

MEMORIA FINAL PROXECTO FEADER 2021-002A

TÍTULO DO PROXECTO: “**PROXECTO LEME (LEITE-METANO ENTÉRICO): NOVAS TECNOLOXÍAS PARA A ESTIMACIÓN DAS EMISIÓN ENTÉRICAS DE METANO EN VACAS DE LEITE**”

DESENVOLVEMENTO CIENTIFICO-TÉCNICO E RESULTADOS DO PROXECTO

PARTE 1ª

Revisión e aplicación do estado da arte acerca da estimación da emisión de metano entérico en vacas de leite mediante o perfil de ácidos graxos (AG) de mostras de leite. Comparación cos resultados da estimación que utilizan modelos baseados en variábeis de produtividade animal, inxesta de materia seca e composición da dieta.

Foi realizada unha revisión da bibliografía máis recente sobre modelos actuais de estimación de CH₄ entérico en vacas de leite en base ao perfil graxo de mostras de leite. Tamén se consideraron outros modelos de estimación de CH₄ a partir de variábeis do animal, do leite (graxa e proteína) e da dieta para comparar os resultados.

Os resultados sinalan a necesidade de dispor de datos de referencia na medida da emisión de CH₄ para poder avanzar con seguridade nesta área. Nesta liña, até dispor da necesaria tecnoloxía, cómpre recorrer a técnicas indirectas suficientemente contrastadas. A este respecto, diversos traballos, como os de Bittante e Cipolat-Gotet (2018 1) e Bittante et al., (2020)2, que teñen como obxectivo avaliar a utilidade da técnica de reflectancia de infravermellos (MIR) aplicada a mostras de leite para estimar a produción de CH₄ entérico nas vacas, utilizan ecuacións publicadas na bibliografía para obter os valores de referencia, considerando a produción de CH₄ estimada como variábel dependente e os espectros MIR das mostras como variábeis independentes predictoras.

Ecuacións para estimar a produción de CH₄ entérico

Da revisión efectuada se destaca que é necesario ter en consideración, entre outros, os seguintes aspectos:

1 Bittante G., Cipolat-Gotet C.. (2018) Direct and indirect predictions of enteric methane daily production, yield, and intensity per unit of milk and cheese, from fatty acids and milk Fourier-transform infrared spectra. *J Dairy Sci.* **101**(8):7219-7235. doi: 10.3168/jds.2017-14289

2 Bittante G., Cipolat-Gotet C., Cecchinato A.. (2020). Genetic Parameters of Different FTIR-Enabled Phenotyping Tools Derived from Milk Fatty Acid Profile for Reducing Enteric Methane Emissions in Dairy Cattle. *Animals (Basel)*. **10**(9):1654. 17 pp. doi: 10.3390/ani10091654

- As ecuacións obtidas polos diversos autores non están sempre validadas, incluso no lugar de obtención, polo que a aplicación indiscriminada de ecuacións tomadas da bibliografía a situacións prácticas leva aparelado un erro de magnitude descoñecida.
- Se hai diferenzas na metodoloxía de determinación dos preditores entre o lugar de obtención da ecuación e o lugar de aplicación da mesma, se producirá un erro cuxa amplitude tampouco poderemos coñecer.
- A maior parte das ecuacións proceden de experimentos específicos, onde se amplifica o rango das respostas agardadas, por exemplo engadindo tratamentos con máis ou menos graxa ou graxa de distintas procedencias, cuxa aplicación a outras circunstancias produtivas é dubidosa.
- Por esta razón son preferíbeis as ecuacións obtidas mediante meta-análise de resultados de múltiples ensaios con diversidade de dietas, localidades e laboratorios, que foron obxecto de validación externa ou cruzada durante a súa elaboración.
- As ecuacións obtidas de meta-análises nas condicións citadas teñen como preditores determinados AG que frecuentemente se atopan no leite en pequenas concentracións, suxeitos a erros de determinación que poden ser importantes. A pesar que as técnicas cromatográficas para mostras de leite aplicadas no entorno CIAM-LIGAL son bastante precisas, alcanzando 49 AG diferentes, o método non permite discriminar determinados AG de cadea impar e/ou ramificada de interese que impiden utilizar a totalidade das ecuacións publicadas.
- Pola contra, as ecuacións baseadas en AG do leite máis doados de determinar por cromatografía e que incluso é posíbel incluso de estimar por FTMIR (por exemplo C16:0) teñen unha capacidade predictiva (medida polo coeficiente de determinación R^2) bastante mediocre cando se aplican a grupos diversos de mostras no contexto das meta-análises realizadas e só se comportan aparentemente ben en ensaios específicos cun número limitado de dietas.
- Por exemplo, será preferíbel utilizar os valores do predictor ácido palmítico (C16:0), constituínte maioritario da graxa do leite, para ter unha estimación aproximada da emisión de CH₄ utilizando unha ecuación obtida mediante meta-análise (por exemplo a de Van Lingen et al., (2014): $\text{CH}_4 \text{ (g/kg DMI)} = 16.27 + 0.16 \times \text{C16:0}$) con preferencia á obtida nun simple experimento (por exemplo a de Chilliard et al., (2009): $\text{CH}_4 \text{ (g/d)} = (-77) + 16.8 \times \text{C16:0}$).
- É dubidosa, en todo caso, a sensibilidade destas ecuacións cando se aplican a distintas situacións produtivas. No seguinte traballo (Mosley et al, 2007)³ se pode observar como aumenta o AG C16:0 cando se engade un suplemento de aceite de palma, co cal a

³ Mosley S.A, Mosley E.E, Hatch B., Szasz JI., Corato A., Zacharias N., Howes D., McGuire M.A.. (2007)- Effect of varying levels of fatty acids from palm oil on feed intake and milk production in Holstein cows. J Dairy Sci. 90(2):987-93. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(07)71583-7

estimación da emisión de CH₄ utilizando as ecuacións univariábeis con este predictor non parecen adecuadas.

Table 5. Fatty acid profile of milk from cows consuming diets containing varying levels of fatty acids of palm oil¹

Fatty acid ²	Targest daily intake of fatty acids of palm oil ³				SEM	Effects of diet ⁴	
	0	500	1,000	1,500		Linear	Quad
4:0	2.95	3.09	3.09	3.03	0.07	NS	NS
6:0	2.02 ^a	1.88 ^b	1.77 ^c	1.72 ^c	0.04	<0.0001	NS
8:0	1.18 ^a	0.99 ^b	0.89 ^c	0.85 ^d	0.03	<0.0001	NS
10:0	2.68 ^a	2.12 ^b	1.85 ^c	1.78 ^c	0.08	<0.0001	NS
12:0	3.06 ^a	2.42 ^b	2.11 ^c	2.04 ^c	0.09	<0.0001	NS
14:0	9.79 ^a	8.63 ^b	7.96 ^c	7.89 ^c	0.16	<0.0001	NS
14:1 <i>cis</i> -9	0.85	0.85	0.82	0.82	0.05	NS	NS
15:0	0.99 ^a	0.83 ^b	0.72 ^c	0.66 ^d	0.01	<0.0001	NS
16:0	30.70 ^a	39.14 ^b	43.96 ^c	45.56 ^d	0.44	<0.0001	NS
16:1 <i>cis</i> -9	2.24 ^a	2.86 ^b	3.35 ^c	3.64 ^d	0.12	<0.0001	NS
17:0	0.56 ^a	0.42 ^b	0.35 ^c	0.30 ^d	0.009	<0.0001	NS
18:0	9.12 ^a	6.83 ^b	5.79 ^c	4.95 ^d	0.24	<0.0001	NS
18:1 <i>cis</i> -9	21.22 ^a	19.30 ^b	17.86 ^c	17.39 ^c	0.43	<0.0001	NS
<i>Trans</i> 18:1	2.26 ^a	1.79 ^b	1.54 ^c	1.44 ^d	0.04	<0.0001	NS
<i>Cis</i> 18:1	1.19 ^a	0.97 ^b	0.88 ^c	0.89 ^c	0.03	<0.0001	NS
18:2 n-6	3.59 ^a	3.17 ^b	2.99 ^c	3.11 ^b	0.08	<0.0001	NS
18:3 n-3	0.50 ^a	0.41 ^b	0.36 ^c	0.36 ^c	0.01	<0.0001	0.06
<i>Cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA	0.46 ^a	0.40 ^b	0.34 ^c	0.30 ^d	0.01	<0.0001	NS
20:0	0.10 ^a	0.08 ^b	0.07 ^c	0.05 ^d	0.001	<0.0001	NS
20:4 n-6	0.12 ^a	0.10 ^b	0.09 ^c	0.10 ^b	0.004	<0.0001	NS
Others	4.20 ^a	3.58 ^b	3.20 ^c	3.19 ^c	0.06	<0.0001	NS
SFA	65.51 ^a	68.35 ^b	70.18 ^c	70.38 ^c	0.48	<0.0001	NS
MUFA	28.53 ^a	26.48 ^b	25.14 ^c	24.87 ^c	0.46	<0.0001	NS
PUFA	5.96 ^a	5.17 ^b	4.68 ^c	4.74 ^c	0.10	<0.0001	NS
Desat	24.78 ^a	23.42 ^b	22.36 ^c	22.15 ^c	0.44	<0.0001	NS
De novo	21.69 ^a	19.14 ^b	17.66 ^c	17.31 ^c	0.35	<0.0001	NS
CLA	0.52	0.45	0.38	0.34	0.01	<0.0001	NS

^{a-d}Means within a row with different superscripts differ ($P < 0.05$).

¹Values given are weight percentage of total fatty acids present in milk collected on d 15 and 16 by cow (n = 18) of each period.

²*Trans* 18:1 = all *trans* 18:1 isomers; *cis* 18:1 = all *cis* 18:1 isomers excluding *cis*-9 18:1; SFA = total saturated fatty acids; MUFA = total monounsaturated fatty acids; PUFA = total polyunsaturated fatty acids; Desat = sum of *cis*-9 14:1, *cis*-9 16:1, *cis*-9 18:1, and *cis*-9, *trans*-11 CLA (products of the Δ^9 -desaturase

- En todo caso, como se indicou anteriormente, é preferíbel utilizar ecuacións multivariábeis obtidas en meta-análises co maior número de dietas posíbeis, o cal obrigaría a usar técnicas cromatográficas contrastadas. Ao non dispor de valores de referencia (valores de CH₄ entérico medido en cámaras respiratorias coa correspondente analítica do leite) no momento actual non somos capaces de desenvolver ecuacións propias nin de estimar o erro cometido cando se aplica unha ou outra ecuación. É de agardar que dentro do programa de investimentos da AGACAL se poida abordar a adquisición de cámaras respiratorias ou, no seu defecto, métodos de medida da emisión de metano entérico tipo GreenFeed que permiten capturar aire expelido polas vacas e analiza-lo mediante técnicas NIRS de forma inmediata, cuxa elevada correlación cos valores obtidos en cámaras respiratoria está

suficientemente acreditado (Hristov et al., 2015 4, Hjiuhtanen et al., 2019 5; Coppa et al., 2021 6; DellaRosa et al, 2021 7).

Ecuacións seleccionadas

Nas simulacións se utilizaron diversas fórmulas predictoras da emisión de metano nas que os AG predictores figuraban nas cromatografías. As expresións da emisión estimada, dependendo das fórmulas eran: a produción total diaria (*Production*, CH₄/d), a produción por unidade de materia seca consumida (*Yield*, CH₄/kg MSI) e a produción por unidade de leite producida (*Intensity*, CH₄/kg FPCM), onde FPCM: produción de leite corrixida en graxa e proteína, calculada segundo a expresión FPCM (kg/d)= PL x (0.337+0.116 x MG + 0.06 x MP), sendo PL é a produción diaria de leite (kg/d), MG o contido en materia graxa do leite (%) e MP o contido en materia proteica (%) (CBV 2008 8). Foron realizadas as conversións entre as distintas formas de estimar a emisión entérica de metano en base aos resultados de inxesta de MS, composición do leite e produción do leite obtidos nos respectivos estudos.

Tras realizar a revisión da bibliografía, as ecuacións retidas foron as seguintes:

Mellores ecuacións seleccionadas da bibliografía para predición de CH₄ utilizando AG do leite como predictores

Autor	Ecuacións	Comentario
Chilliard et al., (2009) ⁹	CH ₄ (g/d)= (-80) + 9.97 x (C8:0+ C10:0 + C12:0 + C14:0 + C16:0) ; R ² =0.88 CH ₄ (g/d)= 729 - 8.72 x (Σ C18) ; R ² =0.88	8 vacas Holstein, 4 dietas, distintas formas de suplemento de aceite vexetal (liño). Medida indirecta de CH ₄ mediante técnica SF ₆

4 Hristov, A.N.; Oh, J; Giallongo, F., Frederick T.; Weeks H.; Zimmerman P., Harper M., Hristova R., Zimmerman R., Branco A., (2015). The Use of an Automated System (GreenFeed) to Monitor Enteric Methane and Carbon Dioxide Emissions from Ruminant Animals. *Journal of Visualized Experiments*. e52904, doi:10.3791/52904.103. 10.3791/52904

5 Huhtanen P, Ramin M., Hristov A.N. (2019). Enteric methane emission can be reliably measured by the GreenFeed monitoring unit, *Livestock Science*, Volume 222, pp 31-40. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2019.01.017>

6 Coppa M. Jurquet J., Eugène M., Dechaux T., Rochette Y., Lamy J.M., Ferlay A., Martin C. (2021). Repeatability and ranking of long-term enteric methane emissions measurement on dairy cows across diets and time using GreenFeed system in farm-conditions. *Methods*, Volume 186, pp 59-67. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2020.11.004>

7 Della Rosa M.M., Jonker A., Wagghorn G.C. (2021). A review of technical variations and protocols used to measure methane emissions from ruminants using respiration chambers, SF₆ marker dilution and GreenFeed, to facilitate global integration of published data. *Animal Feed Science and Technology* 279:115018. DOI:10.1016/j.anifeedsci.2021.115018

8 CVB. 2008. CVB Table Booklet Feeding of Ruminants. CVB series no. 43. Centraal Veevoederbureau, Lelystad, the Netherlands.

⁹ Chilliard Y., Martin C., Rouel J., Doreau M. (2009). Milk fatty acids in dairy cows fed whole crude linseed, extruded linseed, or linseed oil, and their relationship with methane output. *J Dairy Sci.*;92(10):5199-211. doi:10.3168/jds.2009-2375. Erratum in: *J Dairy Sci.* 2010 Oct;93(10):4997. PMID: 19762838.

	$\text{CH}_4 \text{ (g/d)} = 11 + 282 \times \text{C8:0}; R^2=0.81$ $\text{CH}_4 \text{ (g/d)} = (-77) + 16.8 \times \text{C16:0}; R^2=0.82$ $\text{CH}_4 \text{ (g/d)} = 9.46 \times \text{C16:0} - 97.6 \times \text{trans-16+cis-14 C18:1} + 13.3 \times \text{MSI (kg/d)} - 78.3 \times \text{cis-9 C14:1} + 77.4 \times \text{18:2 n-6} - 21.2; R^2 = 0.95$	
Dijkstra et al. (2011) ¹⁰	$\text{CH}_4 \text{ (g/kg DMI)} = 24.6 + 8.74 \times \text{anteiso-C17:0} - 1.97 \times \text{trans-10+11 C18:1} - 9.09 \times \text{cis-11 C18:1} + 5.07 \times \text{cis-13 C18:1} (R^2 = 0.73)$	Datos de 50 vacas derivados de 3 diferentes experimentos con distintas dietas. CH ₄ determinado en cámara respiratoria.
Mohammed et al. (2011) ¹¹	$\text{CH}_4 \text{ (g/d)} = 272.4 - 486.2 \times \text{cis-9 C17:1} - 122.7 \times \text{cis-11 C18:1} + 2.22 \times \text{trans-CLA} - 11.76 \times \sum \text{trans-C18:1} + 260.1 \times \text{anteiso C15:0}; R^2 = 0.74$	Utilizaron 32 observacións procedentes de 16 vacas Holstein alimentadas con dietas suplementadas con aceites vexetais (xirasol, colza e liño) e sales de calcio de aceite de palma. Valores de CH ₄ obtidos en cámara respiratoria
Williams et al. (2014) ¹²	$\text{CH}_4 \text{ (g/d)} = 539 + 50.8 \times \text{C8:0} - 5.26 \times \sum \text{C18}; R^2 = 0.37$	Un total de 278 observacións obtidas en ensaios de alimentación que incluían consumo de pastos e ensilaxes. CH ₄ determinado mediante técnica SF ₆ e cámara respiratoria.
Van Lingen et al., (2014) ¹³	$\text{CH}_4 \text{ (g/kg MSI)} = 23.39 + 9.74 \times \text{C16:0iso} - 1.06 \times (\text{C18:1 t10} + \text{C18:1 t11}) - 1.75 \times \text{C18:2 cis-9,12}; R^2 = 0.54$ $\text{CH}_4 \text{ (g/kg FPCM)} = 21.13 - 1.38 \times \text{C4:0} + 8.53 \times \text{C16:0iso} - 0.22 \times \text{C18:1 c9} - 0.59 \times (\text{C18:1 t10} + \text{C18:1 t11}); R^2=0.47$	Meta-análise de datos de 8 experimentos con vacas Holstein alimentadas con 30 dietas diferentes, a base de ensilaxes de herba e de millo, con e sen suplementos de aceites. Base de datos de 146 observacións en total. Medida de CH ₄ en cámaras respiratorias.

¹⁰ Dijkstra, J., S.M. Van Zijderveld, J.A. Apajalahti, A. Bannink, W.J.J. Gerrits, J.R. Newbold, H.B. Perdok, and H. Berends. 2011. Relationships between methane production and milk fatty acid profiles in dairy cattle. *Anim. Feed Sci. and Technol.* 166-167:590-595.

¹¹ Mohammed, R., S. McGinn, and K. Beauchemin. 2011. Prediction of enteric methane output from milk fatty acid concentrations and rumen fermentation parameters in dairy cows fed sunflower, flax, or canola seeds. *J. Dairy Sci.* 94:6057-6068.

¹² Williams, S.R.O., P.J. Moate, M.H. Deighton, M.C. Hannah, and W. J. Wales. 2014. Methane emissions of dairy cows cannot be predicted by the concentrations of C8:0 and total C18 fatty acids in milk. *Anim. Prod. Sci.* 54:1757-1761.

¹³ Van Lingen H.J., Crompton L.A., Hendriks W.H., Reynolds C.K., Dijkstra J. (2014). Meta-analysis of relationships between enteric methane yield and milk fatty acid profile in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 97(11):7115-32. doi: 10.3168/jds.2014-8268.

	$\text{CH}_4 \text{ (g/kg DMI)} = 16.27 + 0.16 \times \text{C16:0}; R^2=0.15$ $\text{CH}_4 \text{ (g/kg DMI)} = 15.44 + 0.16 \times (\text{C6:0} + \text{C8:0} + \text{C10:0} + \text{C16:0}); R^2=0.17$ $\text{CH}_4 \text{ (g/kg DMI)} = 24.58 - 6.48 \times \text{C18:1c11}; R^2=0.41$	
Rico et al. (2016) ¹⁴	$\text{CH}_4 \text{ (g/d)} = 669.1 + 838.7 \times \text{cis-11 C14:1} - 493.2 \times \text{cis-9 C17:1} - 44.2 \times \text{cis-11 C18:1} - 963.7 \times \text{trans-8, cis-13 C18:2}; R^2 = 0.84$	81 observacións de 3 experimentos en cadrado latino utilizando 27 vacas alimentadas con dietas de esilaxes (60%MS) e concentrado (40%); CH4 determinado en cámara respiratoria
Van Gastelen et al., (2018a) ¹⁵	$\text{CH}_4 \text{ (g/kg FPCM)} = 13.7 - 1.33 \times \text{C4:0} + 32.0 \times \text{C15:0 iso} - 4.12 \times \text{C18:3 n3} - 35.44 \times \text{C20:1 cis11} + 27.62 \times \text{C22:5 n3}$ $R^2=0.75$	Meta-análise de datos de 6 experimentos con vacas Holstein alimentadas con 27 dietas diferentes, a base de herba fresca e ensilaxes de herba e de millo. Base de datos de 123 observacións en total. Medida de CH4 en cámaras respiratorias.
Van Gastelen et al., (2018b) ¹⁶	$\text{CH}_4 \text{ (g/d)} = 507.9 + 62.9 \times \text{C15:0} - 240.6 \times \text{C17:1cis9} - 202.8 \times \text{C18:1 trans10} - 59.3 \times \text{C18:1 trans11} + 48.1 \times \text{C18:2n-6} - 187.1 \times \text{C18:3n-3} + 326.4 \times \text{C20:4n-3} - 816.8 \times \text{C24:0}; R^2=0.54$ $\text{CH}_4 \text{ (g/kg MSI)} = 22.9 + 20.9 \times \text{iso C15:0} - 9.6 \times \text{anteiso C15:0} + 7.6 \times \text{C17:0} - 2.4 \times \text{C18:1 trans11} - 2.7 \times (\text{C18:1 trans15} + \text{C18:1 cis11}) - 4.4 \times \text{C18:3n-3}; R^2=0.40$ $\text{CH}_4 \text{ (g/kg FPCM)} = 8.0 + 24.8 \times \text{iso C15:0} + 10.3 \times \text{iso C17:0} - 6.6 \times (\text{C18:1 trans15} + \text{C18:1 cis11}) + 22.7 \times \text{C22:5n-3}; R^2=0.62$	Meta-análise de datos de 9 experimentos con vacas Holstein alimentadas con 30 dietas diferentes, a base de herba fresca e ensilaxes de herba e de millo. Base de datos de 218 observacións en total. Medida de CH4 en cámaras respiratorias.

AGT: ácidos graxos totais; .Valores de preditores en % AGT; R²: coeficiente de determinación, expresa a porcentaxe de varianza explicada polo modelo; En cor bermella, parámetros non dispoñíbeis nos cromatogramas no momento actual

¹⁴ Rico, D.E., P.Y. Chouinard, F. Hassanat, C. Benchaar, and R. Gervais. 2016. Prediction of enteric methane emissions from Holstein dairy cows fed various forage sources. *Animal* 10:203–211

¹⁵ Van Gastelen S., Antunes-Fernandes E.C., Hettinga K.A., Dijkstra J. (2018). The relationship between milk metabolome and methane emission of Holstein Friesian dairy cows: Metabolic interpretation and prediction potential. *J Dairy Sci.* **101**(3):2110-2126. [doi: 10.3168/jds.2017-13334](https://doi.org/10.3168/jds.2017-13334)

¹⁶ Van Gastelen et al., (2018) Predicting enteric methane emission of dairy cows with milk Fourier-transform infrared spectra and gas chromatography-based milk fatty acid profiles. *J. Dairy Sci.* 101:1–17 <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13052>

En función das características da poboación utilizada na construción do modelo de predición e do coeficiente de determinación da ecuación de estimación da produción de metano entérico, a expresión que parece máis adecuada é a de Van Gastelen et al. (2018) que estima a intensidade de produción de CH₄ (g/kg FPCM) en base a preditores (valores de AG do leite) que están dispoñíbeis nos cromatogramas CIAM-LIGAL $Y \text{ (g/kg FPCM)} = 13.7 - 1.33 \times C4:0 + 32.0 \times C15:0_{iso} - 4.12 \times C18:3_{n3} - 35.44 \times C20:1_{cis11} + 27.62 \times C22:5_{n3}$, onde os preditores están expresados como porcentaxe dos AG totais.

A fin de comprobar a sensibilidade da ecuación, foi utilizada para calcular o valor da intensidade de produción de CH₄ cando se aplicada a dúas bases de datos de mostras de leite co perfil de AG determinado por cromatografía, procedentes de traballos realizados no entorno CIAM-LIGAL e publicados na tese doutoral de Adrián Botana (Botana, 2019)¹⁷.

Características das bases de datos

a) Foi utilizada, en primeiro lugar, unha base de datos procedente de mostras de leite de tanque de 25 explotacións de distintos grupos (PE: pastoreo ecolóxico, PC: pastoreo convencional, EH: ensilaxes de herba; EHEM: ensilaxes de herba e de millo e EM; ensilaxes de millo) cun total de 100 mostras analizadas co perfil de AG completo determinado cromatograficamente.

b) O segundo conxunto de datos procedía dun experimento de alimentación controlada con vacas de leite realizado no CIAM do que se obtiveron un total de 288 mostras de leite de vaca individual das que se dispuña do perfil de AG determinado por cromatografía. Neste caso os tratamentos foron (en kg de MS/vaca e día): T1.- Pasto día e noite cunha suplementación de 2 kg de concentrado comercial; T2.- Pasto durante o día e durante a noite unha ración TMR con ensilado de millo (5 kg), feno de pradeira (0.5 kg) e concentrado (4 kg); T3.- TMR composta de ensilado de herba (6 kg), ensilado de millo (6 kg), feno de pradeira (1.5 kg) e concentrado (8 kg); T4.- TMR composta de ensilado de millo (9 kg), feno de pradeira (2 kg) e concentrado (12 kg).

A fin de ter unha estimación da significación destes resultados aplicados á obtención do valor de pegada de CO₂ por kg de leite, se estimou a emisión de CO₂ equivalente (CO_{2eq}/kg de leite FPCM) asignando un factor de conversión de 25 para pasar g de CH₄ a g CO_{2eq} e supoñendo (para facilitar os cálculos) que a emisión entérica de CO_{2eq} corresponde ao 45% das emisións totais de CO_{2eq} da granxa¹⁸.

¹⁷ Botana A. (2019). Estudio de los sistemas de alimentación en explotaciones de vacuno de Galicia: Efecto de la composición de la dieta sobre el perfil de ácidos grasos y antioxidantes liposolubles de la leche. Tesis doctoral. Escuela de doctorado internacional. Escola Politécnica Superior de Lugo-Universidade de Santiago de Compostela. 266 pp. <http://hdl.handle.net/10347/23671>

¹⁸ Realmente as emisións entéricas serían proporcionalmente superiores nas explotacións menos intensivas, nas que o contido en fibra da ración é superior

O resumo de resultados da aplicación desta ecuación e os resultados das simulación aplicada ás dúas bases de datos se indica nos cadros seguintes, onde se inclúen os valores de produtividade animal, composición fisicoquímica do leite e de FND e Amidón da dieta.

Como se pode observar, existe variabilidade na estimación da produción media de CH₄ entre os diferentes sistemas de produción ao aplicar a ecuación de Van Gastelen et al. (2018) á base de datos de mostras de leite procedente das explotacións, oscilando a intensidade da produción (g CH₄/kg FPCM) entre 15.9 e 13.6 para o leite de vacas no sistema ecolóxico e o de vacas estabuladas alimentadas con racións onde predomina a ensilaxe de millo, evolucionando de forma proporcional ao contido medio de FND na dieta e en sentido inverso ao contido en amidón. Sen embargo, cando se aplica o modelo de predición aos resultados do experimento de alimentación controlada realizado no CIAM, a variación da emisión de CH₄ por kg de leite é máis reducida, oscilando entre 14.8 e 13.3 g CH₄/kg FPCM para os tratamentos de pastoreo continuado con niveis mínimos de concentrado e para os animais estabulados alimentados con TMR a base de ensilaxe de herba e de millo e 8 kg de concentrado/día.

a) Para o conxunto de granxas leiteiras analizadas

	Grupo de explotacións				
	PE	PC	EH	EH-EM	EM
n	24	20	16	20	20
Composición fisicoquímica					
Materia graxa (%)	3.7	3.97	3.87	3.76	3.6
Materia proteica (%)	3.07	3.25	3.25	3.31	3.32
Lactosa (%)	4.61	4.66	4.77	4.81	4.85
Extracto seco magro (%)	8.42	8.68	8.78	8.88	8.93
FPD (x -1 °C)	0.521	0.526	0.529	0.528	0.528
Urea (mg/L)	216	228	265	257	249
Produción de leite					
kg/vaca e día	18.3	20.7	28	33.4	36.6
FPCM (kg/d)	17.4	20.5	27.5	32.5	34.9
Inxestión de MS e eficiencia					
IMS (kg MS/vaca e día)	18.2	19.0	21.9	23.4	24.4
Amidón na dieta					
% MS total	5.5	8.1	17.4	23.8	25.6
FND na dieta					
% MS total	45.8	43.0	34.0	33.0	30.5
	Grupo de explotacións				
	PE	PC	EH	EH-EM	EM
Produción de CH ₄ entérico					
CH ₄ (g/kg FPCM)	15.9	14.9	14.4	13.9	13.6
CH ₄ (g/kg MSI)	15.2	16.1	18.0	19.3	19.5
CH ₄ (g/d)	276	306	395	450	476
Estimación da emisión de CO ₂					
g CO ₂ eq (orixe CH ₄)/kg FPCM	397	372	359	347	341
g CO ₂ /kg FPCM	883	826	798	771	757

b) Para o experimento de sistemas de alimentación realizado no CIAM

GRUPO	Tratamentos			
	T1	T2	T3	T4
n	72	72	72	72
Composición fisicoquímica				
Materia graxa (%)	3.28	3.5	3.5	3.56
Materia proteica (%)	3.07	3.02	3.03	3.27
Lactosa (%)	4.63	4.74	4.72	4.8
Extracto seco magro (%)	8.43	8.47	8.38	8.73
Urea (mg/L)	317	251	193	279
FPD (x -1 °C)	0.522	0.522	0.523	0.527
Producción de leite				
kg/vaca e día	31.4	34.8	35.4	37.8
FPCM (kg/d)	28.3	32.2	32.7	35.8
Inxestión de MS				
IMS (kg MS/vaca e día)	22.4	24.0	24.2	25.1
Amidón na dieta				
% MS total	3.12	12.5	18.7	26.2
FND na dieta				
% MS total	47.0	42.7	36.9	33.4
GRUPO	Tratamentos			
	T1	T2	T3	T4
Producción de CH ₄ entérico				
CH ₄ (g/kg FPCM)	14.8	14.2	13.3	14.2
CH ₄ (g/kg MSI)	18.7	19.1	18.0	20.3
CH ₄ (g/d)	419	457	436	509
Estimación da emisión de CO ₂				
g CO _{2eq} (orixe CH ₄)/kg FPCM	370	356	333	355
g CO ₂ /kg FPCM	823	790	739	790

Estimación da produción de metano entérico en base a ecuacións que non utilizan AG como preditores e aplicación ás bases de datos da tese de Adrián Botana

Como contraste, se revisou a bibliografía buscando ecuacións para estimar a produción de CH₄ en base a outras variábeis (produción de leite, composición da dieta, peso vivo) que procederan dun amplo número de observacións. Dúas recentes publicacións, en relación ao tipo de dietas e número de observacións utilizadas parecen interesantes, a este respecto.

Un traballo de interese é o de Velarde-Guillén et al., (2019)¹⁹, realizado en Canadá, en base a 6 estudos con 193 observacións onde se usaron diferentes dietas con ensilaxes +

¹⁹ Velarde-Guillén J., Pellerin D., Benchaar C., Wattiaux M.A., Charbonneau É. (2019). Development of an equation to estimate the enteric methane emissions from Holstein dairy cows in Canada. *Canadian Journal of Animal Science*, 792-803. <https://doi.org/10.1139/cjas-2018-0241>

concentrados e suplementación con distintos tipos de lípidos. A ecuación ten en conta diversas variábeis relativas a produción e composición do leite, peso vivo, inxestión de MS e composición da ración, polo que parece de interese referencia-la:

$$\text{CH}_4 \text{ (g/d)} = -1260.4 + 1.9 \times \text{Leite (kg/d)} + 62.8 \times \text{Graxa do leite (\%)} - 18.4 \times \text{Proteína do leite (\%)} + 11.0 \times \text{IMS (kg/d)} + 0.30 \times \text{Peso vivo (kg)} + 58.3 \times \text{FND (\%MS)} - 0.80 \text{ FND}^2 \text{ (\%MS)} + 1.9 \text{ Amidón (\%MS)} - 2.5 \times (\text{EE} - \text{graxa inerte no rume}) \text{ (\%MS)}$$

O segundo traballo considerado foi o de Niu et al., (2018) ²⁰, onde se ofrecen diversas ecuacións para estimar a emisión de CH₄ a partir dun estudo intercontinental con máis de 5 mil observacións de vacas individuais procedentes, sobre todo de Europa (3 mil observacións) e USA (2 mil observacións). As ecuacións seleccionadas teñen un erro en validación cruzada de aproximadamente o 17% do valor medio. Ecuacións para estimar a produción de metano, con preditores inxesta de MS diaria IMS (kg/d) e FND da ración (%MS) son:

$$\text{CH}_4 \text{ (g/d)} = 33.2 + 13.6 \text{ IMS} + 2.43 \text{ FND} \quad (\text{Intercontinental, } n = 3384 \text{ observacións válidas})$$

$$\text{CH}_4 \text{ (g/d)} = -26 + 15.3 \text{ IMS} + 3.42 \text{ FND} \quad (\text{Europa, } n = 1770)$$

$$\text{CH}_4 \text{ (g/d)} = 49.5 + 12.1 \text{ IMS} + 2.75 \text{ FND} \quad (\text{USA, } n = 1187)$$

Este traballo tamén proporciona ecuacións para estimar o rendemento (g CH₄/kg MS) e intensidade (g/kg leite corrixida en enerxía ECM) da emisión de metano, con erros de predición en validación cruzada de aproximadamente o 17% da media:

$$\text{CH}_4 \text{ (g/kg MS)} = 13.8 + 0.185 \text{ FND} \quad (\text{Intercontinental, } n = 3116)$$

$$\text{CH}_4 \text{ (g/kg ECM)}^{21 \text{ } 22} = 11.3 - 0.103 \text{ IMS} + 0.118 \text{ FND} \quad (\text{Intercontinental, } n = 3116)$$

Nota: ECM se calcula segundo Tyrrell e Reid (1965) mediante a ecuación

$$\text{ECM (kg/d)} = 12.95 \times \text{Graxa (kg/d)} + 7.65 \times \text{Proteína (kg/d)} \times 0.93 + 0.327 \times \text{Leite (kg/d)}$$

Mellores ecuacións seleccionadas da bibliografía para predición de CH₄ utilizando parámetros de produción animal e composición da dieta como preditores

Autor	Ecuacións	Comentario
Velarde-Guillén et al., (2019)	$\text{CH}_4 \text{ (g/d)} = -1260.4 + 1.9 \text{ PL} + 62.8 \text{ MG} - 18.4 \text{ MP} + 11.0 \text{ IMS} + 0.3 \times \text{PV} + 58.3 \times \text{FND} - 0.8 \text{ FND}^2 + 1.9 \text{ ALM} - 2.5 \times (\text{EE} - \text{GP})$	Vacas Holstein, revisan datos de 6 experimentos con 18 dietas a base de ensilaxes de herba e de millo con e sen suplementos de aceites vexetais, obtendo

²⁰ Niu, M, Kebreab, E, Hristov, AN, et al. Prediction of enteric methane production, yield, and intensity in dairy cattle using an intercontinental database. Glob Change Biol. 2018; 24: 3368– 3389. <https://doi.org/10.1111/gcb.14094>

²¹ Produción de leite corrixida en enerxía: $\text{ECM (kg/d)} = 12.95 \times \text{Graxa (kg/d)} + 7.65 \times \text{Proteína (kg/d)} \times 0.93 + 0.327 \times \text{Leite (kg/d)}$

²² Tyrrell H.F., Reid J.T. (1965) Prediction of the energy value of cow's milk. *J Dairy Sci.* **48**(9):1215-23. [doi: 10.3168/jds.S0022-0302\(65\)88430-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(65)88430-2)

	$R^2 = 0.68$	unha base de datos de 193 observacións. Medida de CH ₄ en cámaras respiratorias.
Niu et al., (2018)	CH ₄ (g/d) = $33.2 + 13.6 \cdot \text{IMS} + 2.43 \cdot \text{FND}$ CCC=0.75	Meta-análise dunha ampla base de datos intercontinental. Ecuación tomada de 3015 datos procedentes de 82 estudos realizados en Europa. Medida de CH ₄ por distintos métodos

R^2 : coeficiente de determinación, expresa a porcentaxe de varianza explicada polo modelo; PL: kg leite/d; MG: % graxa; MP: % proteína; IMS: kg MS/d; PV: peso vivo; FND: %MS; ALM: %MS; EE: extracto etéreo; GP: graxa protexida; CCC: concordance correlation coefficient

Aplicadas estas ecuacións ás bases de datos de mostras de leite anteriormente referenciadas (Botana, 2019), os valores resultantes mostran as diferenzas nas estimacións da produción de metano, con valores de intensidade (g CH₄/kg FPCM) evolucionando aproximadamente no mesmo sentido observado anteriormente cando se aplica o modelo baseado na concentración de AG do leite (tendencia a aumentar co nivel de FND na dieta e a descender coa concentración de amidón) se ben os valores absolutos son máis elevados, sobre todo para o leite producido nas explotacións de pastoreo e cando se aplica o modelo máis xeneralista de Niu et al (2018).

a) Para o conxunto de granxas leiteiras analizadas

GRUPO	Grupo de explotacións				
	PE	PC	EH	EH-EM	EM
n	24	20	16	20	20
Composición fisicoquímica					
Materia graxa (%)	3.7	3.97	3.87	3.76	3.6
Materia proteica (%)	3.07	3.25	3.25	3.31	3.32
Produción de leite					
kg/vaca e día	18.3	20.7	28	33.4	36.6
FPCM (kg/d)	17.4	20.5	27.5	32.5	34.9
Inxestión de MS					
IMS (kg MS/vaca y día)	18.2	19.0	21.9	23.4	24.4
Amidón na dieta					
% MS total	5.5	8.1	17.4	23.8	25.6
FND na dieta					
% MS total	45.8	43.0	34.0	33.0	30.5
GRUPO	Grupo de explotacións				
	PE	PC	EH	EH-EM	EM
Aplicando a ecuación de Velarde-Guillén et al., (2019)					
Produción de CH ₄ entérico					
CH ₄ (g/kg FPCM)	18.7	19.1	18.0	16.0	14.7
CH ₄ (g/d)	325	393	495	521	513
Estimación da emisión de CO ₂					
g CO ₂ -eq (orixe CH ₄)/kg FPCM	467	478	451	401	367
g CO ₂ /kg FPCM	1038	1062	1001	892	816

GRUPO	Grupo de explotacións				
	PE	PC	EH	EH-EM	EM
Aplicando a ecuación de Niu et al., (2018)					
Produción de CH ₄ entérico					
CH ₄ (g/kg FPCM)	22.5	19.3	15.1	13.3	12.6
CH ₄ (g/d)	392	396	414	432	439
Estimación da emisión de CO ₂					
g CO ₂ -eq (orixe CH ₄)/kg FPCM	564	482	377	332	315
g CO ₂ /kg FPCM	1252	1071	837	739	699

b) Para o experimento de sistemas de alimentación realizado no CIAM

GRUPO	Tratamentos			
	T1	T2	T3	T4
n	72	72	72	72
Composición fisicoquímica				
Materia graxa (%)	3.28	3.5	3.5	3.56
Materia proteica (%)	3.07	3.02	3.03	3.27
Produción de leite				
kg/vaca e día	31.4	34.8	35.4	37.8
FPCM (kg/d)	28.3	32.2	32.7	35.8
Inxestión de MS				
IMS (kg MS/vaca e día)	22.4	24.0	24.2	25.1
Amidón na dieta				
% MS total	3.12	12.5	18.7	26.2
FND na dieta				
% MS total	47.0	42.7	36.9	33.4

GRUPO	Tratamentos			
	T1	T2	T3	T4
n	72	72	72	72
Aplicando a ecuación de Velarde-Guillén et al., (2019)				
Produción de CH ₄ entérico				
CH ₄ (g/kg FPCM)	12.8	14.8	15.9	15.2
CH ₄ (g/d)	362	476	522	543
Estimación da emisión de CO ₂				
g CO ₂ -eq (orixe CH ₄)/kg FPCM	320	370	399	380
g CO ₂ /kg FPCM	710	822	886	843

GRUPO	Tratamentos			
	T1	T2	T3	T4
n	72	72	72	72
Aplicando a ecuación de Niu et al., (2018)				
Produción de CH ₄ entérico				
CH ₄ (g/kg FPCM)	16.0	14.4	13.8	12.7
CH ₄ (g/d)	452	463	452	456
Estimación da emisión de CO ₂				
g CO ₂ -eq (orixe CH ₄)/kg FPCM	399	360	345	319
g CO ₂ /kg FPCM	887	800	767	708

CONCLUSIÓNS

É necesario contar con métodos de referencia para a medida directa das emisións de metano entérico en vacas de leite (Cámaras respiratorias ou métodos alternativos contrastados, tipo GreenFeed).

No entanto, cómpre recorrer a métodos indirectos na estimación das emisións, a fin de construír as coleccións de mostras que servirán para o desenvolvemento dos modelos de predición usando a tecnoloxía NIR e MIR. Con este propósito son de utilidade determinadas ecuacións existentes na bibliografía, baseadas na composición de AG do leite, que foron utilizadas para o desenvolvemento do presente proxecto, como se indica nos apartados correspondentes.

É preferíbel usar modelos multivariábeis, debidamente validados, procedentes de meta-análises con elevado número de datos, cuxas características en canto a manexo dos animais e tipos de dieta representen unha situación comparábel á existente nas explotacións galegas. Os modelos univariábeis baseados en AG individuais son menos precisos e se desaconsella a súa utilización.

A estimación da emisión de CH₄ a partir de variábeis de produtividade animal e composición da dieta teñen a dificultade de que normalmente estes valores son difíciles de obter e non son aplicábeis a rutinas de laboratorio.

A utilidade práctica dos modelos de predición baseados en AG do leite determinados cromatograficamente é moi reducida en base ao elevado custo e duracións das análises. Esta circunstancia xustifica a necesidade de abordar a estimación das emisións entéricas de CH₄ mediante espectrofotometría MIR a partir de amplas bases de datos con valores de referencia nos que a produción de CH₄ foi estimada indirectamente.

PARTE 2ª

Estimación das emisións entéricas de metano en vacas de granxas leiteiras galegas

Se utilizaron os valores resultantes da análise cromatográfica das mostras de leite de 53 explotacións comerciais que foron visitadas en catro ocasións (verán, outono, inverno e primavera). Parte das explotacións (n=21) realizaban pastoreo (grupo PAST) durante os períodos de crecemento da herba e as restantes (n=32) seguían un sistema de alimentación con animais estabulados permanentemente e alimentados con ración TMR a base de concentrado e ensilados. En 12 granxas deste grupo non se utilizaba ensilaxe de millo (grupo EH) mentres que nas 20 restantes era a forraxe predominante, xunto coa ensilaxe de herba (grupo EM-EMEH).

Para obter a emisión de CH₄ se utilizou un modelo predictivo (Van Gastelen et al., 2018)²³ que permite estimar a intensidade da produción de CH₄ entérico (g/kg de leite corrixida en graxa e proteína, FPCM) a partir do perfil de ácidos graxos (AG) do leite, mediante a expresión: CH₄ (g/kg FPCM)=13.7 -1.33 x C4:0 +32.0 x C15:0_{iso} -4.12 x C18:3_{n3} -35.44 x C20:1_{cis11} +27.62 x C22:5_{n3}, onde os AG preditores están expresados en porcentaxe sobre o total de AG do leite. A produción diaria de leite corrixida en graxa e proteína (kg FPCM) se obtivo mediante a expresión seguinte: FPCM (kg/vaca)= PL (kg/vaca) x (0.337 +0.116 x MG +0.06 x MP), onde PL é a produción diaria de leite sen corrixir, MG o contido graxo do leite (%) e MP o contido proteico (%).

A partir dos valores calculados da intensidade de produción de CH₄ (g/ kg FPCM) se estimou a produción total diaria de CH₄ (g/vaca) e a produción de CH₄ por kg de materia seca consumida polo animal (g CH₄/ kg MSI).

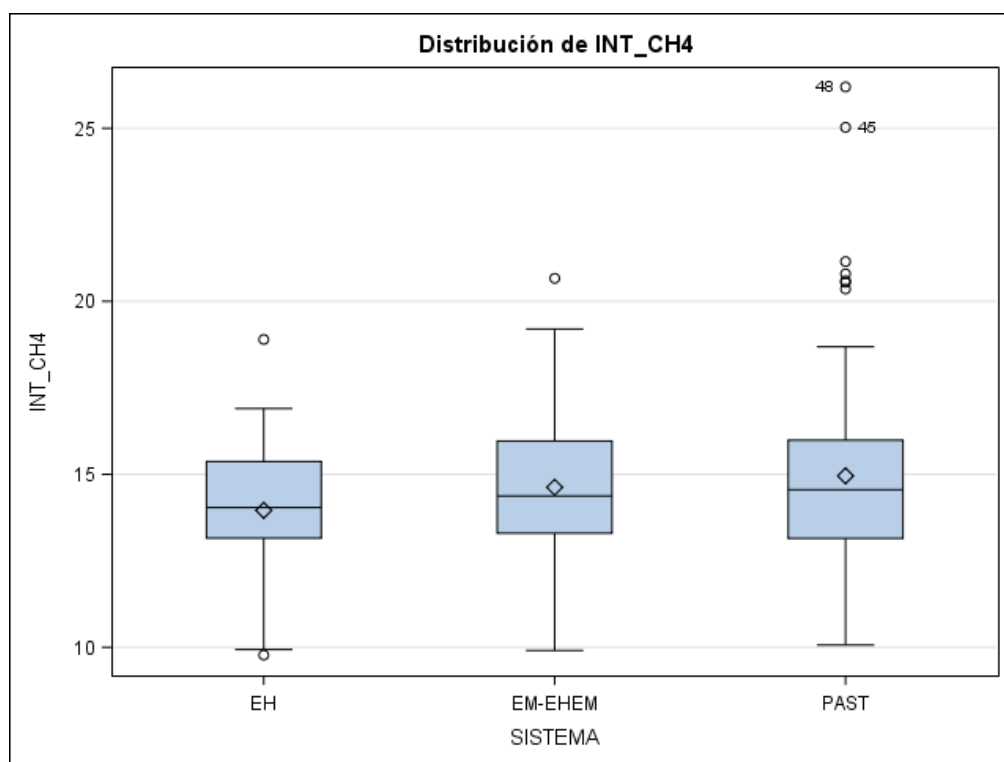
Os valores medios da produción entérica de metano por grupo de explotacións se mostra no cadro seguinte, onde se pode observar que non se detectaron diferenzas significativas entre grupos en canto aos valores da intensidade de emisión (g CH₄/kg FPCM) con valores medios de 14.9, 13.9 e 14.6 para PAST, EH e EM-EMEH. En cambio, as diferenzas na produción total diaria de CH₄ (g/vaca) foron significativas (p<0.001) para EM-EMEH comparado con EH (467.2 vs. 422.1 g/vaca) e a destes dous grupos comparada coa de PAST (261.2 g/vaca). Outro tanto acontece cando consideramos os valores da produción de CH₄ entérico/kg MSI, con diferenzas significativas (p<0.001) entre os grupos EM-EMEH e EH (19.5 vs. 17.9 g/kg MSI, respectivamente, e entre estes e o grupo PAST (14.7 g CH₄/kg MSI).

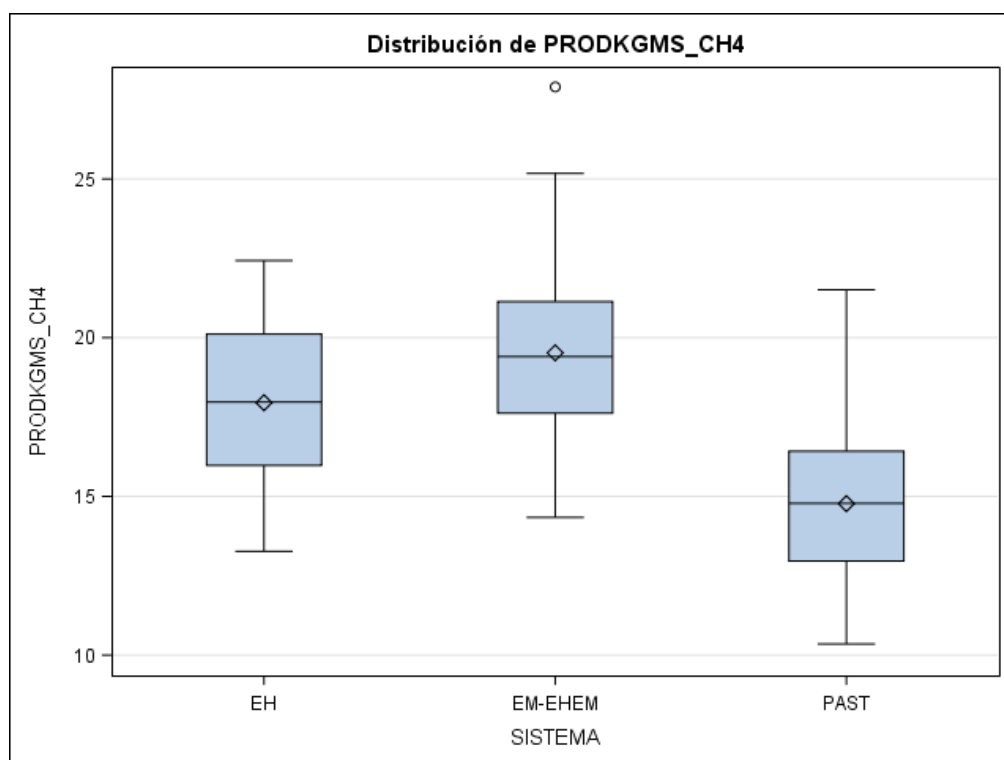
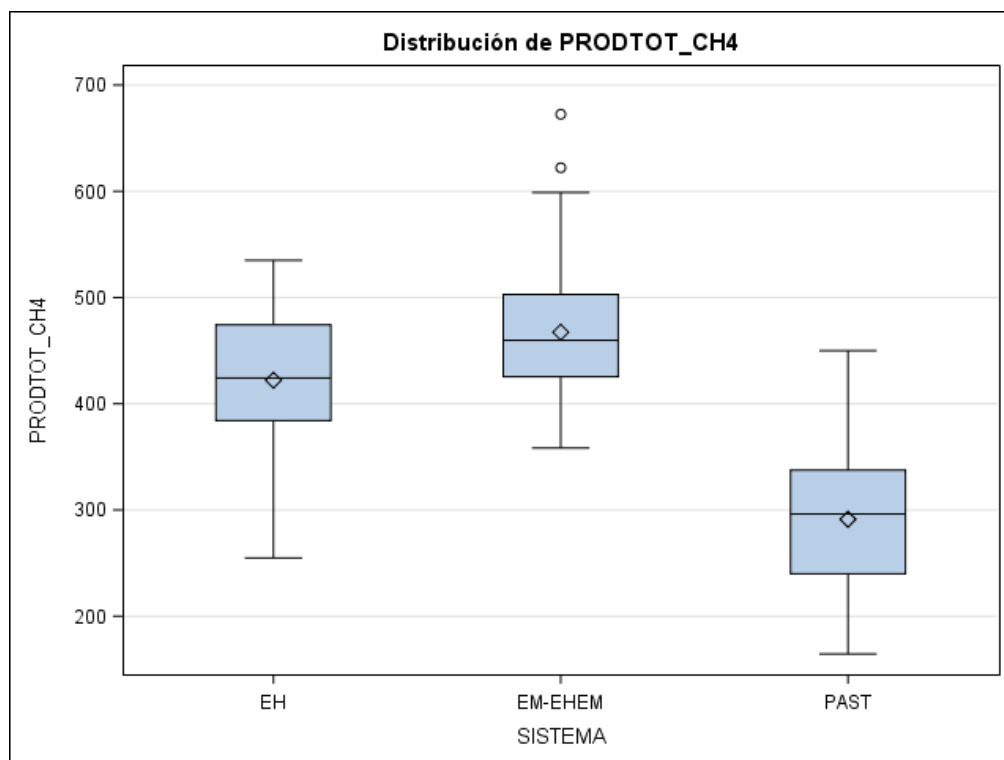
²³ Van Gastelen S., Antunes-Fernandes E.C., Hettinga K.A., Dijkstra J. (2018a). The relationship between milk metabolome and methane emission of Holstein Friesian dairy cows: Metabolic interpretation and prediction potential. *J Dairy Sci.* **101**(3):2110-2126. [doi: 10.3168/jds.2017-13334](https://doi.org/10.3168/jds.2017-13334)

Produción de metano entérico (g CH₄/kg FPCM, g CH₄/vaca e día e g CH₄/kg MSI) para os tres grupos de granxas leiteiras analizadas

Produción de CH ₄	Grupo de explotacións leiteiras			Significación P
	PAST	EH	EM-EMEH	
g CH ₄ /kg FPCM	14.9	13.9	14.6	NS
g CH ₄ /vaca e día	291.2 ^c	422.1 ^b	467.2 ^a	***
g CH ₄ /kg MSI	14.7 ^c	17.9 ^b	19.5 ^a	***

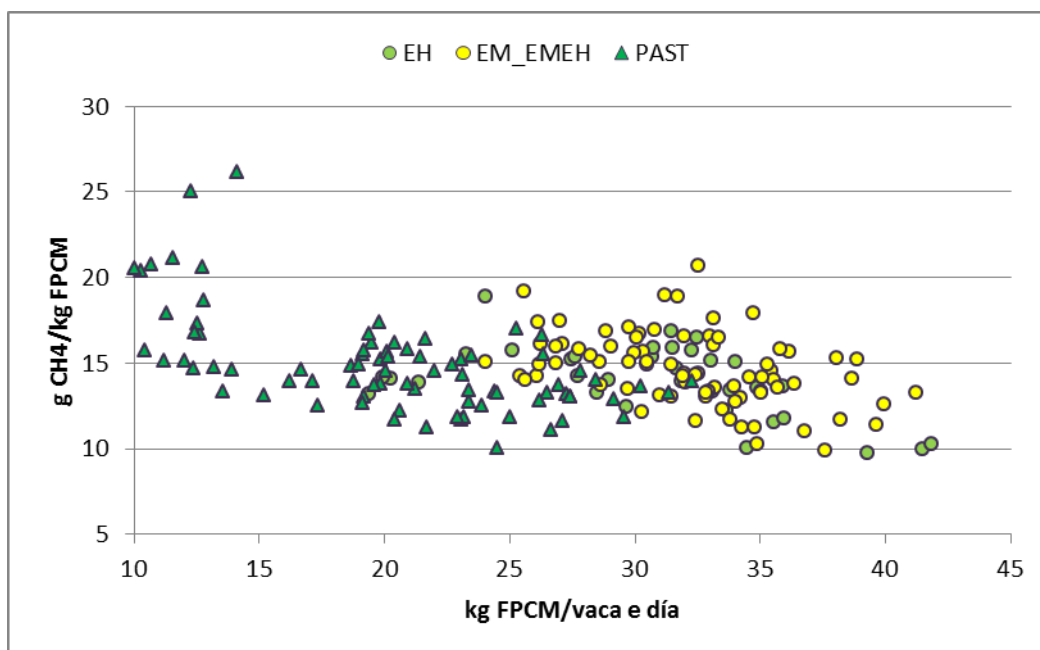
As figuras seguintes mostran a distribución dos valores correspondentes aos tres índices de emisión (INT_CH₄: g /kg FPCM; PRODTOT_CH₄: g /vaca e día; PRODKGMS_CH₄: g/kg MSI), utilizando os gráficos whisker-plot.



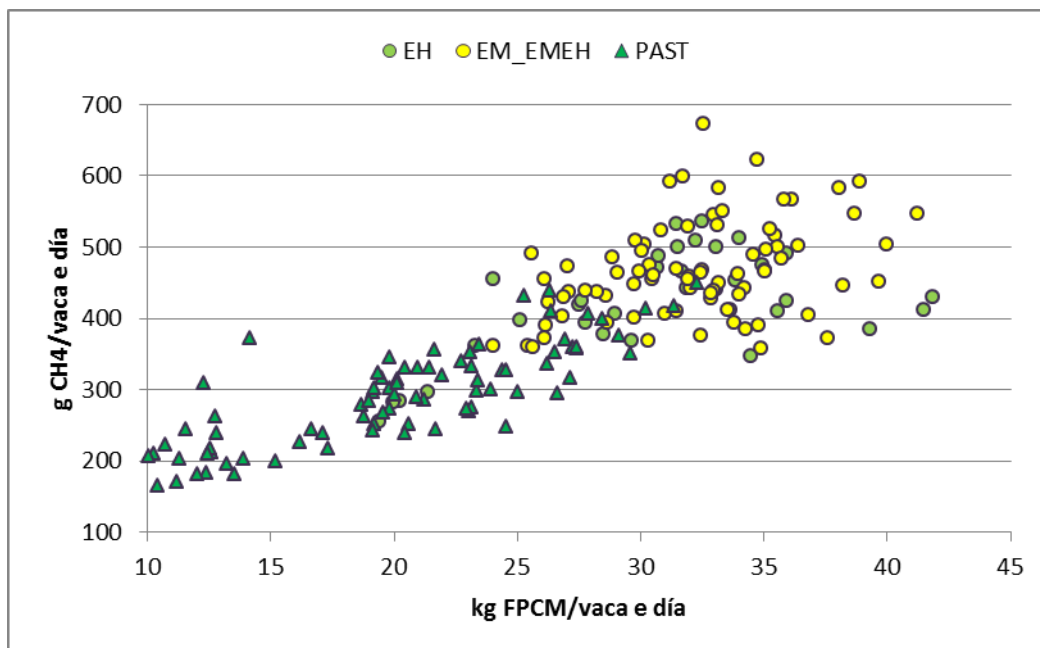


Nas gráficas seguintes se mostra a distribución dos valores de emisión de CH₄ para as diferentes explotacións de cada grupo en función da produción media de leite de cada granxa.

Plot da intensidade de emisión de metano (g CH₄/kg FPCM) e a produción media de leite por vaca por grupo de explotacións (cada valor é a media de cada granxa en cada visita)



Plot da emisión total diaria de metano (g CH₄/vaca) e a produción media de leite por vaca por grupo de explotacións (cada valor é a media de cada granxa en cada visita)



PARTE 3ª

Medida da emisión entérica de metano na granxa do axente cooperante produtor primario

As medidas co aparato Laser-Methane-Detector (LMD) se realizaron na granxa Patalarga durante 6 visitas ao longo de 2022. En cada visita se controlaron entre 10 e 12 vacas diferentes, sendo realizadas un total de 65 medicións. Estas se realizaron de forma estandarizada, replicando a metodoloxía seguida no experimento realizado nas instalacións do CIAM. O aparato se situou a unha distancia de 1.5 m dos animais, sendo realizada a medición durante 10 minutos/vaca e un intervalo de rexistro de datos de 0.5 segundos.

A estimación da produción de metano por vaca se realizou a partir da medición do aparato, efectuada en ppm de CH₄ por metro, aplicando a seguinte ecuación:

$$\text{g CH}_4/\text{vaca e día} = 1.56 \times \text{MED}(\text{CH}_4)_{\text{ppm-m}}$$

onde MED(CH₄)_{ppm-m} é a media dos 1200 valores da concentración de CH₄ en ppm-m rexistrados polo aparato durante a medición en cada animal. Nas visitas se tomaron mostras de leite e de alimento e se anotou a produción por vaca nese momento.

Os datos máis relevantes se resumen nas seguintes táboas:

Datos das vistas, número de vacas controladas e valore medios de produción de leite e de emisión entérica de metano por vaca

Nº Visita	Data	Nº Vacas controladas	Nº parto	Días en leite	Produción leite	Emisión LMD (g CH ₄ /día)
1	21/01/2022	10	2.7	137.2	28.4	328.5
2	27/03/2022	11	2.8	163.7	33.8	399.4
3	21/05/2022	11	3.4	149.4	35.6	379.4
4	25/07/2022	11	2.8	137.0	33.2	358.8
5	21/09/2022	12	2.7	160.2	24.8	376.2
6	25/11/2022	10	2.9	202.4	29.1	337.5

Características da alimentación recibida polas vacas (kg MS/vaca)

Nº Visita	Data	Pasto	Silo herba	Palla	Concentrado
1	21/01/2022	-	ad libitum	0.5	4.9
2	27/03/2022	ad libitum	9.4	0.5	5.0
3	21/05/2022	ad libitum	-	1.0	5.4
4	25/07/2022	ad libitum	-	2.0	4.9
5	21/09/2022	ad libitum	7.6	-	5.0
6	25/11/2022	ad libitum	6.4	0.5	4.7

Composición fisicoquímica do leite (media das mostras individuais/vaca)

Nº Visita	Data	GRAXA	PROT	LACT	ESM	ST	FPD	Urea	CSOM
1	21/01/2022	3.76	3.02	4.86	8.52	12.38	0.531	140	75
2	27/03/2022	3.62	3.21	4.81	8.73	12.35	0.526	197	101
3	21/05/2022	3.68	3.11	4.68	8.51	12.19	0.525	331	159
4	25/07/2022	3.55	3.04	4.63	8.50	12.04	0.524	286	108
5	21/09/2022	3.66	3.16	4.56	8.51	12.17	0.520	337	60
6	25/11/2022	3.74	3.31	4.72	8.89	12.63	0.528	309	64

Perfil de ácidos graxos do leite (media das mostras individuais/vaca)

a) AG en g/100 g leite

Nº Visita	SAT	INS	MIN	PIN	MIR	PAL	EST	OLE	CC	CM	CL	AG_TR
1	2.64	1.03	0.86	0.09	0.39	1.31	0.33	0.75	0.41	1.86	1.23	0.05
2	2.27	1.18	0.98	0.10	0.36	0.94	0.36	0.87	0.37	1.49	1.36	0.10
3	2.40	1.10	0.94	0.09	0.37	1.00	0.39	0.85	0.38	1.55	1.42	0.10
4	2.27	1.10	0.95	0.11	0.35	0.96	0.38	0.88	0.34	1.52	1.44	0.08
5	2.49	0.99	0.87	0.08	0.42	1.17	0.36	0.79	0.35	1.77	1.29	0.05
6	2.38	1.17	0.95	0.10	0.38	1.02	0.38	0.85	0.39	1.59	1.43	0.10

b) AG en g/100 g de AG totais

Nº Visita	SAT	INS	MIN	PIN	MIR	PAL	EST	OLE	CC	CM	CL	AG_TR
1	72.0	28.0	23.5	2.4	10.7	35.8	8.9	20.5	11.1	50.9	33.6	1.5
2	65.8	34.2	28.4	3.0	10.5	27.3	10.3	25.4	10.8	43.2	39.4	2.8
3	68.7	31.3	26.8	2.7	10.5	28.7	11.0	24.3	10.9	44.3	40.6	2.7
4	67.4	32.6	28.2	3.2	10.3	28.5	11.1	26.2	10.2	44.9	42.8	2.5
5	71.6	28.4	24.9	2.3	12.0	33.8	10.3	22.6	10.2	50.9	37.2	1.5
6	67.1	32.9	26.8	2.7	10.6	28.7	10.7	24.0	11.0	44.8	40.4	2.9

SAT: saturados; INS: insaturados; MIN: monoinsaturados; PIN: poliinsaturados; MIR: mirístico (C14:0); PAL: palmítico (C16:0); EST: esteárico (C18:0); OLE: oleico (C18:1n-7); AG_TR: ácidos graxos *trans* (grupos C16:1, C18:1, C18:2 e C18:3); CC: cadea curta; CM: cadea media; CL: cadea longa

O traballo realizado puxo de manifesto a posibilidade de medir a produción individual de CH₄ entérico utilizando o instrumento LMD en situación dunha granxa comercial, de forma estandarizada e causando o mínimo estrés aos animais. Para elo o sistema de restrición de movementos realizado no CIAM mostrou a súa efectividade.

Os valores de emisión e as mostras de leite cos seus conseguintes valores analíticos foron de utilidade para confeccionar as bases de datos, incrementando a súa variabilidade ao incorporar datos de animais alimentados con herba fresca durante gran parte do ano.

PARTE 4ª

Ensaio de alimentación con vacas de leite alimentadas con dietas TMR e proporción variábel de concentrado

Obxecto:

Determinar o efecto da proporción de concentrado na dieta sobre a produtividade das vacas, composición do leite e emisión entérica de metano estimada por diferentes métodos indirectos

Metodoloxía:

O ensaio se desenvolveu no período comprendido entre o 14 de marzo ao 17 de xuño de 2022, cunha duración experimental de 12 semanas. Se utilizaron 6 vacas/tratamento, das cales 2 eran primíparas. A data media de parto dos animais foi o 19 de xaneiro de 2022 e os días en leite ao comezo do experimento eran, de media, 66.8 ± 12.4 días. A produción media diaria de leite por vaca ao inicio foi de 42.3 ± 7.6 kg e o peso vivo medio inicial foi de 683 ± 59.1 kg.

Nos cadros seguintes se detalla a composición da ración TMR en cada tratamento e o valor nutricional da mesma.

Composición da ración TMR en cada tratamento

Tratamento	Ensilado Herba	Ensilado Millo	Feno	Concentrado 24%	kg MS/vaca e día
T0	60%	30.0%	10.0%	0%	18.0
T20	48%	24.0%	8.0%	20%	22.0
T40	36%	18.0%	6.0%	40%	29.0
T60	24%	12.0%	4.0%	60%	30.0

Valor nutricional medio da ración TMR en cada tratamento

Tratamento	% MS	% PB	% FAD	% FND	% DMOD	ENL	UFL
T0	36.00	9.82	36.87	42.26	62.65	1.39	0.82
T20	46.44	12.65	30.88	37.19	66.15	1.49	0.88
T40	56.88	15.47	24.88	32.11	69.65	1.59	0.93
T60	67.32	18.29	18.89	27.04	73.15	1.69	0.99

Nos cadros seguintes se mostra a variación de peso vivo e de condición corporal das vacas ao longo do experimento. Se pode observar a forte perda de peso vivo e de condición corporal das vacas sen suplementación de concentrado (T0) indicando que os animais mobilizaron tecido corporal para a produción de leite durante o ensaio. Por outra banda se observa unha clara correlación entre a ganancia de peso e condición corporal e o nivel de suplementación da ración TMR con concentrado.

Variación de peso vivo das vacas durante o experimento (kg)

Tratamento	Pre-ensaio	1ª Pesada	2ª Pesada	3ª Pesada	4ª Pesada	5ª Pesada	Variación 1ª-5ª pesada
T0	634.5	602.3	591.8	557.1	540.7	519.6	-83.0
T20	630.0	616.5	619.5	614.4	613.1	625.8	+9.3
T40	645.1	643.3	654.2	659.0	668.3	680.0	+36.7
T60	643.6	630.7	659.9	665.1	685.7	688.3	+57.6

Variación de condición corporal das vacas durante o experimento (kg)

Tratamento	1ª Pesada	2ª Pesada	3ª Pesada	4ª Pesada	5ª Pesada	Variación 1ª-5ª pesada
T0	2.67	2.63	2.33	2.08	2.08	-0.55
T20	2.63	2.63	2.63	2.63	2.75	+0.12
T40	2.58	2.58	2.67	2.63	2.79	+0.21
T60	2.71	2.71	2.88	2.88	2.88	+0.57

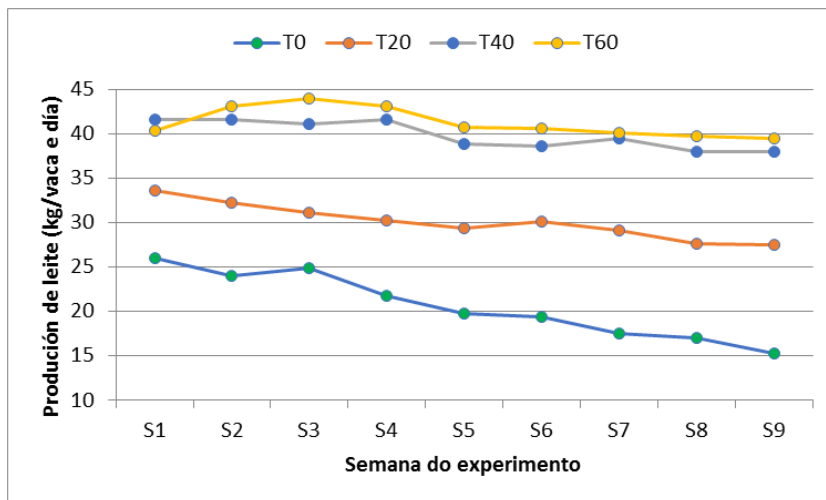
Como era de agardar, houbo unha forte resposta da produción de leite á suplementación con concentrado, de forma practicamente lineal ate o 40% de concentrado, sendo non significativo o incremento entre os niveis T40 e T60.

Produción de leite (kg/vaca e día) durante as semanas 1 a 9 do experimento

Tratamento	Semana experimental									Media S1-S9
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	
T0	25.9	24.0	24.9	21.8	19.8	19.4	17.5	17.0	15.3	20.6
T20	33.6	32.2	31.2	30.3	29.3	30.2	29.1	27.6	27.5	30.1
T40	41.6	41.5	41.1	41.7	38.9	38.6	39.5	38.0	38.0	39.9
T60	40.3	43.1	43.9	43.1	40.7	40.5	40.1	39.8	39.4	41.2

Se observou que a resposta media ao incremento do concentrado na ración respecto do nivel inmediatamente anterior foi variábel entre os distintos tratamentos. Así, un incremento aproximado de 4 kg de concentrado na ración aumentou en case 10 kg a produción de leite ao pasar de T0 a T20 (+2.5 kg leite/kg concentrado), mantendo-se esta resposta de forma aproximada entre os tratamentos T20 a T40 (+2.2 kg leite/kg concentrado), e diminuindo claramente ao pasar ao último nivel de suplementación, toda vez que a resposta foi de tan só de +0.28 kg de leite/kg concentrado adicional.

Gráfico da evolución da produción media de leite por vaca entre as semanas 1 a 9 do experimento para os diferentes tratamentos



Os baixos valores de graxa e proteína do leite no tratamento T0 reflicten, por outra banda, o déficit de enerxía e proteína da dieta para un correcto funcionamento ruminal, o cal sería a causa dunha menor produción de precursores para a síntese "ex novo" de AG ($\leq C14$) na glándula mamaria unido á utilización de parte dos aminoácidos para paliar o déficit de enerxía. O menor contido proteico observado no tratamento T20 en comparación con T40 e T60 podería indicar, de forma máis atenuada, este mesmo efecto.

Composición fisicoquímica do leite dos diferentes tratamentos durante o experimento (semanas 1 a 9)

Tratamento	MG %	MP %	Lact %	ESM %	FPD °C	Urea mg/L	Acetona mmol/L	BHB mmol/L
T0	3.62	2.64	4.70	8.04	-0.527	77	0.10	0.10
T20	3.99	2.91	4.83	8.45	-0.529	127	0.08	0.06
T40	3.88	3.16	4.88	8.76	-0.529	260	0.01	0.02
T60	4.00	3.27	4.98	8.99	-0.529	316	-0.01	-0.01

A mobilización das reservas corporais en T0 (e en menor medida en T20) para compensar a falta de enerxía na ración explican a maior concentración de corpos cetónicos no leite. A pesar disto o risco de cetose é baixo (valor de BHB < 0.15 mmol/L).

Perfil de ácidos graxos FTMR do leite durante o experimento (semanas 1 a 9). Valores en % sobre el total de ácidos graxos

Tratamento	SAT	INS	MIN	PIN	MIR	PAL	EST	OLE	AG_TR
T0	71.7	28.3	25.9	2.1	10.5	33.8	10.4	21.5	0.68
T20	71.6	28.4	25.1	2.3	11.1	32.6	10.0	21.5	1.15
T40	74.6	25.4	21.9	2.2	12.7	35.3	9.2	19.4	1.07
T60	72.3	27.7	23.6	2.4	12.6	33.6	9.4	21.3	1.68

SAT: saturados; INS: insaturados; MIN: monoinsaturados; PIN: poliinsaturados; MIR: mirístico (C14:0); PAL: palmítico (C16:0); EST: esteárico (C18:0); OLE: oleico (C18:1c9) AG_TR: ácidos graxos *trans* (grupos C16:1, C18:1, C18:2 e C18:3)

Ácidos graxos de cadea curta (C4 a C10), media (C12 a C16) e longa ($\geq$ C18) no leite dos diferentes tratamentos durante o experimento (semanas 1 a 9)

Tratamento	CC	CM	CL			
	% AG totais			CC	CM	CL
T0	9.5	50.1	37.2	0.34	1.78	1.32
T20	10.6	49.8	35.4	0.41	1.96	1.39
T40	11.5	54.3	31.6	0.43	2.04	1.18
T60	11.6	52.6	34.0	0.44	2.03	1.31

CC: cadea curta; CM: cadea media; CL: cadea longa

A mobilización da reservas corporais para a produción de leite no T0 e en menor medida no T20 explican, por unha banda, a maior proporción no leite de AG de cadea longa e, consecuentemente, menor presenza de AG de cadea media e curta.

En canto á estimación da produción total de metano entérico (g CH₄/vaca e día), os resultados obtidos da medida co aparato Laser-Methane mostraron unha resposta cuadrática en relación á suplementación con concentrado, ascendendo desde 251 $\pm$ 66 g para T0 até 428 $\pm$ 114 g para T20 e 429 $\pm$ 80 g para T40, descendendo posteriormente a 384 $\pm$ 120 g para T60.

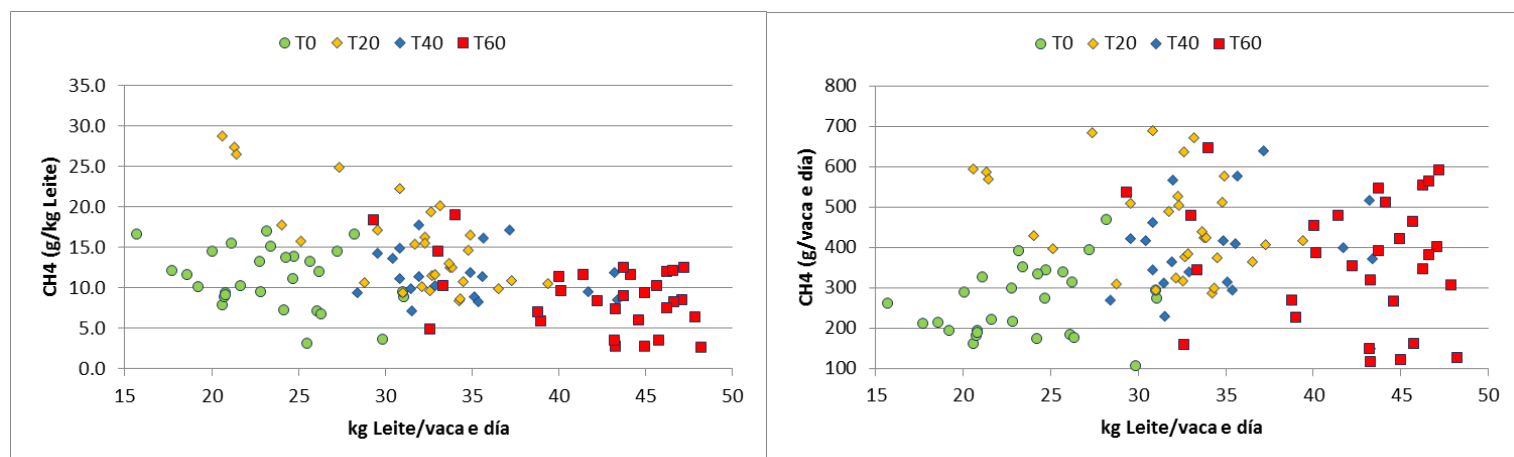
Como se mostra na táboa adxunta, os valores da intensidade da emisión (g CH₄/ kg de leite) foron numericamente superiores para T20 e T0 comparado cos niveis máis altos de suplementación, con valores medios de 12.2, 14.2, 10.8 e 9.3 g de CH₄/kg de leite.

Valores medios por tratamento da medida de emisión entérica de metano durante o experimento

Tratamento	g CH ₄ /vaca e día	g CH ₄ /kg leite	g CH ₄ /Kg MSI
T0	251	12.2	13.9
T20	428	14.2	19.5
T40	429	10.8	14.8
T60	384	9.3	12.8

Nas figuras seguintes se mostra a distribución dos valores de emisión total de CH₄ por vaca e da intensidade de emisión de CH₄ por kg de leite en relación á produción media por vaca, para os diferentes tratamentos. Ditos valores son aparentemente máis baixos que os obtidos mediante os modelos baseados na composición de AG e referidos no apartado PT3 para as explotacións comerciais.

Emisión entérica de metano: Intensidade (kg CH₄/ kg leite) e produción total diaria (kg CH₄/vaca) por tratamento (valores medios por vaca en cada semana de control)



Efecto do nivel de concentrado na ración de vacas leiteiras sobre a produtividade animal, a composición do leite e a emisión entérica de metano

	T0	T20	T40	T60	s.e.m.	p
n	36	36	36	36		
Produción (kg/vaca e día) §						
Leite (non corrixida)	19.2	29.9	38.3	40.6	1.93	<.0001
FPCM	16.5	28.9	37.0	41.2	2.17	<.0001
Graxa	0.64	1.18	1.47	1.66	0.11	<.0001
Proteína	0.48	0.87	1.19	1.35	0.06	<.0001
Extracto Seco Magro	1.57	2.53	3.32	3.63	0.15	<.0001
Sólidos	2.21	3.72	4.79	5.30	0.25	<.0001
Inxestión de materia seca (IMS)e eficiencia (EFI)§						
IMS (kg/vaca e día)	18.4	23.0	25.9	27.3	0.86	<.0001
EFI (kg leite/kg MS)	0.94	1.28	1.42	1.48	0.052	<.0001
Composición do leite (%)§						
Graxa	3.42	3.95	3.94	4.10	0.21	<.0001
Proteína	2.55	2.91	3.20	3.33	0.094	<.0001
Lactosa	4.68	4.82	4.88	4.98	0.1	<.0001
Extracto Seco Magro	8.08	8.47	8.76	8.92	0.11	<.0001
Urea e punto crioscópico						
Urea (ppm)	76	127	274	326	18.9	<.0001
Punto crioscópico °C	-0.527	-0.528	-0.529	-0.529	0.0017	NS
Perfil de ácidos graxos FTMIR (% AGT)						
Saturados	71.94	71.89	74.37	72.31	1.51	<.0001
Insaturados	28.06	28.11	25.63	27.69	1.51	<.0001
Monoinsaturados	25.91	25.72	23.31	25.09	1.45	<.0001
Poliinsaturados	2.15	2.39	2.32	2.60	0.14	<.0001
Mirístico	10.63	11.31	12.65	12.68	0.47	<.0001
Palmítico	34.26	32.68	35.11	33.60	1.36	<.0001
Esteárico	10.33	9.88	9.39	9.38	0.47	<.0001
Oleico	21.44	21.25	19.80	21.32	1.26	0.001
Cadea curta	9.37	10.54	11.38	11.40	0.33	<.0001

Cadea media	50.87	50.49	54.18	52.96	2.03	<.0001
Cadea longa	37.22	35.26	32.06	34.16	1.78	<.0001
AG trans	0.50	1.01	1.02	1.65	0.19	<.0001
Produción de metano - Intensidade (g CH ₄ /kg leite)§						
Laser Methane Detector	11.4	12.7	8.7	7.0	2.17	<.0001
Van Gastelen et al., (2018a)	15.5	13.8	14.8	14.3	0.82	<.0001
Bougouin et al (2019)	12.6	13.6	14.5	15.3	0.63	<.0001
Produción de metano - Total (g CH ₄ /vaca e día)§						
Laser Methane Detector	190	346	319	271	50.9	<.0001
Van Gastelen et al., (2018a)	258	412	548	562	42.4	<.0001
Bougouin et al (2019)	282	430	542	589	39.8	<.0001

Fotografías da medida da emisión de CH₄ entérico na nave experimental do CIAM utilizando o instrumento Laser-Methane



Nota: A medida da emisión entérica seguindo esta metodoloxía se realiza seguindo o manexo normal das vacas de leite estabuladas. O deseño por parte da equipa investigadora¹ dun dispositivo para manter a cabeza do animal en posición de medida, como se mostra nas fotografías, supuxo unha considerábel vantaxe para facilitar o rexistro de datos durante o tempo de medición (10 min/animal) mellorando a fiabilidade das medidas e sen alterar o comportamento natural das vacas. Este dispositivo foi utilizado nas medidas realizadas na granxa cooperante, xa que se adapta ao sistema de cornadizas habituais nas explotacións.

PARTE 5ª

Utilidade da composición dos ácidos graxos do leite de vaca mediante análise FTMIR para estimar a emisión entérica de metano

Obxecto do traballo

Investigar a relación entre o valor da produción de metano entérico en vacas de leite (g CH₄/kg leite) e o perfil graxo de mostras de leite analizadas por espectroscopía de infravermellos (MilkoScan).

Base de datos utilizada

Valores de 527 mostras de leite de vaca analizadas no LIGAL. Do total, 287 son mostras de tanque obtidas en 75 explotacións leiteiras galegas con distinto sistemas de alimentación. As 240 mostras restantes son de vaca individual, procedentes de experimentos realizados no CIAM con diferentes dietas (tempos de acceso ao pasto). As mostras foron analizadas seguindo as rutinas analíticas do LIGAL (análise FTMIR) e por cromatografía de gases (CG-FID). As mostras foron xeradas no decurso dos proxectos FEADER2017-022B, FEADER2019-015A e FEADER 2021-002A e as análises se realizaron seguindo a mesma metodoloxía entre os anos 2018 e 2022.

Metodoloxía

1º.- Estimación da emisión de metano entérico (variábel dependente do modelo).

Se estima a intensidade de produción de metano entérico (g CH₄/kg leite) a partir da composición de ácidos graxos (AG) das mostras de leite analizada mediante cromatografía (CG-FID), así como da composición fisicoquímica do leite. Para a estimación utilizamos os resultados da meta-análise realizada por Bougouin et al., (2019)²⁴. Eliximos esta publicación debido á composición dos modelos propostos (presenza de preditores AG e parámetros fisicoquímicos nas ecuacións), ao elevado número mostras e de ensaios utilizados en dito traballo, así como da variedade de dietas utilizadas, que proporcionan unha gran variabilidade na base de datos utilizada. De entre as ecuacións dispoñíbeis na publicación eliximos unha en base á dispoñibilidade dos valores de AG nos nosos cromatogramas.

A ecuación que utilizamos no traballo para a estimación de gCH₄/kg leite é:

$$(gCH_4/kg) = 15.3 + 3.9 \times C16:0_{iso} - 0.5 \times (C18:1t10 + C18:1t11) + 1.9 \times MG + 2.2 \times MP - 3.2 \times LACT$$
, na cal os valores de AG están expresados e g/100 g de AG totais e os de MG (graxa), MP (proteína) e LACT (lactosa) en g/100 g de leite.

2º.- Modelo de regresión onde os preditores son os valores de AG do conxunto de mostras de leite determinados mediante análise FTMIR (MilkoScan). Os AG dispoñíbeis son os

²⁴ Bougouin, A., Appuhamy, J.A.D.R.N., Ferlay, A., Kebreab, E., Martin, C., Moate, P.J., Benchaar, C., Lund, P., Eugène, M. (2019). Individual milk fatty acids are potential predictors of enteric methane emissions from dairy cows fed a wide range of diets: Approach by meta-analysis. Journal of Dairy Science (JDS), [online] 102(11), 10616-10631. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2018-15940>

obtidos mediante a aplicación de FOSS integrada na rutina analítica do LIGAL²⁵. Estes valores se expresan:

a) En porcentaxe sobre o valor total de AG (AGT), calculados de acordo ao IDF Bulletin (2010) segundo a expresión $g\ AG/100\ g\ AGT = (g\ AG/100\ g\ leite) \times 100 / (MG\% \times 0.95)$, onde MG é a materia graxa do leite.

b) Sen transformar, tal e como resultan da aplicación de FOSS, expresados como g AG/100 g de leite.

3º.- A construción do modelo de regresión se realizou mediante a análise de regresión paso a paso (PROC STEPWISE) e regresión linear simple (PROC REG) do paquete estatístico SAS (SAS/STAT v. 14.2).

4º.- Una vez coñecidos os coeficientes dos modelos de regresión (se opta por utilizar nos dous casos un modelo linear simple, sen interaccións), a proba da súa validez se realiza mediante un proceso de validación cruzada, aplicando o procedemento PROC REG de SAS. Para elo, a base de datos se distribúe aleatoriamente en cinco grupos co 20% de observacións en cada un. A continuación se realizan 5 tandas de validación cruzada nas que o conxunto de calibración en cada tanda está formado polo 80% das observacións e o 20% restante constitúe o conxunto independente de validación. Este vai cambiando secuencialmente ao longo das 5 tandas, de forma que finalmente tódalas observacións pasan polo conxunto de validación. En cada unha das tandas se recalcula o modelo de predición para o conxunto de calibración, obtendo os parámetros da regresión e se aplica este modelo sobre o correspondente conxunto de validación para obter os valores preditos polo modelo. Foron calculados os seguintes estatísticos no proceso de validación cruzada :

- Coeficiente de determinación, que representa a porcentaxe de varianza da variábel dependente (Intensidade, g CH₄/kg leite) que é explicada polo modelo de regresión, respectivamente, nos conxuntos de calibración (R_c^2) e de validación cruzada ($1 - VR$).
- Erro estándar de calibración (SEC) e de validación cruzada ($SECV$) que indican o erro mínimo de predición da variábel dependente cando aplicamos o modelo no conxunto de calibración e de validación, respectivamente. Os erros estándar se calculan a partir dos erros de estimación (e_i = diferenza entre o valor observado e o predito polo modelo) do valor da variábel dependente no conxunto de aplicación do modelo

mediante a expresión $\sqrt{\frac{\sum e_i^2}{n-1}}$, sendo n o número total de mostrase do conxunto onde se aplica o modelo.

Adicionalmente se realizou unha proba de validación externa, asignando aleatoriamente os 2/3 das observacións ao conxunto de calibración e o 1/3 restante ao de validación. Construído o modelo de predición no conxunto de calibración, foron aplicados os seus coeficientes ás observacións do conxunto de validación externa, obtendo os valores preditos polo modelo. Foron calculados os seguintes estatísticos de validación externa:

- Valor do bias como o valor medio da diferenza entre os valores observados e preditos ($bias = \bar{e}_i$)

²⁵ MikoScan de FOSS. Os ácidos graxos das mostrase de leite se determinaron seguindo a FOSS Application Note 0064/Rev 8

- A porcentaxe de varianza explicada polo modelo de calibración aplicado ao conxunto de validación externa (r^2) a partir da regresión lineal entre os valores observados e os preditos pola ecuación.
- Erro de predición (SEP) como o erro estándar da diferenza entre os valores observados e preditos $SEP = \sqrt{\frac{\sum e_i^2}{n-1}}$,

4º.- Como criterio de calidade do modelo de predición e da fiabilidade das estimacións se seguiron os seguintes criterios:

- Shenk e Westerhaus (1996)²⁶ e Shenk *et al.* (2001)²⁷ establecen un valor límite de 0.50 para $(1 - VR)$ a partir do cal a utilidade da ecuación permite a clasificación en rangos (alto meio e baixo).
- O valor RPD é o ratio entre a desviación estándar (SD) do conxunto de mostras para o valor de referencia e o erro estándar de validación cruzada ou de predición ($RPD = SD_{cv}/SECV$ ou $RPD = SD_v/SEP$). Saeys *et al.* (2005)²⁸ indican que modelos con valores de $RPD < 1.5$ presentan baixa capacidade predictiva e non son de utilidade; se o valor RPD está entre 1.5 e 2.0 a predición se considera aceptábel; para valores de RPD entre 2.5 e 3.0 a predición é de boa calidade e para os modelos con valor $RPD > 3.0$ a predición se considera excelente.
- O *ratio* do rango a erro (RER) cuantifica a relación entre o rango de valores de referencia e o erro estándar de validación cruzada ou de predición ($RER = Rango_{cv}/SECV$ ou $RER = Rango_v/SEP$). En xeral se admite que os valores de RER das calibracións con boa capacidade predictiva deben ser superiores a 10 (Williams e Sobering, 1996²⁹; Williams, 2001³⁰).

Resultados

Valores de produción de metano entérico e preditores utilizados na estimación da variábel dependente do modelo

Variable	Mean	Std Dev	Min	Max
Produción de metano				
Intensidade (gCH₄/kg Leite)	14.53	1.77	10.47	25.5
Produción (gCH₄/d)	421.5	115.3	142.4	990.9

²⁶ Shenk J.S., Westerhaus M.O. (1996). calibration the ISI way. En: Near Infrared Spectroscopy: The future Waves. Davies A.M.C e Williams P.C. (Eds.). NIR Publications. Chichester, U.K. pp 198-202.

²⁷ Shenk J.S., Workman J., Westerhaus, M. (2001). Application of NIR spectroscopy to agricultural products. EN: Handbook of Near Infrared Analysis, 2nd ed.; (Eds) Burns, D.A., Ciurczac, E.W.; Marcel Dekker: New York, NY, USA.; pp. 419–474. ISBN 978-0849373930.

²⁸ Saeys W, Mouazen A. M., Ramon H. (2005). Potential for Onsite Analysis of Pig Manure using Visible and Near Infrared Reflectance Spectroscopy. Biosystems Engineering, **91** (4), 393-402.

²⁹ Williams P. C., Sobering D. C. (1996). How do we do it: A brief summary of the methods we use in developing near infrared calibrations. En: A. M. C. Davies e P. C. Williams (Eds.), Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves. Chichester: NIR Publications. pp. 185–188.

³⁰ Williams P. C. (2001). Implementation of Near-Infrared technology. En: P. C. Williams e K. H. Norris (Eds.), Near infrared technology in the agricultural, food industries. St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists, pp. 145–169.

Preditores (AG determinados por CG-FID)				
C16_0 iso	0.21	0.05	0.00	0.45
C18_1t10	0.31	0.16	0.07	1.96
C18_1t11	1.76	1.11	0.42	6.34
Preditores (composición fisicoquímica do leite)				
MG	3.99	0.63	2.85	8.36
MP	3.22	0.24	2.57	3.96
LACT	4.75	0.13	4.24	5.14

Intensidade: g CH₄/kg leite, calculada pola ecuación de Bougoin et al (2019); Producción por vaca (g CH₄/d) calculada como Intensidade x produción de leite.

Valores do perfil de AG das mostras de leite de tanque determinados por FTMIR

a) g AG/100 g AGT	N	Mean	Std Dev	Min.	Max.
AGS	527	68.4	3.6	56.3	77.7
AGI	527	31.6	3.6	22.3	43.7
AGMI	527	27.6	2.9	19.4	37.7
AGPI	527	3.96	0.88	1.70	6.75
MIR	527	10.4	1.4	5.7	14.4
PAL	527	29.6	3.7	17.2	42.9
EST	527	10.4	1.2	7.2	14.6
OLE	527	23.4	2.6	17.0	32.5
AGCC	527	10.4	0.7	8.0	12.5
AGCM	527	45.7	6.7	20.3	61.6
AGCL	527	37.8	4.2	27.6	51.0
AGtrans	527	3.62	1.33	0.80	8.63

b) g AG/100 g leite	N	Mean	Std Dev	Min.	Max.
AGS	527	2.60	0.49	1.65	5.86
AGI	527	1.19	0.18	0.77	2.36
AGMI	527	1.00	0.16	0.65	2.17
AGPI	527	0.14	0.03	0.06	0.31
MIR	527	0.40	0.10	0.20	1.04
PAL	527	1.13	0.29	0.54	3.17
EST	527	0.39	0.07	0.23	0.85
OLE	527	0.88	0.14	0.57	1.94
AGCC	527	0.39	0.07	0.25	0.77
AGCM	527	1.74	0.47	0.70	4.77
AGCL	527	1.42	0.21	0.88	3.05
AGtrans	527	0.13	0.05	0.04	0.33

Ácidos graxos incluídos nos grupos de estimación FTMIR (FOSS Application Note 0064/Rev 8)

AGS	Saturados	C4:0, C6:0, C8:0; C10:0, C12:0, C14:0, C16:0, C18:0, C20:0
AGMI	Monoinsaturados	C10:1, C12:1, C14:1, C16:1; C18:1, C20:1, C22:1, C24:1
AGPI	Poliinsaturados	C18:2, C18:3, C18:4, C20:2, C20:3, C20:4, C20:5, C22:2, C22:3, C22:4, C22:5, C22:6
AGtrans	AG trans	C16:1, C18:1, C18:2, C18:3
AGCC	AG Cadea Curta	C4:0, C6:0, C8:0; C10:0
AGCM	AG Cadea Media	C12:0, C14:0, C16:0
AGCL	AG Cadea Longa	C18:0, C18:1, C18:2, C18:3, C18:4, C20:0; C20:1, C20:2, C20:3, C20:4, C20:5, C22:0; C22:1, C22:2, C22:3, C22:4, C22:5, C22:6, C24:0; C24:1
MIR	Mirístico	C14:0
PAL	Palmítico	C16:0
EST	Esteárico	C18:0
OLE	Oleico	C18:1

Coeficientes de correlación (r) entre a variábel dependente (Intensidade: g CH₄/kg Leite) e os potenciais preditores (AG FTMIR)

a) preditores expresados como g AG/100 g AGT

	AGS	AGI	AGMI	AGPI	MIR	PAL
r	0.54	-0.54	-0.48	-0.60	0.44	0.61
p	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
	EST	OLE	AGCC	AGCM	AGCL	AGtrans
r	-0.40	-0.47	0.00	0.63	-0.53	-0.49
p	<.0001	<.0001	0.9579	<.0001	<.0001	<.0001

Pearson Correlation Coefficients, N = 527; Prob > |r| under H0: Rho=0

b) preditores expresados como g AG/100 g leite

	AGS	AGI	AGMI	AGPI	MIR	PAL
r	0.88	0.44	0.48	-0.09	0.82	0.88
p	<.0001	<.0001	<.0001	0.0464	<.0001	<.0001
	EST	OLE	AGCC	AGCM	AGCL	AGtrans
r	0.50	0.49	0.78	0.90	0.45	-0.24
p	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001

Pearson Correlation Coefficients, N = 527; Prob > |r| under H0: Rho=0

Modelo de predición seleccionado: Coeficientes do modelo de predición

a) preditores expresados como **g AG/100 g AGT**

$$\text{CH4/kg Leite} = 21.79 - 0.528 \times \text{MIR} + 0.394 \times \text{OLE} - 0.496 \times \text{AGCC} + 0.198 \times \text{AGCM} - 0.394 \times \text{AGCL}$$

Coeficiente de determinación (R_c^2) 0.52

Media: 14.53 g CH4/kg Leite

Erro mínimo de predición en calibración SEC: ± 1.25

	INTERCEPT	MIR	OLE	AGCC	AGCM	AGCL
	21.79	-0.528	0.394	-0.496	0.198	-0.394
s.e.	± 3.43	± 0.102	± 0.085	± 0.108	± 0.020	± 0.047
p	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0232	<0.0001	<0.0001

s.e.: Erro estándar do parámetro; p: significación

Valores de preditores en porcentaxe sobre o total de ácidos graxos

b) preditores expresados como **g AG/100 g leite**

$$\text{CH4/kg Leite} = 6.61 - 10.06 \times \text{MIR} - 6.34 \times \text{EST} - 4.17 \times \text{PAL} + 5.26 \times \text{AGMI} + 7.94 \times \text{AGCM}$$

Coeficiente de determinación (R_c^2) 0.91

Media: 14.53 g CH4/kg Leite

Erro mínimo de predición en calibración SEC: ± 0.52

	INTERCEPT	MIR	EST	PAL	AGMI	AGCM
	6.61	-10.067	-6.345	-4.175	5.267	7.948
s.e.	± 0.162	± 0.812	± 0.671	± 0.463	± 0.269	± 0.330
p	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

s.e.: Erro estándar do parámetro; p: significación

Valores de preditores en porcentaxe sobre o total de ácidos graxos

Estatísticos de validación cruzada do modelo de predición

a) preditores expresados como **g AG/100 g AGT**

	g CH4/kg Leite (observed)	g CH4/kg Leite (predicted)	BIAS	SECV	1-VR
Validación cruzada	14.53	14.53	-0.002	1.25	0.49

b) preditores expresados como **g AG/100 g leite**

	g CH4/kg Leite (observed)	g CH4/kg Leite (predicted)	BIAS	SECV	1-VR
Validación cruzada	14.53	14.53	0.0005	0.53	0.91

Estatísticos de validación externa do modelo de predición

a) preditores expresados como **g AG/100 g AGT**

	g CH4/kg Leite (observed)	g CH4/kg Leite (predicted)	BIAS	SEP	r2

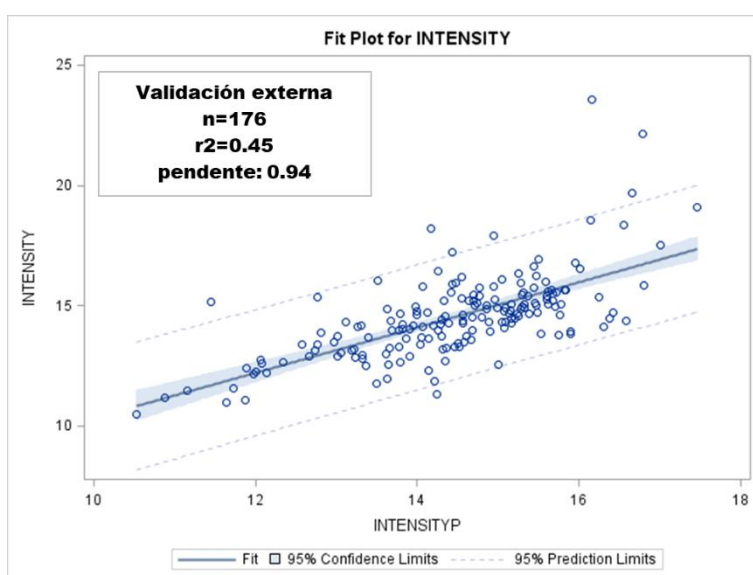
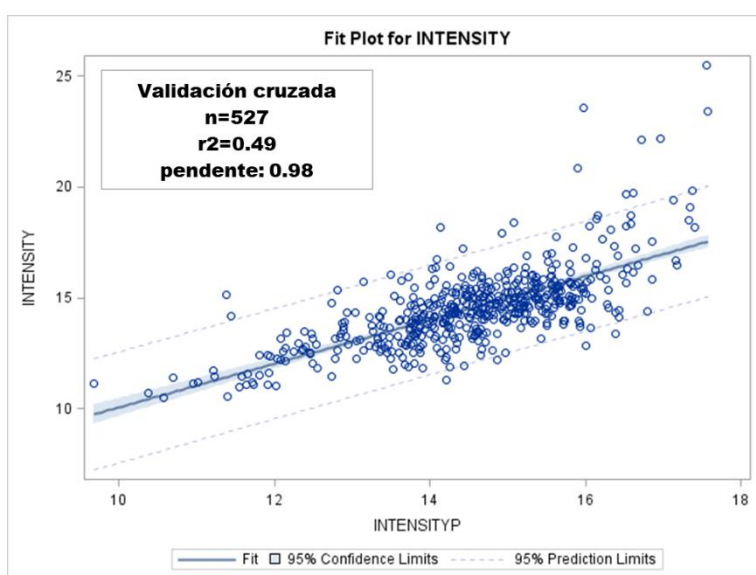
Validación externa	14.52	14.45	0.071	1.31	0.45
--------------------	-------	-------	-------	------	------

b) preditores expresados como g AG/100 g leite

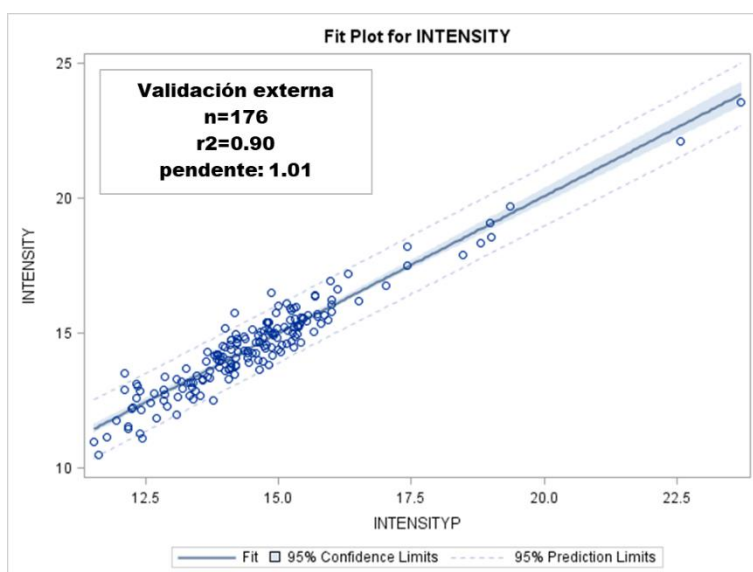
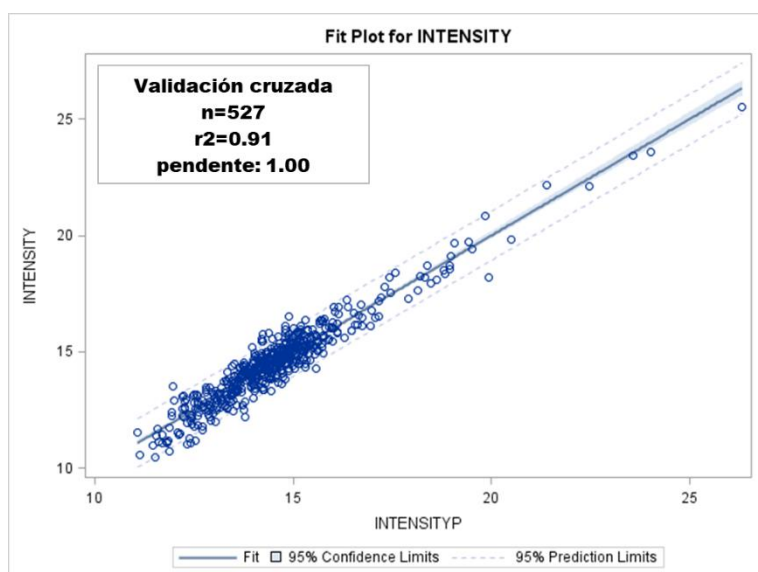
	g CH4/kg Leite (observed)	g CH4/kg Leite (predicted)	BIAS	SEP	r2
Validación externa	14.52	14.53	-0.014	0.54	0.91

Plot de valores observados e preditos da variábel dependente (Intensidade: g CH4/ kg Leite) en validación cruzada e externa

a) preditores expresados como g AG/100 g AGT



b) preditores expresados como g AG/100 g leite



Críterios de calidade das estimacións do modelo de predición

a) preditores expresados como g AG/100 g AGT

- $(1 - VR)$: O valor do coeficiente de determinación en validación cruzada é de 0.49, lixeiramente por baixo do valor umbral de 0.50. O valor do coeficiente de determinación en validación externa é de 0.45, tamén inferior ao limiar de utilidade da ecuación.
- O valor RPD en validación cruzada é de 1.42, lixeiramente inferior ao valor límite de aceptabilidade de 1.50. En validación externa este valor é de 1.34.
- O $ratio$ do rango a erro (RER) en validación cruzada é de 12.0, superior ao valor límite de 10 exixido ás ecuacións con capacidade predictiva aceptábel. En validación externa o valor de RER é exactamente de 10.0.

b) preditores expresados como g AG/100 g AGT

- $(1 - VR)$: Os valores do coeficiente de determinación en validación cruzada e externa é de 0.91, superando o valor umbral de 0.90 que indica unha excelente calidade do modelo de regresión.
- O valor RPD en validación cruzada é de 3.34 e en validación externa de 3.26, mostrando aparentemente en ambos casos unha calidade da calibración excelente ao superar o valor umbral de 3.0.
- O $ratio$ do rango a erro (RER) en validación cruzada é de 28.3 e en validación externa de 24.2, mostrando que o modelo ten unha boa capacidade predictiva.

Conclusión

Atendendo a estes criterios se considera que:

a) O modelo de predición construído a partir de preditores AG-FTMIR de mostras de leite, expresados como porcentaxe sobre o total de AG do leite permitiría obter unha información aproximada acerca da intensidade de emisión de metano entérico, sendo de utilidade para unha clasificación en rangos (alto, medio e baixo) das mostras.

b) O modelo de predición construído a partir de preditores AG-FTMIR de mostras de leite, expresados en g/100 de leite ten unha capacidade predictiva moi superior á do modelo anterior, permitindo aparentemente realizar predicións cuantitativas. Sen embargo se advirte que esta mellora pode ser debida a que a estimación da emisión de metano por Bougouin et al., (2019) se realiza utilizando o contido graxo das mostras de leite, expresado nas mesmas unidades que os preditores (é dicir, g/100 g de leite) que son, á súa vez, compoñentes da graxa. Por tanto, cómpre ter precaución á hora de realizar a estimación utilizando o segundo modelo, cuxa utilidade debe ser comprobada cando se dispoña da posibilidade de obter valores de referencia mediante o uso do instrumento Green-Feed ou outra metodoloxía homologada na bibliografía.

Entre tanto, se recomenda utilizar o primeiro modelo a fin de obter unha información preliminar da intensidade da emisión de metano entérico baseada na composición dos AG das mostras de leite determinada por FTMIR, que debe ser mellorada no futuro inmediato.

PARTE 6ª

Estimación dos grupos de ácidos graxos (AG) de mostras de leite atendendo á súa orixe (“de novo” “Mixed” e “Preformed”) a partir dos AG incluídos nos grupos de estimación FTMIR (FOSS Application Note 0064/Rev 8)

Diversos traballos mostran que a análise da evolución da composición dos AG das mostras de leite tomadas periodicamente no tanque dunha granxa leiteira pode alertar de problemas na alimentación das vacas en produción relacionados coa variabilidade na concentración enerxética da forraxe da ración. Isto pode pasar, por exemplo, cando se remata un silo con herba de 1º corte e se empeza outro con herba de 2º corte, de inferior dixestibilidade.

O leite de vaca ten aproximadamente, de media, un 4% de graxa, a cal está formada por unha complexa combinación de lípidos chamados triglicéridos, compostos por glicerol e tres AG nos seus extremos. Se identificaron máis de 400 AG diferentes no leite, o cal confire á graxa do leite o carácter de ser o compoñente máis variábel deste produto animal, tanto en concentración como en composición. Factores de orixe animal (como raza, estado de lactación e idade) e sobre todo o tipo de alimentación (en particular a relación forraxe/concentrado e o tipo de forraxe) influencian a composición da graxa do leite.

A graxa do leite se deriva de AG sintetizados “de novo” na glándula mamaria a partir dos AG acetato e butirato (AG volátiles) producidos na fermentación ruminal dos alimentos. Recentes estudos (por exemplo Woolpert et al., 2017)³¹ permitiron observar que un aumento na concentración de AG sintetizados “de novo” se relaciona con un aumento do contido graxo do leite. Valores elevados de AG “de novo” indican un funcionamento normal do rume e baixo risco de acidose, evidenciando que a ración ten suficiente fibra efectiva. Schwartz (2018)³² clasifican os AG do leite en tres grupos: O grupo “de novo”, con AG de entre 4 e 14 carbonos, o grupo “Preformed” constituído por AG con 18 ou máis carbonos, procedente da dieta e/ou da mobilización do tecido adiposo dos animais (aos que hai que sumar os AG C15:0 e C17:0, sintetizados pola flora microbiana do rume) e o grupo de 16 carbonos denominado “Mixed” que pode ser orixinado na glándula mamaria a partir dos AG volátiles ou ben proceder directamente da dieta ou da graxa corporal do animal.

Obxectivo

Desenvolver un modelo de predición dos grupos de AG denominados “de novo”, “Mixed” e “Preformed” a partir dos valores de AG FTMIR (FOSS Application Note 0064/Rev 8)

³¹ Woolpert M.E., Dann H.M., Cotanch K.W., Melilli C., Chase L.E., Grant R.J., Barbano D.M. (2017). Management practices, physically effective fiber, and ether extract are related to bulk tank milk de novo fatty acid concentration on Holstein dairy farms. J. Dairy Sci. 100:5097–5106.
<https://doi.org/10.3168/jds.2016-12046>

³² Schwarz, D. 2018. Fatty acid profiling according to origin for optimizing feeding and management of dairy cows – a new approach. FOSS White Paper.

Base de datos utilizada

Valores de 527 mostras de leite de vaca analizadas no LIGAL. Do total, 287 son mostras de tanque obtidas en 75 explotacións leiteiras galegas con distinto sistemas de alimentación. As 240 mostras restantes son de vaca individual, procedentes de experimentos realizados no CIAM con diferentes dietas (tempos de acceso ao pasto). As mostras foron analizadas seguindo as rutinas analíticas do LIGAL (análise FTMIR) e por cromatografía de gases (CG-FID). As mostras foron xeradas no decurso dos proxectos FEADER2017-022B, FEADER2019-015A e FEADER 2021-002A e as análises se realizaron seguindo a mesma metodoloxía entre os anos 2018 e 2022.

Metodoloxía

1º.- Obtención dos valores dos grupos de AG “de novo”, “Mixed” e “Preformed” a partir da composición de ácidos graxos (AG) das mostras de leite analizadas mediante cromatografía (CG-FID).

Ácidos graxos incluídos nos grupos de estimación FTMIR (FOSS Application Note 0064/Rev 8)

AGS	Saturados	C4:0, C6:0, C8:0; C10:0, C12:0, C14:0, C16:0, C18:0, C20:0
AGMI	Monoinsaturados	C10:1, C12:1, C14:1, C16:1; C18:1, C20:1, C22:1, C24:1
AGPI	Poliinsaturados	C18:2, C18:3, C18:4, C20:2, C20:3, C20:4, C20:5, C22:2, C22:3, C22:4, C22:5, C22:6
AGtrans	AG trans	C16:1, C18:1, C18:2, C18:3
AGCC	AG Cadea Curta	C4:0, C6:0, C8:0; C10:0
AGCM	AG Cadea Media	C12:0, C14:0, C16:0
AGCL	AG Cadea Longa	C18:0, C18:1, C18:2, C18:3, C18:4, C20:0; C20:1; C20:2, C20:3, C20:4, C20:5, C22:0; C22:1; C22:2, C22:3, C22:4, C22:5, C22:6, C24:0; C24:1
MIR	Mirístico	C14:0
PAL	Palmítico	C16:0
EST	Esteárico	C18:0
OLE	Oleico	C18:1

Grupos de ácidos graxos do leite polo seu orixe. Schwartz (2018)³³

Grupo	Ácidos graxos
“de novo”	C4:0; C6:0; C8:0; C10:0; C12:0; C14:0; C14:1
“Mixed”	C16:0; C16:1
“Preformed”	C15:0; C17:0; C18:0; C18:1; C18:2; C18:3; C20:0; C20:2; C20:4; C22:0; C24:0

³³ Schwarz, D. 2018. Fatty acid profiling according to origin for optimising feeding and management of dairy cows – a new approach. FOSS White Paper.

Grupos de ácidos graxos do leite polo seu orixe, calculados a partir das determinacións de cromatografía de gases

Grupo	Ácidos graxos
"de novo"	C4:0 +C6:0 +C8:0 +C10:0 +C10:1c9 +C11:0 +C12:0 +C13:0iso +C13:0aio +C12:1 +C13:0 +C14:0iso +C14:0 +C14:1c9
"Mixed"	C16:0 +C16:1t9 +C16:1c7tdesc +C16:1c9n7 +C16:0iso +C16:1c11
"Preformed"	C15:0 +C15:0iso +C15:0aio +C15:1c10 +C17:0 +C17:0iso +C17:0aio +C17:1c9 +C18:0 +C18:1t4t5 +C18:1t6 +C18:1t7t9 +C18:1t10 +C18:1t11 +C18:1t12 +C18:1t13t14 +C18:1c9n9 + C18:1t15c10 +C18:1c11n7 +C18:1c12 +C18:1t16 +C18:2tn6 +C18:2cn6 +C18:3n6 +C18:3n3 +C20:0 +CLAc9t11 +CLAdesc1 +CLAdesc2 +C20:1c9 +C20:1c11n9 +CLAdesc3 +CLAdesc4 +C21:0 +C20:2n6 +C20:3n6 +C20:3n3 +C22:0 +C22:1n9 +C20:4n6 +C22:2n6 +C23:0 +C20:5n3 +C24:0 +C24:1n9 +C22:5n3 +C22:6n3

2º.- Modelo de regresión onde os preditores son os valores de AG do conxunto de mostras de leite determinados mediante análise FTMIR (MilkoScan). Os AG dispoñíbeis son os obtidos mediante a aplicación de FOSS integrada na rutina analítica do LIGAL³⁴. Estes valores se expresan:

a) En porcentaxe sobre o valor total de AG (AGT), calculados de acordo ao IDF Bulletin (2010) segundo a expresión $g\ AG/100\ g\ AGT = (g\ AG/100\ g\ leite) \times 100 / (MG\% \times 0.95)$, onde MG é a materia graxa do leite.

b) Sen transformar, tal e como resultan da aplicación de FOSS, expresados como g AG/100 g de leite.

Á súa vez, a variábel dependente (valores de AG "de novo", "Mixed" e "Preformed" se expresa, respectivamente, en porcentaxe sobre o valor total de AGT e como g AG/100 g de leite.

3º.- A construción do modelo de regresión se realizou mediante a análise de regresión paso a paso (PROC STEPWISE) e regresión linear simple (PROC REG) do paquete estatístico SAS (SAS/STAT v. 14.2). No presente informe non se presentan, en razón á limitación de espazo, os resultados do proceso de validación cruzada e externa das ecuacións de predición.

Resultados

Valores do perfil de AG das mostras de leite de tanque determinados por FTMIR

	N	Mean	Std Dev	Min.	Max.
g/100 g leite					
AGS	527	2.60	0.49	1.65	5.86
AGI	527	1.19	0.18	0.77	2.36
AGMI	527	1.00	0.16	0.65	2.17
AGPI	527	0.14	0.03	0.06	0.31
AG_trans	527	0.13	0.05	0.04	0.33
AGCC	527	0.39	0.07	0.25	0.77

³⁴ MikoScan de FOSS. Os ácidos graxos das mostras de leite se determinaron seguindo a FOSS Application Note 0064/Rev 8

AGCM	527	1.74	0.47	0.70	4.77
AGCL	527	1.42	0.21	0.88	3.05
MIR	527	0.40	0.10	0.20	1.04
PAL	527	1.13	0.29	0.54	3.17
EST	527	0.39	0.07	0.23	0.85
OLE	527	0.88	0.14	0.57	1.94
g/100 g AGT					
AGS	527	68.4	3.6	56.3	77.9
AGI	527	31.6	3.6	22.3	43.7
AGMI	527	26.6	3.0	18.1	38.4
AGPI	527	3.8	0.9	1.8	6.6
AG_trans	527	3.6	1.3	0.8	8.6
AGCC	527	10.4	0.7	8.0	12.5
AGCM	527	45.7	6.7	20.2	61.7
AGCL	527	37.8	4.2	27.6	51.0
MIR	527	10.4	1.4	5.7	14.4
PAL	527	29.6	3.7	17.2	43.0
EST	527	10.4	1.2	7.2	14.6
OLE	527	23.4	2.6	17.0	32.5

Valores dos grupos de AG calculados a partir dos valores da análise cromatográfica das mostras de leite

Grupo	N	Mean	Std Dev	Min.	Max.
g/100 g leite					
DNOVO	527	1.08	0.20	0.59	2.12
MIXED	527	1.26	0.31	0.65	3.67
PREFORM	521	1.45	0.25	0.84	3.09
g/100 g AGT					
DNOVO_AGT	527	28.50	2.80	18.93	35.63
MIXED_AGT	527	33.06	3.97	22.95	49.28
PREFORM_AGT	521	38.50	5.50	21.24	56.02

Coefficientes de correlación (r) entre os grupos de AG e os potenciais preditores FTMIR (FOSS Application Note 0064/Rev 8)

		“de novo”	“Mixed”	“Preform”
		g/100 g leite		
AGS	r	0.91	0.94	0.40
	p	<.0001	<.0001	<.0001
AGI	r	0.33	0.37	0.93
	p	<.0001	<.0001	<.0001
AGMI	r	0.33	0.41	0.92
	p	<.0001	<.0001	<.0001
AGPI	r	0.08	-0.10	0.67
	p	0.0535	0.0213	<.0001
AGtrans	r	-0.29	-0.34	0.49
	p	<.0001	<.0001	<.0001

		“de novo”	“Mixed”	“Preform”
		g/100 g AG total		
AGS	r	0.66	0.78	-0.90
	p	<.0001	<.0001	<.0001
AGI	r	-0.67	-0.78	0.90
	p	<.0001	<.0001	<.0001
AGMI	r	-0.74	-0.72	0.90
	p	<.0001	<.0001	<.0001
AGPI	r	-0.29	-0.77	0.70
	p	<.0001	<.0001	<.0001
AGtrans	r	-0.46	-0.65	0.70
	p	<.0001	<.0001	<.0001

AGCC	r	0.93	0.82	0.42	0.70	0.07	-0.40
	p	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.1253	<.0001
AGCM	r	0.87	0.95	0.18	0.51	0.83	-0.86
	p	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
AGCL	r	0.33	0.42	0.89	-0.71	-0.68	0.85
	p	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
MIR	r	0.92	0.92	0.16	0.71	0.71	-0.87
	p	<.0001	<.0001	0.0002	<.0001	<.0001	<.0001
PAL	r	0.86	0.94	0.26	0.41	0.78	-0.77
	p	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
EST	r	0.42	0.52	0.80	-0.64	-0.51	0.69
	p	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
OLE	r	0.34	0.42	0.92	-0.72	-0.73	0.89
	p	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001

Pearson Correlation Coefficients, N = 527; Prob > |r| under H0: Rho=0

Modelos de predición seleccionados: Coeficientes do modelo de predición

a) Variábeis expresadas en g /100 g leite

AG “de novo”= 0.132 -0.142 x AGMI +0.784 x MIR +1.97 x AGCC

Coeficiente de determinación (R_c^2) 0.92

Media: 1.08 g AG “de novo”/100 g leite

Erro mínimo de predición en calibración SEC: ± 0.056

Coeficiente de variación 5.27%

	INTERCEPT	AGMI	MIR	AGCC
	0.139	-0.142	0.784	1.970
s.e.	± 0.017	± 0.019	± 0.052	± 0.089
p	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

s.e.: Erro estándar do parámetro; p: significación

AG “Mixed”= -0.049 +0.685 x AGMI -0.495 x OLE +0.608 x AGCM

Coeficiente de determinación (R_c^2) 0.92

Media: 1.26 g AG “Mixed”/100 g leite

Erro mínimo de predición en calibración SEC: ± 0.087

Coeficiente de variación 6.96%

	INTERCEPT	AGMI	OLE	AGCM
	-0.049	0.685	-0.495	0.608
s.e.	± 0.026	± 0.132	± 0.155	± 0.086
p	0.060	<0.0001	0.0015	<0.0001

s.e.: Erro estándar do parámetro; p: significación

$$\text{AG "Preformed"} = -0.073 + 1.100 \times \text{AGI} - 0.339 \times \text{MIR} + 0.886 \times \text{EST}$$

Coeficiente de determinación (R_c^2) 0.88

Media: 1.44 g AG "Preformed"/100 g leite

Erro mínimo de predición en calibración SEC: ± 0.086

Coeficiente de variación 5.96%

	INTERCEPT	AGI	MIR	EST
	-0.073	1.100	-0.339	0.886
s.e.	± 0.027	± 0.037	± 0.041	± 0.102
p	0.006	<0.0001	<0.0001	<0.0001

s.e.: Erro estándar do parámetro; p: significación

b) preditores expresados como g AG/100 g AG total

$$\text{AG "de novo"} = 24.4 - 0.457 \times \text{AGMI} + 0.596 \times \text{MIR} - 0.194 \times \text{PAL} + 1.50 \times \text{AGCC}$$

Coeficiente de determinación (R_c^2) 0.74

Media: 28.5 g AG "de novo"/100 g AG total

Erro mínimo de predición en calibración SEC: ± 1.42

Coeficiente de variación 5.01%

	INTERCEPT	AGMI	MIR	PAL	AGCC
	24.46	-0.457	0.596	-0.194	1.508
s.e.	± 3.84	± 0.065	± 0.107	± 0.032	± 1.508
p	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

s.e.: Erro estándar do parámetro; p: significación

$$\text{AG "Mixed"} = 43.9 - 0.730 \times \text{EST} - 0.782 \times \text{OLE} - 1.37 \times \text{AGCC} + 0.358 \times \text{AGCM} + 0.343 \times \text{AGCL}$$

Coeficiente de determinación (R_c^2) 0.71

Media: 33.0 g AG "Mixed"/100 g AG total

Erro mínimo de predición en calibración SEC: ± 2.11

Coeficiente de variación 6.39%

	INTERCEPT	EST	OLE	AGCC	AGCM	AGCL
	43.9	-0.730	-0.782	-1.378	0.358	0.343
s.e.	± 5.22	± 0.153	± 0.140	± 0.195	± 0.032	± 0.098
p	<0.0001	<0.0001	0.0015	<0.0001	<0.0001	0.0005

s.e.: Erro estándar do parámetro; p: significación

$$\text{AG "Preformed"} = 4.92 + 0.662 \times \text{AGI} + 0.419 \times \text{AGMI} - 0.610 \times \text{MIR} + 0.75 \times \text{EST}$$

Coeficiente de determinación (R_c^2) 0.84

Media: 38.49 g AG "Preformed"/100 g AG total

Erro mínimo de predición en calibración SEC: ± 2.17

Coeficiente de variación 5.64%

	INTERCEPT	AGI	AGMI	MIR	EST
	4.92	0.662	0.419	-0.610	0.751
s.e.	± 4.08	± 0.095	± 0.121	± 0.173	± 0.106

<i>p</i>	0.2281	<0.0001	0.0006	0.0005	<0.0001
----------	--------	---------	--------	--------	---------

s.e.: Erro estándar do parámetro; *p*: significación

Conclusión

Se desenvolveron modelos de estimación dos grupos de AG do leite atendendo ao seu orixe (“de novo”, “Mixed” e “Preformed”) a partir dos valores de AG proporcionados pola aplicación das calibracións FTMIR (FOSS Application Note 0064/Rev 8).

Atendendo aos estatísticos de calibración, os modelos permiten explicar entre o 70 e o 92% da varianza, cun erro de estimación que, referido ao valor medio da variábel dependente, representa un coeficiente de variación (CV) menor do 7%.

Os valores do grupo de AG “de novo” se estiman mediante un modelo que explica o 92% da varianza cun CV de 5.2% cando se expresan os valores de AG en g/100 g de leite. Á súa vez, cando os valores de AG se expresan como g/100 g AGT, o modelo para estimar o grupo de AG “de novo” permite explicar o 74% da varianza cun CV de 5.0%.

Estas calibracións poden ser utilizadas nas rutinas analíticas do LIGAL para estimar os grupos de AG do leite atendendo a súa orixe co cal se dispón dunha nova ferramenta para monitorizar a idoneidade da alimentación das vacas de leite.

PARTE 7ª

Relación entre medidas da emisión de metano por método LMD e estimacións indirectas mediante análise do perfil graxo de mostras de leite

Para a realización do proxecto non se puido contar, en contra do previsto, con instrumentación capaz de producir valores de referencia na medida da emisión de metano entérico das vacas en produción. Razón pola cal foi necesario recorrer ao uso de medidas indirectas utilizando o detector láser (LMD) ou ben mediante algoritmos de estimación tomados da bibliografía e baseados na composición de ácidos graxos do leite como preditores, complementados nalgún caso coa composición fisicoquímica do leite.

Obxectivo

Comprobar a medida na cal son comparábeis as medidas indirectas da emisión de metano (LMD vs. estimacións por algoritmos) utilizadas no proxecto.

Metodoloxía

Se comparan as medidas efectuadas co instrumento LMD para determinar a emisión de metano entérico no experimento de alimentación con vacas de leite (proporción de concentrado na dieta) coas estimación da emisión realizadas de forma indirecta a partir da composición de ácidos graxos (AG) das mostras de leite determinadas por cromatografía de gases e composición fisicoquímica do leite.

Se utilizou unha base de datos composta por 144 observacións, correspondentes a 24 animais sobre os que se realizou unha medida quincenal da emisión de metano co instrumento LMD (10 minutos/vaca) e dos que se dispuña da composición de AG das mostras individuais de leite tomadas o mesmo día que se realizaba a medida da emisión de metano.

O cálculo da emisión se realizou da seguinte forma:

a) Instrumento LMD: Situado a 1 m do animal, se tomou o valor medio dos rexistros da medida realizada durante 10 min (1200 rexistros/vaca, medida en ppm.m). Este valor medio ($\bar{X}_{ppm.m}$) se transformou na emisión diaria de metano (LMD_YIELD: $Y_{g\ CH_4/vaca}$) mediante a expresión $Y_{g\ CH_4/vaca} = 1.59 \bar{X}_{ppm.m}$. A emisión unitaria de metano por litro de leite (LMD_INTENSITY: $g\ CH_4/LFPCM$) se obtivo mediante a expresión $Y_{g\ CH_4/vaca}/FPCM$ onde $FPCM$ é a produción diaria de leite corrixida en graxa e proteína (4% MG, 3.3% MP)³⁵.

b) Estimación mediante a composición en AG do leite seguindo o modelo Van Gastelen et al., (2018a): A emisión unitaria de metano por litro de leite ($VG_INTENSITY$) se estimou mediante a ecuación $VG_INTENSITY_{g\ CH_4/LFPCM} = 13.7 - 1.33\ C4:0 + 32.0\ C15:iso - 4.12\ C18:3n3 - 35.44\ C20:1c11n9 + 27.62\ C22:5n3$ onde os preditores foron determinados no laboratorio por cromatografía de gases e están expresados en porcentaxe sobre o total de AG. A emisión diaria de metano por vaca ($VG_YIELD_{g\ CH_4/vaca}$) se estimou mediante a expresión $VG_INTENSITY_{g\ CH_4/LFPCM} \times FPCM$.

c) Estimación mediante a composición en AG do leite seguindo o modelo de Bougouin et al., (2019): A emisión unitaria de metano por litro de leite ($BOU_INTENSITY$) se estimou mediante a ecuación $BOU_INTENSITY_{g\ CH_4/L\ Leite} = 15.3 + 3.9 \times C16:0\ iso - 0.5 \times (C18:1t10 + C18:1t11) + 1.9 \times MG + 2.2 \times MP - 3.2 \times LACT$ onde os AG preditores foron determinados no laboratorio por cromatografía de gases, estando expresados en porcentaxe sobre o total de AG e os valores de materia graxa (MG), proteína (MP) e lactosa (LACT) das mostras do leite se expresan en porcentaxe (g/100 g de leite). A emisión diaria de metano por vaca ($BOU_YIELD_{g\ CH_4/vaca}$) se estimou mediante a expresión $BOU_INTENSITY_{g\ CH_4/L\ Leite} \times PLeite$, onde $PLeite$ é a produción diaria de leite por vaca, sen corrixir.

Se realizou análise de varianza (ANOVA) mediante o procedemento GLM do paquete estatístico SAS (SAS/STAT v. 14.2) para observar o efecto do tratamento (nível de concentrado na ración) sobre a emisión de metano estimada polos diferentes métodos e análise de regresión mediante o mesmo procedemento para comparar os valores obtidos co instrumento LMD e as estimacións dos algoritmos.

Resultados:

Na táboa adxunta se reproducen os valores medios de produción de leite e emisión de metano rexistrados no ensaio de alimentación con vacas de leite. Todos os métodos de estimación da emisión utilizados detectan diferenzas entre tratamentos cun efecto altamente significativo ($p < .0001$) pero os resultados son diferentes en magnitude, en particular cando se consideran os valores unitarios de emisión. Os cálculos realizados para o instrumento LMD mostran un descenso significativo da emisión de metano por litro de leite cando se incrementa a proporción de concentrado na ración, en concordancia coa bibliografía, desde 11.4 g CH₄/litro

³⁵ Calculada como $FPCM (L/d) = Produción (L/d) \times 0.321 \times (0.383 \times \% MG + 0.242 \times \% MP + 0.7832)$

para o tratamento sen concentrado até 7.0 g CH₄/litro para o tratamento co 60% de concentrado. Esta tendencia parece tamén observarse cando se utiliza un dos algoritmos (Van Gastelen et al., 2018a) con valores respectivos de 15.5 e 14.3 g CH₄/litro pero non no outro caso (Bougouin et al., 2019) cuxos resultados mostran incluso un incremento da intensidade de emisión desde 12.6 a 15.3 g CH₄/litro para os tratamentos de 0% e 60% de concentrado, respectivamente. En todo caso, as estimacións obtidas co instrumento LMD son netamente inferiores ás proporcionadas polos outros dous métodos tanto na intensidade como na produción total de metano. Mentres que os resultados obtidos co instrumento LMD mostran unha tendencia cuadrática na emisión total diaria de metano con valores de 190, 346, 319 e 271 g CH₄/vaca para os tratamentos de 0%, 20%, 40% e 60% de concentrado, as estimacións polos outros dous métodos mostran unha tendencia lineal até o nivel de 40% concentrado e un incremento posterior non significativo, con valores de 258, 412, 548 e 562 g CH₄/d para a estimación *VG_YIELD* e de 232, 430, 542 e 589 g CH₄/d para a estimación *BOU_YIELD*.

	Tratamento (% concentrado na ración)				s.e.m.	p
	0%	20%	40%	60%		
n	36	36	36	36		
Produción (kg/vaca e día) §						
<i>Leite (non corrixida)</i>	19.2	29.9	38.3	40.6	1.93	<.0001
<i>FPCM</i>	16.5	28.9	37.0	41.2	2.17	<.0001
Produción de metano - Total (g CH ₄ /vaca e día)§						
<i>LMD_YIELD</i>	190	346	319	271	50.9	<.0001
<i>VG_YIELD</i>	258	412	548	562	42.4	<.0001
<i>BOU_YIELD</i>	282	430	542	589	39.8	<.0001
Produción de metano - Intensidade (g CH ₄ /kg leite)§						
<i>LMD_INTENSITY</i>	114.4	12.7	8.7	7.0	2.17	<.0001
<i>VG_INTENSITY</i>	15.5	13.8	14.8	14.3	0.82	<.0001
<i>BOU_INTENSITY</i>	12.6	13.6	14.5	15.3	0.63	<.0001

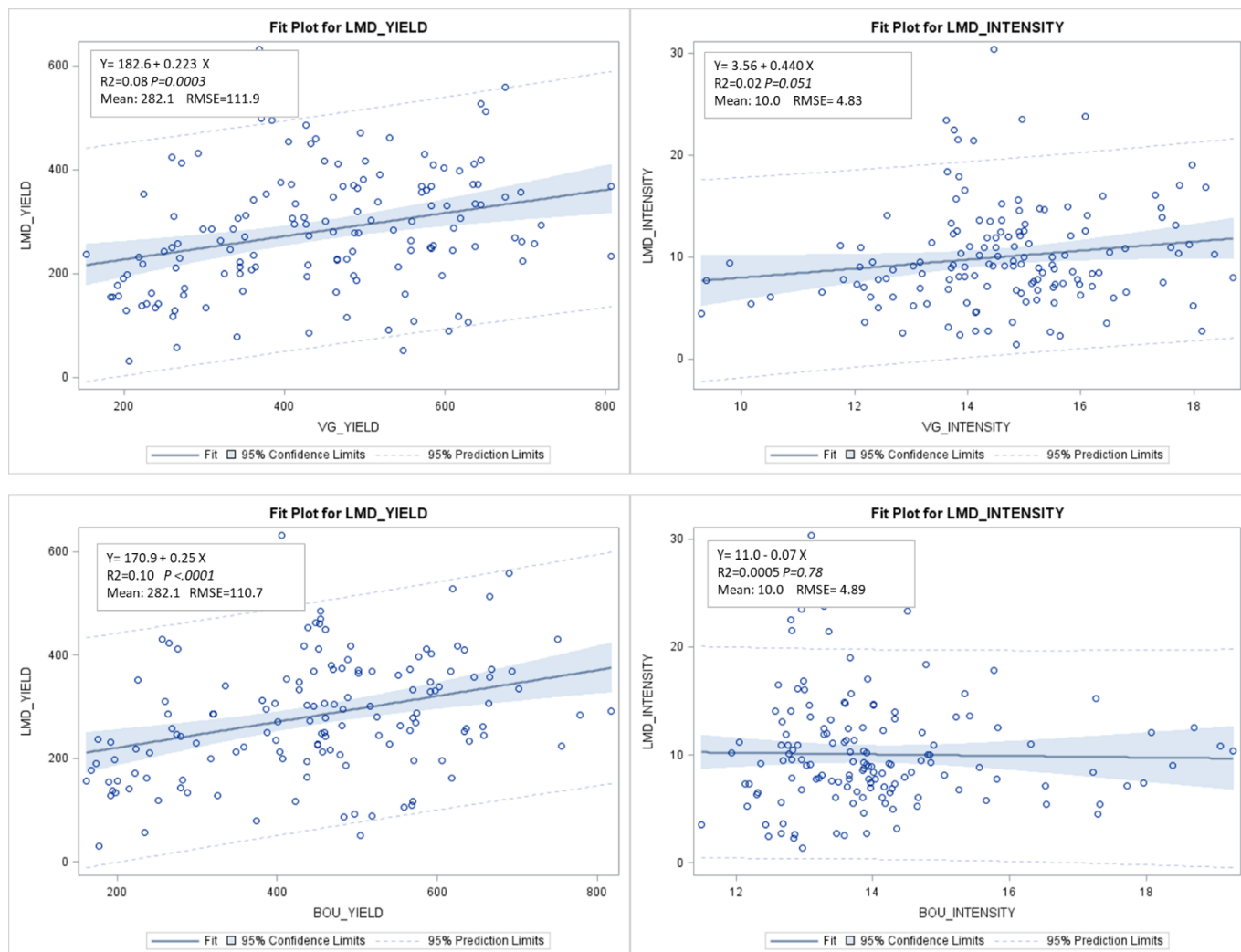
§ Valores corrixidos por covariábeis

Finalmente, cando se analiza a relación entre os valores obtidos mediante o instrumento LMD e os proporcionados polos dous algoritmos, se pode observar a falta de correspondencia entre ambos, en particular para os valores unitarios de emisión de metano por litro de leite, que non é significativa. Cando se consideran os valores da produción diaria de metano a porcentaxe de varianza explicada polos modelos de regresión entre os citados métodos non chega a superar o 10% polo que a correspondencia estudada é altamente insatisfactoria.

Conclusión:

Os métodos indirectos utilizados para estimar a produción entérica de metano en vacas de leite poden ser de utilidade para obter unha información aproximada das emisións. Sen embargo, presentan unha baixa sensibilidade e mostran unha escasa correspondencia entre a metodoloxía de estimación, o que resta fiabilidade ás predicións. Os resultados poñen de manifesto a necesidade de dispoñer de instrumentación para obter valores de referencia da emisión de metano a fin de avanzar na construción de modelos robustos e precisos para a súa estimación.

Relación entre as medidas indirectas de emisión de metano entérico



PARTE 8ª

Estimación das emisións de metano entérico a través do leite de vaca mediante FT-MIR

Introdución

A Espectroscopía do Infravermello Medio con Transformada de Fourier (FT-MIR) está amplamente recoñecida, particularmente en analizar mostras líquidas de alimentos. Esta tecnoloxía é unha técnica de análise espectroscópica que utiliza unha parte do espectro electromagnético, concretamente, lonxitudes de onda do Infravermello medio (MIR; 2500 - 25000 nm), rexión que se utiliza para estudar as vibracións fundamentais e a súa estrutura rotacional-vibratoria asociada. Esta gran amplitude da rexión espectral, en comparación, por exemplo, co NIRS, proporciona un espectro con multitude de datos, obtidos a partir da radiación de todas as lonxitudes de onda que se miden simultaneamente, mediante o uso dun interferómetro e da aplicación da transformada de Fourier. O principal beneficio das lonxitudes de onda longas é que proporcionan unha representación moi exacta do espectro, obtendo información química máis específica das mostras.

Esta metodoloxía se basea en xerar un feixe de luz a partir dun interferómetro que penetre no leite (debido a que se trata dun líquido), grazas aos seus espellos modulará un espectro nun interferograma que, utilizando o algoritmo denominado Transformada de Fourier, nos permitirá medir todas as frecuencias ao mesmo tempo. Desta forma, obtemos un espectro no cal podemos diferenzar bandas significativas en función dos distintos grupos funcionais que conteña o leite.

A espectroscopía FT-MIR habitualmente se utiliza rutineiramente para medir diferentes compoñentes principais do leite, aparecendo nos últimos anos novas aplicacións que permiten determinar novos parámetros de interese e características relacionadas coa calidade do leite, como a orixe alimentaria, perfil de ácidos graxos, produción de metano e a detección de estados fisiolóxicos da vaca (xestación, desequilibrios nutricionais).

A fin de incrementar información a este respecto, realizouse un traballo cuxo obxectivo foi avaliar a capacidade da espectroscopía FT-MIR para estimar as emisións de metano entérico en vacas mediante a análise de mostras do leite de vaca.

Material e métodos

Este estudo realizouse a partir dun total de 505 mostras de leite de vaca, das cales se rexistraron 3 espectros de cada mostra nun instrumento MilkoScan™ 7 RM (FOSS, Hillerød, Denmark), obtendo un total de 1515 observacións (espectros). As mostras de leite de vaca individual proceden de ensaios realizados na finca experimental do CIAM, onde os animais permaneceron en condicións de alimentación controlada. A composición da dieta das racións foi de diferente grado de intensificación, representando os diferentes modelos produtivos galegos.

Os valores de referencia da produción de metano foron calculados a partir do perfil de ácidos graxos aplicando a ecuación de Van Gastelen *et al.* (2018a) para a intensidade de produción de leite (Y, g CH₄/kg FPCM):

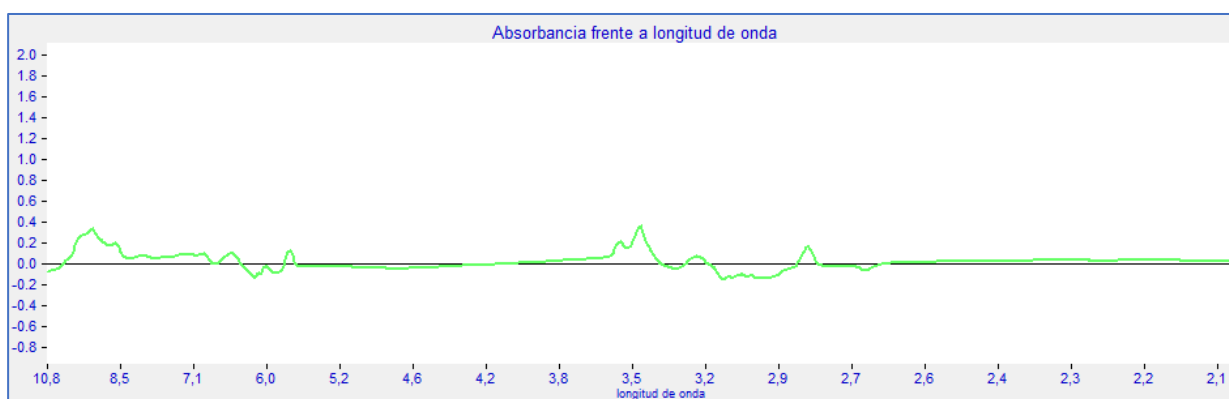
$$Y = 13.7 - 1.33 \text{ C4:0} + 32.0 \text{ C15:0iso} - 4.12 \text{ C18:3n3} - 35.44 \text{ C20:1c11n9} + 27.62 \text{ C22:5n3}$$

A análise da composición de ácidos graxos das mostras de leite realizouse mediante cromatografía de gases, seguindo metodoloxía estándar (GC-FID).

A recollida da información espectral realizouse sobre as mostras en estado líquido, rexistrando as absorbancias en 1060 lonxitudes de onda situadas na banda de infravermello medio (lonxitudes de onda de 925-5010 cm^{-1} , cada 4 cm^{-1}).

A Figura 1 representa o espectro medio do colectivo das 505 mostras de leite (n=1515) rexistrados na rexión MIR, presentado en ordenadas (eixo y) a absorbancia e en abscisas (eixo x) a lonxitude de onda (2,1 -10,8 μm).

Figura 1.- Espectro medio na rexión MIR do colectivo de mostras de leite (n=505)



A análise quimiométrica dos datos se realizou mediante o software FTIR Calibrator (version 5.3.0.0, 2021; FOSS, Hillerød, Denmark). O modelo construído relaciona a información espectral MIR coa produción de metano (g CH_4 /vaca e día). O modelo de regresión lineal múltiple (MLR) é considerado máis efectivo que o modelo de mínimos cuadrados parciais (PLS) para o desenvolvemento de modelos de predición FTMIR con mostras de leite (Shadpour *et al.*, 2022; Ferragina *et al.*, 2015). A ecuación de calibración foi xerada por MLR entre os datos espectrais e os valores de referencia. O conxunto total de mostras se dividiu en 2 grupos, un grupo de calibración, conformado por 352 mostras de leite, e outro grupo independente de validación externa con 153 mostras.

Os espectros se utilizaron cun tratamento espectral de segunda derivada, utilizando o método de elección de variables MLR para seleccionar as rexións de lonxitudes de onda mediante a opción de selección automática de bandas de lonxitudes de onda (canaís espectrais) do software FTIR Calibrator, na cal selecciona de forma automática as lonxitudes de onda máis relevantes, as cales presentan unha maior correlación entre o valor da absorbancia a unha lonxitude de onda determinada e o valor de referencia, e en base as cales se desenvolve a calibración MLR, e ao mesmo tempo se exclúen as variables espectrais que non aportan información relevante sobre o analito ou contén interferencias importantes, evitando así engadir ruído ao modelo.

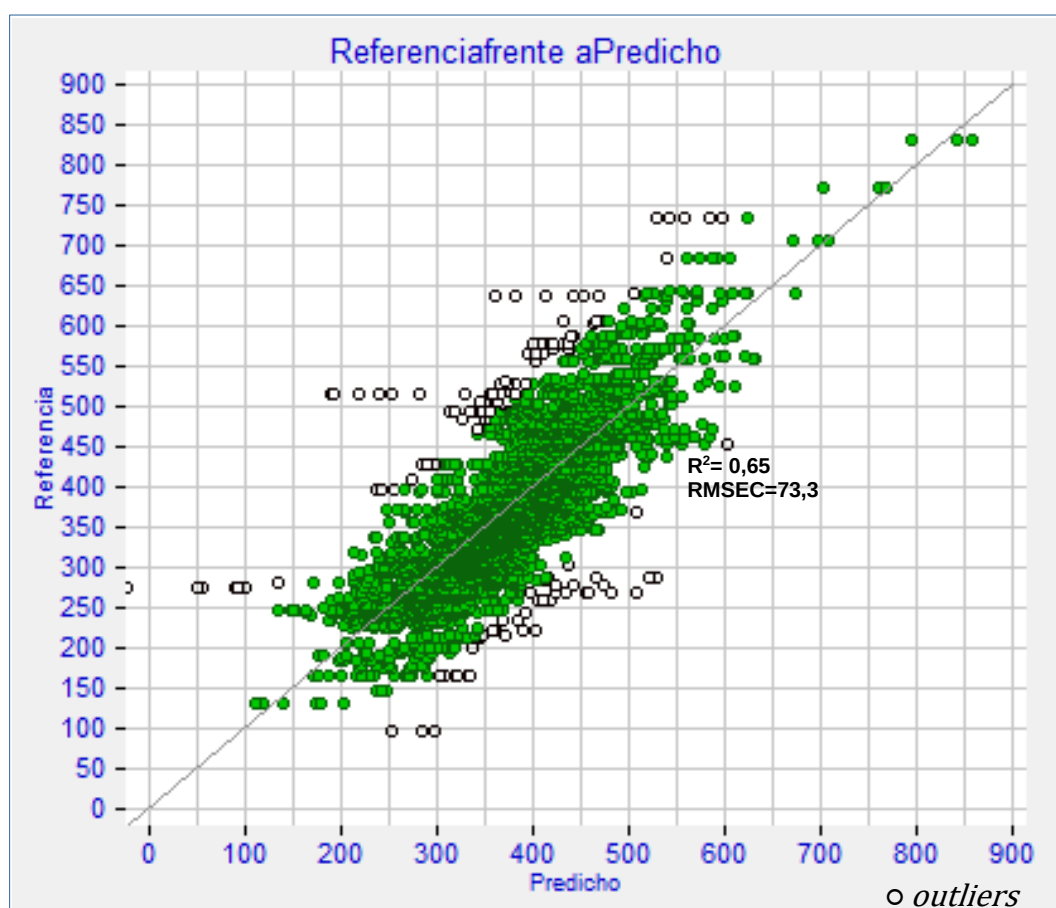
Este paso no proceso de desenvolvemento da calibración MLR é clave, xa que cantos máis canaís se seleccionan, máis información espectral se utiliza. Sen embargo, dado que a selección dun excesivo número de bandas espectrais pode derivar problemas de colinealidade, debido á posible existencia de diferentes variables independentes altamente correlacionadas que aportan a mesma información, ocasionando agregación de ruído ao modelo. O software FTIR calibrator optimiza o número óptimo de canaís espectrais seleccionados, recomendando o software a selección dun número máximo de 40 canaís.

Durante o desenvolvemento da calibración MLR aplicáronse 3 pases de eliminación de mostras anómalas químicas.

Resultados

A Táboa 1 mostra a capacidade da tecnoloxía FT-MIR de estimar as emisións de metano entérico en vacas mediante a análise de mostras do leite de vaca. Na Táboa 1 se mostran os valores da media, desviación estándar e o rango de valores das emisións de metano do grupo de calibración e validación externa das coleccións de mostras que se utilizaron para o desenvolvemento e validación das ecuacións FT-MIR, así como os estatísticos de calibración e validación externa. Para ambos grupos e expresados en g CH₄/vaca e día, os valores medios (e rango de variación) da emisión de metano entérico foron, respectivamente, 374 (163 a 829) e 400 (213 a 639). A variabilidade observada é elevada, reflectindo a alta variabilidade da composición da dieta dos ensaios realizados no CIAM en condicións de alimentación controlada.

Figura 2.- Plot de valores da estimación de metano entérico (g CH₄/vaca e día) e de valores preditos pola ecuación FT-MIR no proceso de calibración.



O valor do coeficiente de determinación (R^2) no proceso de calibración foi 0,65 (Figura 2), permitindo realizar unha clasificación cualitativa básica, en valores alto, medio e baixo do parámetro a predicir (Shenk e Westerhaus, 1996 e Shenk *et al.*, 2001). Por outra banda, o valor do ratio RPDc (1,45) se situou lixeiramente por debaixo do mínimo (RPD=1,50) recomendado por Williams (2001) para que a ecuación sexa útil con propósitos predictivos. Con todo, segundo o valor de RERC (9,09) e atendendo ao criterio indicado por Millmier *et al.*

(2000), os modelos de predición NIRS que posúen valores de RER superiores a 8 permitirían realizar unha predición cuantitativa aceptable.

Táboa 1.- Estatísticos de calibración e validación da ecuación FT-MIR para estimar as emisións de metano entérico (g CH₄/vaca e día) en vacas mediante a análise de mostras do leite.

Calibración											
Parámetro	canais (N)	outliers (N)	N	Min	Max	Med	SD	R ²	RMSEC	RERc	RPDc
g CH ₄ /vaca e día	39	141	915	163	829	374	106	0,65	73,3	9,09	1,45
Validación externa											
Parámetro	N	Min	Max	Med	SD	Rv ²	RMSEP	RERv	RPDv		
g CH ₄ /vaca e día	459	213	639	400	93	0,57	84,7	5,03	1,10		

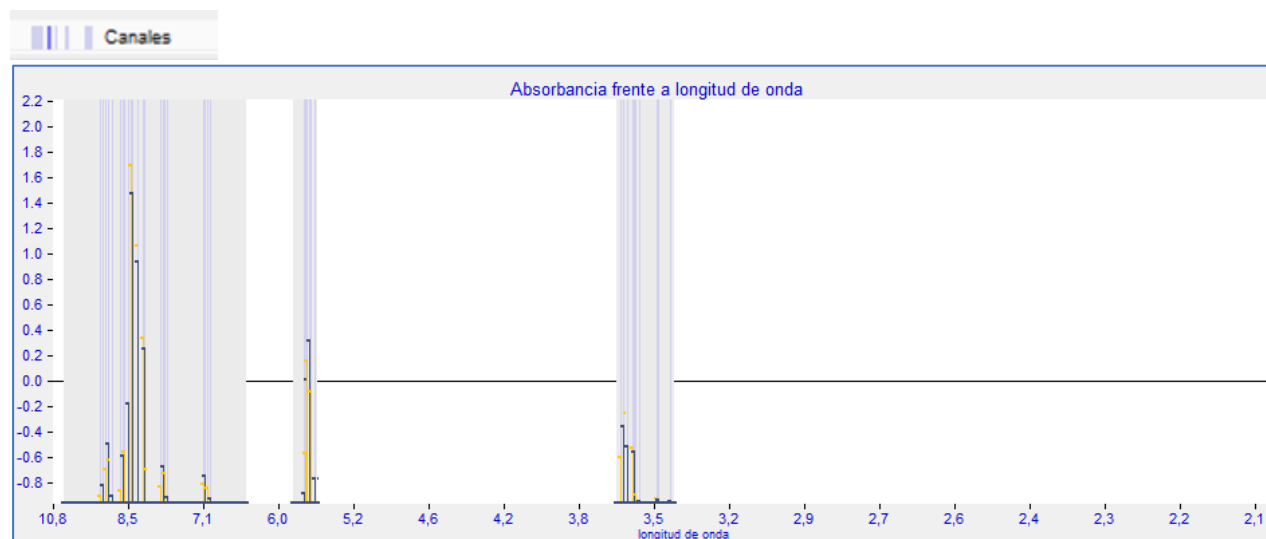
N: número de observacións; Min: valor mínimo; Max: valor máximo; Med: Media; SD: desviación estándar; R²: coeficiente de determinación do modelo de calibración; RMSEC: Error cuadrático medio de calibración; RPDc: ratio entre a SD e RMSEC; RERc: ratio entre rango de valores e RMSEC, R²v: coeficiente de determinación en validación externa; RMSEP: Error cuadrático medio de Predición; RPDv: ratio entre a SD e RMSEP; RERv: ratio entre rango de valores e RMSEP

O coeficiente de determinación (Rv²) e o valor de RMSEP no proceso de validación externa foron, respectivamente, de 0,57 e 84,7 g CH₄/vaca e día. O modelo construído para a estimación do metano entérico non cumpriu un dos criterios de control de calidade suxeridos por Windham *et al.* (1989) para testar a fiabilidade dos modelos de predición nas estimacións realizadas sobre mostras independentes, relativo ao valor mínimo do coeficiente de determinación en validación externa (Rv²>0,60). O valor de índice RERv foi de 5,03, segundo Millmier *et al.* (2000), a utilidade das calibracións permitiría a clasificación en rangos (4,0 < RER ≤ 8,0). Seguindo a Williams (2001) o modelo obtido para a estimación de metano entérico (RPDv = 1,10) non se considera útil, ao presentar un valor de RPD inferior ao valor límite de aceptabilidade 1,50.

Os traballos realizados por Dehareng *et al.* (2012), Vanlinder *et al.* (2015), Vanlinder *et al.* (2021) e Coppa *et al.* (2022), nos cales estudaron a predición de emisión entérica a partir dos espectros FTMIR do leite, cuxos valores de referencia da emisión de metano se determinaron directamente mediante diferentes métodos (técnica SF6, sistema GreenFeed y cámara respirométrica), mostraron valores de Rc² de 0,68, 0,75, 0,68 e 0,73, respectivamente. En canto ao RMSEC dos citados traballos, os valores oscilaron entre 53 e 84 g CH₄/vaca e día, estes resultados son similares aos obtidos no presente traballo.

A Figura 3 mostra a representación gráfica dos coeficientes de lonxitudes de onda na rexión MIR (2,1-10,8 μm) para o modelo de predición da emisión de metano entérico a partir do espectro FTMIR do leite.

Figura 3.- Coeficientes dos canais (rexións espectrais) na ecuación FT-MIR xerada para a estimación de metano entérico.



A ubicación das canais seleccionados no espectro de absorción proporciona información sobre a composición da mostra de leite, e a intensidade das bandas espectrais leva información sobre a concentración do compoñente correspondente. Neste caso, podemos observar 3 zonas principais no espectro FT-MIR (10 a 6,5; 5,8 a 5,6 e 3,4 a 3,6 μm) para o modelo de predición desenvolto neste traballo. Está amplamente recoñecido que ditas rexións espectrais conteñen a maioría da información relevante da composición do leite (Capuano *et al.*, 2014). As áreas do espectro FTIR do leite que proporcionan información para predicir a emisión de metano entérico tamén son relevantes para predicir outras características do leite, como por exemplo, o contido en graxa (Kaylegian *et al.*, 2009) e proteína (Lynch *et al.*, 2006) e o rendemento queixeiro (Ferragina *et al.*, 2017), así como o perfil lípido (Soyeurt *et al.*, 2006; Valenti *et al.*, 2013; Coppa *et al.*, 2021).

A emisión do metano entérico é reflexo da fermentación do alimento no rume, como era de esperar, a emisión de metano entérico está relacionado coas diferenzas espectrais derivadas pola relación entre a dieta e o perfil lipídico do leite. Por tanto, a predición da emisión de metano entérico está asociada con áreas do espectro relacionadas coa predición directa de ácidos graxos, algúns dos cales están incluídos na ecuación de Van Gastelen *et al.* (2018) empregada para estimar os datos de referencia deste traballo.

A continuación se detallan as 3 citadas áreas identificadas no espectro FT-MIR do leite que conteñen os canais seleccionados, os cales posúen unha maior contribución á predición de emisión de metano entérico.

Os canais situados entre as lonxitudes de onda de 10-6,5 μm , nesta rexión espectral existen numerosos canais espectrais significativos e sitúanse moi xuntos entre si, os cales conteñen picos de absorción relacionados coas vibracións no enlace C=C dobre de configuración *trans*, presente nos ácidos graxos (900 a 1100 cm^{-1}), así como picos de absorción relacionados coas vibracións de flexión e estiramento do enlace C-H nos grupos metileno, presentes nas cadeas de carbono saturadas (de 1400 a 1500 cm^{-1}), coincidindo co indicado por Shadpour *et al.* (2022); Wang e Bovenhuis (2019); Shetty *et al.* (2017) e Vanlierde *et al.* (2015).

Os picos de absorción situados entre as lonxitudes de onda de 5,8-5,6 μm se relacionan co enlace carbonilo $\text{C}=\text{O}$ presente en ésteres e ácidos graxos, coincidindo co indicado por Shadpour *et al.* (2022); Shetty *et al.* (2017) e Vanlierde *et al.* (2015), que dentro desta zona, as principais rexións do MIR que están implicadas nos ácidos graxos están localizadas entre 1736 e 1805 cm^{-1} , entre 1736 e 1805 cm^{-1} , asociado cos modos de vibración de extensión do enlace carbonilo ($\text{C}=\text{O}$).

Os canais situados entre as lonxitudes de onda de 3,4-3,6 μm , conteñen información correspondente ás vibracións de flexión e estiramento do enlace $\text{C}-\text{H}$ nos grupos metileno, presentes nas cadeas de carbono dos ácidos graxos saturados (2823 e 3016 cm^{-1} ; Soyeurt *et al.*, 2006). As diferentes bandas que aparecen ao redor de 3000 cm^{-1} se asignan a distintos modos de vibración do enlace $\text{C}-\text{H}$.

Conclusión

Os resultados confirman que a metodoloxía FT-MIR permite detectar diferenzas e clasificar en rangos de emisión de metano entérico. Sen embargo, a calibración obtida para a estimación da emisión de metano entérico non permite nestes momentos realizar unha predición cuantitativa satisfactoria, sendo só posible obter unha información aproximada. Polo tanto, no futuro o modelo de predición debe ser obxecto de mellora para posibilitar a incorporación ás rutinas analíticas do LIGAL, para o cal é imprescindible contar cunha instrumentación que permita obter valores de referencia da emisión de metano entérico³⁶.

Mabegondo, 31 xullo de 2023

³⁶ **A fin de poder realizar medidas con vacas en pastoreo e/ou confinadas, se require dispoñer do sistema automatizado tipo GreenFeed (C-Lock Inc. USA), cuxa adquisición estaba prevista para o pasado ano 2022.**