

**Шлыков Сергей Николаевич,
доцент**

Обогащение жирнокислотного состава говядины полиненасыщенными жирными кислотами

Продукты, обогащенные омега жирными кислотами, все чаще и чаще появляются на прилавках магазинов: хлеб, молочные смеси для детей, кормящих и беременных женщин и многое другое.

Организм человека способен синтезировать только Омега-9 жирные кислоты; Омега-3 и Омега-6 жирные кислоты не способны вырабатываться в организме и должны поступать с пищей, так как они также необходимы для жизнедеятельности.

Сравнительно небольшие различия в строении молекул заставляют Омега-6 и Омега-3 действовать на организм человека совершенно по-разному. «Минусом» кислоты Омега-6 являются продукты ее обмена. Побочные продукты обмена Омега-6 способствуют:

- воспалением;
- образованию кровяных тромбов;
- росту опухолей.

Продукты обмена Омега-3 обладают противоположными эффектами. Как только жиры Омега-3 попадают в организм, они внедряются в клетки, влияя на их структуру и активность. Отсюда такое многообразие их полезных свойств. Эти кислоты:

- улучшают работу сердца, мозга, глаз и суставов;
- снижают уровень вредного холестерина;
- могут оказывать противовоспалительный эффект, в зависимости от того какими клетками будет поглощена эта жирная кислота, например макрофагами, участвующими в иммунных реакциях организма, или клетками сетчатки глаза;

– являются отличными антиоксидантами, то есть способствуют выведению из организма вредных веществ и свободных радикалов (высокоактивных групп атомов, обладающих сильными окислительными свойствами);

– кислоты Омега-3 предотвращают и улучшают состояние при экземе, аллергии, астме, болезни Альцгеймера, депрессии и нервных болезнях, сахарном диабете, гиперактивности детей, псориазе, остеопорозе, артрозе, сердечно-сосудистых проблемах, а также более серьезных болезнях, например, раке простаты или раке груди [1].

Организму человека нужны оба вида жирных кислот, хотя уже установлено, что избыток Омега-6 может привести к печальным последствиям. Потребление Омега-6 и Омега-3 должно происходить в пропорции от 1:1 до 4:1 [2].

Качество продуктов питания приобретает все большее значение для потребителей. Для мяса определение качества становится все более сложным, поскольку оно охватывает не только физические аспекты мяса, такие как нежность, сочность, вкус, но также включает в себя более свежие вопросы, такие как безопасность, прослеживаемость, профилактические свойства и производственная среда. Потребители постепенно осознают взаимосвязь между питанием и здоровьем, особенно в отношении рака и атеросклероза. Знание этих отношений усилило интерес потребителей к диетологическому качеству пищевых продуктов, так что это становится более важным аспектом качества продуктов [3].

Говядина считается очень питательной и ценной пищей. Важность мяса как источника белка с высокой биологической ценностью (включая, например, витамины А, В₆, В₁₂, D, E, железо, цинк, селен) хорошо известна. Однако за последние 10-15 лет эти положительные качества часто омрачались из-за нескольких негативных атрибутов. К последним относятся восприятия того, что говядина содержит большое количество жира, богатого насыщенными жирными кислотами,

ассоциации между красным мясом и раком и вопросы, не связанные с питанием, такие как пагубные последствия для здоровья животных (синдром BSE) [2].

Говядина является естественным носителем полезных n-3 ПНЖК (эйкозапентаеновая кислота (EPA, C20:5n-3) и доксагексаеновая кислота (DHA, C22:6n-3), а также CLA и является важным источником полезных жиров для человека. Повышение уровня этих жирных кислот в говядине улучшит пищевую ценность этого важного мяса для потребителя.

Внутримышечный жир является наиболее важным жировым депо жирных кислот для человека. Соотношение НЖК, МНЖК и ПНЖК в среднем составляет, от 0,45 до 0,48, от 0,35 до 0,45 и до 0,05 от общего количества жирных кислот. Соотношение полиненасыщенных жирных кислот к насыщенным для говядины, как правило, невелико и составляет около 0,1. Соотношение n-6:n-3 для говядины выгодно низкое, обычно менее 3 к 1, что отражает значительные количества полезных n-3 ПНЖК, особенно C18:3n-3, а также EPA и DHA. Говядина также содержит CLA и, в частности, cis-9, trans-11 и trans-10, cis-12 CLA. Антикарциногенные и антиатерогенные эффекты cis-9, trans-11, а также противосудорожные эффекты trans-10, cis-12 отражены в работе Velury MA [1, 2, 3].

Стратегии кормления на растительной основе являются наиболее подходящим и устойчивым подходом к увеличению содержания n-3 ПНЖК в говядине. Трансформация C18:3n-3 из корма в мясо зависит от двух важных процессов:

- повышение уровня C18:3n-3 в корме (и, следовательно, в животном)
- уменьшение процессов биогидрогенирования в рубце.

Опыт исследователей Университета Аберистуита, показывает, что разнообразие травы, стадия роста и способ сохранения (силос и сено, степень увядания и т.д.) влияют на концентрацию C18:3n-3 [4, 5, 6].

С учетом требований к созданию пастбищ с высокой урожайностью, продуктивным долголетием, быстрого достижения пастбищной спелости, устойчивости к выпасу и вытаптыванию, а также высокого содержания ненасыщенных жирных кислот отобраны 3 вида трав: райграс + многолетнее сорго + волоснец. Растения выращивались на территории учебного опытного хозяйства со срезом каждые 6 недель и ежегодным удобрением из расчета 250 кг N на 1 гектар в течении 3 лет. Сбор травяного материал для анализа жирных кислот проводился в июне и сентябре 2014, 2015 и 2016 годах [7, 8, 9].

Содержание жирных кислот определялось в 1 г лиофилизированного материала с использованием метилового эфира гнейнозановой кислоты (C21:0) в качестве внутреннего стандарта (Sigma-Aldrich Co, St Louis, MO, USA) и одностадийной экстракции методом перэтерификации. Метилвые эфиры жирных кислот (FAME) отделялись и количественно определялись с использованием газовой хроматографии. Для оценки компонентов дисперсии использовалась линейная смешанная модель. Анализ проводился с использованием анализа REML (ограниченного максимального правдоподобия) в Genstat (14-е издание, VSN International Ltd, Хемел Хемпстед, Великобритания).

В таблице 1 для каждого года из трех показаны средние и стандартные отклонения для пяти основных жирных кислот (C16:0, C18:0, C18:1n-9, C18:2n-6 и C18:3n-3). Количество C18:2n-6 и C18:3n-3, составляло наибольший процент от общего числа, и их количество было самым высоким во 2-м году, в то время как три незначительных составляющих, как правило, склонны к увеличению в каждом скосе.

Таблица 1

Содержание жирных кислот в исследуемом материале, (мг/г⁻¹ ЛМ)

Год	Наименование	C16:0	C18:0	C18:1n-9	C18:2n-6	C18:3n-3	
За все время	Райграс	4.26±0.620	0.39±0.078	0.38±0.139	2.73±0.633	15.02±4.015	25.03±5.253
За все время	Сорго	3.92±0.693	0.38±0.103	0.46±0.270	2.65±0.846	12.09±3.708	22.95±8.706
За все время	Волоснец	4.01±0.579	0.39±0.073	0.46±0.133	2.94±0.705	11.61±2.889	22.42±6.123
1	Райграс	3.77±0.513	0.36±0.073	0.35±0.116	2.71±0.447	14.66±2.440	23.41±3.141
1	Сорго	2.89±0.140	0.32±0.036	0.42±0.082	2.52±0.267	9.12±1.305	16.58±1.059
1	Волоснец	3.26±0.544	0.34±0.041	0.33±0.044	2.69±0.420	10.17±2.385	18.29±3.141
2	Райграс	4.20±0.389	0.39±0.060	0.37±0.123	3.14±0.372	18.03±3.193	28.96±4.581
2	Сорго	3.88±0.428	0.42±0.135	0.58±0.501	3.30±1.047	14.53±4.336	29.59±12.764
2	Волоснец	3.91±0.220	0.42±0.075	0.57±0.119	3.56±0.558	13.44±2.874	27.10±8.462

3	Райграс	4.75±0.513	0.42±0.088	0.40±0.167	2.35±0.732	12.35±3.861	22.55±5.128
3	Сорго	4.45±0.247	0.39±0.102	0.40±0.059	2.28±0.722	11.96±3.311	21.71±4.718
3	Волоснец	4.44±0.301	0.40±0.079	0.46±0.117	2.64±0.698	11.11±2.929	21.37±3.741

Таблица 1 также отображает, что пять жирных кислот присутствуют во всех образцах. Анализ компонентов дисперсии с использованием модели REML во всех шести покосах продемонстрировал значительное влияние этого фактора.

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что сезонные и экологические факторы оказывают значительную роль в фенотипическую вариацию содержания жирных кислот, что в свою очередь потребует корректировку жирно кислотного состава кормов в процессе выращивания.

Снижение степени биогенизации в рубце может повысить процессы трансформации ПНЖК в мышечную и жировую ткань. ПНЖК быстро гидрируются микробиотикой рубца, что ведет к образованию НЖК (главным образом 18:0), но также и к образованию промежуточных соединений CLA и trans моноенов (главным образом trans-вакценовая кислота TVA). Это одна из основных причин, почему жиры жвачных животных представлены в основном насыщенными жирными кислотами. Липолиз в рубце является предпосылкой для микробного гидрирования (биоугидрогенизации) ненасыщенных жирных кислот. Степень, до которой биоугидрирование является «полной», влияет на количество НЖК, вырабатываемых в рубце, но также на количество CLA и TVA. Определение взаимодействий между компонентами растений и биотикой рубца (липолиз и biohydrogenation) необходимы для направленного улучшения жирнокислотного состава говядины и других продуктов жвачных животных.

ПНЖК содержатся в фосфолипидах растений. Фосфолипиды в большом количестве содержатся в мембранах хлоропластов, и понимание процессов влияющих на содержание хлоропластов в рубце может открыть дополнительные возможности для улучшения состава жирных кислот говядины.

С этой целью выполнено 2 эксперимента **A** и **B**: методом *in vitro* оценивали скорость поглощения, переваривания и выброса хлоропластов биотикой рубца, а методом *in vivo* оценка сохранения ПНЖК по пути в двенадцатиперстную кишку.

Эксперимент А. Исследования *in vitro* проводились для более четкого понимания судьбы хлоропластов, богатых ПНЖК, в рубце и, в частности, процессов, протекающих между хлоропластами и биотикой рубца. Интактные хлоропласты были получены из листьев шпината (*Spinacia oleracea*) с использованием стандартных методов. Полученные хлоропласты обрабатывались простейшими *Epidinia spp.* и *Entodinia spp.* Внутриклеточный и внеклеточный хлорофилл, а также содержание жирных кислот в простейших контролировался с временными интервалами: 0, 0,5, 1, 2, 4 и 8 ч. Внутриклеточное расположение автофлуоресцирующих хлоропластов простейших оценивалось с использованием флуоресцентной конфокальной микроскопии.

Ряд непредвиденных технических проблем мешал успеху этих подходов *in vitro*. На первоначальном этапе исследований была предпринята попытка очистить протозоа рубца как можно от большего количества внутриклеточных хлоропластов, чтобы в момент времени 0 ч они содержали только очень низкое количество внутриклеточного хлоропласта. В первую очередь было использовано фракционирование протозоа, а затем анаэробная инкубация, с целью контроля времени, необходимого им для выделения внутриклеточных хлоропластов. Контроль плотности (густоты) протозоа, жизнеспособность и наличие внутриклеточного хлоропласта велся на протяжении 24 часов. Жизнеспособность протозоа неуклонно снижалась до нескольких живых клеток после 6 ч., а микроскопия показала, что у протозоа имеется много внутриклеточного хлоропласта даже после 24 часов. Вслед за этим была предпринята попытка заменить внутриклеточные хлоропласты богатые C18:3n-3 на хлоропласты богатые C16:3n-3, кормлением кукурузой после фракционирования. Этот эксперимент снова показал, что простейшие не очень активны после 6 часов, поэтому удаление хлоропластов богатых C18:3n-3 и сам эксперимент нужно проводить в течение этого времени что невозможно. В следствии чего было принято решение получения протозоа от коров на соломенном откорме (низкое содержание C18:3n-3 и хлорофилла) за 1 неделю до эксперимента, и использование их непосредственно после фракционирования в экспериментах. Эксперименты были установлены *in vitro* с соотношением 1:100 (1×10^4 протозоа/мл:

1×10^6 хлоропластов/мл). Согласно разработанному эксперименту количество протозоа, которое возможно было извлечь из жидкости рубца, ограничивалось до плотности (густоты) 1×10^4 протозоа/мл. К сожалению, использование этой плотности, не позволило обнаружить жирные кислоты и хлорофилл. Таким образом, из-за проблем жизнеспособности и плотности сделан вывод, что контроль за приемом/перевариванием/выделением методом *in vitro* осуществить невозможно.

Впоследствии чего было принято решение провести эксперимент методом *in vivo*, 6 здоровых животных калмыцкой и казахской белоголовой породы заволжского типа (средний живой вес 250 кг) с фистулами рубца, и двенадцатиперстной кишки ставили на откорм соломой и комбикормом в течение 14 дней, прежде чем переводить на свежую траву, только на один день (только утренний корм). Отбор образцов корма проводился ежедневно и еженедельно объединялись для замораживания, в то время как образцы травы отбирались утром исключительно для эксперимента (приблизительно 1 кг) и замораживались. Отбор протозоа, планктонных и прикрепленных бактерий проводился за 1 час до изменения в рационе и через 2 и 6 часов после изменения. Содержание хлорофилла и жирных кислот в каждой микробной фракции, было проанализировано и фиксированные образцы мониторились на содержание внутриклеточных хлоропластов с использованием конфокальной микроскопии и просвечивающей электронной микроскопии. Рацион на основе соломы и комбикорма имел больше ADF, NDF, C18:1n-9 и меньше WSC, жирных кислот, C16:0, C18:2n-6 и C18:3n-6 по сравнению с рационом на свежей траве, что было предсказуемо.

Полученные данные по жирным кислотам показали, что протозоа были значительно обогащены содержанием C16:0, C18:0, C18:2n-6, C18:3n-6, C18:1 *trans*-11, через 2 часа после кормления свежей травой, а уровень каждой из этих жирных кислот стал отчасти снижаться в течение 6 ч, хотя концентрации внутрипротозойного состава C16:0, C18:0 и C18:3n-3 оставались значительно выше, чем значения, полученные за 1 ч до подачи свежей травы (таблица 2).

Таблица 2

Содержание жирных кислот (мг/г^{-1} ЛМ) в различные промежутки времени до и после кормления свежей травой.

Жирные кислоты	Время			SED	P
	1	2	6		
18:3n-3	0.052a	0.604b	0.511b	0.062	<0.001
18:2n-6	0.955a	2.805b	1.586a	0.298	<0.001
18:2 cis-9, trans-11	0.316a	0.298a	0.334a	0.070	0.879
18:1 trans-11	1.166a	2.792c	1.681b	0.206	<0.001
18:0	5.728b	7.479c	4.516a	0.400	<0.001
16:0	5.281a	11.625c	8.201b	0.585	<0.001

Данные микроскопии показали, что через 2 ч после кормления свежей травой протозоа имели значительно большее количество внутриклеточных хлоропластов, которое оставалось высоким и через 6 ч после кормления, поэтому данные о жирных кислотах коррелировались с содержанием внутрипротозойного хлоропласта. Эти данные иллюстрируют, что поглощение протозоа главным образом хлоропластов растений происходит быстро и внутриклеточный уровень хлоропластов поддерживается в течение по крайней мере 6 часов. Таким образом, простейшие быстро становятся основным резервуаром хлоропластов, а затем полезными источниками ПНЖК.

Эксперимент В. Для эксперимента методом *in vivo* были отобраны 6 здоровых животных калмыцкой и казахской белоголовой породы заволжского типа с фистулами рубца, и двенадцатиперстной кишки.

Животные содержались на ограниченной диете свежей травы (диета с высоким содержанием хлоропластов) и сена (диета с низким содержанием хлоропластов). Дуоденальный поток C18:2n-6 и C18:3n-3 определялся по обеим диетам. Биотика рубца собиралась и очищалась для количественного определения как содержания внутриклеточного хлорофилла, так и в качестве стандарта для количественной ПЦР (qPCR). Протозойный поток в двенадцатиперстную кишку при обеих диетах определялся количественно с использованием qPCR. Зная содержание хлорофилла в протозоа рубца и их течение в двенадцатиперстную кишку, оценивался поток внутриклеточного хлоропласта в двенадцатиперстную кишку. Взаимосвязь между ПНЖК и протозоа по пути в

двенадцатиперстную кишку, обеспечивает доказательство связи с внутриклеточным хлоропластом, и проводилось с использованием канонического корреляционного анализа.

Шесть здоровых животных калмыцкой и казахской белоголовой породы заволжского типа с фистулами рубца, и двенадцатиперстной кишки выращивались по двухступенчатому изменяемому плану откорма: солома:комбикорм (60:40, сухая масса, S:C, низкое содержание хлоропластов) или свежая трава (PRG, высокое содержание хлоропластов). После 12-й адаптации к рациону были отобраны образцы биотики рубца и двенадцатиперстной кишки. Содержание азота и жирных кислот биотики рубца и двенадцатиперстной кишки было оценено и выполнен ПЦР анализ 18S рДНК протозоа, что позволило рассчитать поток протозойного азота (таблица 3).

Таблица 3

Ежедневное потребление и дуоденальные потоки сухого вещества (DM), органического вещества (OM) и азота (N) (г/д).

	Диета		SED	P
	S : C	PRG		
Принято				
Сухие вещества (кг/день)	8.80	9.42	0.54	NS
Общий азот	191	207	11.8	NS
Водорастворимые углеводы (WSC)	607	1488	52.2	<0.001
Нейтральное пищевые волокна (NDF)	4136	4481	255	NS
Кислые пищевые волокна (ADF)	2439	2571	149	NS
Принято жирных кислот	0.28	0.26	0.02	NS
C12:0				
C14:0	0.75	1.10	0.10	0.007
C16:0	27.0	36.0	1.80	0.008
C16:1n-7	1.4	0.4	0.07	<0.001
C18:0	3.26	2.73	0.20	0.05
C18:1n-9	54.0	4.2	2.59	<0.001
C18:2n-6	50.7	35.0	3.21	0.008
C18:3n-3	15.1	153	3.71	<0.001
Дуоденальный поток				
Сухое вещество (кг/день)	12.2	12.1	0.74	NS
OM (кг/день)	11.8	11.5	0.63	NS
Общий азот	125	169	31.5	NS
Протозоа	34.4	0.70	9.84	0.027

Данные по содержанию жирных кислот в протозоа и микроскопические наблюдения показали, что протозоа были обогащены C18:3n-3 после питания свежей травой по сравнению с диетой S:C из-за увеличения содержания внутриклеточного хлоропласта. Однако, дуоденальная концентрация протозоа 18S рДНК после откорма травой была низкой, что указывает на удержание рубцом протозоа. Следствием такого рубцового удержания после откорма свежей травой было то, что малое количество C18:3n-3 или любой другой жирной кислоты поступало в двенадцатиперстную кишку по сравнению со значениями, полученными после откормом солома:комбикорм (таблица 4).

Таблица 4

Общее содержание жирных кислот и протозойно связанных жирных кислот дуоденального потока у животных на откорме солома:комбикорм (S:C) или свежей травой (PRG).

	Дуоденальный поток (г/день)				Протозойный поток (г/день)				Вклад*	
	S:C	PRG	SED	P	S:C	PRG	SED	P	S:C	PRG
C14:0	2.29	1.72	0.21	0.024	0.26	0.00	0.07	<0.001	11.4	0.33
C15:0	1.44	1.27	0.15	<0.001	0.32	0.00	0.19	<0.001	52.8	3.15
C16:0	24.9	25.5	1.30	0.008	5.36	0.16	3.91	0.114	21.5	0.63
C17:0	1.32	1.56	0.15	<0.001	0.13	0.00	0.09	<0.001	9.85	0.23
C18:0	88.6	102	9.77	0.006	8.76	0.26	7.66	0.193	9.89	0.25

C18:1 <i>trans</i> -11	5.20	24.0	2.34	<0.001	1.36	0.07	0.90	<0.001	26.2	0.29
C18:2n-6	10.2	2.21	0.33	<0.001	1.32	0.02	0.88	<0.001	12.9	0.09
C18:3n-3	1.66	3.06	0.23	<0.001	0.14	0.01	0.11	<0.001	8.43	0.33
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA	0.10	0.08	0.02	<0.001	0.08	0.00	0.134	<0.001	80.0	2.00
<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 CLA	0.00	0.06	0.01	<0.001	0.00	0.00	0.00	<0.001	50.0	0.00
Общее количество жирный кислот	173	196	15.7	0.002	23.8	0.46	16.4	0.096	13.8	0.23

Данные таблицы 4 отображают влияние кормления на содержание в протозоа C18:3n-3, соответственно следующим этапом является увеличить протозойный поток в тонкую кишку, сохраняя при этом устойчивую плотность рубцов. Добиться данных результатов возможно при изучении «альпийского фактора», т.к. животные на альпийских лугах обладают сниженными процессами биогидрирования, это может быть связано с вторичными метаболитами растений, включая РРО, сапонины, танины и катехоламины. Эти соединения потенциально могут влиять на процессы липолиза или биогидрирования и улучшения жинокислотного состава говядины.

ЛИТЕРАТУРА

1. Belury MA (2003) Conjugated linoleic acids in type 2 diabetes mellitus: Implications and potential mechanisms., in *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research* (Sebedio J, Christie W and Adlof R eds) pp 267-281, Champaign, Illinois: The American Oil Chemists Society.
2. Huws SA, Kim EJ, Lee MRF, Kingston-Smith AK and Scollan ND (2006) Fatty acid composition of rumen protozoa: a link with chloroplast ingestion?, in *5th Joint RRI-INRA Symposium on Gut Microbiology - Research to Improve Health, Immune Response and Nutrition*, Aberdeen, UK.
3. Dewhurst RJ, Shingfield KJ, Lee MRF and Scollan ND (2006) Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. *Animal Feed Science and Technology* 131:168-206.
4. Baird NA, Etter PD, Atwood TS, Currey MC, Shiver AL, Lewis ZA, Selker EU, Cresko WA and Johnson EA (2008) Rapid SNP Discovery and Genetic Mapping Using Sequenced RAD Markers. *Plos One* 3:e3376.
5. Belury MA (2002) Dietary conjugated linoleic acid in health: Physiological effects and mechanisms of action. *Annual Reviews of Nutrition* 22:505-531
6. Cabiddu A, Lee MRF, Scollan ND and Sullivan ML (2009) Lipolysis and biohydrogenation of forage species at vegetative and reproductive stages of growth. *Journal of Dairy Science* (E-Supplement 1) 92:109-110.
7. Cabiddu A, Salis L, Tweed JKS, Molle G, Decandia M and Lee MRF (2010) The influence of plant polyphenols on lipolysis and biohydrogenation in dried forages at different phenological stages: in vitro study. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90:829-835.
8. Huws SA, Kingston-Smith AH, Kim EJ, Lee MRF, Scott MB, Tweed JK and Scollan ND (2010) Contribution of ruminal protozoa to the duodenal flow of polyunsaturated fatty acids as a consequence of intracellular chloroplasts, in *EU Framework 6 ProSafeBeef Annual General Meeting*, Aberystwyth, UK.
9. Huws SA, Kingston-Smith AH, Kim EJ, Lee MRF, Scott MB, Tweed JK and Scollan ND (2010) Contribution of ruminal protozoa to the duodenal flow of polyunsaturated fatty acids as a consequence of intracellular chloroplasts, in *EU Framework 6 ProSafeBeef Annual General Meeting*, Aberystwyth, UK.

REFERENCES

1. Belury MA (2003) Conjugated linoleic acids in type 2 diabetes mellitus: Implications and potential mechanisms., in *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research* (Sebedio J, Christie W and Adlof R eds) pp 267-281, Champaign, Illinois: The American Oil Chemists Society.
2. Huws SA, Kim EJ, Lee MRF, Kingston-Smith AK and Scollan ND (2006) Fatty acid composition of rumen protozoa: a link with chloroplast ingestion?, in *5th Joint RRI-INRA Symposium on Gut Microbiology - Research to Improve Health, Immune Response and Nutrition*, Aberdeen, UK.

3. Dewhurst RJ, Shingfield KJ, Lee MRF and Scollan ND (2006) Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. *Animal Feed Science and Technology* 131:168-206.
4. Baird NA, Etter PD, Atwood TS, Currey MC, Shiver AL, Lewis ZA, Selker EU, Cresko WA and Johnson EA (2008) Rapid SNP Discovery and Genetic Mapping Using Sequenced RAD Markers. *Plos One* 3:e3376.
5. Belury MA (2002) Dietary conjugated linoleic acid in health: Physiological effects and mechanisms of action. *Annual Reviews of Nutrition* 22:505-531
6. Cabiddu A, Lee MRF, Scollan ND and Sullivan ML (2009) Lipolysis and biohydrogenation of forage species at vegetative and reproductive stages of growth. *Journal of Dairy Science (E-Supplement 1)* 92:109-110.
7. Cabiddu A, Salis L, Tweed JKS, Molle G, Decandia M and Lee MRF (2010) The influence of plant polyphenols on lipolysis and biohydrogenation in dried forages at different phenological stages: in vitro study. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90:829-835.
8. Huws SA, Kingston-Smith AH, Kim EJ, Lee MRF, Scott MB, Tweed JK and Scollan ND (2010) Contribution of ruminal protozoa to the duodenal flow of polyunsaturated fatty acids as a consequence of intracellular chloroplasts, in EU Framework 6 ProSafeBeef Annual General Meeting, Aberystwyth, UK.
9. Huws SA, Kingston-Smith AH, Kim EJ, Lee MRF, Scott MB, Tweed JK and Scollan ND (2010) Contribution of ruminal protozoa to the duodenal flow of polyunsaturated fatty acids as a consequence of intracellular chloroplasts, in EU Framework 6 ProSafeBeef Annual General Meeting, Aberystwyth, UK.