

cooperativa agricola di servizi

cooperlatte



nel regno del Mugello con Mukki

***Qualificazione e valorizzazione del latte del Mugello
attraverso l'indagine dello spettro NMR***

Progetto cofinanziato dalla Camera di Commercio di Firenze per le attività promozionali nel settore agricoltura/zootecnico 2013

Claudio Santucci
CERM, Università di Firenze



FiorGen ONLUS
Fondazione Farmacogenomica

Raccolta dei campioni



LUNEDI'

- 10 campioni di latte crudo provenienti dalle aziende aderenti a CooperLatte;
- 2 campioni di latte crudo di tank AQM e AQM-BIO prelevato in centrale.



MERCOLEDI'

- 10 campioni di latte crudo provenienti dalle aziende aderenti a CooperLatte;
- 2 campioni di latte crudo di tank AQM e AQM-BIO prelevato in centrale;
- 1 campione di latte pastorizzato intero Mugello;
- 1 campione di latte pastorizzato PS Mugello.

- Analisi di 10 campioni di latte pastorizzato intero di tre marchi in commercio

Totale campioni raccolti ed analizzati

***Campioni aziende
CooperLatte***

200 campioni

***Campioni di tank
AQM e AQM-BIO***

40 campioni

***Campioni di latte in
commercio***

60 campioni

***Campioni di latte
pastorizzato INTERO***

11 campioni

***Campioni di latte
pastorizzato PS***

9 campioni

Preparazione dei campioni



I campioni, una volta arrivati al CERM, sono conservati a 4°C fino all'analisi.

I campioni di latte vengono poi trattati con diclorometano per permettere la separazione tra fase lipofila ed idrofila che rappresenta quella di nostro interesse.



I campioni vengono poi inseriti all'interno del tubo NMR per poi procedere con l'analisi strumentale.

Acquisizione degli spettri NMR



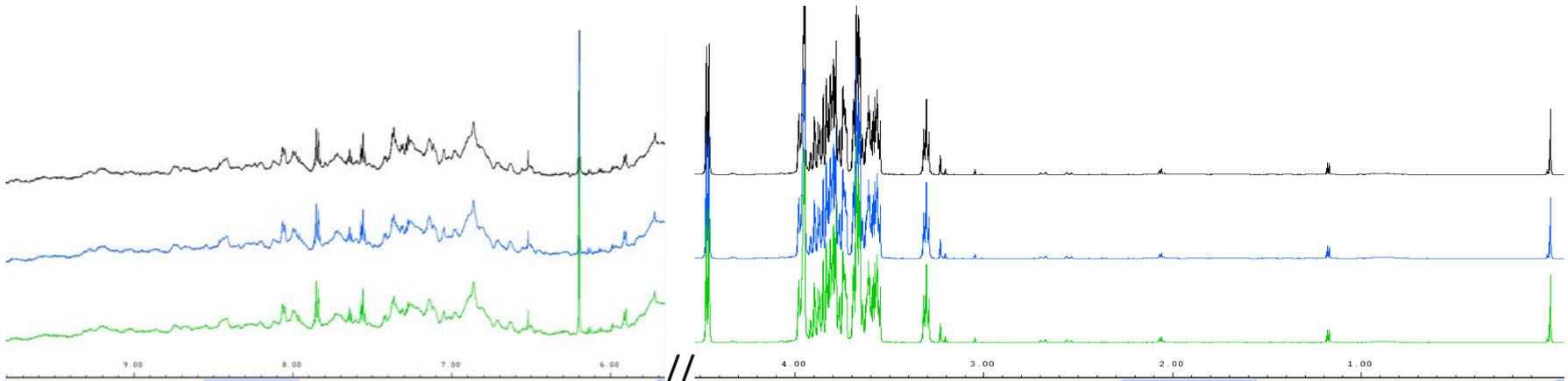
Un auto-campionatore ci permette di lavorare in modo automatizzato con molti campioni.

~30 min a campione ca.

NMR-based Metabolomics



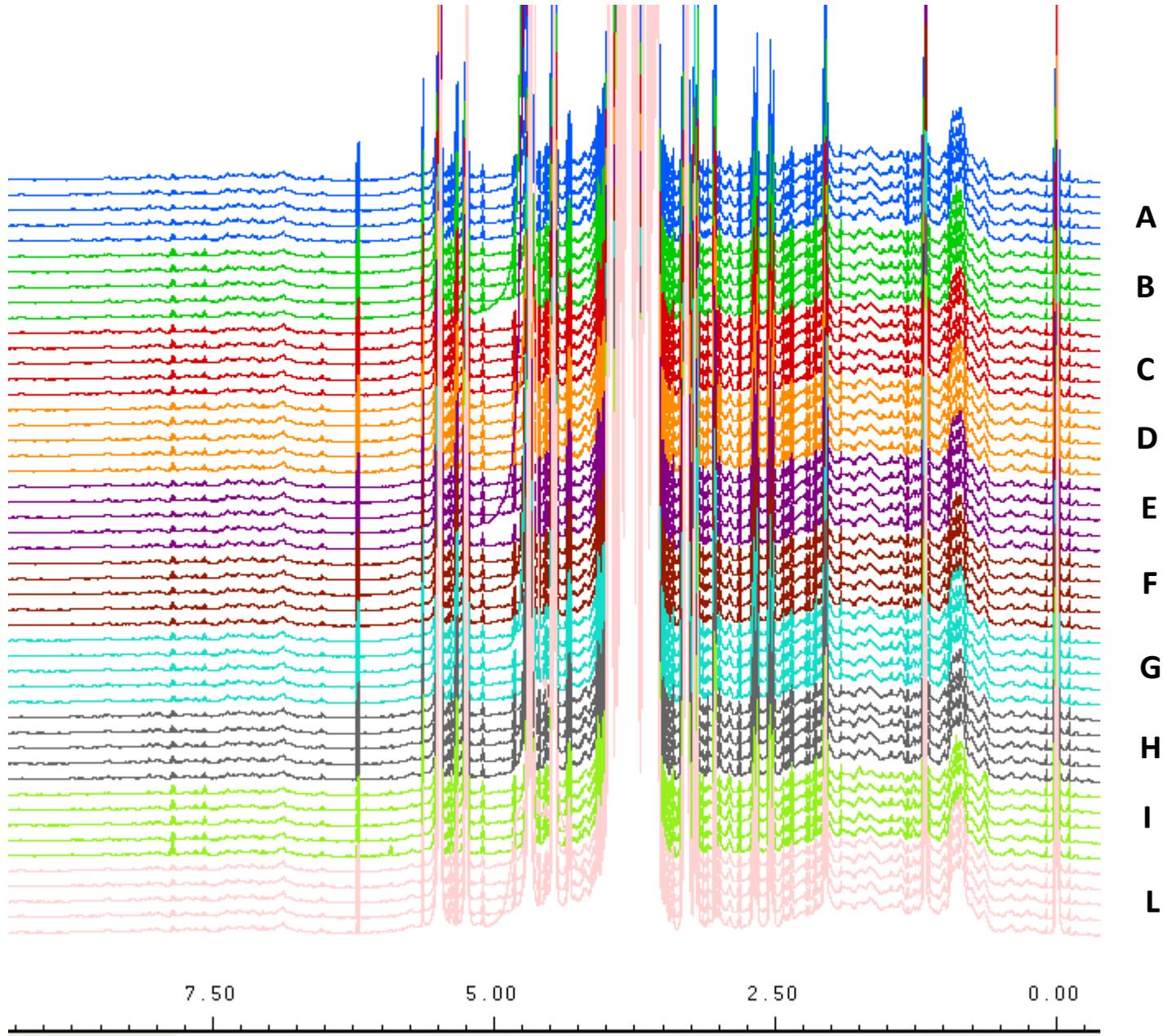
Metabolic fingerprint
(impronta digitale)



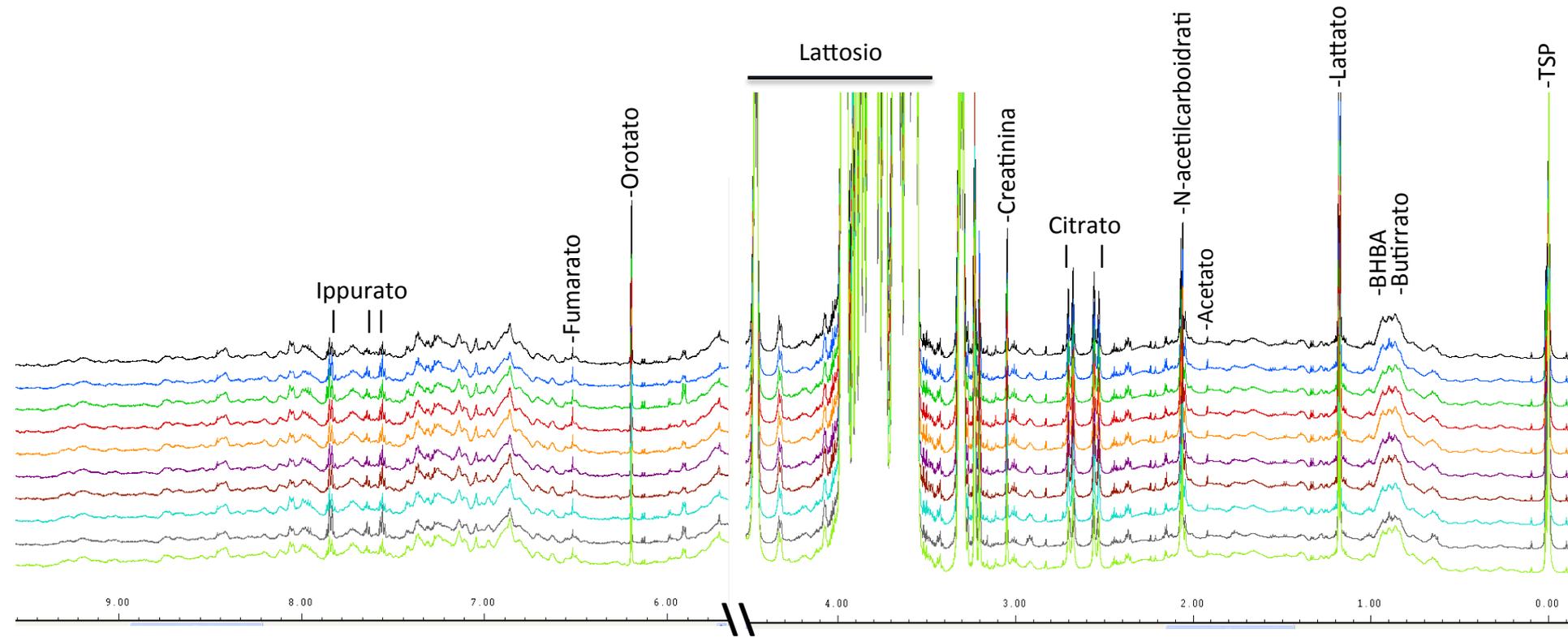
ANALISI DEGLI SPETTRI NMR

Confronto tra le stalle

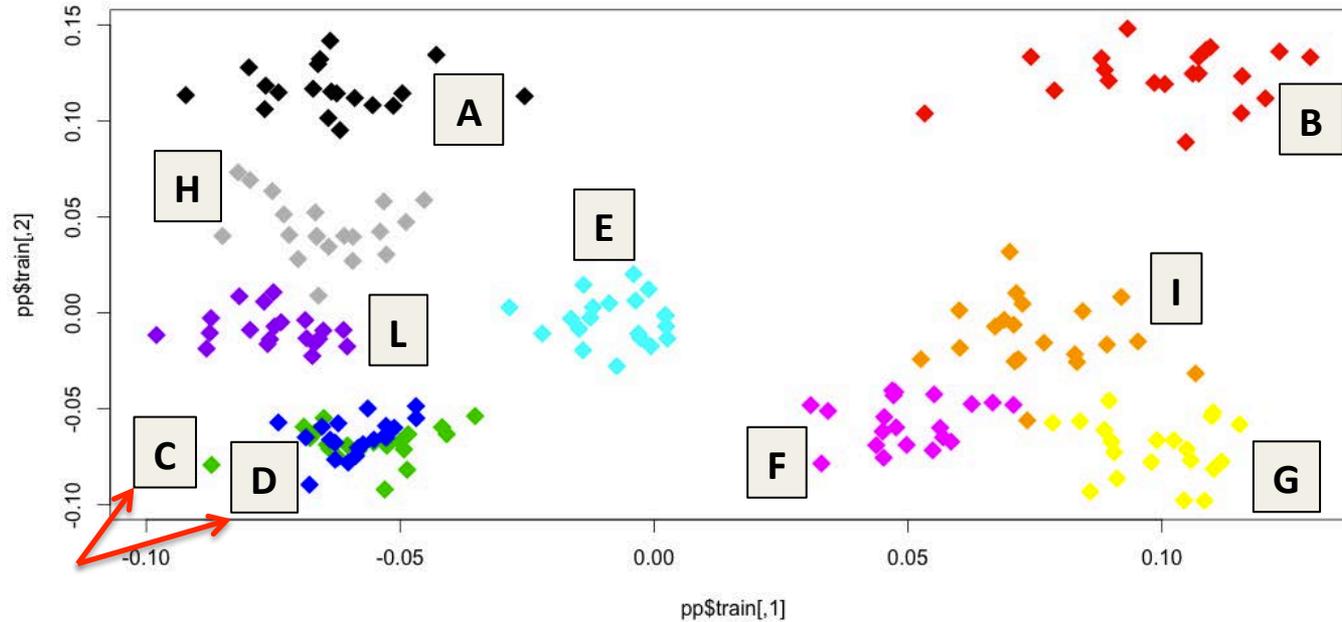
Spettri NMR



Spettri NMR



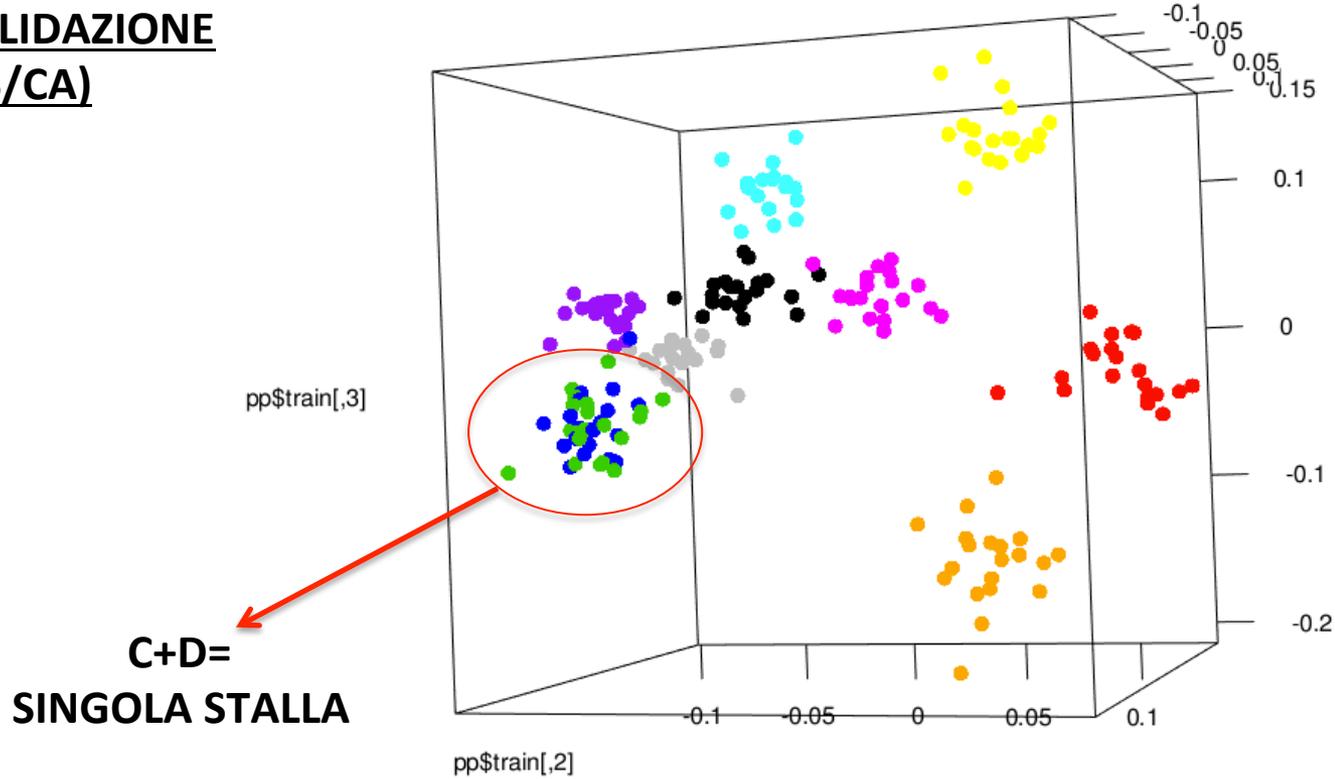
CROSS-VALIDAZIONE (PLS/CA)



%	A	B	C	D	E	F	G	H	I	L
A	100	0.0	0.0	0.0	0	0	0	0.0	0	0.0
B	0	95.2	0.0	0.0	3	0	0	1.8	0	0.0
C	0	0.0	10.2	89.8	0	0	0	0.0	0	0.0
D	0	0.0	79.2	20.8	0	0	0	0.0	0	0.0
E	0	0.0	0.0	0.0	100	0	0	0.0	0	0.0
F	0	0.0	0.0	0.0	0	100	0	0.0	0	0.0
G	0	0.0	0.0	0.0	0	0	100	0.0	0	0.0
H	0	0.0	0.0	0.0	0	0	0	100.0	0	0.0
I	0	0.0	0.0	0.0	0	0	0	9.0	91	0.0
L	0	0.0	0.0	1.2	0	0	0	0.0	0	98.8

ACCURATEZZA 82,2%

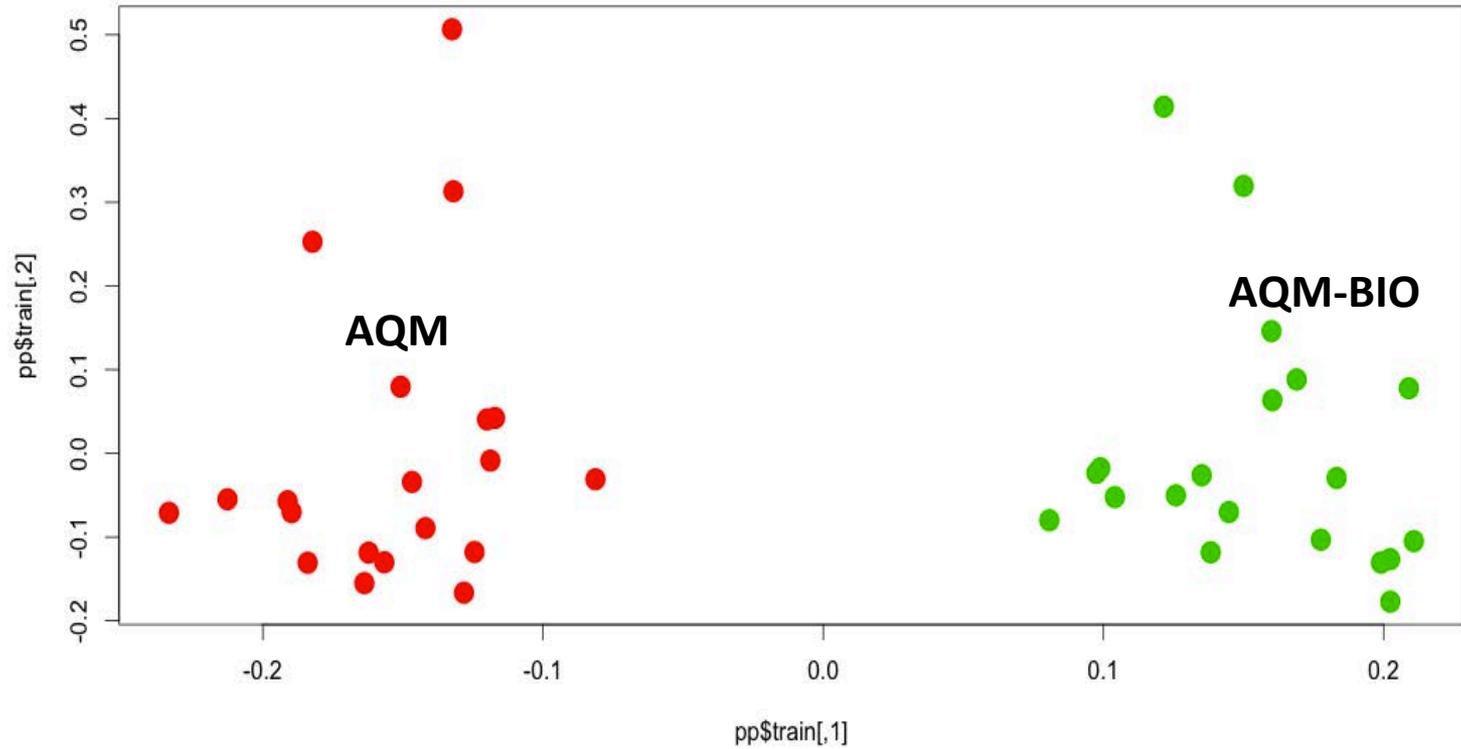
CROSS-VALIDAZIONE (PLS/CA)



%	A	B	C+D	E	F	G	H	I	L
A	95	0	0	0.0	0	0.0	5.0	0.0	0
B	0	89	0	10.0	0	0.0	1.0	0.0	0
C+D	0	0	100	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0
E	0	0	0	100.0	0	0.0	0.0	0.0	0
F	0	0	0	0.0	100	0.0	0.0	0.0	0
G	0	0	0	0.7	0	99.3	0.0	0.0	0
H	0	0	0	0.0	0	0.0	100.0	0.0	0
I	0	0	0	0.0	0	0.0	7.1	92.9	0
L	0	0	0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	100

Confronto tra le tank AQM e AQM-BIO

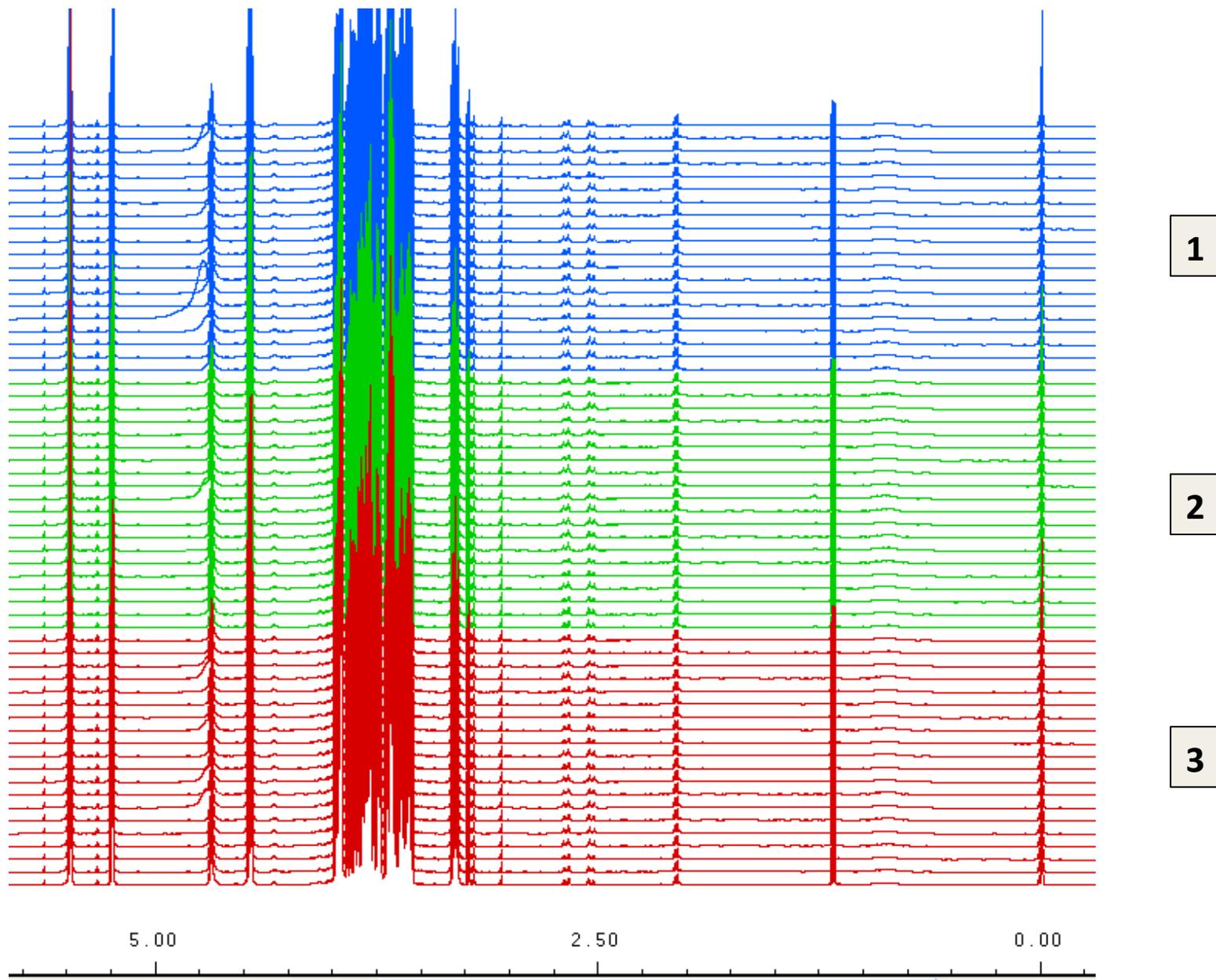
CROSS-VALIDAZIONE (PLS/CA)



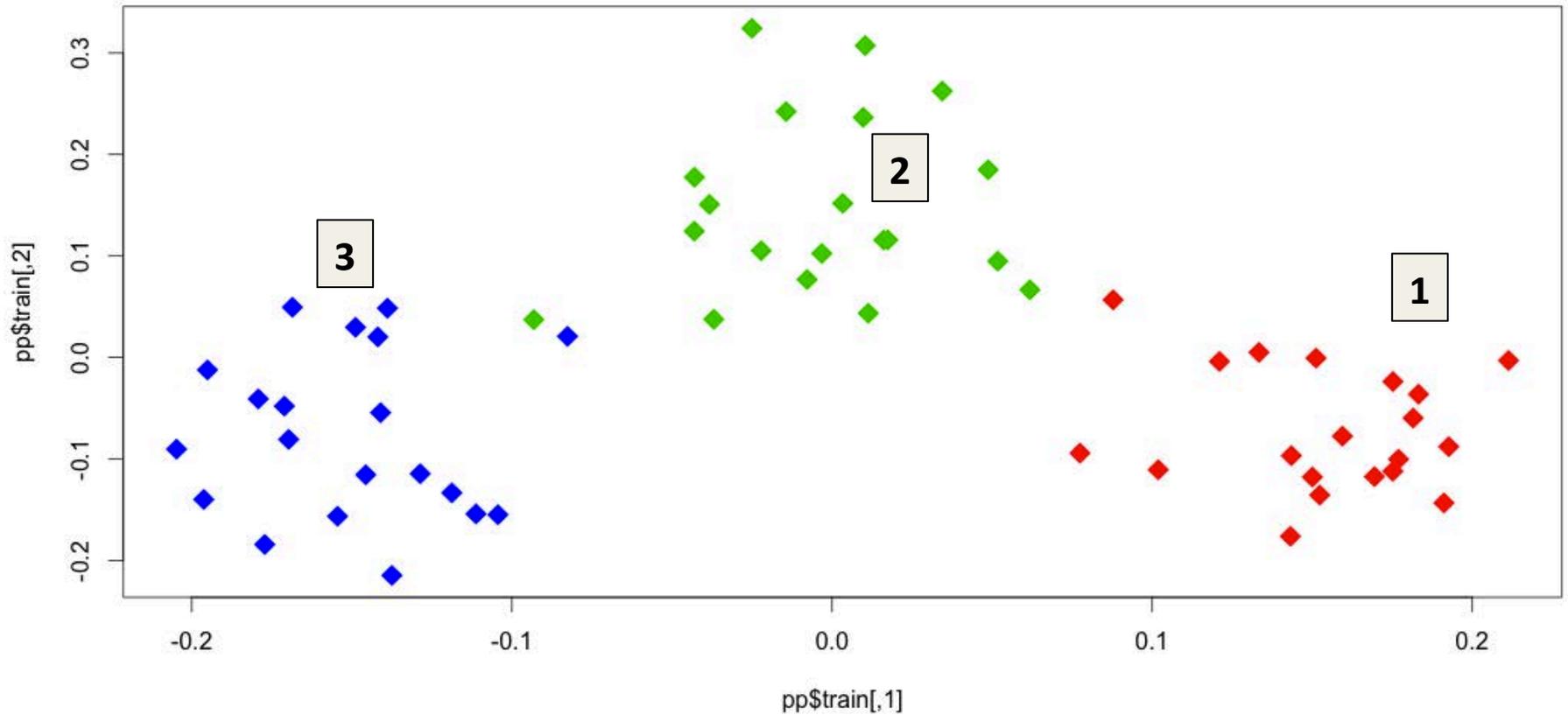
%	AQM	AQM- BIO
AQM	98.1	1.9
AQM- BIO	0	100

ACCURATEZZA 99%

Confronto tra latte pastorizzato intero presente in commercio



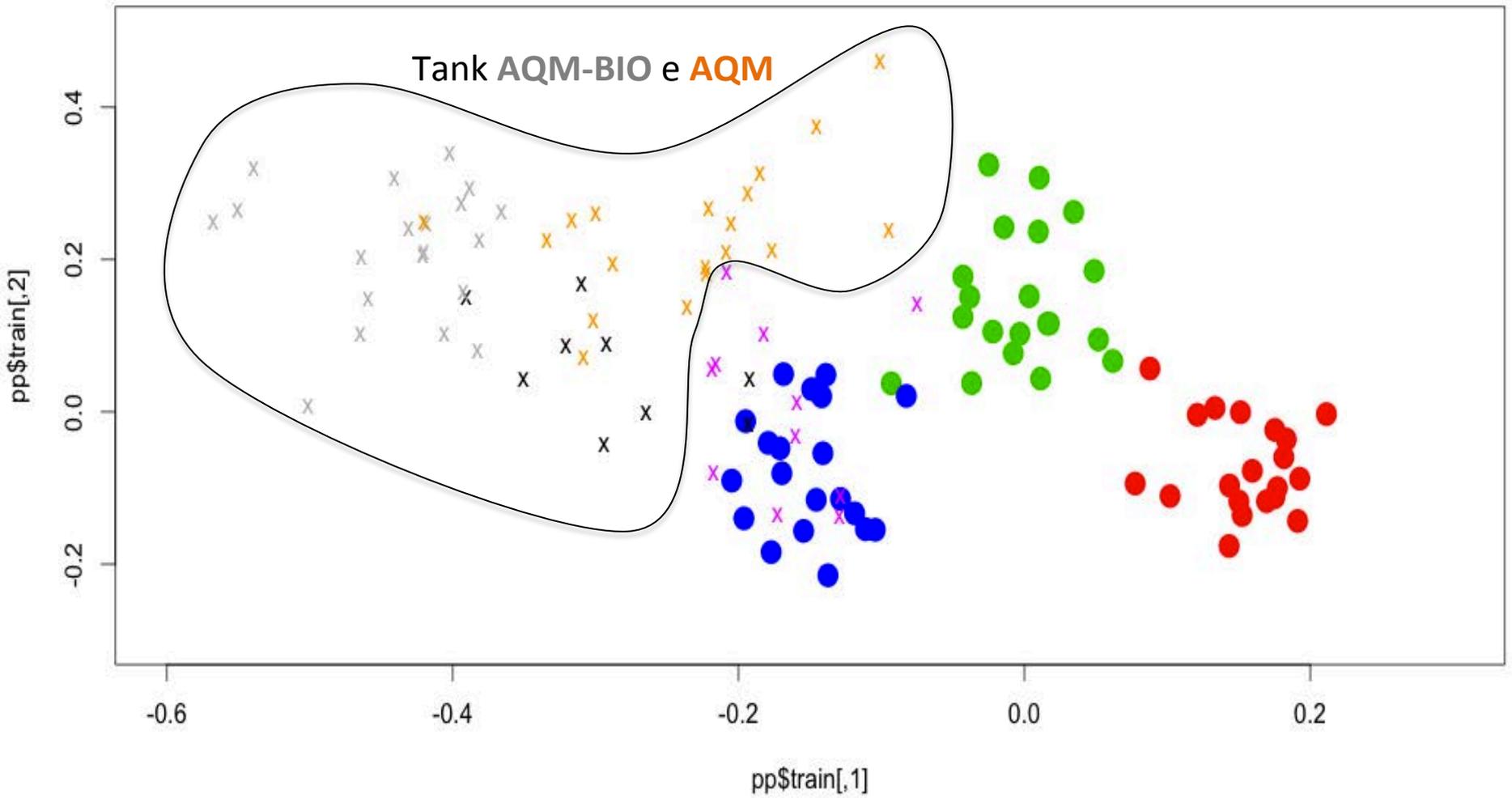
CROSS-VALIDAZIONE (PLS/CA)



%	1	2	3
1	95.9	4.1	0.0
2	8.0	90.2	1.8
3	0.0	3.3	96.7

ACCURATEZZA 94%

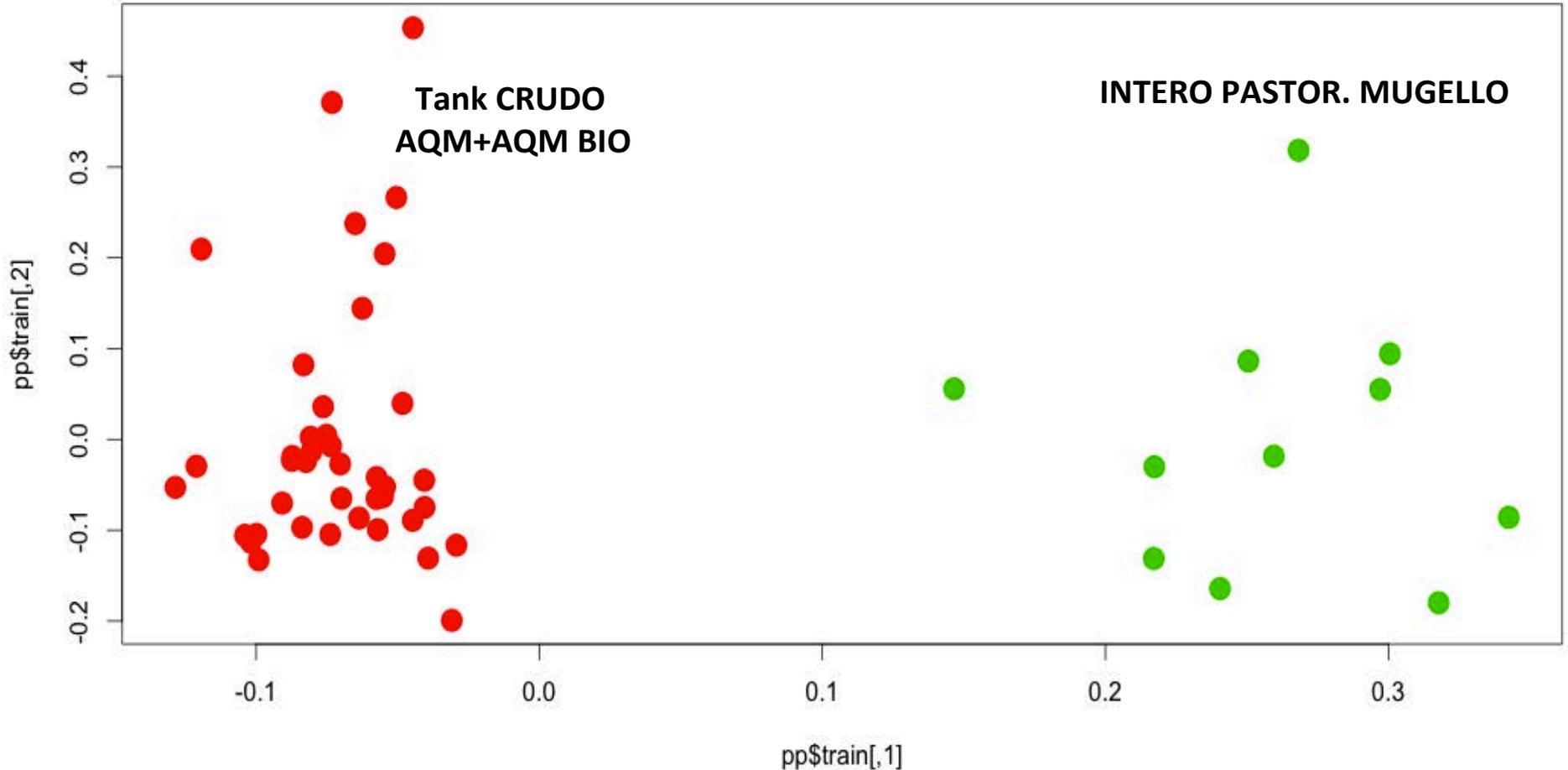
Proiezione dei campioni di latte di TANK AQM e AQM-BIO



Valutazione passaggi produttivi

CROSS-VALIDAZIONE (PLS/CA)

Tank latte AQM+AQM-BIO vs. Latte INTERO PASTORIZZATO MUGELLO della CENTRALE del LATTE



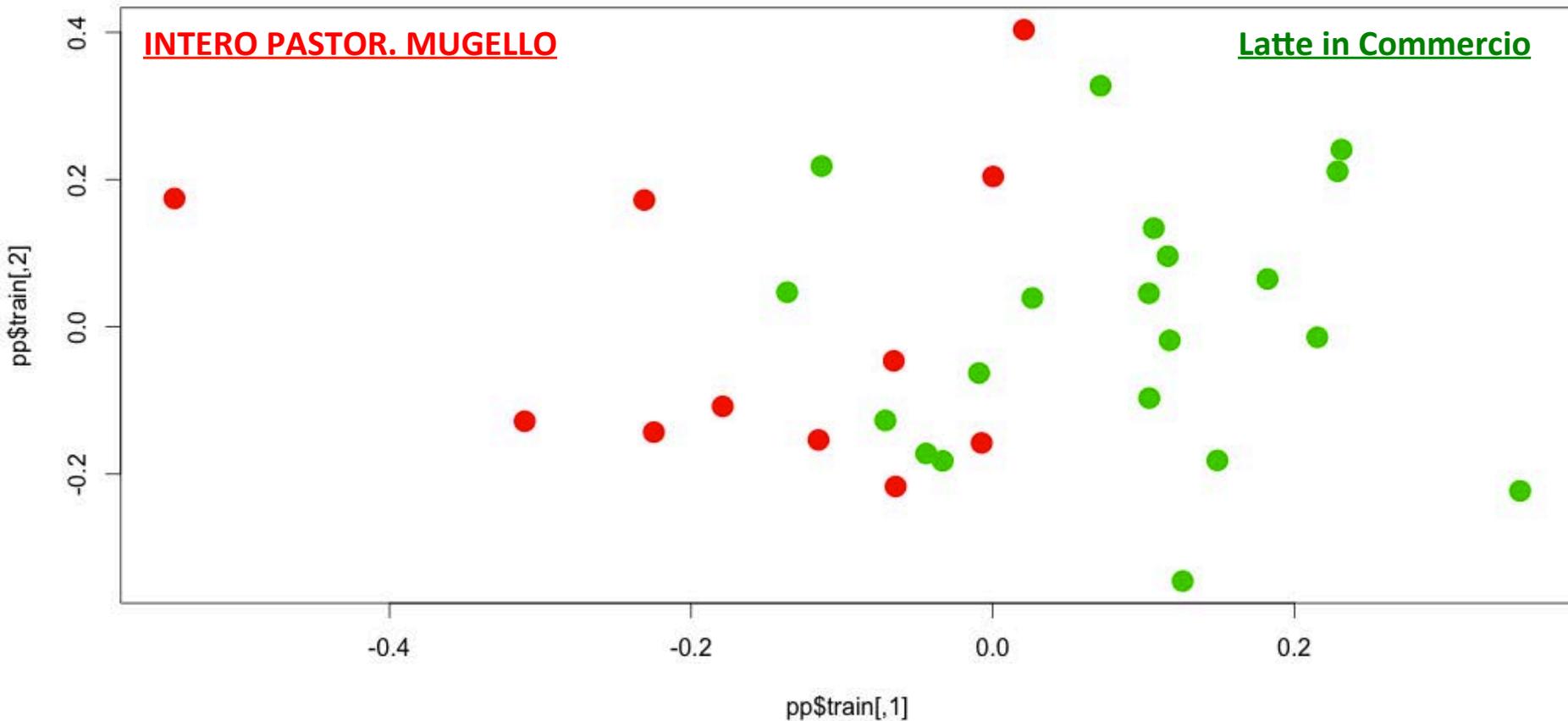
%	Tank	Intero Past. Centrale
Tank	100	0
Intero Past. Centrale	3.7	96.3

ACCURATEZZA 99%

Valutazione dei passaggi produttivi: Latte crudo vs. Latte pastorizzato della centrale

CROSS-VALIDAZIONE (PLS/CA)

Latte INTERO PASTORIZZATO MUGELLO della CENTRALE del LATTE vs. Latte in commercio



%	Intero Past. Centrale	Latte in commercio
Intero Past. Centrale	18.1	81.9
Latte in commercio	40.8	59.2

ACCURATEZZA 44,65%

CONCLUSIONI (1)

- **Attraverso l'analisi del profilo metabolico dei campioni di latte siamo in grado di identificare con un'elevata accuratezza i campioni provenienti dalle singole stalle, i campioni di latte di tank AQM e AQM-BIO e i campioni di ognuna delle tre marche commerciali.**
- I campioni di LATTE FRESCO PASTORIZZATO MUGELLO INTERO raccolti in centrale hanno un profilo metabolico sovrapponibile a quello dei campioni di latte presente in commercio.
- E' stata evidenziata una netta differenza, dovuta al processo di pastorizzazione, tra il latte di tank e latte PASTORIZZATO MUGELLO INTERO. Tale differenza non si evidenzia tra il latte pastorizzato intero campionato in centrale e il latte in commercio.

CORRELAZIONE TRA SPETTRI E INDAGINI DI LABORATORIO

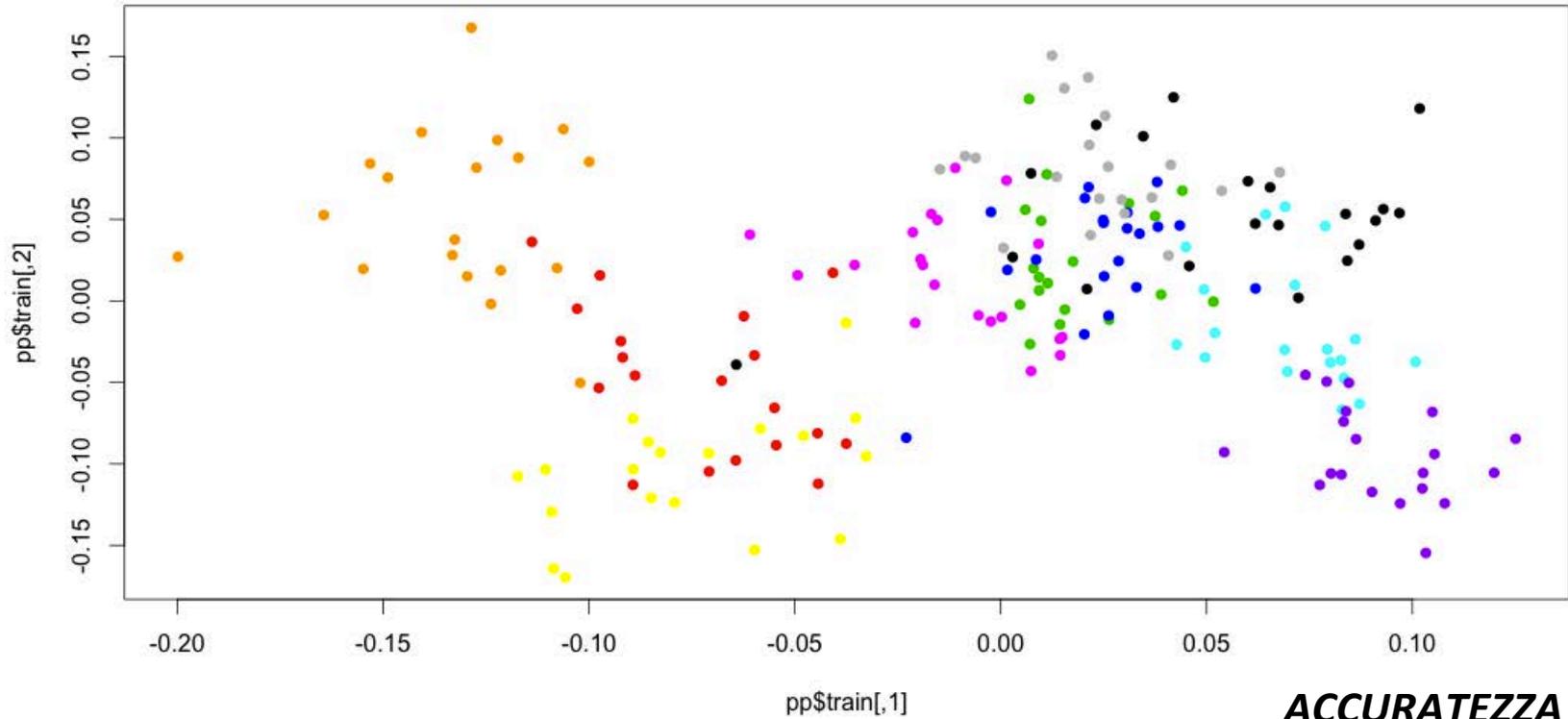
Parametri di laboratorio

- **C.M.T. (ufc/ml) – carica microbica totale** (mesofila aerobia), misurata come unità formanti colonie per unità di volume, espressione della qualità igienica del latte
- **C.S. (n/ml) - Cellule Somatiche**, conta delle cellule per ml di latte, espressione della qualità sanitaria del latte

Parametri collegati alle caratteristiche chimico-fisiche del latte:

- **Gr% (% m/m) – Grasso**, misurato come peso su peso (g di grasso/100 g di latte)
- **Pr% (% m/m) – Proteine**, misurata come peso su peso (g di proteina/100 g di latte)
- **La% (% m/m) – Lattosio**, misurato come peso su peso (g di lattosio/100 g di latte)
- **RSM% (g/100g) – Residuo secco magro**, g di residuo secco magro/100 g di latte
- **PC (°C) – Punto di congelamento** (temperatura alla quale si raggiunge il congelamento del latte, volto al rilevamento di acqua nel latte)
- **Urea (% m/m) – Urea**, misurata come peso su peso (g di urea/100 g di latte)

CROSS-VALIDAZIONE (PLS/CA) - Dati di laboratorio di ogni singola stalla

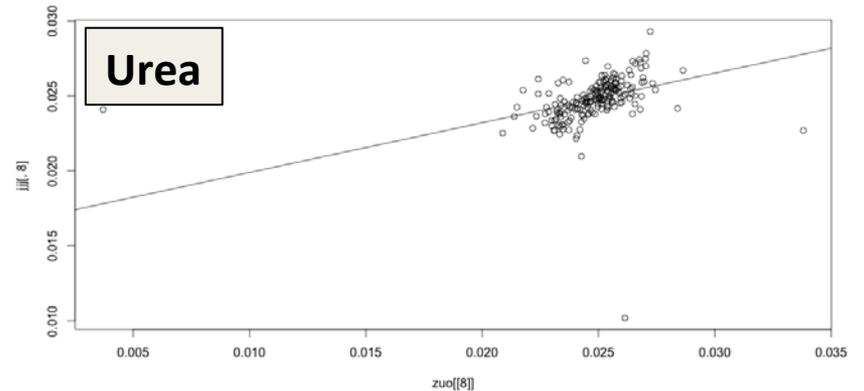
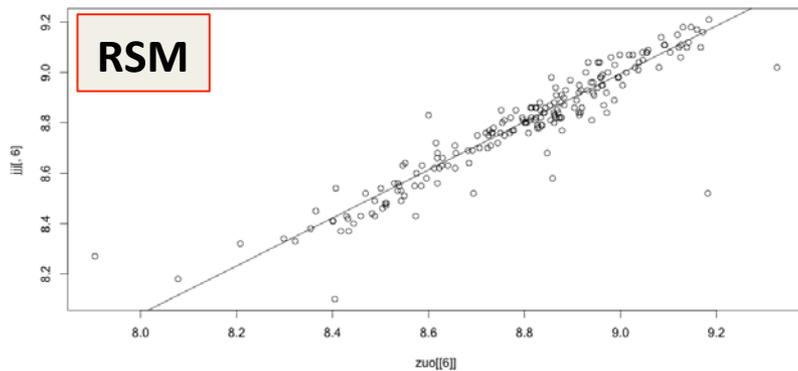
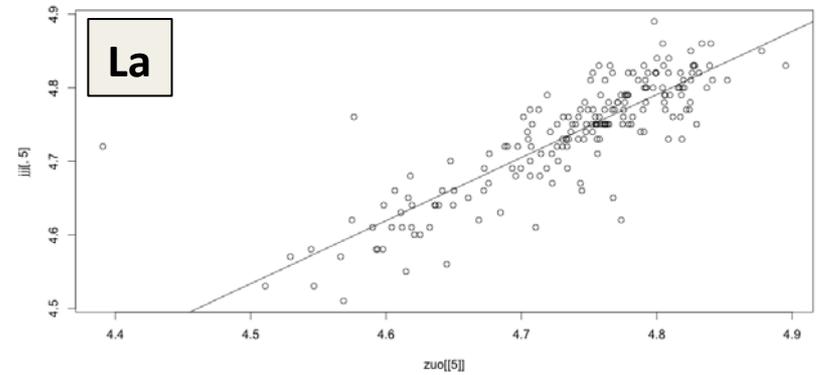
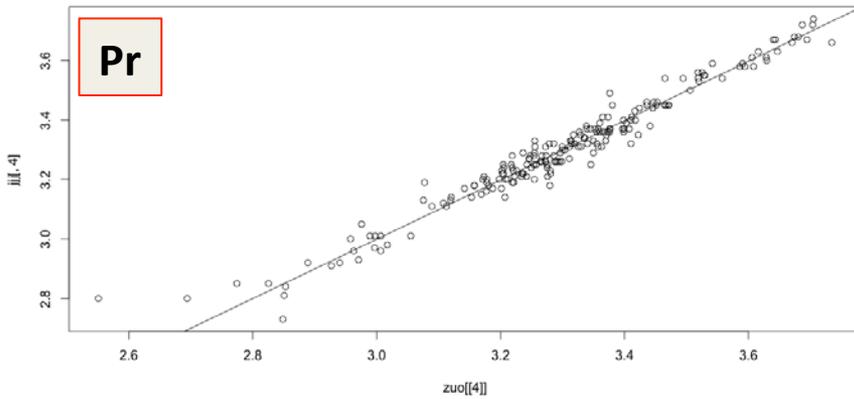
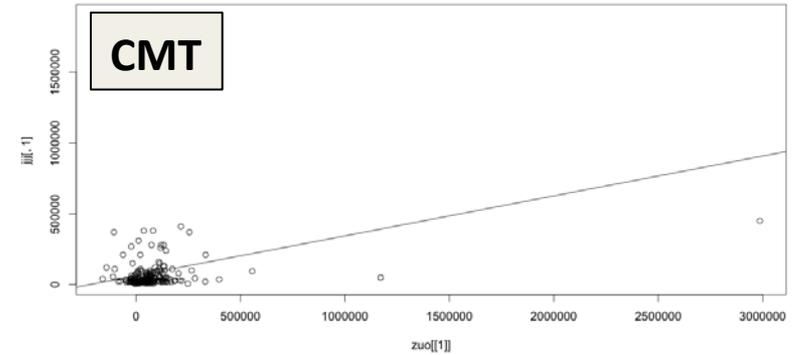


ACCURATEZZA 61%

%	A	B	C	D	E	F	G	H	I	L
A	69.3	2.7	5.0	3.4	0.9	0.0	2.6	15.2	0.9	0.0
B	0.0	78.7	0.0	0.0	0.0	6.8	13.6	0.0	0.9	0.0
C	8.7	0.0	12.7	41.0	0.0	29.7	0.0	8.0	0.0	0.0
D	1.2	0.0	51.9	20.7	3.7	17.9	2.8	1.9	0.0	0.0
E	5.4	0.0	8.3	7.0	71.3	0.0	0.0	0.0	0.0	8.0
F	1.4	0.0	22.8	18.5	0.0	46.6	7.6	0.0	3.1	0.0
G	0.0	10.6	0.0	0.0	0.0	6.1	83.3	0.0	0.0	0.0
H	12.8	0.0	5.6	7.8	0.0	7.5	0.0	66.4	0.0	0.0
I	1.8	12.0	0.0	0.0	0.0	5.2	1.8	3.6	75.7	0.0
L	0.0	0.0	0.0	0.0	9.8	0.0	0.0	0.0	0.0	90.2

Correlazioni – Spettri vs. Dati laboratorio

	Coeff. Correlazione	p-value
CMT	0.212506315	0.002858561
CS	0.050541736	0.484012852
Gr	-0.014424330	0.842186235
Pr	0.976572315	0.000000000
La	0.749186449	0.000000000
RSM	0.951702793	0.000000000
PC	-0.005146816	0.943071632
Urea	0.164011955	0.021956796



Metaboliti associati ai parametri di laboratorio

Metaboliti	CMT	CS	Gr	Pr	La	RSM	PC	Urea	Note
<i>Lattato</i>									Prodotto da lattobacilli che hanno la funzione di mantenere l'omeostasi
<i>Valina</i>									Fornisce energia alla ghiandola mammaria; fonte di carbonio e azoto utili nella sintesi di amminoacidi non-essenziali
<i>Carnitina</i>									Favorisce la digestione degli acidi grassi. La chetosi bovina provoca aumento dei livelli di carnitina.
<i>Colina</i>									Aumento produzione del latte
<i>N-acetilglucosammina</i>									Aumenta con il tempo di conservazione
<i>N-acetilcisteina</i>									Prevenzione Mastiti
<i>Butirrato</i>									Aumento contenuto di grassi nel latte e diminuzione del lattosio
<i>Lattosio</i>									Principale zucchero del latte
<i>β-Idrossibutirrato</i>									Aumento con la chetosi bovina; indice di chetosi subclinica
<i>Glucosio</i>									Precursore del lattosio
<i>Cis-aconitato</i>									Deriva dal metabolismo del citrato che ha effetti sulla produzione del latte.

CONCLUSIONI (2)

- Tramite i dati di laboratorio, le 10 stalle sono distinguibili con una accuratezza pari al 61%. Questo dimostra come l'analisi del profilo metabolico può fornire dati più accurati sulle singole stalle.
- Correlando i parametri di laboratorio con i dati derivanti dagli spettri NMR è possibile osservare una ottima correlazione nonché significativa con % di proteine (Pr) e residuo secco magro (RSM).
- Vengono evidenziate altre correlazioni significative con CMT, La e Urea ma queste correlazioni non sono molto "forti".
- E' possibile evidenziare i metaboliti che maggiormente contribuiscono alla correlazione: Carnitina, N-acetilcisteina e lattosio correlano principalmente con la % di proteine, mentre N-acetilcisteina, lattosio e glucosio correlano maggiormente con RSM.

CORRELAZIONE TRA SPETTRI E RAZIONI ALIMENTARI

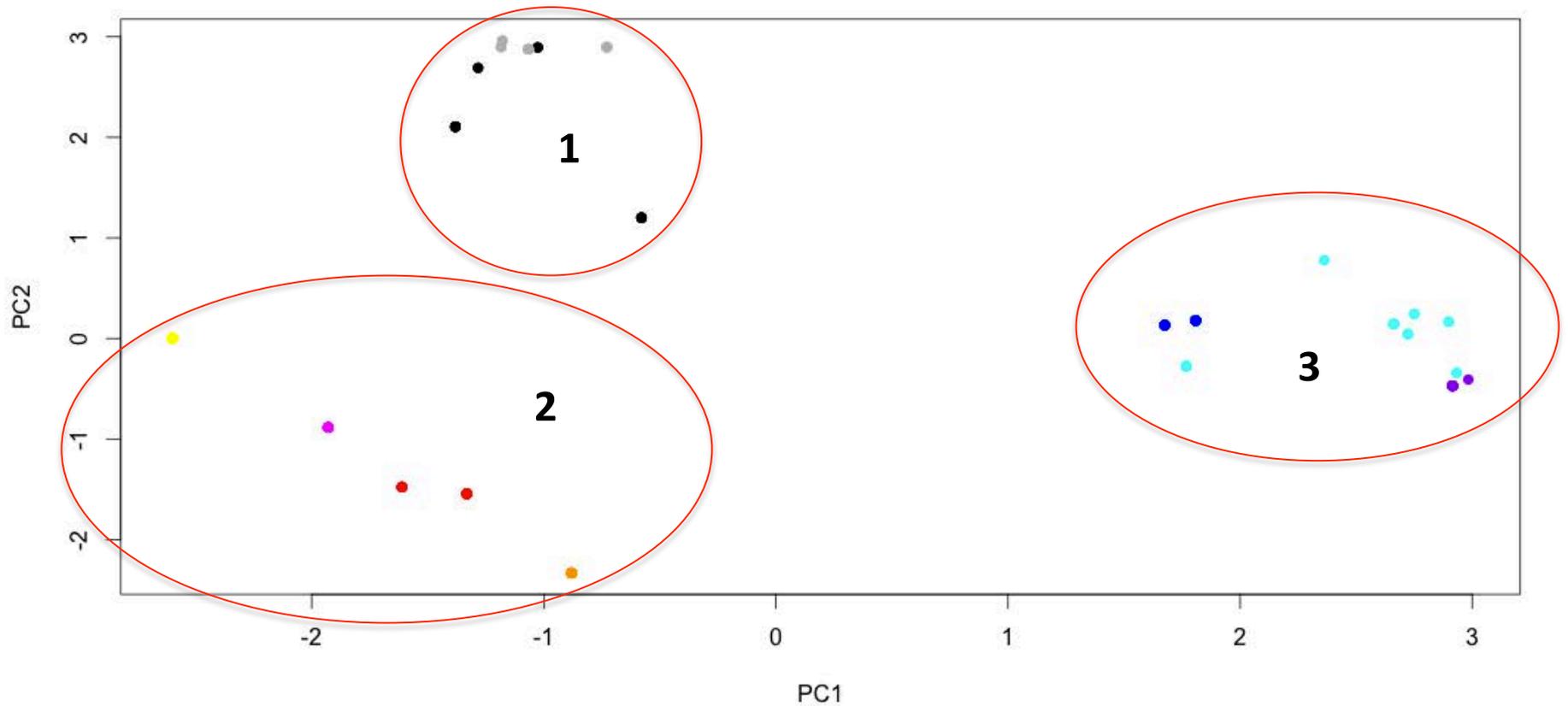
Raggruppamento componenti dell'alimentazione

Insilati	Fieni fasciati	Fieni secchi	Farine di leguminose e alimenti proteici	Farine di cereali ed alimenti energetici	Integratori proteici	integratori energetici	Integratori Sali minerali e vitamine
Insilato di mais	Fasciato di 1° taglio	Fieno di medica	Favino	Mais	Integratore bioforce37 (N)	Integratore starch	Sali
Insilato di grano	Fasciato di loietto	Fieno di I taglio	Pisello	Orzo	Integratore bioforce25 (N)	Integratore biostarch	"Premix Poggiale" - integratore sali
Insilato di sorgo	Fasciato di medica	Fieno polifita	Soia proteica	Triticale	Nucleo proteico		mangime complementare "Amberex B feed" (vitamine, pro-vitamine, lieviti essiccati)
Insilato di erbaio di sorgo	Fasciato di triticale	Fieno di loietto	Soia integrale	Grano	Nucleo proteico "PFextra31"		Tasco powermin (mangime minerale)
Insilato di triticale	Fasciato di erbaio misto leguminose e graminacee	Fieno di erbai misti di leguminose e graminacee	Farina di estrazione di soia	Avena			
Insilato di erbai misti cereali e leguminose			Farina di estrazione di colza	Tritello			
			Farina di estrazione di	Crusca			

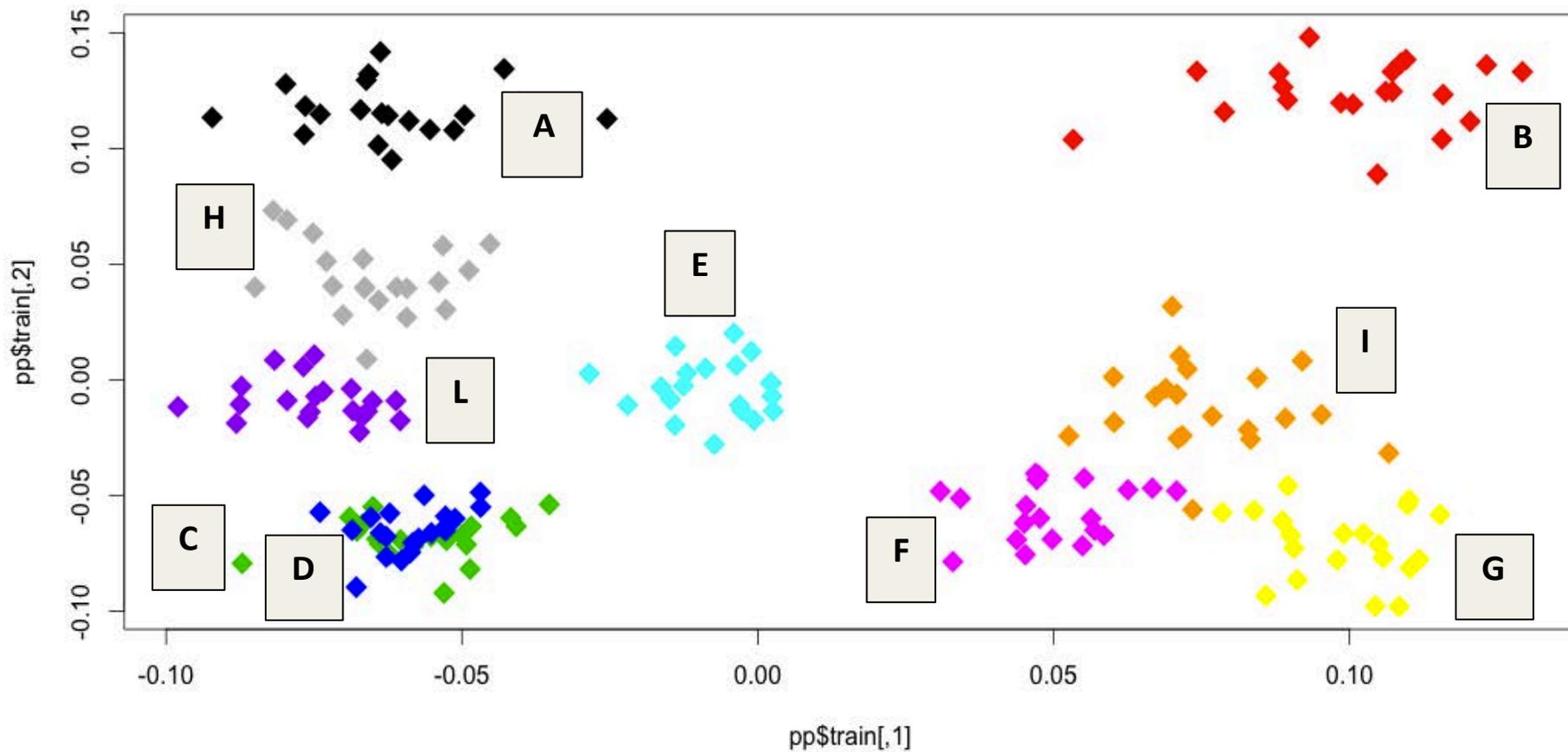
(Kg/bovina in lattazione)

Distribuzione delle stalle in base alle razioni alimentari

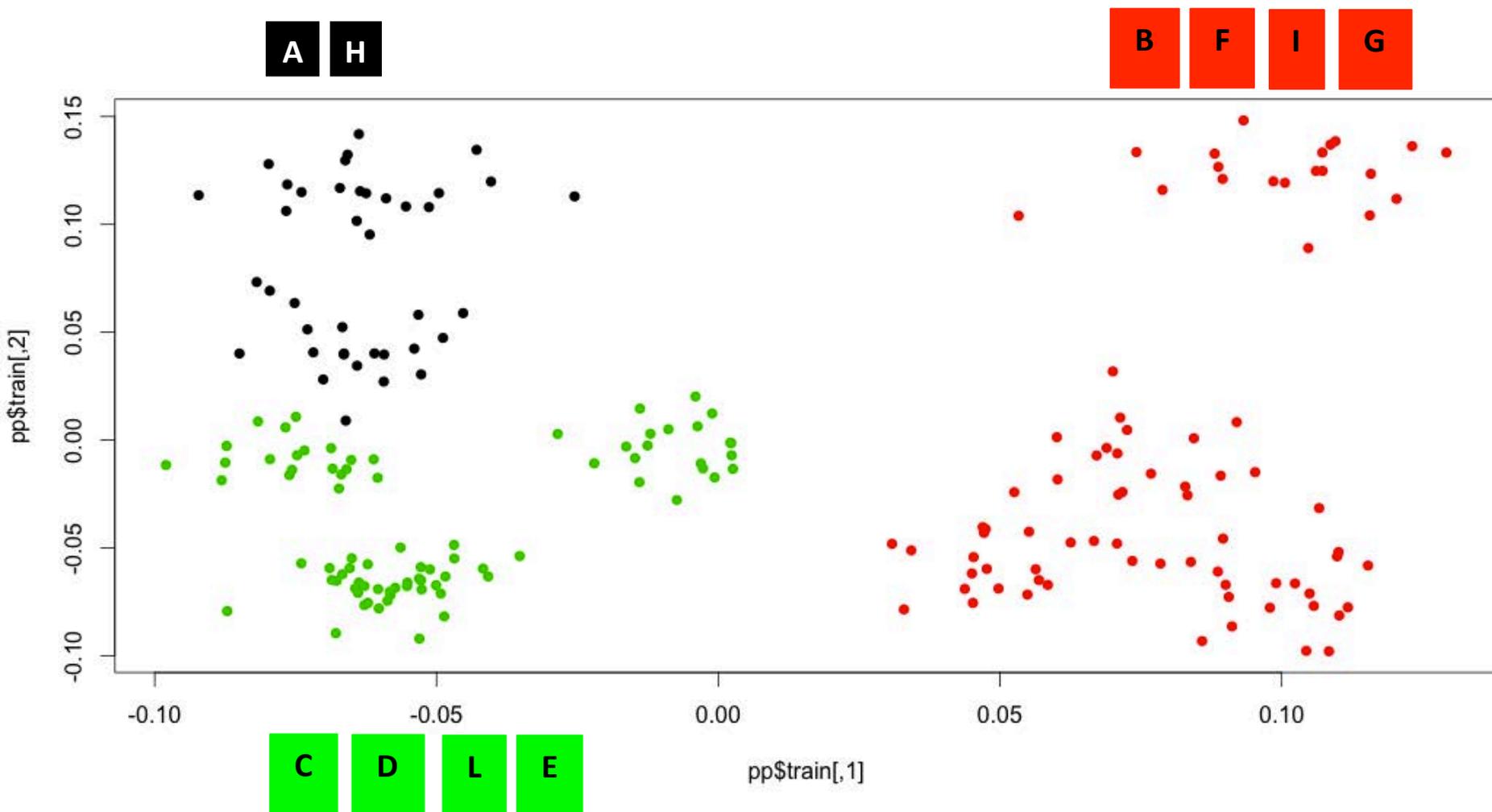
Analisi delle componenti principali (PCA)



La distribuzione delle stalle secondo gli spettri...



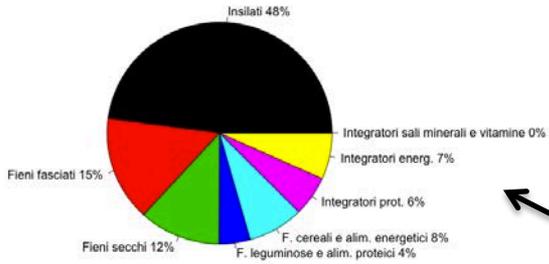
La distribuzione dei gruppi alimentari secondo gli spettri...



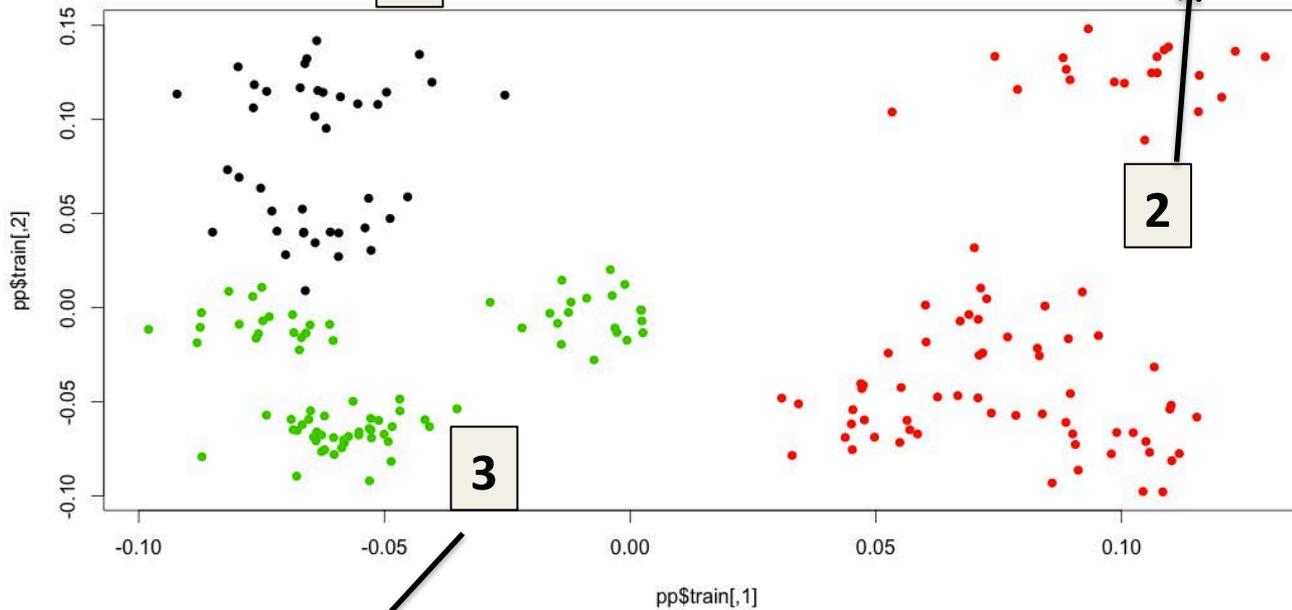
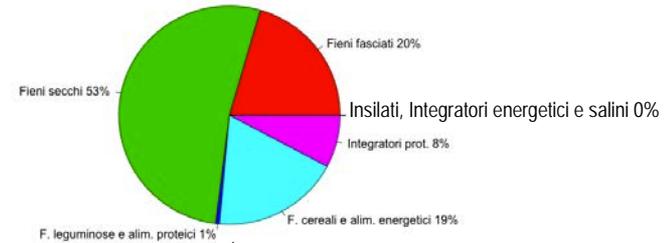
ALIMENTO-TIPI

Alimento-tipi

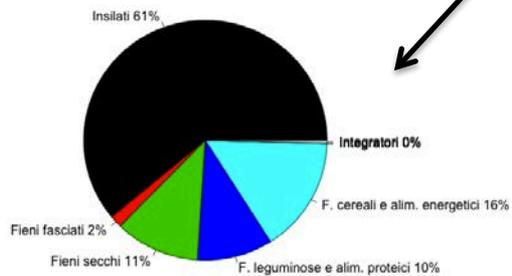
Gruppo 1



Gruppo 2



Gruppo 3



Correlazione tra dati alimentari e spettri

Alimenti	Metaboliti	Coeff. Correlazione
INSILATI	3-metilistidina, Malonato	0.81
FIENI FASCIATI	Orotato, Etanolamina Glutammato	0.39
FIENI SECCHI	Lattosio	0.51
FAR. LEGUMINOSE E ALIMENTI PROTEICI	3-metilistidina, Malonato	0.79
FAR. CEREALI E ALIMENTI ENERGETICI	Ippurato, Cis-aconitato	0.53
INTEGRATORI PROTEICI	Orotato, Galattosio, N- acetilglucosamina	0.34
INTEGRATORI ENERGETICI	3-metilistidina, Carnitina, Malonato	0.29
INTEGRATORI SALI MINERALI E VITAMINE	Acetato, Glutammato	0.65

CONCLUSIONI (3)

- L'analisi delle razioni alimentari ci ha permesso di suddividere le 10 stalle in 3 gruppi con 3 diversi profili alimentari.
- Questi 3 gruppi risultano essere ben identificabili nel grafico della distribuzione delle stalle ottenuta dall'analisi degli spettri NMR. Ciò va a dimostrare come il profilo metabolico dei campioni di latte analizzato sia influenzato dall'alimentazione delle bovine in lattazione.
- Da ciò possiamo distinguere tre ALIMENTO-TIPI:
 1. Prevalenza di insilati e fieni (fasciati e secchi);
 2. Prevalenza di insilati e farine (leguminose e cereali);
 3. Prevalenza di fieni (fasciati e secchi) e farina di cereali.
- La correlazione tra razioni alimentari e spettri mostra una buona correlazione tra gli insilati e farine di leguminose con 3-metilistidina e malonato e tra gli integratori di sali minerali e vitamine con acetato e glutammato.

RINGRAZIAMENTI

Gruppo di Metabolomica ***CERM***

Prof. Claudio Luchinat
Dott. Leonardo Tenori
Dott.ssa Gianna Scatizzi

CooperLatte Mugello

Valentina Morrocchi
Giacomo Matteucci

Egocreanet

Prof. Paolo Manzelli
Marcello Traversi