 2:1 e mettere ad agitare per 30 minuti in un agitatore orbitale ad una temperatura massima di 30°C, per non denaturare la frazione lipidica del latte.

Trascorso il tempo necessario, travasare il tutto in un imbuto separatore filtrando con un filtro veloce. Trascorse 2 ore si è ottenuta la separazione tra la fase idrofila che sta sopra e quella idrofoba sottostante che è raccolta in un pallone da 150 ml attraverso un altro imbuto dotato di filtro e Na₂SO₄ (assorbe l'umidità). Al fine di allontanare il cloroformio dalla fase lipidica del latte, si pone il pallone in rotavapor a 40°C per circa 10 min fino a completa evaporazione del solvente.

Metilazione secondo il metodo ISO 15884: La metodica prevede di pesare circa 100 mg di grasso in una provetta di vetro con tappo a vite per procedere con la metilazione in KOH metanolica 2N. Questa tipologia di reazione permette di *trans* esterificare solo gli acidi grassi legati, con legame estere, al glicerolo e non gli acidi grassi liberi che hanno subito idrolisi.

Si procede sciogliendo il grasso estratto in 3 ml di esano puro in una provetta di vetro con tappo a vite, si aggiungono quindi 0,2 ml di KOH metanolica 2N, si agita per un minuto con vortex. Dopo di che si centrifuga per 3 minuti a 3000 giri.

Con una pipetta automatica si aspirano circa 2 ml di liquido dal surnatante esanico che verranno trasferiti in una provetta. Ora il campione è pronto per l'iniezione in gascromatografo per procedere alla separazione, identificazione e quantificazione degli esteri metilici degli acidi grassi (F.A.M.E.).

Analisi gascromatografica: L'analisi è stata condotta con un gascromatografo HRGC MEGA2 series 8560 Fisons con auto campionatore dotato di software di gestione Chrom-Card Fisons, equipaggiato di Colonna capillare Varian, CP-SIL 88 WCOT Fused Silica, lunga 100m, con diametro interno di 0,25mm e spessore interno del film di 0,2µm. La temperatura iniziale della colonna era di 45°C per 8 min, incremento di 12°C/min, isoterma a 173°C per 47min, incremento di 4°C/min, isoterma finale a 220°C per 30min; temperatura dell'iniettore 250°C e del rivelatore (FID) 270°C.

La pressione del gas di trasporto (Elio) era di 215 kPa ed è stato iniettato 1 microlitro di campione con un rapporto di splittaggio di 50:1.

I singoli acidi grassi sono espressi come percentuale del totale degli acidi grassi.

Identificazione dei picchi, calcolo ed espressione dei risultati: l'identificazione degli esteri metilici presenti in miscela si ottiene per confronto dei tempi di ritenzione con standard noti.

La composizione della miscela di esteri metilici viene determinata con il metodo di normalizzazione interno (si assume che la totalità dei componenti del campione siano rappresentati sul

cromatogramma in modo che il totale delle aree sotto i picchi costituisca il 100% dei costituenti), utilizzando fattori di correzione che convertono le percentuali delle aree e dei picchi in percentuale in peso dei componenti (i fattori di correzione si determinano con l'ausilio di un cromatogramma derivato dall'analisi di una miscela di riferimento di esteri metilici di composizione nota, effettuata in condizioni operative identiche a quelle del campione).

Sovrapponendo quindi il cromatogramma del campione separato e quello del mix di FAME utilizzato come STD esterno (Supelco, Inc. Alltech Associated, Inc., Deerfield, IL) per confronto con i tempi di ritenzione, si riesce ad identificare ogni picco incognito del campione in analisi.

FASE 1: INCREMENTO DI OMEGA3

La prima fase di sperimentazione ha avuto come obiettivo quello di valutare le strategie nutrizionali per aumentare la concentrazione di Omega3 del latte vaccino.

Ciò che si evince dalla parte introduttiva della tesi è che le strategie alimentari più efficaci per elevare il contenuto in Omega3 del latte si basano sostanzialmente sulla modificazione degli apporti lipidici della razione, in modo particolare attraverso la supplementazione con semi di lino, del relativo olio e con foraggi freschi. Al fine di testare la migliore strategia da utilizzare per implementare il contenuto di Omega3 nel latte, sono state eseguite due prove sperimentali presso la stalla sperimentale AUB. I supplementi lipidici utilizzati sono stati il lino in forma estrusa e l'olio di lino in forma microincapsulata (Promilk).

DESCRIZIONE DELLE RICERCHE

RICERCA 1

Finalità della ricerca

Obiettivo della ricerca è stato valutare gli effetti della somministrazione di una dieta arricchita con seme di lino estruso sulla qualità nutrizionale del latte vaccino, ed in particolare sul suo contenuto in acidi grassi Omega3 e CLA.

Materiali e Metodi

La ricerca è stata realizzata presso l'azienda sperimentale della Facoltà di Medicina Veterinaria sita nel comune di Ozzano Emilia (BO), e presso le strutture del Dipartimento di Morfofisiologia Veterinaria e Produzioni Animali.

Nella prova sperimentale sono state utilizzate 40 bovine di razza Frisona Italiana ripartite a formare due gruppi omogenei per ordine di lattazione, produzione quanti-qualitativa di latte, lunghezza di lattazione e peso.

Dai dati relativi alle caratteristiche medie delle bovine appartenenti ai due gruppi, riportati in Tabella 1, si desume come i gruppi fossero del tutto sovrapponibili all'inizio della sperimentazione.

Tabella 1. Caratteristiche medie dei gruppi sperimentali.

		Controllo	Lino
Bovine	n.	20	20
Giorni di lattazione	n.	177	181
Parti	n.	2,8	2,7
Produzione di latte	kg/giorno	28,3	28,1
Grasso	%	4,15	4,12
Proteine	%	3,43	3,45
Lattosio	%	4,95	4,89
Peso vivo	kg	673,1	837,7

Il gruppo di “controllo” è stato alimentato con una dieta a base di fieni e mangimi semplici mentre al gruppo trattato, denominato “Lino”, è stata fornita una razione che includeva lino estruso.

Le razioni (Tabella 2 e 3) sono state somministrate sotto forma di piatto unico e la dieta di base non apportava quantità significative di acidi grassi Omega3 (Tabella 4). La fonte di lino estruso era rappresentata da Omegalin 100 Int Digest (Mignini), un prodotto commerciale costituito da semi di lino estruso, crusca di frumento e lieviti essiccati (Tabella 5), la cui composizione in acidi grassi è riportata in Tabella 6.

Le razioni sono state equilibrate per apportare la stessa quantità di foraggi e concentrati e analoghe quantità di proteina metabolizzabile; l’apporto in energia differiva, a favore della razione contenente il lino, stante il suo maggior contenuto in lipidi (Tabella 3). L’inclusione del seme di lino estruso ha modificato anche il profilo in acidi grassi della razione (Tabella 4) e come atteso, la quantità di acidi linolenico è risultata del 26,3% nella dieta “Lino” verso il 10,9% della razione somministrata agli animali del gruppo “controllo”.

Il disegno sperimentale è stato così articolato:

- periodo di adattamento: della durata di una settimana, all’inizio del quale gli animali sono stati suddivisi in due gruppi omogenei ed alimentati con la razione di base;
- periodo sperimentale: della durata di quattro settimane, durante le quali gli animali hanno ricevuto le due diete sperimentali. La quantità di semi di lino estruso aggiunta alla dieta di base per il gruppo Lino era pari a 1,8 kg/capo/giorno (per un apporto suppletivo di circa 500 grammi di olio, di cui circa 300 grammi costituiti da acido α -linolenico);
- periodo post trattamento: della durata di una settimana, durante la quale le bovine hanno ricevuto la razione di base.

Le diete sono state messe a disposizione degli animali costantemente ad libitum e i consumi giornalieri sono stati ottenuti dalla differenza fra le quantità di unifeed distribuito e le rimanenze quotidiane.

Tabella 2. Razione alimentare fornita agli animali (Kg/capo/giorno).

Ingredienti	Controllo	Lino
Paglia	2,0	2,0
Fieno	12,0	12,0
Mais farina	6,2	5,9
Soia farina	3,0	1,5
Soia buccette	1,5	1,0
Integratore	0,4	0,4
Soia by-pass	0,6	1,1
Seme di lino estruso	-	1,8
Melasso	1,5	1,5

Tabella 3. Composizione centesimale delle diete sperimentali .

Parametro	Controllo	Lino
Sostanza Secca, % s.t.q.	89,83	89,34
Ceneri, % s.s.	9,00	8,62
Proteine gregge, % s.s.	14,2	13,65
Lipidi greggi, % s.s.	1,13	2,92
ADL, % s.s.	3,77	3,20
ADF, % s.s.	27,74	26,32
NDF, % s.s.	39,92	43,31
ADIP, % s.s.	0,66	1,06
NDIP, % s.s.	3,56	3,39

Tabella 4. Composizione in acidi grassi delle diete unifeed (%/tot AG).

Acido grasso	Controllo	Lino
C10:0	0,76	0,41
C12:0	0,62	0,37
C14:0	0,44	0,18
C16:0	22,42	16,23
C16:1n7	0,45	0,19
C18:0	3,24	4,26
C18:1n9	15,13	16,21
C18:1n7	1,21	0,83
C18:2n6	34,95	27,24
C20:1	0,30	0,20
C18:3n3	10,96	26,33
C20:5n3 EPA	0,34	0,10
C22:5n3 DPA	2,18	0,39
C22:6n3 DHA	0,06	0,02

Tabella 5. Composizione centesimale del supplemento a base di semi di lino estruso (% sul tal quale).

Parametro	% t.q.
Umidità	8,31
Proteina greggia	17,83
Grassi greggi	24,54
Ceneri	5,14
Perossidi	2,39

Tabella 6. Composizione in acidi grassi del supplemento a base di semi di lino estruso.

Acido grasso	%/tot AG
C8:0	0,05
C14:0	0,14
C16:0	9,17
C16:1	1,01
C18:0	4,41
C18:1n9	18,92
C18:1n6	18,31
C20:0	0,12
C18:3n3	45,84

Rilievi sperimentali

Alimenti: settimanalmente si è proceduto alla raccolta di un campione di unifeed di ciascuna dieta sperimentale al momento dello scarico, per valutarne umidità, amido, proteina grezza, frazioni fibrose, lipidi grezzi, ceneri, calcio e fosforo secondo metodica CEE 71/393 (Martillotti F., M. Antongiovanni, Rizzi L., E. Santi, 1985).

Latte: i dati relativi alla quantità di latte prodotto per singolo capo sono stati rilevati automaticamente dall'impianto computerizzato annesso alla sala mungitura (AFIFARM). Questi dati venivano rilevati quotidianamente in entrambe le mungiture giornaliere.

Sono stati prelevati da tutti gli animali, ai giorni 0, 7, 14, 21, 28 e 35, campioni individuali di latte che sono stati suddivisi in due aliquote. Un'aliquota è stata analizzata mediante Milk-O-Scan (Foss Electric, Hillerod, Denmark) per la determinazione di lipidi, proteine e lattosio (analisi effettuata su tutti i campioni prelevati), mentre l'altra è stata congelata e successivamente analizzata per la determinazione degli acidi grassi mediante gas-cromatografia (analisi effettuata solo sui campioni raccolti a 0 e 28 giorni).

Analisi statistica

I risultati ottenuti mediante Milk-o-Scan e i dati relativi alla produzione giornaliera di latte sono stati sottoposti ad analisi statistica mediante ANOVA ad una via per misurazioni ripetute, con la dieta come effetto principale. I risultati relativi agli acidi grassi sono stati sottoposti ad analisi statistica mediante ANOVA ad una via, con la dieta come effetto principale. Le differenze sono state ritenute significative per valori di $P < 0,05$.

I risultati sono stati analizzati anche al fine di evidenziare la correlazione esistente tra la produzione di latte e i suoi principali componenti, nonché tra il tenore lipidico del latte e quello in alcuni acidi grassi di particolare interesse.

Per la realizzazione di tali analisi è stato impiegato il software Statistica v. 6.0 (StatSoft Italia S.r.l., Vigenza, Padova).

Risultati e discussioni:

Nel corso della ricerca le vacche non hanno presentato problemi sanitari di rilievo e comunque tali da doverle escludere dai gruppi sperimentali.

I risultati relativi alla produzione giornaliera e alla qualità del latte sono riportati in Tabella 7. L'ingestione giornaliera media è stata pari a 21,8 e 22,1 kg/capo/giorno rispettivamente nei gruppi controllo e lino.

I risultati relativi agli acidi grassi del latte ottenuto dagli animali appartenenti ai due gruppi sperimentali sono illustrati in Tabella 8 sono rappresentate le concentrazioni degli acidi grassi più interessanti.

L'analisi della correlazione esistente tra la produzione di latte ed il suo tenore in lipidi e proteine ha evidenziato una relazione inversa che, all'analisi statistica, è risultata differire in maniera significativa per i parametri considerati (r di Pearson = -0,34 per i lipidi e -0,63 per le proteine; $P < 0,05$).

La produzione di latte e il tenore lipidico del latte non sono invece risultati correlati significativamente alle concentrazioni di alcuni singoli acidi grassi (vaccenico, linoleico, ALA e CLA).

Tabella 7. Produzione e qualità del latte.

	Controllo	Lino
Latte, kg/giorno	26,31 ^a	26,02 ^b
Grasso, %	4,24 ^a	3,95 ^b
Proteine, %	3,50	3,32
Lattosio, %	4,69	4,70

(valori contrassegnati da lettere diverse differiscono significativamente tra loro per $p \leq 0,05$: test Tukey HSD)

Tabella 8. Composizione in acidi grassi del latte (mg/100 mg di grasso) dopo 4 settimane di trattamento.

Acido grasso	Controllo	Lino
C4:0	3,89	4,06
C6:0	2,74	2,76
C8:0	1,74	1,71
C10:0	4,08	3,81
C12:0	4,58	4,00
C14:0	13,3	12,94
C16:0	33,42 ^a	26,53 ^b
C16:1n7	1,37 ^a	0,74 ^b
C18:0	7,75 ^a	12,02 ^b
C18:1t11	0,62 ^a	1,43 ^b
C18:1n9	18,03	21,23
C18:1n7	1,33	1,70
C18:2n6	1,82	1,86
C20:1	0,08	0,09
C18:3n3	0,41 ^a	0,85 ^b
CLA	0,59 ^a	0,91 ^b
C18:2 t10,c12	0,04	0,06
C20:5n3 EPA	0,06	0,06
C22:5n3 DPA	0,02	0,02
C22:6n3 DHA	0,07	0,08

(valori contrassegnati da lettere diverse differiscono significativamente tra loro per $p \leq 0,05$: test Tukey HSD)

L'inclusione di elevate quantità (1,8 kg/capo/giorno) di semi di lino estrusi nella razione delle bovine per migliorare le proprietà nutrizionali del latte prodotto non ha avuto alcuna influenza sulla produzione giornaliera di latte che, per entrambi i gruppi sperimentali, si è attestata su valori del tutto analoghi. Questo rilievo è in linea con quanto osservato da altri autori nel corso di ricerche che avevano l'obiettivo di studiare gli effetti derivanti dalla somministrazione di semi di oleaginose o oli a vacche da latte. L'inclusione di una maggiore quota di lipidi nelle razioni ne eleva il contenuto in energia e questo dovrebbe riflettersi positivamente sulla risposta produttiva delle bovine; questo fenomeno, tuttavia, si osserva generalmente quando gli animali siano in condizione di deficit energetico, che tipicamente caratterizza le prime fasi della lattazione. Nel caso della presente ricerca le vacche si trovavano in fase avanzata di lattazione e quindi in condizione di bilancio energetico positivo; ciò potrebbe giustificare, in analogia con quanto reperito in bibliografia, le mancate risposte produttive che peraltro non erano attese considerato anche il breve periodo sperimentale.

Per quanto riguarda il tenore lipidico del latte, è ben noto dalla letteratura come la presenza di alti livelli di acidi grassi polinsaturi nella dieta delle bovine possa determinare un significativo calo di

questo parametro (Shingfield et al., 2006), benché tale effetto non venga sempre osservato. Nel corso della presente prova, il supplemento a base di semi di lino estruso ha influenzato negativamente il tenore lipidico del latte. Anche il tenore proteico è risultato più basso nel gruppo "Lino", anche se le differenze rispetto al gruppo di controllo non sono risultate significativamente rilevanti. In parte questo risultato può essere collegato al ruolo negativo che i lipidi esercitano sullo sviluppo della micro popolazione ruminale, che rappresenta una delle principali fonti di amminoacidi da cui la bovina attinge per la sintesi di proteine vere del latte.

Come era prevedibile, la somministrazione di un elevato quantitativo di semi di lino estruso ha profondamente modificato la composizione in acidi grassi dei lipidi del latte.

Per quanto riguarda gli acidi grassi Omega3, il contenuto di ALA nel latte degli animali riceventi i semi di lino è più che raddoppiato, passando dallo 0,4% del gruppo di controllo allo 0,85%. Al contrario, le concentrazioni di EPA e DHA non sono state aumentate dal trattamento. Questi dati confermano dunque come l'impiego di fonti vegetali di acidi grassi Omega3 determini un consistente aumento dei livelli di ALA del latte, come già osservato da altri autori, ma non rappresenti una strategia efficace per aumentarne il tenore in EPA e DHA.

Le concentrazioni di CLA e acido vaccenico nel latte degli animali riceventi il seme di lino sono risultate significativamente più alte rispetto al gruppo di controllo. In particolare, l'acido vaccenico è stato più che raddoppiato dal trattamento, mentre la concentrazione complessiva dei due principali isomeri del CLA si è avvicinata all'1%. Questo studio conferma dunque come l'ALA rappresenti un substrato ideale per la sintesi di acido vaccenico e CLA da parte della microflora ruminale. Il seme di lino estruso da noi impiegato ha determinato una riduzione del tenore lipidico del latte, confermando come il fenomeno della cosiddetta *milk fat depression* sia spesso associato all'impiego di alimenti ricchi di acidi grassi polinsaturi.

Conclusioni

Il presente studio ha evidenziato come l'impiego di un elevato quantitativo di semi di lino estruso modifichi profondamente la frazione lipidica del latte vaccino.

In particolare, ad una riduzione del tenore lipidico, corrisponde un importante miglioramento dei lipidi stessi da un punto di vista nutrizionale, come dimostrano i livelli più elevati di acido alfa-linolenico, acido vaccenico e CLA.

RICERCA 2

Finalità della ricerca

Obiettivo della ricerca è stato quello di valutare gli effetti della somministrazione di una dieta arricchita con olio di lino microincapsulato in matrici lipidiche (Promilk), sul contenuto in acidi grassi Omega3 e CLA del latte.

La scelta dell'impiego di lino ruminoprotetto con acidi grassi a lunga catena ha avuto lo scopo di verificare la possibilità di arricchire il latte in Omega3 senza interferire negativamente con il microbiota ruminale.

Materiali e Metodi

La ricerca è stata realizzata presso l'azienda sperimentale della Facoltà di Medicina Veterinaria (AUB) sita nel comune di Ozzano Emilia (BO), e presso le strutture del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie.

Nella prova sperimentale sono state utilizzate 60 bovine di razza Frisona Italiana alimentate con le razioni in Tabella 9. Le razioni sono state somministrate sotto forma di piatto unico, in particolare la dieta di controllo non apportava quantità significative di acidi grassi Omega3, mentre la fonte di Omega3 del periodo di trattamento era rappresentata da Promilk®, un prodotto commerciale della ditta Vetagro S.p.A. e costituito da olio di lino microincapsulato in matrici lipidiche, la cui composizione in acidi grassi è riportata in Tabella 12.

Lo schema sperimentale ha previsto la valutazione delle caratteristiche compositive del latte prodotto in diversi periodi nei quali era somministrato o meno il supplemento oggetto di studio.

Il disegno sperimentale è stato così articolato in cinque fasi:

- Fase 1 di adattamento (Controllo 1): della durata di 4 settimane, durante il quale gli animali sono stati alimentati con la razione di base;
- Fase 2 sperimentale (Promilk 1): della durata di 4 settimane, durante il quale gli animali sono stati alimentati con la razione di base a cui sono stati aggiunti 350g/capo/giorno di Promilk (pari a 122g/capo giorno di olio di lino);
- Fase 3 di post trattamento (Controllo 2): della durata di 4 settimane, durante il quale gli animali sono stati alimentati con la razione di base;

- Fase 4 sperimentale (Promilk 2) : della durata di 4 settimane, durante il quale gli animali sono stati alimentati con la razione di base a cui sono stati aggiunti 350g/capo/giorni di Promilk (pari a 122g/capo giorno di olio di lino);
- Fase 5 post trattamento (Controllo 3): della durata di 4 settimane, durante il quale gli animali sono stati alimentati con la razione di base.

Le diete sono state messe a disposizione degli animali costantemente ad libitum ed i consumi giornalieri sono stati ottenuti dalla differenza fra le quantità di unifeed distribuito e le rimanenze quotidiane.

Tabella 9. Razioni alimentari delle diverse fasi sperimentali (Kg/capo/giorno).

Ingrediente	Controllo 1	Promilk 1	Controllo 2	Promilk 2	Controllo 3
Fieno	12,0	12,0	12,0	12,0	12,0
Mais farina	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5
Soia farina	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Soia buccette	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Integratore	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Soia by-pass	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Melasso	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Promilk	-	0,35	-	0,35	-

Tabella 10. Principali caratteristiche delle diete somministrate nelle fasi sperimentali.

Parametro	Controllo 1	Promilk 1	Controllo 2	Promilk 2	Controllo 3
Sostanza secca consumata, kg/capo/giorno	25,8	26,0	25,9	26,2	26,5
Foraggi, % della s.s.	48	47,3	48	47,3	48
Concentrati, % della s.s.	52	52,7	52	52	52
Proteina greggia, %s.s.	15,12	15,05	15,21	14,95	15,08
NDF,% s.s.	35,72	35,72	36,39	36,39	33,78
ADF,% s.s.	23,05	23,05	23,42	23,42	20,44
ADL,% s.s.	3,99	3,99	3,45	3,45	3,67
Amido, % s.s.	22,64	22,64	23,21	23,21	23,71
EE, % s.s.	3,17	4,03	2,92	3,99	2,95

Tabella 11. Principali caratteristiche lipidiche delle diete somministrate nelle fasi sperimentali.

Parametro	Controllo 1	Promilk 1	Controllo 2	Promilk 2	Controllo 3
C18:1, apporto in g/giorno	93,82	115,50	85,04	106,73	88,30
C18:2, apporto in g/giorno	317,20	344,69	279,98	307,47	301,48
C18:3, apporto in g/giorno	83,80	137,87	78,16	132,23	76,82
C18:1,2,3, apporto in g/giorno	494,82	598,06	443,18	546,43	466,60
LID	853	1067	766	972	802

Tabella 12. Composizione del supplemento lipidico Promilk

Promilk (Olio di lino microincapsulato)	
Grassi grezzi, % s.t.q.	95,0
Ceneri grezze, % s.t.q.	4,0
Proteine grezze, % s.t.q.	0,1
Fibra grezza, % s.t.q.	0,3
Vitamina E, % s.t.q.	0,5

Rilievi sperimentali

Alimenti: settimanalmente si è proceduto alla raccolta di un campione di unifeed al momento dello scarico per effettuare le analisi i cui risultati sono riportati in Tabella 10 e 11.

Latte: i dati relativi alla quantità di latte prodotto per singolo capo sono stati rilevati automaticamente dall'impianto computerizzato di cui è dotata la sala mungitura (AFIFARM). Questi dati venivano rilevati quotidianamente in entrambe le mungiture giornaliere.

Nel corso della ricerca per due volte nelle due settimane finali di ogni fase sperimentale è stato prelevato il latte di massa ottenuto dal frigorifero che conteneva il latte munto la sera precedente e quello del mattino stesso. Un'aliquota è stata analizzata mediante Milk-O-Scan (Foss Electric, Hillerod, Denmark) per la determinazione di lipidi, (analisi effettuata su tutti i campioni prelevati), mentre l'altra è stata congelata e successivamente analizzata per la determinazione degli acidi grassi mediante gas-cromatografia con le metodiche già precedentemente descritte.

Analisi statistica

I risultati ottenuti mediante Milk-o-Scan e i dati relativi alla produzione giornaliera di latte sono stati sottoposti ad analisi statistica mediante ANOVA ad una via per misurazioni ripetute, con la dieta come effetto principale.

Le differenze sono state ritenute significative per valori di $P < 0,05$.

I risultati sono stati analizzati anche al fine di evidenziare la correlazione esistente tra la produzione di latte e i suoi principali componenti, nonché tra il tenore lipidico del latte e quello in alcuni acidi

grassi di particolare interesse. Per la realizzazione di tali analisi è stato impiegato il software Statistica v. 6.0 (StatSoft Italia S.r.l., Vigenza, Padova).

Risultati e discussioni

Nel corso della ricerca le vacche non hanno presentato problemi sanitari di rilievo e comunque tali da doverle escludere dalla sperimentazione.

I risultati relativi alla produzione giornaliera di latte e la quantità di grasso prodotto, sono riportati in Tabella 13.

I risultati relativi agli acidi grassi del latte ottenuti dagli animali nei vari periodi sperimentali sono illustrati in Tabella 14; sono rappresentate le concentrazioni degli acidi grassi più interessanti.

La produzione di latte e il tenore lipidico del latte non sono risultati correlati significativamente alle diverse fasi sperimentali, seppure si nota una generale flessione della % di grasso nelle fasi in cui si utilizzava il supplemento lipidico Promilk (Tabella 15).

Tabella 13. Produzione e caratteristiche qualitative del latte nelle diverse fasi sperimentali.

	Controllo 1		Promilk 1		Controllo 2		Promilk 2		Controllo 3	
	media	<i>dev.st</i>	media	<i>dev.st</i>	media	<i>dev.st</i>	media	<i>dev.st</i>	media	<i>dev.st</i>
Latte, kg/giorno	28,35	1,72	28,68	0,62	29,63	4,16	31,50	2,89	29,04	1,14
Grasso, %	3,82	0,31	3,76	0,09	3,78	0,04	3,68	0,10	3,79	0,02
Grasso, kg/capo/giorno	1,08	0,04	1,08	0,02	1,12	0,15	1,16	0,12	1,10	0,04

Tabella 14. Composizione in acidi grassi del latte (%/ tot AG) nelle diverse fasi sperimentali.

	Controllo 1		Promilk 1		Controllo 2		Promilk 2		Controllo 3	
	media	dev.st	media	dev.st	Media	dev.st	media	dev.st	media	dev.st
C18:3n3	0,39 ^b	0,02	0,79 ^a	0,13	0,52 ^b	0,08	0,81 ^a	0,12	0,55 ^b	0,04
CLA	0,55	0,19	0,53	0,11	0,51	0,10	0,51	0,10	0,52	0,05
C18:2 t10,c12	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01
C4:0	3,87	0,48	3,90	0,25	3,35	0,43	3,85	0,73	3,42	0,17
C6:0	2,68	0,26	2,77	0,13	2,34	0,35	2,55	0,26	2,37	0,17
C8:0	1,73	0,12	1,78	0,06	1,55	0,26	1,63	0,20	1,55	0,13
C10:0	4,02	0,20	3,91	0,17	3,73	0,64	3,92	0,41	3,70	0,24
C12:0	4,40	0,12	4,10	0,13	4,11	0,69	4,26	0,41	4,12	0,12
C14:0	12,93	0,62	12,01	0,21	11,75	1,35	12,33	0,48	12,09	0,32
C16:0	30,71	2,00	29,99	0,55	29,36	1,14	29,87	1,13	30,12	1,15
C16:1	1,53	0,32	1,44	0,26	1,82	0,44	1,39	0,16	1,70	0,25
C18:0	7,97 ^b	0,75	10,30 ^a	0,64	9,25 ^{ab}	0,66	9,64 ^a	0,33	9,01 ^{ab}	0,65
C18:1n9	18,62	1,31	19,19	0,51	20,68	2,34	18,68	1,62	19,71	1,69
C18:2n6	2,07 ^b	0,24	2,45 ^{ab}	0,13	2,09 ^b	0,26	2,64 ^a	0,20	2,42 ^{ab}	0,06
C20:5n3 EPA	0,05	0,03	0,05	0,04	0,05	0,02	0,06	0,01	0,08	0,04
C22:6n3 DHA	0,06	0,03	0,01	0,01	0,01	0,02	0,03	0,03	0,01	0,01

(valori contrassegnati da lettere diverse differiscono significativamente tra loro per $p \leq 0,05$: test Tukey HSD)

Come nella ricerca che aveva previsto l'impiego di seme di lino estruso, anche l'inclusione di olio di lino ruminoprotetto nella razione non ha influenzato la produzione giornaliera di latte che si è attestata su valori del tutto analoghi nelle diverse fasi sperimentali.

La somministrazione di 350 g/giorno di Promilk, pari a 122 g/giorno di olio di lino ha invece modificato la composizione in acidi grassi dei lipidi del latte.

Per quanto riguarda gli acidi grassi Omega3, il contenuto di ALA nel latte degli animali riceventi l'olio di lino è aumentato significativamente. Possiamo notare dai dati riportati in Tabella 14, come i contenuti di Omega3 passino da livelli medi dello 0,39% nella fase 1 di adattamento a valori più che raddoppiati nella fase 2 di sperimentazione (dieta con Promilk). Lo stesso andamento significativo lo verificiamo nelle due fasi successive, passando da valori dello 0,52% nella fase 3 ad addirittura valori dello 0,81% nella fase 4. Durante la fase 5, tornando a una dieta base senza supplementazione, i valori di Omega3 ritornano su valori pari allo 0,55%, in linea con le fasi 1 e 3.

Le concentrazioni di CLA, EPA e DHA non subiscono modificazioni apprezzabili nelle diverse fasi di ricerca mentre le concentrazioni relative all'acido stearico subiscono incrementi significativi nelle fasi di trattamento.

Anche l'utilizzo di olio di lino microincapsulato in matrici lipidiche da noi impiegato ha determinato una leggera flessione del tenore lipidico del latte che tuttavia non è apparso significativo. Questo

rilevo unitamente all'andamento delle concentrazioni in acido stearico sembrano dimostrare che la protezione dell'olio di lino del prodotto utilizzato non fosse del tutto completa; in effetti l'aumento di acido stearico nel latte può essere attribuita all'aumento della sua disponibilità a livello mammario in conseguenza dei processi di bioidrogenazione ruminale dell'acido linolenico.

Conclusioni

La ricerca ha evidenziato come l'impiego di 122 g/capo giorno di olio di lino incluso in lipidi saturi (350 g/capo/giorno Promilk) modifichi profondamente la frazione lipidica del latte con un importante incremento in acido alfa linolenico). In particolare questo aumento è di fatto molto simile a quello che si può ottenere con il supplemento di quantità di seme di lino estruso elevate, come dimostrato nella prova n° 1.

FASE 2: INCREMENTO DI OMEGA3 E CLA

Le ricerche svolte nella prima fase di sperimentazione hanno portato a interessanti risultati per quanto riguarda gli incrementi nella concentrazione di Omega 3 nel latte di animali alimentati con seme di lino estruso e con olio di lino ruminoprotetto. Nel caso dell'impiego di seme di lino estruso si è osservato anche un incremento della produzione di CLA che è l'espressione dei fenomeni di bioidrogenazione ruminale operata dai batteri a carico dei lipidi insaturi e, in questo caso, in modo particolare del linolenico. E' noto dalla letteratura che il principale substrato in grado di elevare il contenuto di CLA del latte è tuttavia rappresentato dall'acido linoleico, che è in gran misura contenuto nei semi di soia, colza, girasole e mais o negli olii da essi ottenuti. E' altresì noto dalla letteratura che la supplementazione di fonti altamente insature come l'olio di pesce, a diete che già prevedono l'impiego di alimenti ricchi di acido linoleico, incrementano ulteriormente la produzione di CLA, in quanto viene rallentata la fase finale del processo di bioidrogenazione che porta alla formazione di acido stearico; l'impiego di olio di pesce peraltro, può contribuire di per sé a elevare le concentrazioni di Omega3 del latte.

DESCRIZIONE DELLE RICERCHE

RICERCA 3

Finalità della ricerca

Obiettivo della ricerca n° 3 è stato quello di testare gli effetti dell'integrazione di due diversi livelli di olio di pesce microincapsulato in matrici lipidiche (Promega®) in diete che prevedevano l'uso di soia integrale estrusa, al fine di elevare le concentrazioni di CLA e Omega3 del latte.

Materiali e Metodi

La ricerca è stata realizzata presso l'azienda sperimentale della Facoltà di Medicina Veterinaria (AUB) sita nel comune di Ozzano Emilia (BO), e presso le strutture del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie.

Per lo svolgimento della ricerca sono state utilizzate 60 bovine di razza Frisona Italiana in lattazione, ripartite a formare 3 gruppi sperimentali omogenei, ciascuno costituito da 20 bovine: G1 , G2 e G3.

Il disegno sperimentale è stato così articolato:

- Periodo di adattamento: della durata di 4 settimane durante le quali tutti i gruppi sono stati alimentati con la razione di controllo contenente soia integrale estrusa; questa razione è stata utilizzata anche per alimentare il gruppo G1 nelle fasi successive della ricerca.

- Periodo sperimentale: della durata di 4 settimane durante le quali gli animali dei gruppi G2 e G3 hanno ricevuto in aggiunta alla dieta base rispettivamente: 125 e 250 g/capo/giorno di Promega, che apportava una quantità di 87,5 e 175 g/capo/giorno di olio di pesce.
- Periodo di post-trattamento: della durata di 4 settimane, durante le quali tutti i gruppi sono tornati ad assumere la razione utilizzata nel periodo di adattamento.

In Tabella 15 viene riportata la composizione delle razioni fornite sotto forma di piatto unico; la dieta è stata fornita ad libitum attraverso la tecnica del piatto unico, e i consumi giornalieri sono stati ottenuti dalla differenza fra le quantità di unifeed distribuito e le rimanenze quotidiane.

Tabella 15. Composizione della razione fornita sotto forma di piatto unico (Kg/capo/giorno) ai 3 gruppi sperimentali.

Ingredienti	G1	G2	G3
Fieno polifita	10,0	10,0	10,0
Polpe bietola	1,0	1,0	1,0
Soia Buccette	1,5	1,5	1,5
Soia farina	2,0	2,0	2,0
Soia estrusa	1,5	1,5	1,5
Integratore	0,6	0,6	0,6
Soia by-pass	1,0	1,0	1,0
Melasso	0,5	0,5	0,5
Sorgo Farina	9,0	9,0	9,0
Promega	-	0,125	0,250

In Tabella 16 sono riportate le principali caratteristiche del prodotto commerciale fornito dalla ditta Vetagro S.p.A., denominato Promega®.

Tabella 16. Composizione del supplemento lipidico Promega

Promega (Olio di pesce microincapsulato)	
DHA, % tot AG	6,5
EPA, % tot AG	2,1
Numero di Iodio, g I ₂ /Kg	65-75

Tabella 17. Composizione centesimale degli alimenti della razione.

Parametro		Paglia	Fieno	Farina di sorgo	Polpe di bietola	Bucchette di soia	Soia f.e. 48%	Soia estrusa
Sostanza Secca	% s.t.q..	97,07	97,35	88,93	94,05	91,35	92,24	92,51
Lipidi greggi	% s.s.	1,03	1,73	3,00	1,21	1,43	2,28	22,10
Ceneri %	% s.s.	16,19	9,31	1,11	4,16	6,18	6,24	5,07
NDF %	% s.s.	73,45	58,62	11,06	45,24	64,62	13,37	15,55
ADF %	% s.s.	55,36	40,03	3,81	28,86	51,26	7,89	12,11
ADF/NDF %	% s.s.	75,37	68,29	34,45	63,79	79,33	58,98	77,92
ADL %	% s.s.	7,34	6,08	1,12	16,92	1,97	1,14	3,17
Amido %	% s.s.	2,96	4,81	73,69	2,08	-	2,10	6,09
P.G. %	% s.s.	3,97	8,23	7,96	10,07	10,89	48,70	32,20
P.SOL %	% s.s.	1,47	2,42	1,83	1,68	2,54	8,42	14,83
NPN %	% s.s.	0,69	2,26	1,32	1,54	2,44	4,43	4,52
NDIP %	% s.s.	1,18	2,16	3,14	6,88	4,54	3,34	0,53
ADIP %	% s.s.	0,84	0,97	0,76	1,76	1,06	0,44	0,25

Tabella 18. Principali caratteristiche lipidiche delle diete somministrate ai tre gruppi sperimentali.

	G1	G2	G3
C18:1, apporto in g/giorno	122,15	123,34	123,37
C18:2, apporto in g/giorno	330,12	331,27	332,95
C18:3, apporto in g/giorno	89,51	121,65	146,64
C18:1,2,3, apporto in g/giorno	541,78	576,26	602,96
LID	912	999	1085

Tabella 19. Composizione acidica degli unifeed dei gruppi sperimentali (%/tot AG).

Acido grasso	G1	G2	G3
C6:0	0,01	0,00	0,00
C8:0	0,02	0,00	0,00
C10:0	0,02	0,01	0,00
C12:0	0,09	0,10	0,07
C14:0	0,29	0,84	0,96
C14:1	0,02	0,02	0,02
C16:0	15,32	20,38	21,45
C16:1	0,41	0,58	0,51
C18:0	0,00	3,83	4,23
C18:1 t11	3,57	0,00	0,00
C18:1n9	24,41	16,54	17,02
C18:1n7	0,76	1,37	1,25
C18:2n6	42,73	46,92	45,16
C20:0	0,00	0,00	0,00
C20:1	0,02	0,00	0,00
C18:3n3	8,54	4,28	3,12
C18:4n3	0,00	0,73	1,09
CLA	0,00	0,00	0,00
CLA2	0,00	0,00	0,00
C22:0	0,01	0,00	0,00
C22:1	0,01	0,00	0,00
ARA	0,57	0,00	0,00
C20:5n3EPA	0,02	0,11	0,80
C22:2	0,01	0,00	0,00
C22:4n6	0,05	0,00	0,00
C22:5n3DPA	0,04	0,04	0,06
C22:6n3DHA	0,04	0,29	0,38

Rilievi sperimentali

Alimenti: settimanalmente si è proceduto alla raccolta di un campione di unifeed dei tre gruppi sperimentali al momento dello scarico, per effettuarne le relative analisi.

Latte: i dati relativi alla quantità di latte prodotto per singolo capo sono stati rilevati automaticamente dall'impianto computerizzato di cui è dotata la sala mungitura (AFIFARM). Questi dati venivano rilevati quotidianamente in entrambe le mungiture giornaliere.

Nel corso della ricerca, per due volte nelle 2 ultime settimane di ciascun periodo sperimentale, è stato prelevato il latte di massa dei tre gruppi sperimentali ottenuto dai refrigeratori che contenevano il latte munto la sera precedente e quello del mattino stesso. Un'aliquota è stata analizzata mediante

Milk-O-Scan (Foss Electric, Hillerod, Denmark) per la determinazione di lipidi, (analisi effettuata su tutti i campioni prelevati), mentre l'altra è stata congelata e successivamente analizzata per la determinazione degli acidi grassi mediante gas-cromatografia.

Analisi statistica

I risultati ottenuti mediante Milk-o-Scan e i dati relativi alla produzione giornaliera di latte sono stati sottoposti ad analisi statistica mediante ANOVA ad una via per misurazioni ripetute, con la dieta come effetto principale. Le differenze sono state ritenute significative per valori di $P < 0,05$.

I risultati sono stati analizzati anche al fine di evidenziare la correlazione esistente tra la produzione di latte e i suoi principali componenti, nonché tra il tenore lipidico del latte e quello in alcuni acidi grassi di particolare interesse. Per la realizzazione di tali analisi è stato impiegato il software Statistica v. 6.0 (StatSoft Italia S.r.l., Vigenza, Padova).

Risultati e discussioni:

Nel corso della ricerca le vacche non hanno presentato problemi sanitari di rilievo e comunque tali da doverle escludere dai gruppi sperimentali.

Il consumo di alimenti non è stato influenzato né dai supplementi di Promega né dalle diverse fasi della sperimentazione e si è attestato su valori di 23,9, 24,0 e 24,2 chilogrammi di sostanza secca rispettivamente per i gruppi G1, G2 e G3.

I risultati relativi alla composizione degli alimenti utilizzati sono riportati in Tabella 17, i valori ottenuti sono in linea con le attese teoriche e le diete fornite con la tecnica del piatto unico, come appare dai risultati riportati in Tabella 18 e 19, corrispondono a quanto era stato previsto all'atto della formulazione delle razioni.

I risultati relativi alla produzione giornaliera di latte e la quantità di grasso prodotto, sono riportati in Tabella 20.

I risultati relativi agli acidi grassi del latte ottenuti dagli animali nei vari periodi sperimentali sono illustrati in Tabella 21; sono rappresentate le concentrazioni degli acidi grassi più interessanti.

La produzione di grasso in termini di percentuali e di grammi/giorno durante la fase sperimentale, è risultata significativamente diversa fra i gruppi in prova: si nota infatti una significativa flessione della produzione di grasso nei gruppo G2 e G3 rispetto al G1 (Tabella 20). Notiamo come invece l'inclusione di olio di pesce nella razione non ha avuto influenza sulla produzione giornaliera di latte, che si è attestata su valori del tutto analoghi.

Tabella 20. Produzione e grasso del latte nella fase sperimentale per i tre gruppi in prova.

	G1		G2		G3	
	media	dev.st	media	dev.st	media	dev.st
Latte, kg/giorno	29,00	0,20	28,48	0,10	29,75	0,54
Grasso, %	3,86 ^a	0,16	3,61 ^{ab}	0,10	3,45 ^b	0,09
Grasso, Kg/capo/giorno	1,12 ^a	0,10	1,03 ^b	0,03	1,02 ^b	0,03

(valori contrassegnati da lettere diverse differiscono significativamente tra loro per $p \leq 0,05$: test Tukey HSD)

Tabella 21. Composizione in acidi grassi del latte (%/ tot AG) nella fase sperimentale per i tre gruppi in prova.

	G1		G2		G3	
	media	dev.st	media	dev.st	media	dev.st
C18:3n3	0,46	0,02	0,52	0,03	0,51	0,05
CLA	0,58 ^b	0,06	0,75 ^a	0,05	0,85 ^a	0,12
C18:1t-11	1,60	0,32	1,85	0,33	2,21	0,62
C18:2 t10,c12	0,07	0,05	0,13	0,03	0,37	0,23
C14:0	11,99	0,76	11,69	0,80	11,14	1,17
C16:0	28,51	1,77	27,27	1,65	26,08	1,88
C18:0	8,87	1,00	9,38	0,75	10,13	1,59
C18:2	19,75	1,47	20,85	1,81	22,36	1,73

(valori contrassegnati da lettere diverse differiscono significativamente tra loro per $p \leq 0,05$: test Tukey HSD)

Dalla Tabella 21 si evince come la somministrazione di olio di pesce abbia notevolmente modificato la composizione in acidi grassi dei lipidi del latte. In modo particolare notiamo le differenze maggiori in termini di arricchimento in CLA: infatti i gruppi G2 e G3, che avevano ricevuto rispettivamente 125 e 250 g/giorno di Promega, risultano significativamente più alti in CLA rispetto al gruppo G1 (dieta base). Apprezzabili differenze tra i gruppi supplementati e il gruppo di controllo G1, si notano anche nelle concentrazioni di acido vaccenico, il C18:1 t-11, precursore appunto del CLA.

Per quanto riguarda gli acidi grassi Omega3, il contenuto di ALA nel latte degli animali riceventi olio di pesce è leggermente aumentato, anche se non in maniera significativa; infatti se il G1 presentava valori medi dello 0,46%, i gruppi G2 e G3 si attestano su valori dello 0,52 e 0,51% rispettivamente.

Conclusioni

La ricerca ha evidenziato come l'impiego di olio di pesce, ancorché ruminoprotetto, nelle razioni di bovine in lattazione modifichi la frazione lipidica del latte.

In particolare, si sono registrati significativi incrementi in CLA del latte sia a dosaggi di 87,5 che di 175 g/capo/giorno di olio di pesce, mentre trascurabili sono stati gli incrementi per quanto riguarda il contenuto nel latte di Omega3. L'impiego di olio di pesce protetto determina inoltre una notevole depressione dei titoli di grasso, soprattutto utilizzando ai dosaggi più elevati (175 g/capo/giorno).

RICERCA 4

Finalità della ricerca

Obiettivo della ricerca è quello di testare gli effetti dell'integrazione di olio di pesce microincapsulato in matrici lipidiche (Promega®) e lino estruso, su diete che prevedevano l'utilizzo di soia estrusa, al fine di elevare le concentrazioni di CLA e Omega3 del latte.

Materiali e Metodi

La ricerca è stata realizzata presso l'azienda sperimentale della Facoltà di Medicina Veterinaria (AUB), sita nel comune di Ozzano Emilia (BO), e presso le strutture del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie.

Nella prova sperimentale sono state utilizzate 60 bovine di razza Frisona Italiana alimentate con le razioni in Tabella 22. Le razioni sono state somministrate sotto forma di piatto unico, in particolare la dieta di controllo apportava basse quantità di acidi grassi Omega3 con della soia estrusa, mentre la fonte di Omega3 del periodo di trattamento era rappresentata da Promega, un prodotto commerciale della ditta Vetagro S.p.A. e costituito da olio di pesce microincapsulato in matrici lipidiche (Tabella 25), e lino estruso.

Il disegno sperimentale è stato così articolato in tre fasi:

- Fase 1 di adattamento: della durata di 4 settimane, durante il quale gli animali sono stati alimentati con la razione di base, che prevedeva soia estrusa in ragioni di 1,5 Kg/capo/giorno;
- Fase 2 sperimentale: della durata di 4 settimane, durante il quale gli animali sono stati alimentati con la razione di base a cui sono stati aggiunti 100g/capo/giorno di Promega (pari a 35g/capo giorno di olio di lino) e 400 g/capo/giorno di semi di lino estrusi;
- Fase 3 di post trattamento: della durata di 4 settimane, durante il quale gli animali sono stati alimentati nuovamente con la razione di base;

Le diete (Tabella 22) sono state messe a disposizione degli animali costantemente ad libitum ed i consumi giornalieri sono stati ottenuti dalla differenza fra le quantità di unifeed distribuito e le rimanenze quotidiane.

Tabella 22. Razioni alimentari delle diverse fasi sperimentali (Kg/capo/giorno).

Ingredienti	Fase 1	Fase 2	Fase 3
Fieno polifita	10,0	10,0	10,0
Polpe bietola	1,0	1,0	1,0
Soia buccette	1,5	1,5	1,5
Soia farina	2,0	2,0	2,0
Soia estrusa	1,5	1,5	1,5
Integratore	0,6	0,6	0,6
Soia by-pass	1,0	1,0	1,0
Melasso	0,5	0,5	0,5
Sorgo farina	9,0	9,0	9,0
Lino estruso	-	0,4	-
Promega	-	0,1	-

Tabella 23. Principali caratteristiche delle diete somministrate nelle fasi sperimentali.

Parametro	Fase 1	Fase 2	Fase 3
Sostanza secca consumata ,	87,5	87,5	87,5
Foraggi, % della s.s.	17,0	17,4	17,0
Concentrati, % della s.s.	32,58	32,43	33,69
NDF,% s.s.	20,96	20,86	21,68
ADF,% s.s.	3,12	3,17	3,23
ADL,% s.s.	22,99	22,57	23,77
Amido, % s.s.	3,94	4,77	4,07
EE, % s.s.	122,00	143,00	126,16

Tabella 24. Principali caratteristiche lipidiche delle diete somministrate nelle fasi sperimentali.

	Fase 1	Fase 2	Fase 3
C18:1, apporto in g/giorno	330,12	347,08	341,26
C18:2, apporto in g/giorno	89,63	198,73	92,04
C18:3, apporto in g/giorno	541,07	688,90	559,46
C18:1,2,3, apporto in g/giorno	960,82	1234,71	992,76
LID	912	999	1085

Tabella 25. Composizione del supplemento lipidico Promega

Promega (Olio di pesce microincapsulato)	
DHA, % tot AG	6,5
EPA, % tot AG	2,1
Numero di Iodio, g I ₂ /Kg	65-75

Rilievi sperimentali

Alimenti: settimanalmente si è proceduto alla raccolta di un campione di unifeed al momento dello scarico, per effettuarne le relative analisi (Tabella 23 e 24).

Latte: i dati relativi alla quantità di latte prodotto per singolo capo sono stati rilevati automaticamente dall'impianto computerizzato annesso alla sala mungitura (AFIFARM). Questi dati venivano rilevati quotidianamente in entrambe le mungiture giornaliere.

Nel corso della ricerca, per due volte nelle ultime due settimane di ciascun periodo, è stato prelevato il latte di massa ottenuto dal frigorifero che conteneva il latte munto la sera precedente e quello del mattino stesso. Un'aliquota è stata analizzata mediante Milk-O-Scan (Foss Electric, Hillerod, Denmark) per la determinazione di lipidi, (analisi effettuata su tutti i campioni prelevati), mentre l'altra è stata congelata e successivamente analizzata per la determinazione degli acidi grassi mediante gas-cromatografia.

Analisi statistica

I risultati ottenuti mediante Milk-o-Scan e i dati relativi alla produzione giornaliera di latte sono stati sottoposti ad analisi statistica mediante ANOVA ad una via per misurazioni ripetute, con la dieta come effetto principale. Le differenze sono state ritenute significative per valori di $P < 0,05$.

I risultati sono stati analizzati anche al fine di evidenziare la correlazione esistente tra la produzione di latte e i suoi principali componenti, nonché tra il tenore lipidico del latte e quello in alcuni acidi grassi di particolare interesse. Per la realizzazione di tali analisi è stato impiegato il software Statistica v. 6.0 (StatSoft Italia S.r.l., Vigenza, Padova).

Risultati e discussioni:

Nel corso della ricerca le vacche non hanno presentato problemi sanitari di rilievo e comunque tali da doverle escludere dalla sperimentazione.

I risultati relativi alla produzione giornaliera di latte e la quantità di grasso prodotto, sono riportati in Tabella 26.

I risultati relativi agli acidi grassi del latte ottenuti dagli animali nei vari periodi sperimentali sono illustrati in Tabella 27; sono rappresentate le concentrazioni degli acidi grassi più interessanti.

La produzione di latte e il tenore lipidico del latte non sono risultati correlati significativamente alle diverse fasi sperimentali, seppure si nota una generale flessione della % di grasso nella fase 2 di sperimentazione, (Tabella 26).

Tabella 26. Produzione e grasso del latte nelle diverse fasi sperimentali.

	Fase 1		Fase 2		Fase 3	
	media	dev.st	media	dev.st	media	dev.st
Latte, kg/giorno	35,06	1,13	35,00	1,56	36,19	1,84
Grasso, %	3,63	0,44	3,56	0,18	3,75	0,45
Grasso, Kg/capo/giorno	1,27	0,15	1,23	0,06	1,31	0,16

Tabella 27. Composizione in acidi grassi del latte (%/ tot AG) nelle diverse fasi sperimentali.

	Fase 1		Fase 2		Fase 3	
	media	dev.st	Media	dev.st	media	dev.st
C18:3n3	0,70	0,08	0,82	0,12	0,72	0,09
CLA	0,80	0,05	0,86	0,12	0,81	0,01
C18:2 t10,c12	0,11	0,04	0,08	0,10	0,08	0,07
EPA+DHA	0,05	0,02	0,06	0,01	0,07	0,06
C14:0	10,97	0,99	11,72	0,67	11,88	0,68
C16:0	25,13	1,33	24,70	1,79	24,52	1,32
C18:0	10,23	1,31	10,49	1,00	10,43	1,00
C18:1n9+ C18:1,t11	24,01	3,18	22,32	2,60	21,51	2,49

L'inclusione olio di pesce e lino estruso nella razione base non ha avuto influenza sulla produzione giornaliera di latte e si è attestata su valori del tutto analoghi.

La somministrazione di 100 g/capo/giorno di Promega, pari a 35 g/giorno di olio di pesce, in aggiunta a 1,5 Kg/giorno di semi di soia estrusa e 400 g/giorno semi di lino estrusi ha profondamente modificato la composizione in acidi grassi dei lipidi del latte.

Notiamo infatti dai dati rappresentati in Tabella 27, un incremento seppur non significativo sia di Omega3 (C18:3n3 ALA), sia di CLA, che si attestano rispettivamente nella Fase 2 di sperimentazione a livelli di 0,82% e 0,86 %, in linea con i risultati attesi; le concentrazioni di EPA e DHA non subiscono, invece, modificazioni apprezzabili.

Anche in questo caso si è osservata una riduzione del tenore lipidico del latte, confermando ancora come il fenomeno della *milk fat depression* sia associato all'impiego di alimenti ricchi di acidi grassi polinsaturi.

Conclusioni

La ricerca ha evidenziato come l'impiego di 35 g/capo giorno di olio di pesce (100 g/capo /giorno Promega), in associazione con 1,5 Kg/giorno di semi di soia estrusa e 400 g/giorno semi di lino estrusi, modifichi profondamente la frazione lipidica del latte.

In particolare, si registra un buon incremento in acidi Omega3 (soprattutto acido alfa linolenico) e CLA del latte, pur accompagnato da una leggera flessione dei titoli lipidici del latte.

RICERCA 5

Finalità della ricerca

Obiettivo della ricerca è quello di testare gli effetti dell'integrazione olio di pesce microincapsulato in matrici lipidiche (Promega®) e lino estruso, su diete che prevedevano l'utilizzo di soia estrusa, al fine di elevare le concentrazioni di CLA e Omega3 del latte.

Materiali e Metodi

La ricerca è stata realizzata presso l'azienda Sapori, sita nel comune di Sasso Marconi (BO), e presso le strutture del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie.

Nella prova sperimentale sono state utilizzate 70 bovine di razza Frisona Italiana alimentate con le razioni in Tabella 28. Le razioni sono state somministrate sotto forma di piatto unico, in particolare la dieta di controllo apportava basse quantità di acidi grassi Omega3 con della soia estrusa, mentre la fonte di Omega3 del periodo di trattamento era rappresentata da Promega®, un prodotto commerciale della ditta Vetagro S.p.A. e costituito da olio di pesce microincapsulato in matrici lipidiche (Tabella 31), e lino estruso.

Lo schema sperimentale ha previsto la valutazione delle caratteristiche compositive del latte prodotto in diversi periodi nei quali erano somministrati o meno i supplementi oggetto di studio.

Il disegno sperimentale è stato così articolato in cinque fasi:

- Fase 1 di adattamento: della durata di 4 settimane, durante il quale gli animali sono stati alimentati con la razione di base, che prevedeva soia estrusa in ragioni di 1 Kg/capo/giorno;
- Fase 2 sperimentale: della durata di 4 settimane, durante il quale gli animali sono stati alimentati con la razione di base a cui sono stati aggiunti 100g/capo/giorno di Promega (pari a 35g/capo giorno di olio di lino) e 400 g/capo/giorno di semi di lino estrusi;
- Fase 3 di post trattamento: della durata di 4 settimane, durante il quale gli animali sono stati alimentati nuovamente con la razione di base;

Le diete (Tabella 28) sono state messe a disposizione degli animali costantemente ad libitum ed i consumi giornalieri sono stati ottenuti dalla differenza fra le quantità di unifeed distribuito e le rimanenze quotidiane.

Tabella 28. Razioni alimentari fornite agli animali nelle diverse fasi sperimentali (Kg/capo/giorno).

Ingrediente	Fase 1	Fase 2	Fase 3
Silomais	24,0	24,0	24,0
Medica fieno	6,8	6,8	6,8
Mais farina	4,6	4,6	4,6
Orzo farina	2,2	2,2	2,2
Nucleo proteico	1,5	1,5	1,5
Soia farina estrazione (48%)	0,6	0,6	0,6
Soia integrale estrusa	1,0	1,0	1,0
Promega	-	0,1	-
Lino estruso	-	0,4	-

Tabella 29. Principali caratteristiche delle diete somministrate nelle fasi sperimentali.

Parametro	Fase 1	Fase 2	Fase 3
Sostanza secca consumata, Kg	21,5	22	21,7
Foraggi, % della s.s.	62,0	60,5	62,0
Concentrati, % della s.s.	38,0	39,5	38,0
Proteina grezza, % s.s.	16,12	16,05	16,18
NDF,% s.s.	33,5	33,4	33,7
ADF,% s.s.	23,27	23,12	23,4
ADL,% s.s.	4,13	4,17	4,01
Amido, % s.s.	30,02	29,4	29,87
EE, % s.s.	3,65	4,57	3,65

Tabella 30. Principali caratteristiche lipidiche delle diete somministrate nelle fasi sperimentali.

	Fase 1	Fase 2	Fase 3
C18:1, apporto in g/giorno	102,79	124,35	104,26
C18:2, apporto in g/giorno	288,53	305,82	292,65
C18:3, apporto in g/giorno	62,74	145,48	63,63
C18:1,2,3, apporto in g/giorno	454,06	575,65	460,54
LID	752	1029	762

Tabella 31. Composizione del supplemento lipidico Promega

Promega (Olio di pesce microincapsulato)	
DHA, %/ tot AG	6,5
EPA, %/ tot AG	2,1
Numero di Iodio, g I ₂ /Kg	65-75

Rilievi sperimentali

Alimenti: settimanalmente si è proceduto alla raccolta di un campione di unifeed al momento dello scarico, per effettuarne le relative analisi (Tabelle 29 e 30).

Latte: i dati relativi alla quantità di latte prodotto per singolo capo sono stati rilevati settimanalmente. Nel corso della ricerca, per due volte a settimana nelle due settimane finali di ciascun periodo sperimentale, è stato infatti prelevato il latte di massa ottenuto dal frigorifero che conteneva il latte munto la sera precedente e quello del mattino stesso. Un'aliquota è stata analizzata mediante Milk-O-Scan (Foss Electric, Hillerod, Denmark) per la determinazione di lipidi, (analisi effettuata su tutti i campioni prelevati), mentre l'altra è stata congelata e successivamente analizzata per la determinazione degli acidi grassi mediante gas-cromatografia.

Analisi statistica

I risultati ottenuti mediante Milk-o-Scan e i dati relativi alla produzione giornaliera di latte sono stati sottoposti ad analisi statistica mediante ANOVA ad una via per misurazioni ripetute, con la dieta come effetto principale. Le differenze sono state ritenute significative per valori di $P < 0,05$.

I risultati sono stati analizzati anche al fine di evidenziare la correlazione esistente tra la produzione di latte e i suoi principali componenti, nonché tra il tenore lipidico del latte e quello in alcuni acidi grassi di particolare interesse. Per la realizzazione di tali analisi è stato impiegato il software Statistica v. 6.0 (StatSoft Italia S.r.l., Vigenza, Padova).

Risultati e discussioni:

Nel corso della ricerca le vacche non hanno presentato problemi sanitari di rilievo e comunque tali da doverle escludere dalla sperimentazione.

I risultati relativi alla produzione giornaliera di latte e la quantità di grasso prodotto, sono riportati in Tabella 32.

I risultati relativi agli acidi grassi del latte ottenuti dagli animali nei vari periodi sperimentali sono illustrati in Tabella 33; sono rappresentate le concentrazioni degli acidi grassi più interessanti.

La produzione di latte e il tenore lipidico del latte non sono risultati influenzati significativamente nelle diverse fasi sperimentali, seppure si noti una generale flessione della percentuale di grasso nella fase 2 di sperimentazione, (Tabella 32).

Tabella 32. Produzione e grasso del latte nelle diverse fasi sperimentali.

	Fase 1		Fase 2		Fase 3	
	media	dev.st	media	dev.st	media	dev.st
Latte, kg/giorno	29,00	1,78	25,32	1,12	29,41	1,57
Grasso, %	4,12	0,12	3,87	0,13	4,26	0,12
Grasso, kg/capo/giorno	1,19	0,34	0,98	0,28	1,24	0,16

Tabella 33. Composizione in acidi grassi del latte (%/ tot AG) nelle diverse fasi sperimentali.

	Fase 1		Fase 2		Fase 3	
	media	dev.st	Media	dev.st	media	dev.st
C18:3n3	0,67	0,01	0,88	0,10	0,70	0,01
CLA	0,50 ^b	0,01	0,75 ^a	0,09	0,52 ^b	0,01
C18:2 t10,c12	0,18	0,10	0,16	0,08	0,01	0,00
EPA+DHA	0,06	0,02	0,09	0,00	0,07	0,02
C14:0	12,26	1,04	10,85	0,22	11,71	0,37
C16:0	32,59	1,42	28,71	1,31	29,01	0,47
C18:0	7,93	0,46	10,38	0,60	9,53	0,07
C18:1n9+ C18:1,t11	18,08	1,73	22,21	1,96	16,66	0,48

(valori contrassegnati da lettere diverse differiscono significativamente tra loro per $p \leq 0,05$: test Tukey HSD)

L'inclusione olio di pesce e lino estruso nella razione base non ha avuto influenza sulla produzione giornaliera di latte e si è attestata su valori del tutto analoghi.

La somministrazione di 100 g/giorno di Promega, pari a 35 g/giorno di olio di pesce, in aggiunta a 1 Kg/giorno di semi di soia estrusa e 400 g/giorno semi di lino estrusi ha profondamente modificato la composizione in acidi grassi dei lipidi del latte.

Notiamo in fatti dalla Tabella 33 un incremento significativo in termini di CLA nella Fase 2 di sperimentazione, comparata con le altre due fasi che prevedevano la somministrazione agli animali di una dieta base con soia estrusa. Si raggiungono infatti concentrazioni medie di CLA pari allo 0,75%, contro lo 0,50% della fase 1 di adattamento e lo 0,52% della fase post trattamento. Seppur non significativo, si registra comunque un incremento anche per quanto riguarda le concentrazioni di acidi grassi Omega3, mentre le concentrazioni di EPA e DHA non subiscono modificazioni apprezzabili nelle diverse fasi di ricerca.

Anche in questo caso l'utilizzo di olio di pesce microincapsulato in matrici lipidiche da noi impiegato ha determinato una riduzione del tenore lipidico del latte, confermando ancora come il fenomeno della cosiddetta *milk fat depression* sia spesso associato all'impiego di alimenti ricchi di acidi grassi polinsaturi.

Conclusioni

La ricerca ha evidenziato come l'impiego di 35g/capo giorno di olio di pesce (100 g/capo /giorno Promega), in associazione con 1 Kg/giorno di semi di soia estrusa e 400 g/giorno semi di lino estrusi, modifichi profondamente la frazione lipidica del latte.

In particolare, si registra un buon notevole incremento in CLA e in acidi Omega3 (soprattutto acido alfa linolenico), pur accompagnato da una leggera flessione dei titoli lipidici del latte.

FASE 3: INCREMENTO DI OMEGA3 E CLA SENZA PENALIZZARE I TITOLI DI GRASSO

Quando le razioni sono modificate per innalzare il contenuto di CLA e di Omega3 è frequente osservare una flessione dei titoli di grasso nel latte che portano a una situazione di penalizzazione economica del produttore o addirittura a una “non accettabilità” commerciale del latte che deve, soprattutto in determinate filiere produttive, mantenere una quantità di grasso superiori almeno ai 35-36 grammi per litro.

Le motivazioni per le quali l’arricchimento in CLA e Omega3 del latte può determinare una flessione dei titoli lipidici sono riassumibili nei seguenti punti:

- gli intermedi del processo di bioidrogenazione (isomeri dell’acido linoleico e oleico) e degli stessi Omega3 agiscono riducendo la captazione degli acidi grassi circolanti da parte della mammella (effetto principalmente attribuito agli AGPI) con ciò riducendo la disponibilità dei substrati utili alla sintesi dei trigliceridi;
- il *trans* - 10, *cis* - 12 in particolare, che viene sintetizzato da specifici batteri ruminanti in determinate condizioni (Palmonari et al. 2010), ma anche gli altri isomeri del C18:2 e del C18:1, riducono l’azione dell’enzima Acetil-CoA sintasi che in mammella controlla la formazione degli acidi grassi a corta e media catena a partire da acetato e butirato; in condizioni usuali questi rappresentano oltre il 50% degli acidi grassi secreti con il latte;
- la incompleta idrogenazione ruminale degli acidi grassi a 18 atomi di carbonio, largamente rappresentati nei vegetali di cui si alimentano i ruminanti, può determinare una relativa carenza di acido stearico per la mammella; ciò è vero soprattutto nelle fasi più avanzate della lattazione quando non vi è il contributo derivante dalla mobilitazione delle riserve lipidiche dell’organismo;
- gli isomeri degli acidi grassi insaturi, per la loro conformazione strutturale, tendono a “irrigidire” la membrana del globulo di grasso innalzandone il punto di fusione; ciò di fatto renderebbe impossibile la sintesi di grasso per un impedimento fisico;
- la fluidità della membrana è controllata dalla formazione ex novo di acido oleico a partire da acido stearico; questa trasformazione è operata dall’enzima stearoil - CoA desaturasi che, tuttavia, è contemporaneamente impegnato dagli isomeri del C18:2 presenti in quantità più elevate rispetto ad una usuale situazione nella quale la bio idrogenazione ruminale avviene in maniera più completa.

L'acido stearico, in definitiva, gioca un ruolo determinante per la formazione del grasso del latte da parte della mammella e potrebbe essere uno dei fattori limitanti quando si operi per arricchire il latte di CLA e Omega3; il fenomeno è stato ipotizzato da Looor e Herbein (2003), Chilliard et al. (2004) e ripreso da Looor e collaboratori (2005), ma non è mai stata condotta una ricerca che abbia indagato il problema in maniera specifica.

Obiettivo quindi di questa ricerca è stato quello di testare gli effetti dell'integrazione di due diversi livelli di stearina in diete arricchite con olio di pesce e olio di sola per elevare le concentrazioni di CLA nel latte senza deprimere i livelli di grasso.

DESCRIZIONE DELLA RICERCA

RICERCA 6

Finalità della ricerca

Obiettivo della ricerca è quello di testare gli effetti dell'integrazione di due diversi livelli di stearina in diete formulate arricchite con oli per elevare le concentrazioni di CLA nel latte.

In particolare la ricerca ha previsto l'uso di olio di pesce protetto in matrici lipidiche e olio di soia e, nei gruppi trattati, è stato impiegato un grasso inerte costituito prevalentemente da acido stearico e acido palmitico forniti prevalentemente sotto forma di monogliceridi per favorirne la digeribilità intestinale .

Materiali e metodi

La ricerca è stata realizzata presso la stalla sperimentale della Facoltà di Medicina Veterinaria sita nel comune di Ozzano dell'Emilia (BO), presso i laboratori di zootecnia del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie ed i laboratori del Dipartimento di Agronomia e Gestione dell'Agroecosistema della Facoltà di Agraria dell'Università di Pisa. La sperimentazione in stalla si è svolta nell'arco di tempo compreso fra il Marzo e il Maggio del 2012, per la durata di 10 settimane.

Per lo svolgimento della ricerca sono state utilizzate 30 bovine di razza Frisona Italiana in lattazione, ripartite a formare 3 gruppi sperimentali omogenei: CONTROLLO (10 soggetti), STEA 150 (10 soggetti), STEA 300 (10 soggetti); i dati relativi alle caratteristiche delle bovine presenti nei gruppi sperimentali sono riportati in Tabella 34.

Tabella 34. Caratteristiche dei gruppi sperimentali.

		STEA300	STEA150	CONTROLLO
Vacche	n.	10	10	10
Casi	n.	120	120	120
Latte	Kg/giorno	35,2	35,9	35,4
Grasso	%	3,38	3,21	3,33
Grasso	g/giorno	1187	1146	1176
Proteine	%	3,41	3,31	3,32
Lattosio	%	4,94	4,93	4,83
Caseina	%	2,70	2,64	2,57
Urea	mg/giorno	18,8	17,2	14,5
Cellule	n. x 1000	99	358	388
Peso	Kg	605	613	616
Ruminazione	Min./giorno	414	443	404
Riposo	Min./giorno	51	46	50

Il disegno sperimentale è stato così articolato:

- Periodo di adattamento: della durata di 2 settimane durante le quali tutti i gruppi sono stati alimentati con la razione di controllo (olio di pesce + olio di soia).
- Periodo sperimentale: della durata di 6 settimane durante le quali gli animali dei gruppi STEA 150 e STEA 300 hanno ricevuto in aggiunta alla dieta base 150 e 300 g/giorno rispettivamente di un supplemento lipidico costituito da stearina e palmitato.
- Periodo di post-trattamento: della durata di 2 settimane durante le quali tutti i gruppi sono tornati ad assumere la razione utilizzata nel periodo di adattamento.

In Tabella 35 viene riportata la composizione delle razioni fornite sotto forma di piatto unico.

Tabella 35. Composizione della razione fornita sotto forma di piatto unico (Kg/giorno).

Ingredienti	STEA 300	STEA 150	CONTROLLO
Fieno di graminacee	10,0	10,0	10,0
Sorgo + olio di soia (3%)	6,7	6,7	6,7
Fiocco di Mais	3,3	3,3	3,3
Soia f.e. (44% P.G.)	2,0	2,0	2,0
Aminoplus	1,0	1,0	1,0
Integratore	0,6	0,6	0,6
Mangime liquido	1,5	1,5	1,5
Olio di pesce protetto	0,1	0,1	0,1
Monogliceridi	0,30	0,15	0,00

A tutti gli animali è stato fornito olio di soia in ragione di 200 g/capo/giorno e olio di pesce protetto in ragione di 35g/capo/giorno (incapsulato con 65 grammi di lipidi inerti) per elevare il contenuto di CLA nel grasso del latte. Le dosi somministrate sono state scelte in funzione di esperienze precedenti per ottenere una quantità di CLA nel latte compresa fra 6 e 8 mg/g di acidi grassi totali.

L'olio di pesce utilizzato era apportato da Promega, olio di pesce parzialmente idrogenato ad alto contenuto di Omega3, microincapsulato con tecnologia spray-cooling brevettata; il contenuto di DHA del prodotto era del 6,5% degli acidi grassi totali, e quello di EPA era del 2,1%.

La dieta fornita ai gruppi STEA 150 e STEA 300 apportava rispettivamente 150 e 300 g/capo/giorno di un prodotto commerciale, denominato "MDT Stearine". L'integratore mineral-vitaminico (Panvit) utilizzato era composto da bicarbonato di sodio, carbonato di calcio, cloruro di sodio, solfato di calcio e farinaccio di frumento. Gli additivi nutrizionali apportati per kg erano: vitamina A 700000 U.I.; vitamina D3 50000 U.I.; vitamina E 1500 mg; zinco 3000 mg; manganese 3000 mg; rame 650 mg; iodio 70 mg; cobalto 25 mg; selenio 20 mg. La dieta è stata fornita ad libitum attraverso la tecnica del piatto unico; le bovine avevano inoltre libero accesso al fieno di graminacee (lo stesso impiegato nel carro miscelatore) lasciato a disposizione in greppia. I soggetti più produttivi disponevano anche di mangime somministrato attraverso gli autoalimentatori in funzione del livello produttivo e fino ad un massimo di 3 kg al giorno. La stima dei consumi giornalieri è stata ottenuta considerando il consumo di mangime in autoalimentatore e la differenza fra le quantità di alimenti distribuiti in greppia (piatto unico e fieno) e le rimanenze quotidiane.

Il piatto unico è stato preparato e scaricato in greppia giornalmente ed avvicinato alla mangiatoia ogni 6 ore; per assicurare che le bovine non rimanessero mai senza alimento la miscelata è stata preparata per garantire almeno il 5% di residui.

Rilievi sperimentali

Quotidianamente, oltre ai dati produttivi e qualitativi del latte (sistema Afifarm®), sono stati registrati automaticamente ed individualmente il peso vivo degli animali e i tempi di ruminazione (sistema RuminAct®) e di riposo (sistema Afifarm®); sono stati inoltre registrati tutti gli eventi sanitari occorsi durante il periodo sperimentale.

Alimentazione: un campione rappresentativo della razione del piatto unico è stato prelevato allo scarico e dopo 24 ore (residui) una volta alla settimana. Tutti i componenti della razione sono stati prelevati ed analizzati all'inizio della prova e all'arrivo di nuovi lotti.

Le analisi dei campioni sono state effettuate presso il laboratorio della sezione di zootecnia del Dipartimento Scienze Mediche Veterinarie della Facoltà di Medicina Veterinaria (Ozzano Emilia - Bologna). Le metodiche utilizzate sono riportate nel testo dell'AOAC (Association of Official

Analytical Chemists, Official Methods of Analysis) e adattate per rispondere ai parametri di sicurezza della Comunità Europea.

Latte: i dati relativi alla quantità e alla qualità del latte prodotto per singolo capo sono stati rilevati quotidianamente dall'impianto computerizzato presente in sala di mungitura tramite un dispositivo di riconoscimento individuale (sistema Afifarm® e Afilab®). La produzione è stata rilevata ogni giorno in entrambe le mungiture. Da ciascun animale sono stati inoltre effettuati dei campionamenti individuali di latte a: 7, 14, 28, 42, 56, e 70 giorni dall'inizio della prova, suddivisi poi in due aliquote. Un'aliquota è stata analizzata mediante Milk-O-Scan (Foss Electric Hillerod, Denmark) per la determinazione dei lipidi, proteine, lattosio, urea, caseina e cellule somatiche. Quest'aliquota di latte è stata consegnata all'APA di Bologna che ha effettuato le analisi presso i laboratori regionali dell'associazione allevatori. L'altra aliquota è stata congelata e successivamente analizzata per la determinazione degli acidi grassi mediante gas-cromatografia, presso il Dipartimento di Agronomia e Gestione dell'Agroecosistema della Facoltà di Agraria dell'Università di Pisa.

Analisi statistica

I dati relativi all'analisi quantitativa e qualitativa del latte sono stati sottoposti ad analisi statistica mediante ANOVA a misure ripetute utilizzando il pacchetto di analisi statistica "Statistica 9" della StatSoft Italia S.r.l. I dati individuali relativi alla produzione di latte, al peso vivo, e ai tempi di ruminazione e di riposo registrati giornalmente, sono stati analizzati mediante ANOVA a misure ripetute.

Per l'analisi statistica dei dati qualitativi del latte la valutazione statistica è stata effettuata mediante ANOVA a misure ripetute per i dati derivati dal periodo sperimentale e mediante ANOVA a una via per i dati rilevanti il periodo pre e post sperimentale.

Risultati e discussione

Nel corso della ricerca le vacche non hanno presentato problemi sanitari di rilievo e comunque tali da doverle escludere dai gruppi sperimentali.

I risultati relativi alla composizione degli alimenti utilizzati sono riportati in Tabella 36, i valori ottenuti sono in linea con le attese teoriche e le diete fornite con la tecnica del piatto unico, come appare dai risultati riportati in Tabella 37, corrispondono a quanto era stato previsto all'atto della formulazione delle razioni.

Tabella 36. Composizione centesimale degli alimenti utilizzati nel corso della ricerca (%S.S).

	Fieno		Sorgo + olio soia		Fiocco mais	Soia f.e.	Aminoplus	Mangime		Integratore
Campioni analizzati	6		3		1	1	1	3		1
	Media	<i>dev.st.</i>	media	<i>dev.st.</i>				media	<i>dev.st.</i>	
Sostanza secca	91,26	1,09	89,76	0,72	89,21	88,87	88,59	89,42	0,17	90,69
Ceneri grezze	9,43	1,09	1,45	0,72	1,22	6,96	7,36	8,74	0,17	87,83
Proteina grezza	9,99	1,15	10,59	0,01	9,18	45,43	50,58	22,43	0,11	-
ADIP	1,18	0,19	2,75	-	-	3,34	0,61	0,59	0,06	-
NDIP	2,94	0,03	3,42	0,02	-	4,36	-	2,30	0,04	-
Proteina Solubile	4,09	0,30	2,66	0,26	1,24	10,81	10,46	5,62	-	-
Lipidi grezzi	2,32	0,72	6,28	0,28	3,75	0,77	2,52	3,20	2,13	0,55
NDF	51,20	0,18	16,91	0,03	12,51	11,16	12,96	29,73	0,17	-
ADF	35,68	0,44	7,34	0,03	4,29	9,28	8,09	18,37	0,02	-
ADL	6,02	0,44	3,09	-	0,79	2,15	1,87	2,16	-	-
Amido	3,02	0,33	67,65	-	71,83	12,44	8,04	25,22	-	5,76
Calcio	1,24	2,27	0,05	3,80	0,06	0,29	0,58	0,91	2,58	16,02
Fosforo	0,28	2,11	0,22	0,91	0,13	0,55	0,59	0,39	3,43	0,04

Si deve in particolare annotare l'equivalenza fra gli apporti di principi alimentari nelle diverse razioni ad eccezione degli apporti lipidici che, come era logico attendersi, sono risultati più elevati nelle razioni fornite alle bovine del gruppo STE 150 e STEA 300.

In Tabella 38 sono riportati i risultati relativi al consumo di alimenti forniti con il piatto unico; si registrano differenze significative fra i diversi gruppi durante il periodo sperimentale; in generale si è osservato un calo dell'ingestione di alimento nel periodo sperimentale rispetto a quello di adattamento; la flessione dell'ingestione è stata più marcata nel periodo post sperimentale. Il consumo di fieno lungo in greppia e di mangimi in auto alimentatore si è attestato rispettivamente su valori medi rispettivamente di 1 e 2,2 Kg circa per capo giorno e non si sono invece potute rilevare differenze apprezzabili fra i gruppi.

La grassatura della razione nelle vacche da latte molto di frequente porta a una flessione dell'ingestione in sostanza secca (Gagliostro and Chilliard 1991, Allen 2000, Rabiee et al. 2012); sono stati supposti diversi fattori a spiegazione del fenomeno quali la maggiore densità energetica, l'interferenza negativa sulla digeribilità della fibra nel rumine, la regolazione del centro della fame, anche per la liberazione di messaggeri a livello intestinale e, infine, l'influenza negativa che talune fonti lipidiche (oli di pesce soprattutto) hanno nei confronti dell'appetibilità della razione. In questo caso tuttavia i consumi inferiori di alimento si sono registrati nel gruppo di controllo che non riceveva i supplementi di stearina; ciò starebbe a indicare che questo prodotto non sembra interferire negativamente con l'appetibilità delle razioni. La flessione dell'ingestione registrata nell'ultima fase del periodo di ricerca può invece essere attribuita, almeno in parte, all'aumento della temperatura ambientale registrata in quelle settimane.

In Tabella 39 sono riportati i dati relativi al peso delle bovine, al consumo in auto alimentatore, ai tempi di ruminazione e di riposo registrati. Il peso vivo medio delle bovine è aumentato in tutti i gruppi all'avanzare della ricerca; in particolare, si può osservare come le differenze registrate fra l'inizio e la fine della ricerca siano tali da ritenere che le bovine si trovavano in un buon stato di nutrizione e con un buon equilibrio energetico. Anche i dati relativi ai tempi medi di ruminazione e di riposo rientrano entro i valori considerati normali per animali caratterizzati da una condizione di generale benessere; le differenze osservate fra i gruppi sperimentali, per quanto degne di nota, non sembrano attribuibili ai diversi trattamenti alimentari e, in ogni caso, non sono al di fuori dei ranges di normalità.

Tabella 37. Composizione delle razioni fornite con il piatto unico (% S.S.)

	STEA 300		STEA 150		CONTROLLO	
	media	dev.st	media	dev.st	media	dev.st
S.S.	86,72	2,47	86,46	1,74	87,34	1,84
Ceneri	9,65	0,34	9,78	0,33	9,60	0,46
PG	15,24	0,65	15,26	0,87	15,23	0,51
ADIP	1,10	0,11	1,06	0,07	1,06	0,03
NDIP	2,18	0,38	2,22	0,33	2,10	0,13
PSOL	3,64	0,13	3,61	0,27	3,49	0,14
Lipidi grezzi	3,27	0,70	3,39	0,42	3,75	0,24
NDF	31,64	3,15	32,46	3,75	32,23	2,65
ADF	23,69	2,45	23,48	2,02	21,97	1,09
ADL	3,80	0,38	3,76	0,44	3,83	0,14
Amido	23,73	2,34	22,55	2,51	23,11	0,85
Calcio	0,92	0,09	1,00	0,07	1,03	0,10
Fosforo	0,40	0,02	0,40	0,03	0,38	0,02

Tabella 38. Ingestione di sostanza secca.

		STEA300	STEA150	CONTROLLO
<i>Periodo di adattamento</i>				
Casi	n.	12	12	12
Piatto unico	Kg/giorno	21.2	21.5	21.2
Autoalimentatore	Kg/giorno	2.4	2.3	2.2
<i>Periodo sperimentale</i>				
Casi	n.	42	42	42
Piatto unico	Kg/giorno	20.3 ^a	20.3 ^a	19.4 ^b
Autoalimentatore	Kg/giorno	2.4	2.2	2.1
<i>Periodo post trattamento</i>				
Casi	n.	14	14	14
Piatto unico	Kg/giorno	18,6 ^a	20,2 ^b	18,6 ^a
Autoalimentatore	Kg/giorno	2,3	2,3	2,2

(valori contrassegnati da lettere diverse differiscono significativamente tra loro per $p \leq 0,05$: test Tukey HSD)

Tabella 39. Risultati relativi a peso, tempi di ruminazione e di riposo.

		STEA300	STEA150	CONTROLLO
<i>Periodo di adattamento</i>				
Vacche	n.	10	10	10
Casi	n.	120	120	120
Peso	Kg	605	613	616
Ruminazione	Min	414	443	404
Riposo	Min	51	46	50
<i>Periodo sperimentale</i>				
Vacche	n.	10	10	10
Casi	n.	420	420	420
Peso	Kg	622	640	631
Ruminazione	Min	429	473	412
Riposo	Min	52	48	49
<i>Periodo post trattamento</i>				
Vacche	n.	10	10	10
Casi	n.	140	140	140
Peso	Kg	629	660	642
Ruminazione	Min	432	467	408
Riposo	Min	52	47	49

In Tabella 40 sono riportati i risultati produttivi ottenuti. L'integrazione lipidica della razione con monogliceridi di stearina e palmitato hanno indotto un leggero aumento della produzione di latte che tuttavia non è apparsa significativamente diversa fra i gruppi; gli aumenti sono stati di 0,4 kg/capo/giorno per STEA 300 vs il controllo e di 0,6 kg/capo/giorno per STEA 150 vs il controllo. Il miglioramento della produzione di latte in seguito alla grassatura delle razioni spesso accade a fronte di una diminuzione del consumo di alimenti e questo determina un miglioramento dell'efficienza alimentare. La stessa situazione è stata osservata nella nostra ricerca con il risultato che la quantità di latte prodotta per kg di sostanza secca assunta (considerati i soli consumi da piatto unico) è risultata pressoché identica nelle bovine che hanno ricevuto i supplementi lipidici (1,74 kg di latte/kg di sostanza secca per STEA 300, 1,76 kg di latte/kg di sostanza secca per STEA 150).

Tabella 40. Risultati produttivi: effetto delle diete per periodo.

		STEA300	STEA150	CONTROLLO
<i>Periodo di adattamento</i>				
Vacche	n.	10	10	10
Casi	n.	120	120	120
Latte	Kg/giorno	35,2	35,9	35,4
Grasso	%	3,38	3,21	3,33
Grasso	g/giorno	1187	1146	1176
Proteine	%	3,41	3,31	3,32
lattosio	%	4,94	4,93	4,83
caseina	%	2,70	2,64	2,57
urea	mg/giorno	18,8	17,2	14,5
cellule	n. x 1000	99	358	388
Acidi grassi tot	g/giorno	1107	1069	1097
<i>Periodo sperimentale</i>				
Vacche	n.	10	10	10
Casi	n.	420	420	420
Latte	Kg/giorno	35,4	35,6	35,0
Grasso	%	3,61	3,36	3,40
Grasso	g/giorno	1278	1191	1187
Proteine	%	3,39	3,28	3,30
lattosio	%	4,91	4,92	4,79
caseina	%	2,55	2,59	2,51
urea	mg/giorno	20,8	19,5	18,4
cellule	n. x 1000	369	253	1224
Acidi grassi tot	g/giorno	1192	1111	1108
<i>Periodo post trattamento</i>				
Vacche	n.	10	10	10
Casi	n.	140	140	140
Latte	Kg/giorno	34,7	35,3	33,6
Grasso	%	3,47	3,29	3,35
Grasso	g/giorno	1198	1150	1120
Proteine	%	3,29	3,20	3,21
lattosio	%	4,96	4,90	4,63
caseina	%	2,49	2,63	2,46
urea	mg/giorno	11,8	18,3	14,0
cellule	n. x 1000	148	190	659
Acidi grassi tot	g/giorno	1118	1073	1045

Il supplemento a livelli maggiori di monogliceridi ha aumentato seppure non significativamente i titoli lipidici del latte (Tabella 40); in particolare le bovine del gruppo STEA 300 hanno trasferito nel latte in media 90 g di grasso in più al giorno rispetto al controllo; le bovine del gruppo STEA 150 invece hanno prodotto una quantità giornaliera di grasso del tutto sovrapponibile a quella delle bovine di controllo. Le vacche del gruppo STEA 300 hanno mediamente prodotto nel periodo di supplemento 85 g di grasso in più al giorno rispetto al periodo sperimentale precedente e seguente l'integrazione con monogliceridi; le vacche appartenenti alla tesi STEA 150 invece hanno mediamente prodotto 43 g di acidi grassi in più al giorno rispetto al periodo sperimentale precedente e seguente i supplementi. Nella fase finale della ricerca i tutti i gruppi si è registrato un calo della quantità di grasso prodotto giornalmente con una flessione dei titoli percentuali che, per quanto non significativa, ha riguardato solo i gruppi STEA 150 (-0,07 punti percentuali) e STEA 300 (-0,14 punti percentuali).

Tabella 41. Stima della disponibilità mammaria di acido stearico e palmitico da supplemento.

		STEA 300	STEA 150
Ingestione di C18:0	g/giorno	192,0	96,4
Ingestione di C16:0	g/giorno	82,3	41,3
C18:0 assorbito	g/giorno	139,8	70,2
C16:0 assorbito	g/giorno	59,9	30,1
Disponibilità teorica di C18:0 per la mammella (captazione pari al	g/giorno	75,5	37,9
Disponibilità di C16:0 (captazione pari al 67% della quota	g/giorno	40,1	20,2

*(Enjalbert et al. 1998), si è considerata una digeribilità intestinale del 72.8% - CPM-Dairy- e per il C18:0 una perdita ulteriore del 10% per trasformazione a C18:1 a livello intestinale.

Il trasferimento di acidi grassi nel grasso del latte, in termini quantitativi per i gruppi trattati, rispetto al periodo pre sperimentale sono molto vicini; in particolare nel gruppo STEA 300, a fronte di una teorica disponibilità di 75,5 g di acido stearico vi è stato un trasferimento di 68,9 g (C18:0 + C18:1), corrispondente al 91,3% de valore teorico (Tabella 41). Nel gruppo STEA 150, a fronte di una teorica disponibilità di 37,9 g, vi è stato un trasferimento di 40,3 g (C18:0 + C18:1), che corrisponde al 106,5 % del valore teorico.

Tabella 42. Incrementi di acido stearico e oleico rispetto al periodo pre sperimentale, disponibilità teorica e tassi di trasferimento

	C18	C18:1	C18+C18:1	Disponibilità Teorica	% sul teorico
STEA 300	27,69	41,21	68,90	75,5	91,3
STEA 150	9,43	30,92	40,35	37,9	106,5

In Tabella 43, 44 e 45 sono riportati i risultati delle analisi gas cromatografiche effettuate sul latte.

Tabella 43. Composizione percentuale degli acidi grassi del latte osservati nel corso della ricerca (dati espressi in % sul totale degli acidi grassi).

	STEA 300					STEA 150					CONTROLLO				
	D-1	D13	D27	D41	D55	D-1	D13	D27	D41	D55	D-1	D13	D27	D41	D55
C4	3,05	2,77	2,77	2,42	2,52	2,95	2,42	2,48	2,72	2,60	2,82	2,72	2,48	2,52	2,87
C6	2,01	1,79	1,87	1,71	1,74	1,94	1,72	1,71	1,79	1,79	1,82	1,83	1,73	1,73	2,01
C8	1,40	1,21	1,29	1,21	1,22	1,33	1,24	1,20	1,21	1,25	1,21	1,26	1,22	1,21	1,39
C10	3,42	2,82	3,18	3,00	2,96	3,23	3,13	3,01	2,84	3,06	2,77	3,12	3,03	2,91	3,30
C10-1c9	0,35	0,30	0,31	0,29	0,30	0,30	0,29	0,28	0,29	0,32	0,30	0,32	0,29	0,29	0,31
C11	0,10	0,07	0,08	0,07	0,06	0,09	0,09	0,08	0,06	0,07	0,06	0,08	0,08	0,06	0,08
C12	4,12	3,38	3,88	3,70	3,59	3,84	3,85	3,70	3,38	3,74	3,27	3,85	3,74	3,54	3,95
C13iso	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04	0,03
C12-1c9	0,12	0,10	0,11	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,09	0,11	0,10	0,11	0,10	0,10	0,11
C13	0,15	0,12	0,13	0,12	0,11	0,14	0,13	0,14	0,11	0,12	0,11	0,14	0,13	0,11	0,13
C14iso	0,09	0,09	0,09	0,10	0,10	0,10	0,09	0,11	0,11	0,11	0,10	0,09	0,10	0,11	0,09
C14	12,78	11,68	12,58	12,27	12,25	11,89	12,19	12,33	11,57	12,28	11,44	12,48	12,31	12,13	12,39
C14-1t9	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
C15iso	0,22	0,21	0,21	0,22	0,21	0,22	0,19	0,23	0,22	0,20	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21
C14-1c9	1,30	0,93	1,13	1,09	1,11	1,05	1,07	1,19	1,06	1,23	0,86	1,17	1,10	1,12	1,12
C15ante	0,49	0,45	0,52	0,53	0,52	0,49	0,54	0,52	0,51	0,48	0,45	0,54	0,53	0,52	0,43
C15	1,28	1,08	1,19	1,16	1,06	1,16	1,19	1,27	1,09	1,07	1,02	1,22	1,16	1,07	1,14
C16iso	0,17	0,21	0,19	0,21	0,23	0,19	0,18	0,20	0,21	0,20	0,22	0,19	0,21	0,23	0,18
C16	27,43	28,71	29,81	30,40	28,94	28,08	29,29	29,07	28,00	28,29	28,70	29,85	30,05	28,82	28,95
C16-1t9	0,07	0,05	0,05	0,05	0,06	0,06	0,06	0,05	0,06	0,06	0,05	0,05	0,05	0,06	0,06
C16-1c7	0,17	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,17	0,17	0,16	0,17	0,16	0,16	0,16	0,16	0,15
C16-1c9+C17iso	1,63	1,61	1,77	1,75	1,66	1,62	1,68	1,72	1,52	1,57	1,61	1,81	1,75	1,69	1,86
C17ante	0,40	0,38	0,39	0,40	0,43	0,41	0,41	0,43	0,42	0,39	0,38	0,40	0,40	0,43	0,38
C17	0,56	0,53	0,54	0,55	0,52	0,55	0,55	0,61	0,56	0,52	0,52	0,55	0,55	0,52	0,52
C17-1c9	0,19	0,18	0,19	0,19	0,18	0,18	0,19	0,21	0,19	0,17	0,18	0,20	0,20	0,18	0,19

	STEAs 300					STEAs 150					CONTROLLI				
C18	8,33	9,95	9,08	9,66	9,79	9,36	9,08	9,32	10,46	8,82	10,15	8,96	9,86	9,92	8,71
C18-1t4	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
C18-1t5	0,07	0,09	0,07	0,08	0,04	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,09	0,07	0,08	0,05	0,07
C18-1t6-8	0,40	0,30	0,26	0,23	0,36	0,35	0,34	0,27	0,35	0,36	0,30	0,26	0,24	0,35	0,31
C18-1t9	0,32	0,25	0,22	0,21	0,26	0,28	0,26	0,25	0,26	0,29	0,25	0,23	0,22	0,26	0,26
C18-1t10	0,81	0,55	0,50	0,47	0,51	0,57	0,72	0,71	0,69	0,60	0,53	0,52	0,49	0,51	0,59
C18-1t11	1,35	1,21	1,00	1,06	1,28	1,33	1,18	1,03	1,29	1,25	1,20	0,97	1,06	1,28	1,17
C18-1t12	0,55	0,67	0,56	0,48	0,52	0,70	0,63	0,63	0,62	0,90	0,63	0,58	0,50	0,53	0,81
C18-1c9	17,97	20,12	18,29	18,63	19,22	18,86	18,78	18,99	19,91	19,23	20,57	18,36	18,50	19,38	18,25
C18-1t15+c11	0,77	0,72	0,72	0,68	0,69	0,78	0,78	0,74	0,72	0,76	0,70	0,73	0,69	0,68	0,73
C18-1c12	0,35	0,31	0,27	0,26	0,32	0,30	0,34	0,29	0,33	0,39	0,31	0,27	0,26	0,31	0,30
C18-1t16	0,35	0,31	0,30	0,29	0,32	0,34	0,32	0,29	0,32	0,35	0,31	0,30	0,29	0,32	0,32
C18-2t9t12	0,12	0,09	0,11	0,10	0,12	0,09	0,13	0,10	0,13	0,11	0,09	0,11	0,10	0,12	0,12
C18-2t11c15	0,06	0,05	0,04	0,05	0,04	0,05	0,06	0,05	0,06	0,05	0,05	0,04	0,04	0,04	0,05
C18-2c9-c12	2,71	2,33	2,27	2,31	2,47	2,67	2,47	2,44	2,49	2,81	2,28	2,32	2,30	2,46	2,30
C20	0,22	0,29	0,26	0,28	0,28	0,25	0,26	0,27	0,29	0,23	0,29	0,26	0,28	0,28	0,23
C18-3n3	0,39	0,37	0,35	0,36	0,41	0,41	0,38	0,39	0,43	0,40	0,37	0,36	0,36	0,41	0,35
C20-1c8	0,20	0,28	0,24	0,22	0,23	0,21	0,24	0,27	0,24	0,24	0,28	0,25	0,23	0,23	0,23
C18-2c9-t11	0,75	0,66	0,54	0,57	0,70	0,69	0,67	0,53	0,69	0,71	0,67	0,53	0,56	0,70	0,62
C21	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
C20-2n6	0,03	0,02	0,02	0,03	0,02	0,03	0,03	0,03	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
C20-3n6	0,12	0,11	0,10	0,10	0,11	0,12	0,11	0,11	0,12	0,11	0,11	0,11	0,10	0,12	0,10
C20-4n6	0,24	0,17	0,27	0,28	0,29	0,29	0,29	0,27	0,28	0,22	0,16	0,27	0,28	0,29	0,18
C20-5n3	0,04	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04	0,02	0,04	0,03	0,05	0,03	0,03	0,03	0,03	0,06
C22-4n6	0,02	0,02	0,02	0,03	0,04	0,03	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,03	0,04	0,02
C24	0,03	0,05	0,03	0,03	0,02	0,03	0,04	0,03	0,02	0,04	0,05	0,03	0,03	0,03	0,04
C22-5n6	0,04	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01

	STEA 300					STEA 150					CONTROLLO				
C22-5n3	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	0,06	0,07	0,06	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,07
C22-6n3	0,02	0,02	0,03	0,03	0,03	0,02	0,02	0,04	0,03	0,03	0,02	0,03	0,03	0,03	0,04
SFA	66,35	65,81	68,18	68,09	66,62	66,32	66,67	66,80	65,67	65,34	65,59	67,87	68,16	66,46	67,08
UFA	31,60	32,07	30,03	30,27	31,64	31,81	31,55	31,41	32,58	32,70	32,29	30,29	30,20	31,80	30,92
PUFA	4,60	3,93	3,85	3,94	4,32	4,52	4,28	4,10	4,38	4,60	3,87	3,92	3,93	4,32	3,93
MUFA	27,00	28,14	26,18	26,33	27,31	27,30	27,26	27,31	28,20	28,09	28,41	26,38	26,28	27,49	26,99
PUFA n6	4,15	3,71	3,61	3,57	3,88	4,22	4,00	3,88	4,01	4,57	3,61	3,70	3,60	3,87	3,84
PUFA n3	0,57	0,52	0,50	0,52	0,56	0,58	0,56	0,58	0,60	0,59	0,52	0,52	0,52	0,57	0,56

Tabella 44. Composizione in acidi grassi del latte osservato nel corso della ricerca (dati espressi grammi/giorno).

	STEA 300					STEA 150					CONTROLLO				
	D-1	D13	D27	D41	D55	D-1	D13	D27	D41	D55	D-1	D13	D27	D41	D55
C4	32,80	31,55	33,87	30,12	27,26	33,08	26,66	27,58	27,77	26,44	30,15	27,21	22,95	24,91	28,91
C6	21,63	21,04	22,48	19,44	19,21	21,38	18,42	19,12	18,87	18,23	20,19	19,17	17,73	17,51	20,30
C8	15,05	14,31	15,46	12,93	13,48	14,53	12,87	13,50	13,26	12,88	13,84	13,46	13,36	12,56	14,03
C10	36,88	33,26	37,51	29,50	32,74	34,91	31,58	33,97	32,61	32,52	33,47	33,52	36,32	31,98	33,69
C10-1c9	3,74	3,63	3,93	3,17	3,63	2,95	2,98	3,20	3,00	3,11	3,10	3,17	3,23	3,00	3,25
C11	1,12	0,73	0,91	0,61	0,75	0,93	0,82	0,93	0,77	0,97	0,73	0,77	0,95	0,79	0,79
C12	44,51	39,35	45,54	34,47	39,48	40,71	37,66	41,79	39,23	40,29	39,84	41,18	47,14	40,08	40,58
C13iso	0,35	0,36	0,39	0,36	0,31	0,32	0,34	0,35	0,35	0,34	0,37	0,33	0,35	0,37	0,31
C12-1c9	1,30	1,19	1,32	0,92	1,24	0,96	0,97	1,13	1,00	1,11	1,02	1,14	1,31	1,12	1,14
C13	1,62	1,24	1,53	1,16	1,25	1,45	1,29	1,56	1,36	1,59	1,24	1,24	1,58	1,33	1,31
C14iso	0,93	1,00	1,13	1,08	0,98	1,05	0,98	1,21	1,18	0,99	1,10	0,97	1,08	0,93	0,89
C14	137,35	132,06	147,52	119,17	128,89	125,18	126,36	136,71	128,46	129,67	128,25	126,97	142,96	129,38	127,94
C14-1t9	0,18	0,13	0,15	0,12	0,14	0,10	0,12	0,13	0,11	0,14	0,11	0,13	0,14	0,13	0,11
C15iso	2,39	2,33	2,63	2,25	1,78	2,36	2,00	2,55	2,33	2,13	2,27	1,92	2,42	2,14	2,12

	STE A 300					STE A 150					CONTROLLO				
C14-1c9	13,99	10,06	14,53	11,40	14,04	9,78	10,69	12,89	10,97	12,97	11,05	10,65	12,82	11,44	11,72
C15ante	5,16	4,91	5,85	5,13	4,69	5,20	5,34	5,73	5,25	4,81	4,90	5,32	5,89	5,63	4,44
C15	13,72	11,46	13,71	10,97	10,86	11,87	11,78	13,78	11,99	12,88	11,37	10,90	13,67	12,32	11,77
C16iso	1,82	2,32	2,24	2,09	1,99	2,01	1,92	2,22	2,29	2,04	2,23	2,04	2,31	2,19	1,87
C16	295,28	327,79	352,92	294,00	296,14	275,49	298,02	316,37	295,18	286,17	308,65	315,37	353,52	304,18	300,71
C16-1t9	0,75	0,61	0,55	0,66	0,64	0,66	0,65	0,56	0,63	0,61	0,67	0,62	0,59	0,61	0,63
C16-1c7	1,78	1,72	1,77	1,78	1,66	1,68	1,70	1,79	1,67	1,75	1,80	1,70	1,78	1,73	1,55
C16-1c9+C17iso	17,54	18,12	19,91	16,85	17,96	15,81	16,31	18,45	15,91	17,63	18,34	18,18	21,67	18,67	19,35
C17ante	4,21	4,15	4,64	4,26	3,72	4,40	4,16	4,69	4,53	4,23	4,10	3,87	4,46	4,61	3,87
C17	5,93	5,83	6,64	6,14	5,08	5,79	5,57	6,52	5,91	5,65	5,62	5,00	6,14	5,74	5,44
C17-1c9	2,01	1,99	2,14	1,82	1,84	1,83	1,82	2,21	1,95	2,00	1,90	1,90	2,27	2,10	1,98
C18	89,50	112,91	109,49	120,00	80,88	100,34	100,20	100,56	108,42	90,05	105,08	88,87	95,08	99,09	89,51
C18-1t4	0,27	0,23	0,16	0,19	0,22	0,24	0,21	0,19	0,21	0,24	0,27	0,22	0,18	0,22	0,18
C18-1t5	0,71	1,00	0,84	1,07	0,70	0,87	0,68	0,84	0,75	0,84	0,73	0,69	0,55	0,32	0,72
C18-1t6-8	4,33	3,34	2,74	3,30	4,19	3,66	3,63	2,81	3,54	3,63	3,64	3,42	2,69	3,89	3,26
C18-1t9	3,40	2,83	2,55	2,58	3,34	2,88	2,74	2,69	2,67	7,17	3,00	2,54	2,41	2,75	2,79
C18-1t10	8,63	5,84	5,25	5,54	8,81	5,91	6,92	7,05	6,86	5,97	5,69	5,38	5,43	5,82	6,23
C18-1t11	14,56	13,47	11,57	13,93	12,38	13,66	12,90	11,37	13,04	12,77	14,49	12,49	11,43	13,09	12,24
C18-1t12	5,97	6,78	6,89	7,20	8,33	8,98	6,63	6,75	6,31	9,14	8,33	6,03	4,35	4,94	8,56
C18-1c9	192,04	229,27	222,30	233,69	188,98	193,10	201,53	206,66	204,27	198,37	201,46	180,08	189,37	198,15	188,58
C18-1t15+c11	8,31	7,85	7,64	7,98	7,55	8,40	8,09	7,99	7,69	8,50	7,88	7,51	7,72	7,77	7,65
C18-1c12	3,72	3,60	2,94	3,31	4,70	3,40	3,69	3,18	3,25	3,94	3,04	3,22	2,66	3,33	3,20
C18-1t16	3,72	3,45	3,25	3,36	3,35	3,64	3,40	3,15	3,36	3,83	3,58	3,42	3,16	3,30	3,37
C18-2t9t12	1,29	1,04	1,06	1,33	1,30	0,97	1,24	1,07	1,40	1,19	1,00	1,34	0,98	1,45	1,30
C18-2t11c15	0,64	0,60	0,47	0,61	0,53	0,48	0,63	0,53	0,57	0,59	0,53	0,49	0,48	0,47	0,49
C18-2c9-c12	29,27	25,85	25,66	25,62	29,44	29,02	26,37	26,70	27,12	29,82	27,26	24,32	25,18	26,72	24,07
C20	2,41	3,27	3,21	3,37	2,19	2,48	2,82	2,95	3,00	2,37	2,80	2,53	2,75	2,81	2,37

	STEA 300					STEA 150					CONTROLLO				
C18-3n3	4,21	4,10	4,01	4,31	4,04	4,36	4,18	4,19	4,56	4,31	4,24	3,72	3,77	4,41	3,69
C20-1c8	2,17	3,20	3,33	2,91	2,56	1,83	2,60	2,87	2,39	2,33	2,47	2,13	2,34	2,32	2,39
C18-2c9-t11	8,09	7,57	5,89	7,62	7,22	6,80	7,19	5,98	6,93	7,13	6,87	7,01	6,04	7,31	6,53
C21	0,22	0,19	0,21	0,19	0,18	0,16	0,22	0,22	0,25	0,18	0,22	0,20	0,27	0,25	0,19
C20-2n6	0,30	0,27	0,30	0,22	0,25	0,31	0,29	0,29	0,22	0,30	0,26	0,24	0,29	0,23	0,24
C20-3n6	1,27	1,19	1,19	1,07	1,14	1,23	1,12	1,23	1,20	1,15	1,30	1,11	1,15	1,30	1,02
C20-4n6	2,54	1,57	3,12	2,97	2,60	3,01	2,97	2,98	2,96	1,89	3,28	2,92	3,06	3,07	1,84
C20-5n3	0,43	0,26	0,46	0,24	0,51	0,38	0,23	0,46	0,28	0,61	0,41	0,21	0,42	0,27	0,57
C22-4n6	0,27	0,17	0,19	0,38	0,26	0,23	0,21	0,25	0,38	0,26	0,24	0,38	0,23	0,44	0,22
C24	0,29	0,63	0,42	0,25	0,32	0,31	0,51	0,33	0,26	0,34	0,35	0,27	0,44	0,24	0,38
C22-5n6	0,38	0,09	0,14	0,08	0,09	0,24	0,12	0,09	0,09	0,09	0,12	0,10	0,13	0,11	0,07
C22-5n3	0,61	0,58	0,61	0,58	0,53	0,62	0,65	0,69	0,62	0,60	0,62	0,61	0,59	0,64	0,68
C22-6n3	0,25	0,25	0,34	0,33	0,34	0,22	0,26	0,43	0,36	0,32	0,20	0,25	0,33	0,33	0,35
PUFA n6	44,70	40,30	41,19	41,97	47,86	47,09	42,35	42,26	42,71	47,50	44,56	39,42	37,76	41,34	40,27
PUFA n3	6,15	5,80	5,89	6,07	5,94	6,06	5,95	6,30	6,39	6,42	6,01	5,27	5,58	6,13	5,76

Tabella 45. Composizione in acidi grassi del latte osservata nel periodo sperimentale (dati espressi in grammi al giorno).

	STEA300	STEA150	CONTROLLO
C4	31,85 ^a	27,34 ^{ab}	25,02 ^b
C6	20,99	18,80	18,14
C8	14,23	13,21	13,13
C10	33,43	32,72	33,94
C10-1c9	3,58	3,06	3,14
C11	0,75	0,84	0,84
C12	39,79	39,56	42,80
C13iso	0,37	0,34	0,35

	STEA300	STEA150	CONTROLLO
C12-1c9	1,15	1,03	1,19
C13	1,31	1,40	1,39
C14iso	1,07	1,12	0,99
C14	132,92	130,51	133,10
C14-1t9	0,13	0,12	0,13
C15iso	2,40	2,29	2,16
C14-1c9	11,99	11,51	11,63
C15ante	5,30	5,44	5,61
C15	12,05	12,52	12,30
C16iso	2,22	2,14	2,18
C16	324,90	303,19	324,36
C16-1t9	0,61	0,61	0,61
C16-1c7	1,76	1,72	1,74
C16-1c9+C17iso	18,29	16,89	19,51
C17ante	4,35	4,46	4,31
C17	6,20	6,00	5,63
C17-1c9	1,98	1,99	2,09
C18	114,13 ^a	103,06 ^{ab}	94,35 ^b
C18-1t4	0,19	0,20	0,20
C18-1t5	0,97	0,76	0,52
C18-1t6-8	3,13	3,33	3,33
C18-1t9	2,65	2,70	2,56
C18-1t10	5,55	6,94	5,54
C18-1t11	12,99	12,43	12,34
C18-1t12	6,96	6,57	5,10
C18-1c9	228,42 ^a	204,15 ^{ab}	189,20 ^b
C18-1t15+c11	7,85	7,92	7,67

	STEA300	STEA150	CONTROLLO
C18-1c12	3,28	3,37	3,07
C18-1t16	3,35	3,30	3,29
C18-2t9t12	1,14	1,24	1,26
C18-2t11c15	0,56	0,58	0,48
C18-2c9-c12	25,71	26,73	25,41
C20	3,28	2,92	2,70
C18-3n3	4,14	4,31	3,97
C20-1c8	3,15	2,62	2,26
C18-2c9-t11	7,03	6,70	6,79
C21	0,20	0,23	0,24
C20-2n6	0,26	0,27	0,25
C20-3n6	1,15	1,18	1,19
C20-4n6	2,56	2,97	3,01
C20-5n3	0,32	0,32	0,30
C22-4n6	0,25	0,28	0,35
C24	0,43	0,37	0,32
C22-5n6	0,10	0,10	0,11
C22-5n3	0,59	0,65	0,61
C22-6n3	0,31	0,35	0,30
PUFA n6	41,15	42,44	39,51
PUFA n3	5,92	6,21	5,66

(valori contrassegnati da lettere diverse differiscono significativamente tra loro per $p \leq 0,05$: test Tukey HSD)

Dall'analisi dei principali risultati ottenuti, si può dire che la strategia alimentare utilizzata che aveva come primo obiettivo quello di aumentare il contenuto di CLA (C18:2c9-t11) è riuscita; in tutti i gruppi infatti i contenuti di acido rumenico sono risultati mediamente in linea con le previsioni. Anche il contenuto totale di Omega3 è apparso mediamente elevato in considerazione del modesto apporto di olio di pesce utilizzato e comunque tale da determinare un rapporto Omega3: Omega6 molto favorevole; il risultato è probabilmente da ascrivere alla composizione lipidica dei fieni utilizzati.

Relativamente ai contenuti di acido oleico, palmitico e stearico i risultati disponibili ci consentono di confermare che la maggiore disponibilità di C18:0 abbia modificato l'attività secretoria della mammella, infatti sia l'acido stearico C18:0 che l'acido oleico C18:1c9 hanno avuto un aumento significativo nel gruppo STEA300 rispetto al controllo. In particolare notiamo un aumento del 17,3% e del 17,2% del C18:0 e C18:1c9 rispettivamente, del gruppo STEA300 rispetto al controllo.

Conclusioni

I risultati della presente ricerca per quanto non esaustivi, sono del tutto originali e sembrano confermare un ruolo limitante dell'acido stearico sulla sintesi di grasso nel latte come ipotizzato da alcuni Autori. La supplementazione di acido stearico a bovine in cui si è indotto un aumento della concentrazione di CLA nel latte, ha consentito infatti di limitare la flessione del titolo di grasso del latte.

CONCLUSIONI

In conclusione si può affermare che attraverso opportune modulazioni degli apporti lipidici delle diete è possibile innalzare i contenuti di CLA e acidi grassi della serie Omega3 senza che la percentuale di grasso subisca flessioni incompatibili con la produzione di latte ad alta qualità.

I limiti nutrizionali da utilizzare nella formulazione delle razioni più importanti per garantire le percentuali di grasso nel latte e migliorarne le caratteristiche nutrizionali sono rappresentati nei seguenti punti:

- gli incrementi di acido alfa linolenico nel latte è strettamente dipendente dagli apporti dietetici e, in analogia con quanto riportato in letteratura, il tasso di trasferimento è compreso fra il 4 e il 6% delle quote assunte con le razioni;
- l'apporto di acidi grassi della serie Omega3 e Omega6 che hanno dato i migliori risultati in termini di Omega3 e CLA nel latte sono stati rispettivamente di 200 e 350 grammi/giorno;
- la quantità di olio di pesce da utilizzare per innalzare i livelli di CLA senza osservare una flessione significativa dei titoli lipidici non deve superare, nelle tipiche diete utilizzate nella nostra realtà zootecnica, i 45-50 grammi al giorno;
- nelle comuni condizioni di allevamento del nostro paese non sembrano raggiungibili livelli Omega3 e CLA nel latte tali da poter conferire allo stesso la qualifica di “funzionale” secondo le attuali normative Europee;
- l'incremento di CLA esercitato dal supplemento di olio di pesce (in quantità di 35 grammi circa) non è riproducibile con altre fonti di grassi a testimonianza del fatto che, probabilmente, gli acidi grassi polinsaturi a lunga catena in esso rappresentati, interferiscono positivamente con i microrganismi deputati alla bioidrogenazione ruminale dei lipidi, inibendo (come segnalato in letteratura) l'ultima tappa della bioidrogenazione;
- la supplementazione con acido stearico consente di limitare la flessione del titolo di grasso del latte;

- la proporzione di foraggi sulla sostanza secca assunta non deve essere inferiore al 50 %;
- il LID (livello di insaturazione della dieta) non deve superare il valore di 1000;
- nel periodo invernale i valori indicati possono essere rispettivamente del 10% inferiore per il livello di foraggi (45% della s.s.) e del 5% superiore per il LID (1050);
- i risultati ottenuti, nell'insieme, lasciano intravedere la possibilità di produrre (con molte attenzioni e, probabilmente, maggiori costi da parte degli allevatori) latti che presentano contemporaneamente più modificazioni positive (50% in più di CLA e Omega3, aumento dell'acido stearico e riduzione del palmitato e del miristico); ciò induce a riflettere sulla possibilità di produrre un latte con un profilo lipidico polifunzionale.

BIBLIOGRAFIA

- A E Brodie, V.A.M.R.F.E.J.Y.H. 1999. Conjugated linoleic acid inhibits differentiation of pre- and post-confluent 3T3-L1 preadipocytes but inhibits cell proliferation only in preconfluent cells. *The Journal of nutrition*. 129:602 – 6.
- AbuGhazaleh, a a, and T.C. Jenkins. 2004. Disappearance of docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids from cultures of mixed ruminal microorganisms. *Journal of dairy science*. 87:645–51. doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)73207-5.
- Acta, B., C. Biochemistry, and V. Biochemistry. 1988. *Biochimica et Biophysica Acta*, 936 (1988) 280-288. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 936:280–288.
- Ahnadi, C.E., N. Beswick, L. Delbecchi, J.J. Kennelly, and P. Lacasse. 2002. Addition of fish oil to diets for dairy cows. II. Effects on milk fat and gene expression of mammary lipogenic enzymes. *The Journal of dairy research*. 69:521–31.
- Allen, M.S. 2000. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 83:1598–1624.
- Allred, S.L., T.R. Dhiman, C.P. Brennand, R.C. Khanal, D.J. McMahon, and N.D. Luchini. 2006. Milk and cheese from cows fed calcium salts of palm and fish oil alone or in combination with soybean products. *Journal of dairy science*. 89:234–48. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72088-4.
- Ambrose, D.J., J.P. Kastelic, R. Corbett, P.A. Pitney, H. V Petit, J.A. Small, and P. Zalkovic. 2006. Lower pregnancy losses in lactating dairy cows fed a diet enriched in alpha-linolenic acid. *Journal of dairy science*. 89:3066–74. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72581-4.
- Andersen, J.B., C. Ridder, and T. Larsen. 2008. Priming the cow for mobilization in the periparturient period: effects of supplementing the dry cow with saturated fat or linseed. *Journal of Dairy Science*. 91:1029–1043.
- Andersson, A., C. Nälsén, S. Tengblad, and B. Vessby. 2002. Fatty acid composition of skeletal muscle reflects dietary fat composition in humans. 76.
- Arbonés-Mainar, J.M., M.A. Navarro, M.A. Guzmán, C. Arnal, J.C. Surra, S. Acín, R. Carnicer, J. Osada, and H.M. Roche. 2006. Selective effect of conjugated linoleic acid isomers on atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E knockout mice. *Atherosclerosis*. 189:318–327.
- Aro, A., S. Männistö, I. Salminen, M.L. Ovaskainen, V. Kataja, and M. Uusitupa. 2000. Inverse association between dietary and serum conjugated linoleic acid and risk of breast cancer in postmenopausal women. *Nutrition and Cancer*. 38:151–157.
- Attar-Bashi, N.M., R.S. Weisinger, D.P. Begg, D. Li, and A.J. Sinclair. 2007. Failure of conjugated linoleic acid supplementation to enhance biosynthesis of docosahexaenoic acid from alpha-linolenic acid in healthy human volunteers. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*. 76:121–30. doi:10.1016/j.plefa.2006.11.002.
- Azain, M.J., D.B. Hausman, M.B. Sisk, W.P. Flatt, and D.E. Jewell. 2000. Dietary conjugated linoleic acid reduces rat adipose tissue cell size rather than cell number. *The Journal of nutrition*. 130:1548–1554.
- Banni, S., E. Angioni, V. Casu, M.P. Melis, G. Carta, F.P. Corongiu, H. Thompson, and C. Ip. 1999a. Decrease in linoleic acid metabolites as a potential mechanism in cancer risk reduction by conjugated linoleic acid. *Carcinogenesis*. 20:1019–1024.
- Banni, S., E. Angioni, V. Casu, M.P. Melis, S. Scrugli, G. Carta, F.P. Corongiu, and C. Ip. 1999b. An increase in vitamin A status by the feeding of conjugated linoleic acid. *Nutrition and Cancer*. 33:53–57.

- Barber, M.C., R. a Clegg, M.T. Travers, and R.G. Vernon. 1997. Lipid metabolism in the lactating mammary gland. *Biochimica et biophysica acta*. 1347:101–26.
- Bas, P., H. Archimède, A. Rouzeau, and D. Sauvant. 2003. Fatty acid composition of mixed-rumen bacteria: effect of concentration and type of forage. *Journal of Dairy Science*. 86:2940–2948.
- Bateman, H.G., and T.C. Jenkins. 1998. Influence of soybean oil in high fiber diets fed to nonlactating cows on ruminal unsaturated fatty acids and nutrient digestibility. *Journal of Dairy Science*. 81:2451–2458.
- Bauchart, D., F. Legay-Carmier, M. Doreau, and B. Gaillard. 1990. Lipid metabolism of liquid-associated and solid-adherent bacteria in rumen contents of dairy cows offered lipid-supplemented diets. *The British journal of nutrition*. 63:563–578.
- Bauman, D.E., and J.M. Griinari. 2000. Regulation and nutritional manipulation of milk fat. Low-fat milk syndrome. *Advances in experimental medicine and biology*. 480:209–16. doi:10.1007/0-306-46832-8_26.
- Bauman, D.E., and J.M. Griinari. 2003. Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annual review of nutrition*. 23:203–27. doi:10.1146/annurev.nutr.23.011702.073408.
- Baumgard, L.H., E. Matitashvili, B.A. Corl, D.A. Dwyer, and D.E. Bauman. 2002. trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid decreases lipogenic rates and expression of genes involved in milk lipid synthesis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 85:2155–2163.
- Belury, M.A., and A. Kempa-Steczko. 1997. Conjugated linoleic acid modulates hepatic lipid composition in mice. *Lipids*. 32:199–204.
- Belury, M.A., A. Mahon, and S. Banni. 2003. The conjugated linoleic acid (CLA) isomer, t10c12-CLA, is inversely associated with changes in body weight and serum leptin in subjects with type 2 diabetes mellitus. 133.
- Boken, S.L., C.R. Staples, L.E. Sollenberger, T.C. Jenkins, and W.W. Thatcher. 2005. Effect of grazing and fat supplementation on production and reproduction of Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 88:4258–4272.
- Bougnoux, P., N. Hajjaji, K. Maheo, C. Couet, and S. Chevalier. 2010. Fatty acids and breast cancer: sensitization to treatments and prevention of metastatic re-growth. *Progress in Lipid Research*. 49:76–86. doi:10.1016/j.plipres.2009.08.003.
- Brenner, R. 1984. Effect of unsaturated acids on membrane structure and enzyme kinetics. *Progress in lipid research*.
- Bretillon, L., J.M. Chardigny, S. Grégoire, O. Berdeaux, and J.L. Sébédio. 1999. Effects of conjugated linoleic acid isomers on the hepatic microsomal desaturation activities in vitro. *Lipids*. 34:965–969.
- Brown, A.W., A.H. Trenkle, and D.C. Beitz. 2011. Diets high in conjugated linoleic acid from pasture-fed cattle did not alter markers of health in young women. *Nutrition research New York NY*. 31:33–41.
- Brown, J.M., M.S. Boysen, S. Chung, O. Fabiyi, R.F. Morrison, S. Mandrup, and M.K. McIntosh. 2004. Conjugated linoleic acid induces human adipocyte delipidation: autocrine/paracrine regulation of MEK/ERK signaling by adipocytokines. *The Journal of Biological Chemistry*. 279:26735–26747.
- Brown, J.M., and M.K. McIntosh. 2003. Conjugated linoleic acid in humans: regulation of adiposity and insulin sensitivity. *The Journal of nutrition*. 133:3041–3046.
- Buisson, A., F. Ordiz, M. Pellizzon, and K.-L.C. Jen. 2000. Conjugated linoleic acid does not impair fat regain but alters IGF-1 levels in weight-reduced rats. *Nutrition Research*. 20:1591–1601. doi:10.1016/S0271-5317(00)00244-X.

- Burke, J.M., C.R. Staples, C.A. Risco, R.L. De La Sota, and W.W. Thatcher. 1997. Effect of ruminant grade Menhaden fish meal on reproductive and productive performance of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 80:3386–3398.
- Butz, D.E., G. Li, S.M. Huebner, and M.E. Cook. 2007. A mechanistic approach to understanding conjugated linoleic acid's role in inflammation using murine models of rheumatoid arthritis. *American journal of physiology Regulatory integrative and comparative physiology*. 293:R669–R676.
- Calder, P. 2004. n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored.
- Calder, P.C. 1997. n-3 polyunsaturated fatty acids and cytokine production in health and disease. *Annals of nutrition metabolism*. 41:203–234.
- Calder, P.C. 2003. n-3 Polyunsaturated fatty acids and inflammation: From molecular biology to the clinic. *Lipids*. 38:343–352. doi:10.1007/s11745-003-1068-y.
- Calder, P.C. 2006. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 83:1505S–1519S.
- Cant, J.P., E.J. DePeters, and R.L. Baldwin. 1993. Mammary amino acid utilization in dairy cows fed fat and its relationship to milk protein depression. *Journal of Dairy Science*. 76:762–774.
- De Caterina, R., M.A. Cybulsky, S.K. Clinton, M.A. Gimbrone, and P. Libby. 1995. Omega-3 fatty acids and endothelial leukocyte adhesion molecules. *Prostaglandins leukotrienes and essential fatty acids*. 52:191–195.
- Chalupa, W., B. Vecchiarelli, A.E. Elser, D.S. Kronfeld, D. Sklan, and D.L. Palmquist. 1986. Rumen fermentation in vitro as influenced by long chain fatty acids. *Journal of Dairy Science*. 67:1293–1301.
- Champe, P.C., R.A. Harvey, and D.R. Ferrier. 2005. *Biochemistry*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Chichlowski, M.W., J.W. Schroeder, C.S. Park, W.L. Keller, and D.E. Schimek. 2005. Altering the fatty acids in milk fat by including canola seed in dairy cattle diets. *Journal of Dairy Science*. 88:3084–3094.
- Chilliard, Y. 1993. Dietary fat and adipose tissue metabolism in ruminants, pigs, and rodents: a review. *Journal of Dairy Science*. 76:3897–3931.
- Chilliard, Y., and A. Ferlay. 2004. Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. *Reproduction Nutrition Development*. 44:467–492.
- Chilliard, Y., A. Ferlay, and M. Doreau. 2001. Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. *Livestock Production Science*. 70:31–48.
- Chouinard, P.Y., V. Girard, and G.J. Brisson. 1998. Fatty acid profile and physical properties of milk fat from cows fed calcium salts of fatty acids with varying unsaturation. *Journal of dairy science*. 81:471–81. doi:10.3168/jds.S0022-0302(98)75599-7.
- Christie, W.W. 2003. *Lipid Analysis - Isolation, Separation, Identification and Lipidomic Analysis*. The Oily Press.
- Clore, J.N., J. Li, R. Gill, S. Gupta, R. Spencer, A. Azzam, W. Zuelzer, W.B. Rizzo, and W.G. Blackard. 1998. Skeletal muscle phosphatidylcholine fatty acids and insulin sensitivity in normal humans. *American Journal of Physiology*. 275:E665–E670.
- Cocchi M., Frega N.G., N.R.C. 2005. Aspetti dell'apporto lipidico animale di omega-3 per la nutrizione umana. *Alimenti e salute (CLUEB)* 339-346.

- COOK, M.E., C.C. MILLER, Y. PARK, and M. PARIZA. 1993. Immune Modulation by Altered Nutrient Metabolism: Nutritional Control of Immune-Induced Growth Depression. *Poultry Science*. 72:1301–1305. doi:10.3382/ps.0721301.
- Corl, B.A., L.H. Baumgard, J.M. Griinari, P. Delmonte, K.M. Morehouse, M.P. Yurawecz, and D.E. Bauman. 2002. Trans-7,cis-9 CLA is synthesized endogenously by delta9-desaturase in dairy cows. *Lipids*. 37:681–8.
- Côrtés, C., D.C. da Silva-Kazama, R. Kazama, N. Gagnon, C. Benchaar, G.T.D. Santos, L.M. Zeoula, and H. V. Petit. 2010. Milk composition, milk fatty acid profile, digestion, and ruminal fermentation in dairy cows fed whole flaxseed and calcium salts of flaxseed oil. *Journal of dairy science*. 93:3146–57. doi:10.3168/jds.2009-2905.
- Cortright, R., D. Muoio, and G. Dohm. 1997. Skeletal muscle lipid metabolism: A frontier for new insights into fuel homeostasis. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 8:228–245. doi:10.1016/S0955-2863(97)89660-X.
- Costa, E.N., E.C.Q. Lacerda, S.M.S. Santos, C.M.S. Santos, M. Franco, R.R. Silva, and J.I. Simionato. 2011. Action of successive heat treatments in bovine milk fatty acids. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 22:2115–2120. doi:10.1590/S0103-50532011001100014.
- Crepaldi, G., G. Romanato, P. Tonin, and S. Maggi. 2007. Osteoporosis and body composition. *Anales de medicina interna Madrid Spain 1984*. 30:177–178.
- De Deckere, E.A., J.M. van Amelsvoort, G.P. McNeill, and P. Jones. 1999. Effects of conjugated linoleic acid (CLA) isomers on lipid levels and peroxisome proliferation in the hamster. *The British journal of nutrition*. 82:309–17.
- DeFronzo, R.A., E. Jacot, E. Jequier, E. Maeder, J. Wahren, and J.P. Felber. 1981. The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes*. 30:1000–7.
- Demeyer, D., and M. Doreau. 1999. Targets and procedures for altering ruminant meat and milk lipids. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 58:593–607.
- Desroches, S., P.Y. Chouinard, I. Galibois, L. Corneau, J. Delisle, B. Lamarche, P. Couture, and N. Bergeron. 2005. Lack of effect of dietary conjugated linoleic acids naturally incorporated into butter on the lipid profile and body composition of overweight and obese men. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 82:309–319.
- Dewhurst, R.J., and P.J. King. 1998. Effects of extended wilting , shading and chemical additives on the fatty acids in laboratory grass silages. *Science*. 219–224.
- Dhiman, T.R., G.R. Anand, L.D. Satter, and M.W. Pariza. 1999. Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets. *Journal of dairy science*. 82:2146–56. doi:10.3168/jds.S0022-0302(99)75458-5.
- Dhiman, T.R., S.-H. Nam, and A.L. Ure. 2005. Factors affecting conjugated linoleic acid content in milk and meat. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 45:463–482.
- Van Dijk, H.J., G.D. O'Dell, P.R. Perry, and L.W. Grimes. 1983. Extruded Versus Raw Ground Soybeans for Dairy Cows in Early Lactation. *Journal of Dairy Science*. 66:2521–2525. doi:10.3168/jds.S0022-0302(83)82121-3.
- Doreau, M., K. Adingra, B. Rémond, and Y. Chilliard. 1988. Respective effects of the quantities ingested and physiological stage on the digestibility of the same diet in dairy cows. *Reproduction Nutrition Development*. 28 Suppl 1:63–64.
- Doreau, M., and Y. Chilliard. 1997. Digestion and metabolism of dietary fat in farm animals. *British Journal of Nutrition*. 78:S15–S35.

- Doreau, M., and A. Ferlay. 1994. Digestion and utilisation of fatty acids by ruminants. *Animal Feed Science and Technology*. 45:379–396. doi:10.1016/0377-8401(94)90039-6.
- Elgersma, a. 2003. Comparison of the fatty acid composition of fresh and ensiled perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.), affected by cultivar and regrowth interval. *Animal Feed Science and Technology*. 108:191–205. doi:10.1016/S0377-8401(03)00134-2.
- Enjalbert, F., M. Nicot, C. Bayourthe, R. Moncoulon, N. Supe, and L. Inge. 1998. Duodenal Infusions of Palmitic, Stearic or Oleic Acids Differently Affect Mammary Gland Metabolism of Fatty Acids in Lactating Dairy Cows 1. 1525–1532.
- Eyjolfson, V., L.L. Spriet, and D.J. Dyck. 2004. Conjugated linoleic acid improves insulin sensitivity in young, sedentary humans. 36.
- Feldmann, M., and R.N. Maini. 2003. Rheumatoid arthritis: introduction. *Springer Seminars in Immunopathology*. 2:S17–S22.
- Fellner, V., F.D. Sauer, and J.K. Kramer. 1997. Effect of nigericin, monensin, and tetronasin on biohydrogenation in continuous flow-through ruminal fermenters. *Journal of Dairy Science*. 80:921–928.
- Focant, M., E. Mignolet, M. Marique, F. Clabots, T. Breyne, D. Dalemans, and Y. Larondelle. 1998. The effect of vitamin E supplementation of cow diets containing rapeseed and linseed on the prevention of milk fat oxidation. *Journal of Dairy Science*. 81:1095–1101.
- Forsythe, L.K., J.M.W. Wallace, and M.B.E. Livingstone. 2008. Obesity and inflammation: the effects of weight loss. *Nutrition Research Reviews*. 21:117–133.
- Fotouhi, N., and T.C. Jenkins. 1992. Resistance of fatty acyl amides to degradation and hydrogenation by ruminal microorganisms. *Journal of Dairy Science*. 75:1527–1532.
- Fruchart, J.C., B. Staels, and P. Duriez. 2001. New concepts on the mechanism of action of fibrates and therapeutic perspectives in atherosclerosis. *Bulletin de l'Academie nationale de medecine*. 185:63–74; discussion 74–75.
- Gallus, S., P. Colombo, V. Scarpino, P. Zuccaro, E. Negri, G. Apolone, and C. La Vecchia. 2006. Overweight and obesity in Italian adults 2004, and an overview of trends since 1983. *European Journal of Clinical Nutrition*. 60:1174–1179.
- Gama, M., P. Garnsworthy, J. Griinari, P. Leme, P. Rodrigues, L. Souza, and D. Lanna. 2008. Diet-induced milk fat depression: Association with changes in milk fatty acid composition and fluidity of milk fat. *Livestock Science*. 115:319–331. doi:10.1016/j.livsci.2007.08.006.
- Giesy, J.G., M.A. McGuire, B. Shafii, and T.W. Hanson. 2002. Effect of dose of calcium salts of conjugated linoleic acid (CLA) on percentage and fatty acid content of milk fat in midlactation holstein cows. *Journal of dairy science*. 85:2023–9. doi:10.3168/jds.S0022-0302(02)74279-3.
- Goodridge, J., J.R. Ingalls, and G.H. Crow. 2001. Transfer of omega-3 linolenic acid and linoleic acid to milk fat from flaxseed or Linola protected with formaldehyde 1. *Canadian Journal of Animal Science*.
- Gopaul, N.K., E.E. Anggård, A.I. Mallet, D.J. Betteridge, S.P. Wolff, and J. Nourooz-Zadeh. 1995. Plasma 8-epi-PGF₂ alpha levels are elevated in individuals with non-insulin dependent diabetes mellitus. *FEBS Letters*. 368:225–229.
- Griinari, J.M., B. a Corl, S.H. Lacy, P.Y. Chouinard, K. V Nurmela, and D.E. Bauman. 2000. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Delta(9)-desaturase. *The Journal of nutrition*. 130:2285–91.

- Hammarstedt, A., P.-A. Jansson, C. Wesslau, X. Yang, and U. Smith. 2003. Reduced expression of PGC-1 and insulin-signaling molecules in adipose tissue is associated with insulin resistance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 301:578–582.
- Harfoot, C.G. 1994. Regulation of lipid metabolism in the rumen. *Progress in Lipid Research*. 124:21–54.
- Harwood, J.L., and N.J. Russell. 1984. Lipids in plants and microbes.
- Hawkins, D.E., K.D. Niswender, G.M. Oss, C.L. Moeller, K.G. Odde, H.R. Sawyer, and G.D. Niswender. 1995. An increase in serum lipids increases luteal lipid content and alters the disappearance rate of progesterone in cows. *Journal of Animal Science*. 73:541–545.
- He, K., Y. Song, M.L. Daviglius, K. Liu, L. Van Horn, A.R. Dyer, and P. Greenland. 2004. Accumulated evidence on fish consumption and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of cohort studies. *Circulation*. 109:2705–2711.
- Heinemann, F.S., and J. Ozols. 2003. Stearoyl-CoA desaturase, a short-lived protein of endoplasmic reticulum with multiple control mechanisms. *Prostaglandins leukotrienes and essential fatty acids*. 68:123–133.
- Hibbeln, J.R., J.M. Davis, C. Steer, P. Emmett, I. Rogers, C. Williams, and J. Golding. 2007. Maternal seafood consumption in pregnancy and neurodevelopmental outcomes in childhood (ALSPAC study): an observational cohort study. *Lancet*. 369:578–585.
- Hornstra, G., G. Hornstra, and M. Rand. 1986. Effect of dietary n - 6 and n - 3 polyunsaturated fatty acids on the fluidity of platelet membranes in rat and man. *Progress in Lipid Research*. 25:637 – 638.
- House, R.L., J.P. Cassady, E.J. Eisen, M.K. McIntosh, and J. Odle. 2005. Conjugated linoleic acid evokes delipidation through the regulation of genes controlling lipid metabolism in adipose and liver tissue. *Obesity reviews an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. 6:247–258.
- Hung, T., J.L. Sievenpiper, A. Marchie, C.W.C. Kendall, and D.J.A. Jenkins. 2003. Fat versus carbohydrate in insulin resistance, obesity, diabetes and cardiovascular disease. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 6:165–176.
- Ip, C., S.F. Chin, J.A. Scimeca, and M.W. Pariza. 1991. Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Research*. 51:6118–6124.
- Ip, C., M.M. Ip, T. Loftus, S. Shoemaker, and W. Shea-Eaton. 2000. Induction of apoptosis by conjugated linoleic acid in cultured mammary tumor cells and premalignant lesions of the rat mammary gland. *Cancer epidemiology biomarkers prevention a publication of the American Association for Cancer Research cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 9:689–696.
- Ip, C., C. Jiang, H.J. Thompson, and J.A. Scimeca. 1997. Retention of conjugated linoleic acid in the mammary gland is associated with tumor inhibition during the post-initiation phase of carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 18:755–759.
- Ip, C., J.A. Scimeca, and H. Thompson. 1995. Effect of timing and duration of dietary conjugated linoleic acid on mammary cancer prevention. *Nutrition and Cancer*. 24:241–247.
- Ip, M.M., S.O. McGee, P.A. Masso-Welch, C. Ip, X. Meng, L. Ou, and S.F. Shoemaker. 2007. The t10,c12 isomer of conjugated linoleic acid stimulates mammary tumorigenesis in transgenic mice over-expressing erbB2 in the mammary epithelium. *Carcinogenesis*. 28:1269–1276.
- Jeffrey, B.G., H.S. Weisinger, M. Neuringer, and D.C. Mitchell. 2001. The role of docosahexaenoic acid in retinal function. *Lipids*. 36:859–71.

- Jenkins, T.C., R.J. Wallace, P.J. Moate, and E.E. Mosley. 2008. Board-invited review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *Journal of animal science*. 86:397–412. doi:10.2527/jas.2007-0588.
- Jensen, R.G. 2002. The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *Journal of dairy science*. 85:295–350. doi:10.3168/jds.S0022-0302(02)74079-4.
- Jerred, M.J., D.J. Carroll, D.K. Combs, and R.R. Grummer. 1990. Effects of fat supplementation and immature alfalfa to concentrate ratio on lactation performance of cattle. *Journal of Dairy Science*. 73:3771–3777.
- Jones, E.L., K.J. Shingfield, C. Kohen, A.K. Jones, B. Lupoli, A.S. Grandison, D.E. Beever, C.M. Williams, P.C. Calder, and P. Yaqoob. 2005. Chemical, physical, and sensory properties of dairy products enriched with conjugated linoleic acid. *Journal of Dairy Science*. 88:2923–2937.
- Kanwar, R.K., A.K. Macgibbon, P.N. Black, J.R. Kanwar, A. Rowan, M. Vale, and G.W. Krissansen. 2011. Bovine milk fat enriched in conjugated linoleic and vaccenic acids attenuates allergic airway disease in mice. *Clinical and experimental allergy journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 41:208–218. doi:10.1111/j.1365-2222.2011.03723.x.
- Katz, A.M. 2002. Trans-Fatty Acids and Sudden Cardiac Death. *Circulation*. 105:669–671.
- Katz, I., and M. Keeney. 1966. Characterization of the octadecenoic acids in rumen digesta and rumen bacteria. *Journal of dairy science*. 49:962–6. doi:10.3168/jds.S0022-0302(66)87990-0.
- Kelley, N.S., N.E. Hubbard, and K.L. Erickson. 2007. Conjugated linoleic acid isomers and cancer. *The Journal of nutrition*. 137:2599–2607.
- Kelly, M.L., E.S. Kolver, D.E. Bauman, M.E. Van Amburgh, and L.D. Muller. 1998. Effect of intake of pasture on concentrations of conjugated linoleic acid in milk of lactating cows. *Journal of dairy science*. 81:1630–6. doi:10.3168/jds.S0022-0302(98)75730-3.
- Kelly, O., and K.D. Cashman. 2004. The effect of conjugated linoleic acid on calcium absorption and bone metabolism and composition in adult ovariectomised rats. *Prostaglandins leukotrienes and essential fatty acids*. 71:295–301.
- Kemp, P., and D.J. Lander. 1983. The hydrogenation of gamma-linolenic acid by pure cultures of two rumen bacteria. *The Biochemical journal*. 216:519–522.
- Kennedy, S.R., M.J. Leaver, P.J. Campbell, X. Zheng, J.R. Dick, and D.R. Tocher. 2006. Influence of dietary oil content and conjugated linoleic acid (CLA) on lipid metabolism enzyme activities and gene expression in tissues of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Lipids*. 41:423–36.
- Kennelly, J.J. 1996. The fatty acid composition of milk fat as influenced by feeding oilseeds. *Animal Feed Science and Technology*. 60:137–152. doi:10.1016/0377-8401(96)00973-X.
- Kim, Y.K., D.J. Schingoethe, D.P. Casper, and F.C. Ludens. 1991. Lactational response of dairy cows to increased dietary crude protein with added fat. *Journal of Dairy Science*. 74:3891–3899.
- Kinsella, J.E. 1972. Stearyl CoA as a precursor of oleic acid and glycerolipids in mammary microsomes from lactating bovine: Possible regulatory step in milk triglyceride synthesis. *Lipids*. 7:349–355. doi:10.1007/BF02532654.
- Kitessa, S.M., S.K. Gulati, G.C. Simos, J.R. Ashes, T.W. Scott, E. Fleck, and P.C. Wynn. 2004. Supplementation of grazing dairy cows with rumen-protected tuna oil enriches milk fat with n-3 fatty acids without affecting milk production or sensory characteristics. *The British journal of nutrition*. 91:271–8. doi:10.1079/BJN20031050.

Kriketos, A.D., D.A. Pan, S. Lillioja, G.J. Cooney, L.A. Baur, M.R. Milner, J.R. Sutton, A.B. Jenkins, C. Bogardus, and L.H. Storlien. 1996. Interrelationships between muscle morphology, insulin action, and adiposity. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*. 270:R1332–1339.

Kris-Etherton, P.M., W.S. Harris, and L.J. Appel. 2002. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation*. 106:2747–2757.

Kritchevsky D., Tepper S.A., Wright S., and Czarnecki S.K. 2002. Influence of graded levels of conjugated linoleic acid (CLA) on experimental atherosclerosis in rabbits. *Nutrition Research*. 22:5. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0271-5317(02)00432-3.

Kuhnt, K., J. Kraft, P. Moeckel, and G. Jahreis. 2006. Trans-11-18 : 1 is effectively Delta9-desaturated compared with trans-12-18 : 1 in humans. *The British journal of nutrition*. 95:752–761.

Lacasse, P., J.J. Kennelly, L. Delbecchi, and C.E. Ahnadi. 2002. Addition of protected and unprotected fish oil to diets for dairy cows. I. Effects on the yield, composition and taste of milk. *The Journal of dairy research*. 69:511–20.

Lands, W.E.M. 1989. Differences in n-3 and n-6 eicosanoid precursors. *Advances in Prostaglandin Thromboxane and Leukotriene Research*. 19, 602–605.

Lanham-New, S.A. 2008. Importance of calcium, vitamin D and vitamin K for osteoporosis prevention and treatment. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 67:163–176.

LaRosa, P.C., J. Miner, Y. Xia, Y. Zhou, S. Kachman, and M.E. Fromm. 2006. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid causes inflammation and delipidation of white adipose tissue in mice: a microarray and histological analysis. *Physiological Genomics*. 27:282–294.

Larsson, S.C., L. Bergkvist, and A. Wolk. 2009. Conjugated linoleic acid intake and breast cancer risk in a prospective cohort of Swedish women. *The American journal of clinical nutrition*. 90:556–60. doi:10.3945/ajcn.2009.27480.

Lee, K.N., M.W. Pariza, and J.M. Ntambi. 1998. Conjugated linoleic acid decreases hepatic stearyl-CoA desaturase mRNA expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 248:817–821.

Lichtenstein, A.H., L.M. Ausman, S.M. Jalbert, and E.J. Schaefer. 1999. Effects of different forms of dietary hydrogenated fats on serum lipoprotein cholesterol levels [see comments] [published erratum appears in N Engl J Med 1999 Sep 9;341(11):856]. *The New England Journal of Medicine*. 340:1933–1940.

Lichtenstein, A.H., and U.S. Schwab. 2000. Relationship of dietary fat to glucose metabolism. *Atherosclerosis*. 150:227–243.

Lock, A.L., and D.E. Bauman. 2004. Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. *Lipids*. 39:1197–1206.

Lock, A.L., and P.C. Garnsworthy. 2003. Seasonal variation in milk conjugated linoleic acid and D 9 - desaturase activity in dairy cows. *Livestock Production Science*. 79:47–59.

MacRedmond, R., G. Singhera, S. Attridge, M. Bahzad, C. Fava, Y. Lai, T.S. Hallstrand, and D.R. Dorscheid. 2010. Conjugated linoleic acid improves airway hyper-reactivity in overweight mild asthmatics. 40.

Malpuech-Brugère, C., W.P.H.G. Verboeket-van De Venne, R.P. Mensink, M.-A. Arnal, B. Morio, M. Brandolini, A. Saebo, T.S. Lassel, J.M. Chardigny, J.L. Sébédio, and B. Beaufrère. 2004. Effects of two conjugated linoleic Acid isomers on body fat mass in overweight humans. 12.

- Martillotti F., M. Antongiovanni, Rizzi L., E. Santi, G.B. 1985. Metodi di analisi per la valutazione degli alimenti di impiego zootecnico. *Quaderni metodologici n.8*. IPRA-CNR.
- Mateos, G.G., P.G. Rebollar, and P. Medel. 1995. Utilización de grasas y productos lipídicos en alimentación animal.
- McCrorie, T.A., E.M. Keaveney, J.M.W. Wallace, N. Binns, and M.B.E. Livingstone. 2011. Human health effects of conjugated linoleic acid from milk and supplements. *Nutrition Research Reviews*. 24:206–227. doi:10.1017/S0954422411000114.
- Mcguire, M.A., and M.K. Mcguire. 2000. Conjugated linoleic acid (CLA): A ruminant fatty acid with beneficial effects on human health M . A . McGuire and M . K . McGuire The online version of this article , along with updated information and services , is located on the World Wide Web at : Co. *Journal of Animal Science*. 1–8.
- McNamara, R.K., C.-G. Hahn, R. Jandacek, T. Rider, P. Tso, K.E. Stanford, and N.M. Richtand. 2007. Selective deficits in the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid in the postmortem orbitofrontal cortex of patients with major depressive disorder. *Biological psychiatry*. 62:17–24. doi:10.1016/j.biopsych.2006.08.026.
- Meľuchová, B., J. Blaško, R. Kubinec, R. Górová, J. Dubravská, M. Margetín, and L. Soják. 2008. Seasonal variations in fatty acid composition of pasture forage plants and CLA content in ewe milk fat. *Small Ruminant Research*. 78:56–65. doi:10.1016/j.smallrumres.2008.05.001.
- Mendoza, A., A. La Manna, D. Crespi, M.A. Crowe, and D. Cavestany. 2008. Whole sunflower seeds as a source of polyunsaturated fatty acids for grazing dairy cows: Effects on metabolic profiles and resumption of postpartum ovarian cyclicity. *Livestock Science*. 119:183–193. doi:10.1016/j.livsci.2008.04.005.
- Meraz-Torres, L.S.& H.H.-S. 2012. Conjugated Linoleic Acid in Dairy Products: A Review. *American Journal of Food Technology*. 176–179.
- Mitchell, P.L., and R.S. McLeod. 2008. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis: studies in animal models. *Biochemistry and cell biology Biochimie et biologie cellulaire*. 86:293–301.
- Moate, P., W. Chalupa, T. Jenkins, and R. Boston. 2004. A model to describe ruminal metabolism and intestinal absorption of long chain fatty acids. *Animal Feed Science and Technology*. 112:79–105. doi:10.1016/j.anifeedsci.2003.10.007.
- Moloney, F., S. Toomey, E. Noone, A. Nugent, B. Allan, C.E. Loscher, and H.M. Roche. 2007. Antidiabetic effects of cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid may be mediated via anti-inflammatory effects in white adipose tissue. *Diabetes*. 56:574–582.
- Moore, K., and W.W. Thatcher. 2006. Major advances associated with reproduction in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 89:1254–1266.
- Moran, E.F. 1994. Tropical Forests and their Crops. By Nigel J. H. Smith, J. T. Williams, Donald L. Plucknett, and Jennifer P. Talbot. Ithaca, New York: Cornell University Press, 1992. xvi 568 pp. Illustrations, notes, references, index. Paper \$27.95. *Forest*. 38:147–148. doi:10.2307/3983933.
- Mougiou, V., A. Matsakas, A. Petridou, S. Ring, A. Sagredos, A. Melissopoulou, N. Tsigilis, and M. Nikolaidis. 2001. Effect of supplementation with conjugated linoleic acid on human serum lipids and body fat. *The Journal of nutritional biochemistry*. 12:585–594.
- Murphy, M.G. 1990. Dietary fatty acids and membrane protein function. *The Journal of nutritional biochemistry*. 1:68–79.
- Mussa P.P., M.G. 1997. Acidi grassi polinsaturi: funzioni ed impiego terapeutico nei carnivori. *Obiettivi Veterinari* 10: 13-19.

- Nagao, K., N. Inoue, Y.-M. Wang, and T. Yanagita. 2003. Conjugated linoleic acid enhances plasma adiponectin level and alleviates hyperinsulinemia and hypertension in Zucker diabetic fatty (fa/fa) rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 310:562–566.
- Neves, C.A., G.T. Santos, M. Matsushita, E.M. Alves, R.L. Oliveira, A.F. Branco, D.C. Silva, A.C. Furlan, and H.V. Petit. 2007. Intake, whole tract digestibility, milk production, and milk composition of Holstein cows fed extruded soybeans treated with or without lignosulfonate. *Animal Feed Science and Technology*. 134:32–44. doi:10.1016/j.anifeedsci.2006.05.015.
- Nishida, C., R. Uauy, S. Kumanyika, and P. Shetty. 2007. The Joint WHO/FAO Expert Consultation on diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: process, product and policy implications. *Public Health Nutrition*. 7:245–250. doi:10.1079/PHN2003592.
- Noone, E.J., H.M. Roche, A.P. Nugent, and M.J. Gibney. 2002. The effect of dietary supplementation using isomeric blends of conjugated linoleic acid on lipid metabolism in healthy human subjects. *British Journal of Nutrition*. 88:243–251.
- Nordoy, A., and S.H. Goodnight. 1990. Dietary lipids and thrombosis. Relationships to atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 10:149–163. doi:10.1161/01.ATV.10.2.149.
- Noto, A., P. Zahradka, N. Yurkova, X. Xie, H. Truong, E. Nitschmann, M.R. Ogborn, and C.G. Taylor. 2007. Dietary conjugated linoleic acid decreases adipocyte size and favorably modifies adipokine status and insulin sensitivity in obese, insulin-resistant rats. *Metabolism Clinical And Experimental*. 56:1601–1611.
- Ntambi, J.M., and M. Miyazaki. 2004. Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Progress in Lipid Research*. 43:91–104.
- Onakpoya, I.J., P.P. Posadzki, L.K. Watson, L.A. Davies, and E. Ernst. 2012. The efficacy of long-term conjugated linoleic acid (CLA) supplementation on body composition in overweight and obese individuals: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *European Journal of Nutrition*. 51:127–34. doi:10.1007/s00394-011-0253-9.
- Orbach, J., and W.H.H. Andrews. 1973. STIMULATION OF AFFERENT NERVE TERMINALS IN THE PERFUSED RABBIT LIVER BY SODIUM SALTS OF SOME LONG-CHAIN FATTY ACIDS. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci*. 58:267–274.
- Palmer, J.P., S. Helqvist, G.A. Spinas, J. Mølviq, T. Mandrup-Poulsen, H.U. Andersen, and J. Nerup. 1989. Interaction of beta-cell activity and IL-1 concentration and exposure time in isolated rat islets of Langerhans. *Diabetes*. 38:1211–1216.
- Palmonari, A., D.M. Stevenson, D.R. Mertens, C.W. Cruywagen, and P.J. Weimer. 2010. pH dynamics and bacterial community composition in the rumen of lactating dairy cows. *Journal of dairy science*. 93:279–87. doi:10.3168/jds.2009-2207.
- Palmquist, D.L., A. Denise Beaulieu, and D.M. Barbano. 1993. Feed and Animal Factors Influencing Milk Fat Composition. *Journal of Dairy Science*. 76:1753–1771. doi:10.3168/jds.S0022-0302(93)77508-6.
- Palmquist, D.L., and T.C. Jenkins. 1980. Fat in lactation rations: review. *Journal of Dairy Science*. 63:1–14.
- Palombo, J.D., A. Ganguly, B.R. Bistran, and M.P. Menard. 2002. The antiproliferative effects of biologically active isomers of conjugated linoleic acid on human colorectal and prostatic cancer cells. *Cancer Letters*. 177:163–172.
- Pantoja, J., J.L. Firkins, M.L. Eastridge, and B.L. Hull. 1996. Fatty acid digestion in lactating dairy cows fed fats varying in degree of saturation and different fiber sources. *Journal of dairy science*. 79:575–84. doi:10.3168/jds.S0022-0302(96)76402-0.

- Pariza, M.W., and W.A. Hargraves. 1985. A beef-derived mutagenesis modulator inhibits initiation of mouse epidermal tumors by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Carcinogenesis*. 6:591–593.
- Pariza, M.W., Y. Park, and M.E. Cook. 2000. Mechanisms of action of conjugated linoleic acid: evidence and speculation. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine New York NY*. 223:8–13.
- Pariza, M.W., Y. Park, and M.E. Cook. 2001. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Progress in lipid research*. 40:283–98.
- Park, Y., K.J. Albright, W. Liu, J.M. Storkson, M.E. Cook, and M.W. Pariza. 1997. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids*. 32:853–858.
- Parodi, P.W. 1994. Conjugated linoleic acid: An anticarcinogenic fatty acid present in milk fat. *Australian Journal of Dairy Technology*. 49:93–97.
- Parodi, P.W. 2003. Conjugated linoleic acid in food. *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*. vol.2:101–122.
- Peterson, D.G., E.A. Matitashvili, and D.E. Bauman. 2003. Diet-induced milk fat depression in dairy cows results in increased trans-10, cis-12 CLA in milk fat and coordinate suppression of mRNA abundance for mammary enzymes involved in milk fat synthesis. *The Journal of nutrition*. 133:3098–102.
- Petit, H. V, C. Germiquet, and D. Lebel. 2004. Effect of feeding whole, unprocessed sunflower seeds and flaxseed on milk production, milk composition, and prostaglandin secretion in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 87:3889–3898.
- Pinkoski, C., P.D. Chilibeck, D.G. Candow, D. Esliger, J.B. Ewaschuk, M. Facci, J.P. Farthing, and G.A. Zello. 2006. The effects of conjugated linoleic acid supplementation during resistance training. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 38:339–348.
- Polan, C.E., J.J. McNeill, and S.B. Tove. 1964. BIOHYDROGENATION OF UNSATURATED FATTY ACIDS BY RUMEN BACTERIA. *Journal Of Bacteriology*. 88:1056–1064.
- Pollard, M.R., F.D. Gunstone, A.T. James, and L.J. Morris. 1980. Desaturation of positional and geometric isomers of monoenoic fatty acids by microsomal preparations from rat liver. *Lipids*. 17:437–442.
- Ponter, A.A., A.-E. Parsy, M. Saadé, J.-P. Mialot, C. Ficheux, C. Duvaux-Ponter, and B. Grimard. 2006. Effect of a supplement rich in linolenic acid added to the diet of post partum dairy cows on ovarian follicle growth, and milk and plasma fatty acid compositions. *Reproduction Nutrition Development*. 46:19–29. doi:10.1051/rnd:2005058.
- Poore, M.H., J. a Moore, R.S. Swingle, T.P. Eck, and W.H. Brown. 1991. Wheat straw or alfalfa hay in diets with 30% neutral detergent fiber for lactating Holstein cows. *Journal of dairy science*. 74:3152–9. doi:10.3168/jds.S0022-0302(91)78500-7.
- Pradhan, A.D., J.E. Manson, N. Rifai, J.E. Buring, and P.M. Ridker. 2001. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. 286.
- Prandini, A., S. Sigolo, G. Tansini, N. Brogna, and G. Piva. 2007. Different level of conjugated linoleic acid (CLA) in dairy products from Italy. *Journal of Food Composition and Analysis*. 20:472–479. doi:10.1016/j.jfca.2007.03.001.
- Prentice, A., I. Schoenmakers, M.A. Laskey, S. De Bono, F. Ginty, and G.R. Goldberg. 2006. Nutrition and bone growth and development. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 65:348–360.

- R Bickerstaffe, A R Johnson. 1972. The effect of intravenous infusions of sterculic acid on milk fat synthesis. *The British journal of nutrition*. 27:561 – 70.
- R T Holman, M.M.M. 1981. Cis and trans-octadecenoic acids as precursors of polyunsaturated acids. *Progress in lipid research*. 20:151 – 6.
- Rabiee, A.R., K. Breinhild, W. Scott, H.M. Golder, E. Block, and I.J. Lean. 2012. Effect of fat additions to diets of dairy cattle on milk production and components: A meta-analysis and meta-regression. *Journal of Dairy Science*. 95:3225–47. doi:10.3168/jds.2011-4895.
- Raff, M., T. Tholstrup, S. Basu, P. Nonboe, M.T. Sørensen, and E.M. Straarup. 2008. A diet rich in conjugated linoleic acid and butter increases lipid peroxidation but does not affect atherosclerotic, inflammatory, or diabetic risk markers in healthy young men. *The Journal of nutrition*. 138:509–514.
- Reiffel, J.A., and A. McDonald. 2006. Antiarrhythmic effects of omega-3 fatty acids. *The American Journal of Cardiology*. 98:50i–60i.
- Risérus, U., P. Arner, K. Brismar, and B. Vessby. 2002. Treatment with dietary trans10cis12 conjugated linoleic acid causes isomer-specific insulin resistance in obese men with the metabolic syndrome. 25.
- Risérus, U., B. Vessby, J. Arnlöv, and S. Basu. 2004. Effects of cis-9,trans-11 conjugated linoleic acid supplementation on insulin sensitivity, lipid peroxidation, and proinflammatory markers in obese men. 80.
- De Roos, B., G. Rucklidge, M. Reid, K. Ross, G. Duncan, M.A. Navarro, J.M. Arbones-Mainar, M.A. Guzman-Garcia, J. Osada, J. Browne, C.E. Loscher, and H.M. Roche. 2005. Divergent mechanisms of cis9, trans11- and trans10, cis12-conjugated linoleic acid affecting insulin resistance and inflammation in apolipoprotein E knockout mice: a proteomics approach. *The FASEB journal official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 19:1746–1748.
- Rossetti, R.G., C.M. Seiler, M. Laposata, and R.B. Zurier. 1995. Differential regulation of human T lymphocyte protein kinase C activity by unsaturated fatty acids. *Clinical Immunology and Immunopathology*. 76:220–224.
- Ruxton, C.H.S., S.C. Reed, M.J.A. Simpson, and K.J. Millington. 2004. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *Journal of human nutrition and dietetics : the official journal of the British Dietetic Association*. 17:449–59. doi:10.1111/j.1365-277X.2004.00552.x.
- S H Goodnight, W S Harris, W E Connor, D.R.I. 1982. Polyunsaturated fatty acids, hyperlipidemia, and thrombosis. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex.)*. 2:87 – 113.
- Von Schacky, C., and P.C. Weber. 1985. Metabolism and effects on platelet function of the purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in humans. *Journal of Clinical Investigation*. 76:2446–2450.
- Schingoethe, D.J., D.P. Casper, C. Yang, D.J. Illg, J.L. Sommerfeldt, and C.R. Mueller. 1988. Lactational response to soybean meal, heated soybean meal, and extruded soybeans with ruminally protected methionine. *Journal of dairy science*. 71:173–80. doi:10.3168/jds.S0022-0302(88)79539-9.
- Schoenherr, W.D., and D.E. Jewell. 1997. Nutritional modification of inflammatory diseases. *Seminars In Veterinary Medicine And Surgery Small Animal*. 12:212–222.
- Scott, T.W., L.J. Cook, and S.C. Mills. 1971. Protection of dietary polyunsaturated fatty acids against microbial hydrogenation in ruminants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 48:358–364. doi:10.1007/BF02890762.
- Secchiari, P., M. Antongiovanni, M. Mele, A. Serra, A. Buccioni, G. Ferruzzi, F. Paoletti, and F. Petacchi. 2003. Effect of kind of dietary fat on the quality of milk fat from Italian Friesian cows. *Livestock Production Science*. 83:43–52. doi:10.1016/S0301-6226(03)00043-5.

- Shingfield, K.J., C.K. Reynolds, G. Hervás, J.M. Griinari, a S. Grandison, and D.E. Beever. 2006. Examination of the persistency of milk fatty acid composition responses to fish oil and sunflower oil in the diet of dairy cows. *Journal of dairy science*. 89:714–32. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72134-8.
- Simopoulos, A.. 2002. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 56:365–379. doi:10.1016/S0753-3322(02)00253-6.
- Skaar, T.C., and R.R. Grummer. 1989. Distribution of lipid in hepatic tissue of dairy goats in positive and negative energy balance. *Zentralblatt fur Veterinarmedizin Reihe A*. 36:555–558.
- Smedman, A., S. Basu, S. Jovinge, G.N. Fredrikson, and B. Vessby. 2005. Conjugated linoleic acid increased C-reactive protein in human subjects. *The British journal of nutrition*. 94:791–795.
- Smit, L.A., A. Baylin, and H. Campos. 2010. Conjugated linoleic acid in adipose tissue and risk of myocardial. *American Journal of Clinical Nutrition*. doi:10.3945/ajcn.2010.29524.
- Solomon, R., L.E. Chase, D. Ben-Ghedalia, and D.E. Bauman. 2000. The effect of nonstructural carbohydrate and addition of full fat extruded soybeans on the concentration of conjugated linoleic acid in the milk fat of dairy cows. *Journal of dairy science*. 83:1322–9. doi:10.3168/jds.S0022-0302(00)74998-8.
- Spicer, L.J., E. Alpizar, and S.E. Echterkamp. 1993. Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and(or) insulin-like growth factor I production in vitro. *Journal of Animal Science*. 71:1232–1241.
- Staples, C.R., J.M. Burke, and W.W. Thatcher. 1998. SYMPOSIUM : OPTIMIZING ENERGY NUTRITION FOR REPRODUCING DAIRY COWS Influence of Supplemental Fats on Reproductive Tissues and Performance of Lactating Cows 1. *Journal of Dairy Science*. 81:856–871. doi:10.3168/jds.S0022-0302(98)75644-9.
- Steck, S.E., A.M. Chalecki, P. Miller, J. Conway, G.L. Austin, J.W. Hardin, C.D. Albright, and P. Thuillier. 2007. Conjugated linoleic acid supplementation for twelve weeks increases lean body mass in obese humans. *The Journal of nutrition*. 137:1188–1193.
- Sumida, C., R. Graber, and E. Nunez. 1993. Role of fatty acids in signal transduction: Modulators and messengers. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 48:117–122. doi:10.1016/0952-3278(93)90019-S.
- Sutton, J.D. 1989. Altering Milk Composition by Feeding Metabo " tes. *Journal of Dairy Science*. 72:2801–2814.
- Taylor, C.G., and P. Zahradka. 2004. Dietary conjugated linoleic acid and insulin sensitivity and resistance in rodent models. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 79:1164S–1168S.
- Tholstrup, T., M. Raff, E.M. Straarup, P. Lund, S. Basu, and J.M. Bruun. 2008. An oil mixture with trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid increases markers of inflammation and in vivo lipid peroxidation compared with cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid in postmenopausal women. *The Journal of nutrition*. 138:1445–1451.
- Tilley, S.L., T.M. Coffman, and B.H. Koller. 2001. Prostaglandins and their precursors Mixed messages : modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *Journal of Clinical Investigation*. 108:15–23. doi:10.1172/JCI200113416.Virtually.
- Timmen, H., and S. Patton. 1988. Milk fat globules: Fatty acid composition, size and in vivo regulation of fat liquidity. *Lipids*. 23:685–689. doi:10.1007/BF02535669.
- Toomey, S., H. Roche, D. Fitzgerald, and O. Belton. 2003. Regression of pre-established atherosclerosis in the apoE^{-/-} mouse by conjugated linoleic acid. *Biochemical Society Transactions*. 31:1075–1079.

- Tricon, S., G.C. Burdge, E.L. Jones, J.J. Russell, S. El-Khazen, E. Moretti, W.L. Hall, A.B. Gerry, D.S. Leake, R.F. Grimble, C.M. Williams, P.C. Calder, and P. Yaqoob. 2006. Effects of dairy products naturally enriched with cis-9,trans-11 conjugated linoleic acid on the blood lipid profile in healthy middle-aged men. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 83:744–753.
- Tsuboyama-Kasaoka, N., M. Takahashi, K. Tanemura, H.J. Kim, T. Tange, H. Okuyama, M. Kasai, S. Ikemoto, and O. Ezaki. 2000. Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice. *Diabetes*. 49:1534–1542.
- Ueda, K., a Ferlay, J. Chabrot, J.J. Loo, Y. Chilliard, and M. Doreau. 2003. Effect of linseed oil supplementation on ruminal digestion in dairy cows fed diets with different forage:concentrate ratios. *Journal of dairy science*. 86:3999–4007. doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)74011-9.
- Veira, D.M., L.L. Charmley, E. Charmley, and a. J. Lee. 2001. The effect of feeding soybean oil to mid-lactation dairy cows on milk production and composition and on diet digestion. *Canadian Journal of Animal Science*. 81:425–428. doi:10.4141/A01-016.
- Vernon, R.G., and D.J. Flint. 2007. Lipid Metabolism in Farm Animals. *Proceedings of the Nutrition Society*. 47:287–293. doi:10.1079/PNS19880046.
- Villavecchia, V., and G. Eigenmann. 1975. Nuovo Dizionario Di Merceologia E Chimica Applicata 5.
- Voorrips, L.E., H.A.M. Brants, A.F.M. Kardinaal, G.J. Hiddink, P.A. Van Den Brandt, and R.A. Goldbohm. 2002. Intake of conjugated linoleic acid, fat, and other fatty acids in relation to postmenopausal breast cancer: the Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 76:873–882.
- Wanders, A.J., I.A. Brouwer, E. Siebelink, and M.B. Katan. 2010. Effect of a High Intake of Conjugated Linoleic Acid on Lipoprotein Levels in Healthy Human Subjects. *PLoS ONE*. 5:7.
- Watkins, B.A., and M.F. Seifert. 2000. Conjugated linoleic acid and bone biology. *Journal of the American College of Nutrition*. 19:478S–486S.
- Watras, A.C., A.C. Buchholz, R.N. Close, Z. Zhang, and D.A. Schoeller. 2007. The role of conjugated linoleic acid in reducing body fat and preventing holiday weight gain. *International journal of obesity 2005*. 31:481–487.
- Weldon, S., S. Mitchell, D. Kelleher, M.J. Gibney, and H.M. Roche. 2004. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis: no effect on molecular markers of cholesterol homeostasis in THP-1 macrophages. *Atherosclerosis*. 174:261–273.
- Whigham, L.D., E.B. Cook, J.L. Stahl, R. Saban, D.E. Bjorling, M.W. Pariza, and M.E. Cook. 2001. CLA reduces antigen-induced histamine and PGE2 release from sensitized guinea pig tracheae. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*. 280:R908–912.
- Whigham, L.D., A.C. Watras, and D.A. Schoeller. 2007. Efficacy of conjugated linoleic acid for reducing fat mass: a meta-analysis in humans. *The American journal of clinical nutrition*. 85:1203–11.
- Whitlock, L. a, D.J. Schingoethe, a R. Hippen, K.F. Kalscheur, R.J. Baer, N. Ramaswamy, and K.M. Kasperson. 2002. Fish oil and extruded soybeans fed in combination increase conjugated linoleic acids in milk of dairy cows more than when fed separately. *Journal of dairy science*. 85:234–43. doi:10.3168/jds.S0022-0302(02)74072-1.
- Wistuba, T.J., E.B. Kegley, and J.K. Apple. 2006. Influence of fish oil in finishing diets on growth performance, carcass characteristics, and sensory evaluation of cattle. *Journal of animal science*. 84:902–9.
- Yamasaki, M., K. Kishihara, K. Mansho, Y. Ogino, M. Kasai, M. Sugano, H. Tachibana, and K. Yamada. 2000. Dietary conjugated linoleic acid increases immunoglobulin productivity of Sprague-Dawley rat spleen lymphocytes. *Bioscience biotechnology and biochemistry*. 64:2159–2164.

Yasui, Y., R. Suzuki, H. Kohno, S. Miyamoto, F. Beppu, M. Hosokawa, K. Miyashita, and T. Tanaka. 2007. 9trans,11trans conjugated linoleic acid inhibits the development of azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. *Nutrition and Cancer*. 59:82–91.

Yu, Y., P.H. Correll, and J.P. Vanden Heuvel. 2002. Conjugated linoleic acid decreases production of pro-inflammatory products in macrophages: evidence for a PPAR gamma-dependent mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1581:89–99.