

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti,
Risorse Naturali e Ambiente

Corso di laurea magistrale in Scienze e Tecnologie Animali

Influenza delle frazioni proteiche sul processo di
coagulazione e caseificazione del latte bovino

Relatore
Prof. Giovanni Bittante

Laureando
Nicolò Amalfitano
Matricola n.1106427

ANNO ACCADEMICO 2015-2016

RIASSUNTO

L'obiettivo della presente tesi è stato quello di valutare l'effetto del contenuto delle principali frazioni proteiche (α_{s1} -CN, α_{s2} -CN, β -CN, κ -CN, α -LA, β -LG) nei confronti dei caratteri che definiscono l'attitudine casearia di un latte e l'efficienza nel processo di caseificazione: parametri lattodinamografici tradizionali (RCT, k_{20} , a_{30} , a_{45}) e quelli derivanti da un modello matematico (RCT_{eq}, k_{CF} , k_{SR} , CF_p, C_{max}, t_{max}); la resa casearia distinta in 3 tipologie (%CY_{CURD}, %CY_{SOLIDS}, %CY_{WATER}) ed espressa come produzione giornaliera di formaggio per vacca (dCY_{CURD}, dCY_{SOLIDS}, dCY_{WATER}); il recupero dei nutrienti del latte nella cagliata (REC_{FAT}, REC_{PROTEIN}, REC_{SOLIDS}, REC_{ENERGY}).

La prova ha previsto il campionamento del latte di 1.271 bovine di razza bruna provenienti da 85 allevamenti situati nella Provincia di Trento: gli allevamenti di provenienza sono stati classificati in 4 categorie in base al sistema di stabulazione, alimentazione e management aziendale (tradizionale, moderna senza uso di carro unifeed, moderna con carro unifeed ed uso di insilati, moderna con carro senza insilati con aggiunta di acqua nella razione). L'analisi statistica dei dati raccolti ha implicato l'utilizzo di un modello lineare misto che ha incluso l'effetto random del singolo allevamento e gli effetti fissi legati alla tipologia aziendale, ai giorni di lattazione, all'ordine di parto e alle frazioni proteiche.

I risultati ottenuti hanno evidenziato che tra le frazioni proteiche considerate, il contenuto crescente di κ -CN ha influito molto positivamente sulla coagulazione, sulla velocità di rassodamento e di sineresi: in questo modo il coagulo ha potuto raggiungere una consistenza superiore, migliorando probabilmente il recupero di nutrienti e quindi le rese. La α_{s1} -CN e la β -CN hanno avuto maggior effetto sulla consistenza del coagulo, in quanto maggiori costituenti della frazione proteica del latte bovino. La α_{s2} -CN e la β -LG hanno invece mostrato sempre un effetto inverso e negativo. Al contrario, l'aumento della sieroproteina α -LA ha migliorato la resa in formaggio fresco favorendo la ritenzione idrica della cagliata.

Si ritengono necessari ulteriori studi per analizzare gli aspetti genetici e genomici che controllano i caratteri studiati e l'effetto delle varianti genetiche delle frazioni proteiche. Data la natura laboriosa delle analisi svolte, si suggerisce la ricerca di metodi alternativi più veloci, di facile utilizzo e a basso costo per applicarle a livello di popolazione.

ABSTRACT

The aim of the present work was to assess the effect of milk protein fractions (α_{s1} -CN, α_{s2} -CN, β -CN, κ -CN, α -LA, β -LG) on the traits that define milk clotting attitude and the efficiency of the cheese-making process: traditional milk coagulation properties (RCT , k_{20} , a_{30} , a_{45}) and parameters obtained from a mathematical (four-parameter) model (RCT_{eq} , k_{CF} , k_{SR} , CF_p , C_{max} , t_{max}); three measures of percentage cheese yield ($\%CY_{CURD}$, $\%CY_{SOLIDS}$, $\%CY_{WATER}$), also expressed as daily cheese yields multiplying $\%CY$ with daily milk yield (dCY_{CURD} , dCY_{SOLIDS} , dCY_{WATER}); three measures of nutrient recovery in the curd (REC_{FAT} , $REC_{PROTEIN}$, REC_{SOLIDS} , REC_{ENERGY}).

The trial involved the sampling of 1.271 Brown Swiss cows reared in 85 herds located in Trento province: farms were classified in 4 categories according to the management, feeding and housing system (traditional system, modern system without total mixed ration (TMR), modern system with TMR and silage, modern system with TMR and without silage). Data were analyzed using a linear mixed model that included the random effect of the sampled herds and the fixed effects of dairy farm system, days in milk, parity and protein fractions.

The results showed that the increasing of κ -CN content affected positively milk coagulation, curd-firming and syneresis rates: in this way the curd resulted firmer, improving the milk nutrient recovery in the curd and the cheese yields. The α_{s1} -CN and β -CN had more effect on curd firmness, as major constituent of protein fraction in bovine milk. On the contrary, the α_{s2} -CN and β -LG showed an opposite and negative effect. On the other side α -LA fraction improved fresh cheese yield increasing the water retention in the curd.

Further studies are necessary to assess the genetic and genomic aspects controlling these traits and the effects of protein genetic variants.

Considering that the analysis proposed in this study are expensive, complex and time-consuming of the analyses, it would be useful to find faster, easy to use and low-cost alternative methods in order to apply them at population level.

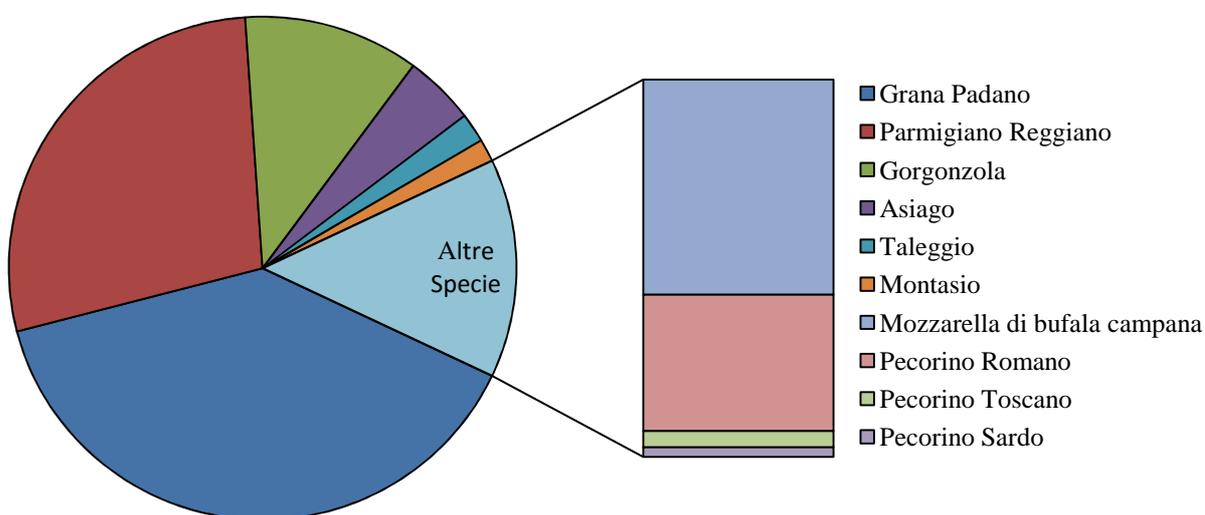
SOMMARIO

RIASSUNTO	3
ABSTRACT	5
1. INTRODUZIONE.....	9
2. IL LATTE	13
3. LE FRAZIONI PROTEICHE DEL LATTE.....	17
3.1 Le caseine.....	17
3.1.1 α_{s1} -CN.....	18
3.1.2 α_{s2} -CN.....	19
3.1.3 β -CN	19
3.1.4 κ -CN	20
3.2 Le sieroproteine.....	22
3.2.1 β -LG	22
3.2.2 α -LA	23
4. QUALITÀ TECNOLOGICA DEL LATTE	25
5. OBIETTIVI.....	29
6. MATERIALI E METODI.....	31
6.1 Disegno Sperimentale	31
6.2 Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography	32
6.3 Lattodinamografia	35
6.4 Modellizzazione del tracciato lattodinamografico	36
6.5 Micro-caseificazione	37
6.6 Analisi statistica	41
7. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	43
8. CONCLUSIONI.....	67
BIBLIOGRAFIA.....	69
SITOGRAFIA	76

1. INTRODUZIONE

La maggior parte del latte prodotto in Italia è utilizzata dall'industria come materia prima della trasformazione casearia: nel nostro Paese, la qualità del latte rappresenta un aspetto molto importante da un punto di vista nutrizionale, tecnologico, igienico-sanitario ed organolettico-sensoriale. Nel 2014 sono state prodotte circa 11.037.360 ton di latte, di cui circa il 60-80% è stato destinato alla trasformazione casearia (Cassandro, 2003; CLAL, 2014); tra le produzioni più importanti che caratterizzano le diverse regioni italiane si distinguono 49 formaggi DOP.

Figura 1: Formaggi DOP prodotti con latte di vacca e altre specie nel 2014 in Italia (ton; CLAL, 2014).

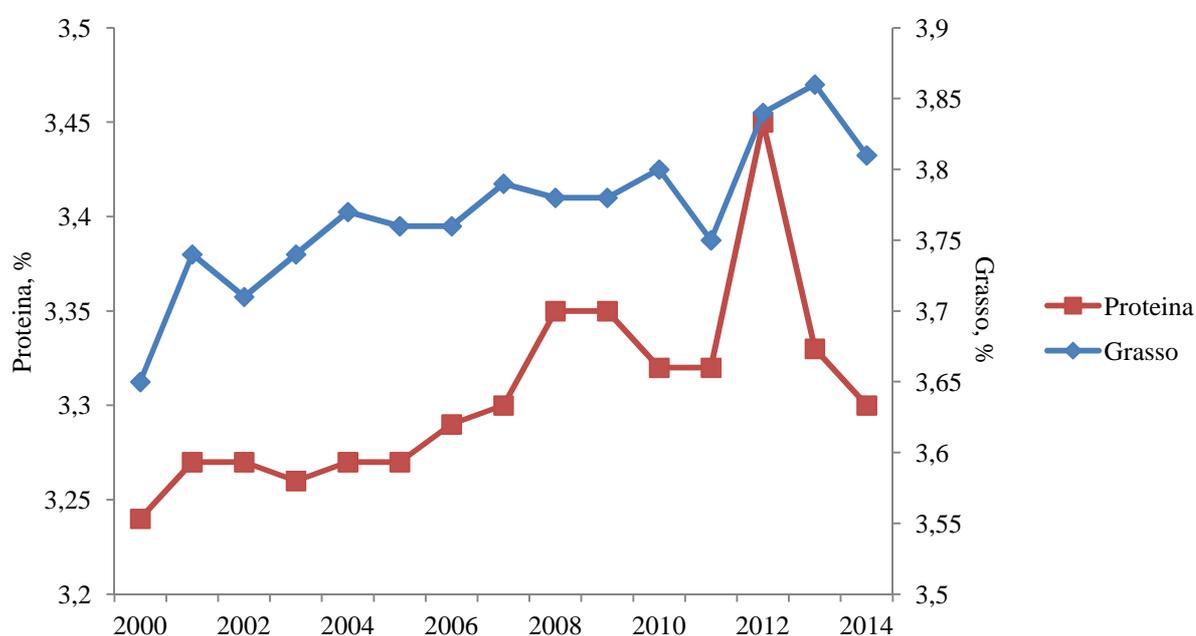


Come indicato in Figura 1, i due prodotti di punta del settore lattiero caseario italiano sono il Grana Padano e il Parmigiano Reggiano. Questi due formaggi da soli assorbono rispettivamente il 24% e il 18% del latte prodotto a livello nazionale e contribuiscono per il 71% del valore all'ingrosso delle produzioni casearie tutelate. A seguire si possono trovare Mozzarella di Bufala Campana, Gorgonzola, Pecorino Romano e Asiago che insieme coprono il 23% (Pieri, 2014).

Per il controllo qualitativo del latte, numerosi sono i controlli eseguiti sul latte destinato alle produzioni DOP. Oltre ai classici controlli funzionali realizzati dall'Associazione Italiana Allevatori a livello di singolo animale, si affiancano quelli gestiti dai caseifici per il Pagamento Latte Qualità: un sistema che si basa sulla monetizzazione di un punteggio positivo o negativo attribuito in base a determinate caratteristiche della materia

prima prodotta da ogni singolo allevamento. Prendendo come esempio i criteri utilizzati per il latte destinato alla produzione di Parmigiano Reggiano, il punteggio viene determinato valutando: l'acidità titolabile, il conteggio delle cellule somatiche, la carica batterica dei coliformi e totale, la presenza di clostridi e inibenti, il contenuto in % peso di grasso e proteina. Questi ultimi due punti in particolare sono di grande importanza per la trasformazione del latte, in quanto da essi dipende la resa casearia costituita principalmente dal 95% del grasso e dal 75% della proteina contenuti nel latte di partenza; ed è per questo motivo che i caseifici sfruttano il pagamento differenziato in base alla qualità per stimolare gli allevatori a investire e migliorare il loro prodotto.

Figura 2. Grasso e proteina nel latte bovino dal 2000 al 2014 nella regione Veneto (ARAV, 2015).



Il monitoraggio della qualità del latte ha comportato un miglioramento della qualità produttiva delle lattifere: i risultati ottenuti sul contenuto di grasso e proteina del latte bovino grazie al miglioramento genetico e alle migliori condizioni di allevamento sono molto incoraggianti; a titolo di esempio in Figura 2 è rappresentato l'andamento di questi due componenti nel latte prodotto nella regione Veneto (ARAV, 2015). In particolare, questa regione rappresenta adeguatamente la situazione del settore, producendo il 10% della quota nazionale di latte e dedicandone circa l'85% a formaggi DOP e tradizionali.

Attualmente il settore lattiero caseario italiano sta vivendo una profonda crisi in seguito ad una serie di circostanze che hanno provocato una riduzione dei ricavi nei confronti degli stakeholders operanti lungo l'intera filiera, con particolare riferimento ai produttori di latte: il 2015 è stato un anno problematico per il mercato lattiero caseario veneto, con una

perdita di fatturato di circa l'11%. La recente abolizione delle quote latte che ha provocato un'ulteriore danno al settore: questo strumento di controllo dell'offerta permetteva di mantenere una certa redditività all'allevatore; la sua scomparsa ha determinato il via libera alla produzione provocando una discesa del prezzo. Infatti nel corso della campagna 2014/2015 il numero degli allevamenti da latte si è ridotto del 4,5% mentre la produzione è rimasta stabile, in linea con il trend nazionale. Analizzando i dati raccolti dall'osservatorio Latte dell'Ismea (2015), il calo del prezzo di vendita alla stalla di oltre 0.05 €/l è stato significativo per la chiusura di molti piccoli produttori in un settore dove i costi medi di produzione vanno da 38 centesimi a 60 centesimi per litro di latte. La crisi si è risentita anche per i trasformati, con una produzione di Grana Padano in forte calo (-15%) e una leggera contrazione anche per l'Asiago. D'altro canto, si è assistito anche a una lieve crescita per la produzione di formaggio Montasio (+1,4%) e una buona prestazione per il Piave (+4%) (Veneto Agricoltura, 2016).

Negli ultimi anni l'andamento del prezzo del latte crudo alla stalla non ha sostenuto adeguatamente i benefici ottenuti sulla qualità e la situazione non sembra migliorare: secondo i dati CLAL (2016) a marzo il valore ha raggiunto i 0,34€/l, ossia quasi 0,10€/l in meno rispetto all'inizio del 2014.

2. IL LATTE

Il latte è il primo alimento per il nascituro di ogni specie lattifera e per questo motivo contiene tutti gli elementi nutritivi necessari per il suo sostentamento e sviluppo. Dal punto di vista chimico, si tratta di un miscuglio eterogeneo nel quale i diversi componenti possono essere presenti in soluzione, allo stato colloidale ed allo stato di fine emulsione (Mehta, 2015). A livello di allevamento, i fattori che influenzano la sua composizione sono numerosi e possono essere suddivisi in due gruppi: il gruppo degli endogeni è legato alla genetica di specie/razza e dell'individuo, allo stato di salute, all'età, allo stadio di lattazione e all'ordine di parto; il gruppo degli esogeni è legato all'ambiente di allevamento ed include l'alimentazione, la stabulazione, le tecniche di mungitura, la stagione ed il microclima della stalla.

La frazione secca del latte, che rappresenta circa il 12% del suo contenuto, è composta dai seguenti nutrienti: lattosio, lipidi, sostanze azotate, vitamine e minerali.

Il lattosio è un disaccaride formato da una molecola di glucosio e una di galattosio unite da un legame β 1-4, nonché principale carboidrato del latte: il suo contenuto si mantiene intorno al 4.8% e grandi variazioni possono essere indice di problematiche a livello di apparato mammario, come la mastite. Il lattosio è inversamente proporzionale alla concentrazione di grasso e caseina, in quanto contribuisce attivamente alla pressione osmotica del latte: la sintesi del lattosio nella mammella richiama osmoticamente acqua dal sangue e aumenta il volume del latte secreto, influenzando la concentrazione di altri elementi e mantenendo costante il rapporto acqua:lattosio. Dal punto di vista nutrizionale fornisce energia immediata, contribuisce alla formazione del tessuto nervoso e all'assorbimento del calcio a livello osseo, ma può essere causa di intolleranze; dal punto di vista tecnologico è coinvolto nella reazione di Maillard, causando l'imbrunimento non enzimatico del latte e dei suoi derivati, e rappresenta il substrato fondamentale per le fermentazioni microbiche (Fox, 2011). Queste fermentazioni sono di grande interesse per l'industria lattiero casearia e tre sono particolarmente tenute in considerazione: la fermentazione lattica, ad opera dei batteri appartenenti ai generi *Streptococcus* e *Lactobacillus*, importante per l'abbassamento del pH durante il processo di caseificazione; quella propionica, attuata dal genere *Propionbacterium*, che determina la formazione della tipica occhiatura in formaggi come l'Asiago Pressato DOP; quella butirrica, causata dai clostridi che è responsabile del gonfiore tardivo, indesiderato in tutte le produzioni.

I lipidi sono la fonte energetica principale del latte e responsabili del colore e dei suoi sapori e aromi, comprese le essenze assunte dall'animale tramite l'alimentazione. Il latte

bovino ne contiene dal 3% al 6%: sono composti al 98% da trigliceridi e da un 2% costituito da fosfolipidi, colesterolo, mono- e di-gliceridi e acidi grassi non esterificati; inoltre, al loro interno, si possono trovare sostanze liposolubili come vitamine, β -carotene e composti aromatici. Durante il processo di caseificazione, circa il 90-95% del grasso del latte viene inglobato nella rete della cagliata e quindi influenza positivamente la resa casearia. Nel latte i lipidi sono organizzati in globuli con un diametro medio di 3-4 μm e tenuti in emulsione grazie ad una membrana esterna formata principalmente da fosfolipidi. Questa membrana ha anche la funzione di proteggere i grassi dalle alterazioni dovute alla loro ossidazione e alla lipolisi le quali possono provocare l'insorgere di aromi sgradevoli (Taylor and MacGibbon, 2011). Queste alterazioni vengono indicate con il termine generico di irrancidimento, che però in certi prodotti caseari sono molto ricercate: ad esempio, l'irrancidimento idrolitico, che determina il sapore piccante di alcuni formaggi, e l'irrancidimento chetonico, che contribuisce al sapore tipico degli erborinati.

Le sostanze azotate del latte possono essere divise in due componenti: una proteica che rappresenta il 95% (caseine e sieroproteine) e le restanti frazioni non proteiche (urea, nucleotidi, amminoacidi liberi, ecc.). Le proteine del latte costituiscono in media il 3.5% e sono un insieme di molecole molto eterogeneo e, per questo motivo, possono essere suddivise in 5 categorie: caseine, sieroproteine, proteine della membrana fosfolipidica dei globuli di grasso, enzimi e altre minori proteine. La maggior parte appartiene alle prime 2 classi che vengono distinte per la loro solubilità in determinate condizioni: si considerano caseine quelle proteine che a pH 4.6 tendono a precipitare, mentre le sieroproteine restano in soluzione nel surnatante. Le prime costituiscono il 78% circa della frazione proteica e sono presenti sotto forma di grandi aggregati colloidali, detti micelle caseiniche, tenuti insieme da ponti idrogeno e dai legami che si formano tra il calcio ionico e i gruppi fosfato di queste proteine. Le micelle hanno un diametro che può andare da meno di 100nm a più di 300nm e si mantengono in soluzione colloidale grazie a delle forze elettrostatiche di repulsione e ai macropeptidi della κ -caseina posta in superficie che permette loro di mantenere l'elevata idratazione e quindi la stabilità sterica (Dalglish & Corredig, 2012). Da un punto di vista nutrizionale, le caseine rappresentano una fonte di amminoacidi essenziali per la dieta e fungono da trasporto per il fosfato di calcio necessario per lo sviluppo del neonato; dal punto di vista tecnologico costituiscono il gel che intrappola gli altri nutrienti dando forma alla cagliata. Le sieroproteine invece formano circa il 18% delle proteine e, al momento della trasformazione casearia, vanno a far parte del siero, sottoprodotto che negli ultimi anni è stato rivalutato per il suo valore nutrizionale. Inoltre, dalla degradazione delle proteine del latte, si ottengono dei peptidi

biologicamente attivi che svolgono una serie di funzioni benefiche per la salute umana (Pereira, 2014). Le restanti proteine sono presenti in minori concentrazioni e svolgono ruoli piuttosto importanti: gli enzimi, ad esempio, hanno diverse funzioni, alcune ancora sconosciute, ma in generale svolgono un'azione di difesa contro le infezioni intestinali, come il lisozima che oltre a essere battericida aumenta la capacità di risposta degli anticorpi; oltre a questi, anche le immunoglobuline svolgono un'azione di difesa che concorre a creare un'immunità passiva nel lattante; le proteine della membrana fosfolipidica invece racchiudono un gruppo molto eterogeneo di proteine localizzate sui globuli di grasso, tra cui enzimi come le protein-chinasi che operano la fosforilazione di altre proteine, fondamentale per l'attivazione delle loro funzioni biologiche; infine ci sono le proteine di trasporto che chelano elementi minerali importanti per lo sviluppo del neonato, come la lattoferrina che inoltre sottrae il ferro disponibile per le attività dei microrganismi patogeni.

I costituenti minori del latte sono le vitamine e i sali minerali: le prime possono essere divise in liposolubili (A, D, E, K) e idrosolubili (B1, B2, B6, B12, C, PP, acido pantotenico, acido folico, biotina) e sono importanti come regolatori di diverse funzioni vitali dell'organismo; la frazione minerale invece è divisa in base al contributo in macroelementi (sodio, potassio, cloro, calcio, magnesio, fosforo) e microelementi (ferro, rame, zinco, manganese, selenio, iodio, cromo, cobalto, molibdeno, fluoro, arsenico, nichel, silicio, e boro), tutti essenziali per la nutrizione umana e presenti sia nella fase acquosa in forma ionica come il sodio e il potassio, sia nella fase micellare legati alle caseine come nel caso del calcio e del fosforo (Gaucheron, 2005; Pereira, 2014).

Tutti questi nutrienti svolgono una funzione nutrizionale fondamentale per la prima alimentazione di ogni specie, ma quando si parla di qualità tecnologica per la produzione casearia le proteine del latte assumono un ruolo di primo piano.

3. LE FRAZIONI PROTEICHE DEL LATTE

3.1 Le caseine

Le caseine costituiscono quella frazione proteica del latte che tende a precipitare per acidificazione a pH 4,6 e rappresentano il 78% delle proteine totali. Vengono distinte in 4 tipologie denominate α_{s1} -caseina (α_{s1} -CN), α_{s2} -caseina (α_{s2} -CN), β -caseina (β -CN) e κ -caseina (κ -CN), le quali nel latte bovino si presentano in una proporzione approssimativa di 4:1:4:1 (Bobe et al., 1998; Bonfatti et al., 2008).

Sono proteine a carattere acido, stabili al calore, particolarmente suscettibili agli enzimi proteolitici e con un elevato volume idrodinamico. Questo è dovuto alla loro particolare struttura caratterizzata da una conformazione aperta, che facilita l'azione degli enzimi, e da un'elevata capacità di adattamento all'ambiente circostante, motivo per cui sono definite proteine reomorfiche. Questa struttura è il risultato dell'aggregazione degli amminoacidi che le compongono, i quali tendono a raggrupparsi in determinate regioni della molecola in base alla loro idrofobicità; questa caratteristica si riflette anche sull'aggregazione delle proteine: secondo il modello proposto da Schmidt (1980) le quattro tipologie di caseine si raggruppano per ridurre il contatto delle regioni idrofobiche con la fase acquosa a formare delle sub-micelle, le quali a loro volta si uniscono utilizzando il fosfato di calcio colloidale come cementante, dando origine alle ben note micelle caseiniche.

Oltre a questo, anche le modifiche post-traduzionali hanno un effetto importante sulle proprietà fisico-chimiche e funzionali delle caseine. La modifica principale è la fosforilazione, ossia l'aggiunta di un gruppo fosfato ad un residuo della proteina; nel caso delle caseine avviene sui residui di serina (o più raramente su quelli di treonina), determinando la classificazione di queste come fosfoproteine. La fosforilazione può essere di diverso grado, ma generalmente le caseine nel latte bovino sono fosforilate al massimo del loro potenziale. I residui fosforilati tendono a raggrupparsi in cluster e insieme agli ioni calcio formano il cosiddetto fosfato di calcio colloidale che tiene insieme la struttura delle micelle. In secondo luogo c'è la glicosilazione, ossia l'aggiunta di uno zucchero alla catena di amminoacidi, cosa che nel latte bovino avviene solo nella κ -CN. Si verifica precisamente nei residui di treonina, e occasionalmente in quelli di serina, situati nella parte C-terminale idrofila della proteina.

Ad aumentare ulteriormente l'eterogeneità di queste proteine intervengono le varianti genetiche: nel corso degli anni sono state scoperte delle varianti tra le singole tipologie di caseine, dovute a differenze di amminoacidi in singoli siti della molecola o alla mancanza di

intere brevi sequenze. Tutto questo ha diversi risvolti sulla funzionalità delle caseine, in particolare durante il processo di caseificazione.

3.1.1 α_{s1} -CN

La α_{s1} -CN è la caseina più presente nel latte di vacca (costituisce circa il 38% della frazione caseinica) ed è quella con la più alta carica negativa. La α_{s1} -CN può essere divisa in due componenti: una minore e una maggiore indicate come α_{s0} e α_{s1} , aventi la stessa sequenza amminoacidica. Sono entrambe dei peptidi a catena singola formati da 199 residui tra i quali è assente la cisteina. La differenza tra le due sta nel grado di fosforilazione: infatti la componente minore presenta un residuo di serina fosforilato in più in posizione 41 rispetto alla maggiore. Presenta una spiccata idrofobicità vicino ai residui 25, 90–110, e 140–190 e una regione acida intorno ai residui 38 e 78 che le permette di legare in modo stretto il calcio; questo determina una elevata sensibilità alla concentrazione dell'elemento a tutte le temperature: infatti all'aumentare della concentrazione dello ione, le caseine tendono a formare aggregati di maggiori dimensioni fino alla flocculazione (Farrell et al., 2004; Farrell, 2011; Ng-Kwai-Hang, 2011).

Nel corso degli anni sono state scoperte 8 varianti genetiche di questa caseina che vengono indicate con le lettere A, B, C, D, E, F, G, H: la variante B è quella predominante nella specie *Bos taurus*, mentre la variante C è stata trovata più frequentemente nelle sottospecie *Bos Indicus* (zebù) e *Bos Grunniens* (yak) e la E solo nel *Bos Grunniens*. Le varianti A e D sono state identificate nel genere *Bos taurus*: in particolare la prima nelle razze frisona pezzata nera, frisona pezzata rossa e pezzata rossa tedesca, mentre la seconda in alcune razze italiane e francesi; infine le ultime varianti scoperte F, G e H sono state trovate in razze pezzate nere tedesche, nella bruna italiana e nella razza kuri del Chad (Formaggioni et al., 1999; Farrell et al., 2004).

Le differenze che contraddistinguono le diverse varianti condizionano molto le proprietà reologiche della cagliata: ad esempio la variante A è caratterizzata dalla mancanza di 13 residui amminoacidici che la rende meno idrofobica e meno sensibile all'azione enzimatica, quindi un latte che contiene tale variante tende a produrre una cagliata più soffice e meno adatta alla produzione casearia rispetto a quelli con la variante B (Farrell et al., 2004); a sua volta nello studio di Schmidt et al. (1970) è stato dimostrato che la variante C contribuisce a formare cagliate più compatte rispetto alla B.

3.1.2 α_{s2} -CN

La α_{s2} -CN costituisce circa il 10% della frazione caseinica e consiste in 2 componenti maggiori e in numerose componenti minori con diverso grado di fosforilazione indicate come α_{s2} , α_{s3} , α_{s4} , α_{s6} . La proteina di riferimento per indicare questa famiglia è la α_{s2} -CN A-11P, un peptide a catena singola formato da 207 residui amminoacidici. Rappresenta la caseina più idrofila per via della presenza di 3 cluster di gruppi anionici, composti da residui di fosfoserina e glutammina, equamente distribuiti lungo la catena; a differenza delle altre caseine, presenta un numero inferiore di residui di prolina e solo 2 di cisteina in posizione 36 e 40: in particolare, le cisteine sono in grado di formare un legame disolfuro che può essere intramolecolare, creando un piccolo anello all'interno della struttura, oppure intermolecolare, formando quindi un dimero come nel caso della α_{s5} costituita da α_{s4} e α_{s6} . Inoltre questa caseina è più sensibile ai livelli di calcio ionico a causa del suo elevato grado di fosforilazione: infatti precipita ad una concentrazione dello ione di 2mM, rispetto alla α_{s1} -CN che necessita di 6mM (Farrell et al., 2004; Farrell, 2011; Ng-Kwai-Hang, 2011).

Sono state identificate 4 varianti genetiche indicate con le lettere A, B, C e D: la variante A è quella più diffusa tra le razze bovine occidentali, mentre la D è meno diffusa ma è stata trovata nelle razze francesi vosgienne, montbeliarde e in 3 razze spagnole; invece le varianti B e C sono presenti rispettivamente nel latte di zebù e yak (Formaggioni et al., 1999; Farrell et al., 2004).

3.1.3 β -CN

La β -CN costituisce circa il 36% della frazione caseinica bovina e presenta molte somiglianze con la α_{s1} -CN: la proteina di riferimento β -CN A2-5P è un peptide a catena singola formato da 209 residui amminoacidici, privo di cisteina e ricco di prolina, altamente idrofobico e sensibile ai livelli di calcio a temperatura ambiente. Si tratta della caseina più idrofoba del latte per via dell'elevata presenza di catene laterali non polari nella struttura e della regione C terminale priva di cariche; la sequenza N-terminale rappresenta invece la parte più idrofila della molecola, grazie all'elevata carica negativa, che le conferisce un comportamento anfipatico (tanto da formare aggregati micellari in soluzione). La precipitazione in presenza di calcio, come detto in precedenza, è dovuta ai gruppi esteri fosforici che con l'elemento formano il fosfato di calcio colloidale; infatti in seguito a defosforilazione enzimatica, la β -CN perde questa sensibilità e, inoltre, riduce quella della α_{s1} -CN. La β -CN è una ricca fonte di peptidi bioattivi derivanti dall'azione di diverse proteasi

enzimatiche, tra cui la precedentemente nota γ -CN originata dall'enzima Plasmina (Farrell et al., 2004; Farrell, 2011; Ng-Kwai-Hang, 2011).

La sua eterogeneità sembra essere dovuta solamente alle sue 12 varianti genetiche indicate con le lettere A¹, A², A³, B, C, D, E, F, G, H¹, H², I. Le varianti A¹ e A² sono le più diffuse nelle razze bovine più diffuse, insieme alla meno comune A³ presente nella razza frisona; le varianti B e C sono presenti soprattutto nelle razze jersey e guernsey. Le restanti sono molto rare, in quanto sono state individuate solo in particolari specie e razze, come la variante D presente solamente nel latte di zebù e la E trovata nella razza da carne piemontese (Formaggioni et al., 1999; Farrell et al., 2004).

Queste varianti sembrano influenzare molto la produzione e le concentrazioni delle diverse frazioni proteiche. Ad esempio, la variante A¹ è associata ad una minor produzione di kg di proteina rispetto alla A², dovuta ad una riduzione della produzione di latte; inoltre è associata a una maggior concentrazione relativa di α_{s1} -CN e κ -CN, a discapito della α_{s2} -CN e della β -CN stessa. La variante B è invece collegata ad un aumento della concentrazione relativa della κ -CN e della β -CN rispetto alla A¹ e A² (Heck et al., 2009; Bonfatti et al., 2010a; Jensen et al., 2012) ed è stato riportato che le vacche che presentano la variante B producono un latte più ricco in proteina e con una migliore coagulazione: sembra, infatti, che la sostituzione di amminoacidi causi una minore repulsione tra le β -CN e che quindi le micelle siano portate ad aggregarsi più facilmente (McLean et al., 1984; Marziali & Ng-Kwai-Hang, 1986).

3.1.4 κ -CN

La κ -CN è l'unica proteina della famiglia delle caseine che risulta essere glicosilata nel latte bovino. Rappresenta il 10-12% della frazione caseinica e può essere suddivisa in una componente maggiore e almeno 6 minori, distinte da diverso grado di fosforilazione e glicosilazione. La κ -CN A-1P è la proteina di riferimento per indicare questa famiglia: si tratta di un peptide a catena singola formato da 169 residui amminoacidici, ricco in prolina e con 2 residui di cisteina, e da una catena glucidica composta da acido acetilneuraminico, galattosio e N-acetilgalattosamina. Il punto di unione tra le due catene è rappresentato dai residui di treonina presenti in posizione 131, 133 e 135 che permettono diversi livelli di glicosilazione. Questi sono posizionati nel peptide C-terminale che rappresenta la regione idrofila della caseina e che le permette di restare in contatto con la fase acquosa del latte. Questo glicomacropptide (residui da 106 a 169) è la ragione per cui la κ -CN si posiziona sulla superficie della micella caseinica, mantenendola quindi in sospensione colloidale. Quando

l'enzima chimosina del caglio rompe il legame tra i residui 105 e 106, la stabilità della micella viene meno in quanto sulla superficie restano i 2/3 della κ -CN nettamente idrofobici, denominati para- κ -CN. Da qui ha inizio l'aggregazione delle diverse micelle e il processo di coagulazione del latte. Un altro fattore che rafforza la capacità di solvatazione di questa proteina è la sua solubilità in presenza di calcio a tutte le temperature per via dello scarso livello di fosforilazione: ciò le permette di esercitare un potere stabilizzante anche sulle altre caseine in un mezzo calcico, motivo per cui viene definita colloide protettore. I due residui di cisteina invece le permettono di formare legami intramolecolari e intermolecolari, dando origine anche a dei polimeri con la β -LG in seguito a riscaldamento (Farrell et al., 2004; Farrell, 2011; Ng-Kwai-Hang, 2011).

Sono state individuate 11 varianti genetiche, indicate con le lettere A, B, C, E, F¹, F², G¹, G², H, I, J. Le varianti più comuni sono la A e la B, seppur con una maggior frequenza della A nelle razze da latte più diffuse, ad eccezione della jersey; meno comuni sono la variante C, scoperta per la prima volta nel latte della razza grigio alpina, la variante E, presente in diverse razze come la frisona, e le varianti G e H individuate solo nella razza pinzgauer. Le altre sono molto più rare e presenti solo in particolari razze e sottospecie come la G2 e la F rispettivamente nel latte di yak e zebù (Formaggioni et al., 1999; Farrell et al., 2004).

Come per la β -CN, anche la variante B della κ -CN è associata a caratteristiche favorevoli per la trasformazione casearia: il latte che presenta questa variante tende ad avere un contenuto proteico più elevato rispetto alla A e una maggiore concentrazione relativa di κ -CN, risultando in migliori proprietà coagulative (Heck et al., 2009; Bonfatti et al., 2010a; Jensen et al., 2012). La variante E invece è associata ad un latte con un minor contenuto proteico e bassa concentrazione relativa di κ -CN, con una coagulazione più lenta e un coagulo di scarsa consistenza rispetto alle varianti A e B (Ikonen et al., 1999).

3.2 Le sieroproteine

Il termine siero proteine viene utilizzato per indicare tutte quelle proteine che restano in soluzione dopo la precipitazione isoelettrica delle caseine a pH 4.6; tuttavia anche queste proteine possono precipitare a pH acido se riscaldate. Rappresentano circa il 20% delle proteine del latte e il contributo principale a questa frazione è dato da β -Lattoglobulina (β -LG) e α -Lattoalbumina (α -LA) (Ng-Kwai-Hang, 2011).

3.2.1 β -LG

La β -LG costituisce la principale rappresentante delle sieroproteine del latte bovino essendo presente nell'ordine di 2-3g/L. Sembra essere presente solo nel latte di quelle specie la cui placenta impedisce il passaggio di immunoglobuline al feto. La sua struttura primaria, rappresentata nella proteina di riferimento β -LG B, è formata da una singola catena peptidica di 162 residui amminoacidici, tra cui si distinguono 5 residui di cisteina. In particolare, 4 di questi residui possono creare legami disolfurici intramolecolari che la portano a ripiegarsi su sé stessa, mentre il quinto le permette di formare dei dimeri con altre molecole a pH compreso tra 3 e 7; avvicinandosi all'acidità, la β -LG tende a creare degli aggregati di maggiori dimensioni (Farrell et al., 2004; Ng-Kwai-Hang, 2011).

La β -LG è stata la prima ad essere studiata per il suo polimorfismo e, fino ad oggi, sono state scoperte 12 varianti genetiche indicate con le lettere A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, W, Dr. Le più diffuse nella popolazione bovina sono la A e la B, con una maggiore frequenza della seconda in razze europee come la rossa danese, alcune razze da carne italiane e nello zebù. La variante D è stata trovata in molte razze nostrane come la rendena, la reggiana, la modenese e la modicana, e in alcune razze europee come la jersey danese e la simmental polacca e tedesca. Invece la C è stata individuata solo nella jersey tedesca e australiana. Le restanti varianti sono molto rare in quanto presenti solo in determinate razze e sottospecie, come le varianti E, F e G scoperte nella sottospecie *Bos javanicus*. La variante Dr, invece, è interessante poiché è l'unica glicosilata di questa proteina (Formaggioni et al., 1999; Farrell et al., 2004).

Come per la β -CN e la κ -CN, anche in questo caso la variante più interessante per la qualità tecnologica del latte è la B, poiché a questa è associato un minor contributo della β -LG in favore della maggiore concentrazione delle caseine (Heck et al., 2009; Jensen et al., 2012).

3.2.2 α -LA

La α -LA è la seconda sieroproteina più presente nel latte bovino e contribuisce nell'ordine di 1-1,5 g/L. La proteina che la rappresenta è la α -LA B: si tratta di un peptide a catena singola costituito da 123 residui e caratterizzato dalla presenza di 4 legami disolfuro intramolecolari tra gli 8 residui di cisteina. Generalmente si trova insieme a uno o più componenti minori denominati glico- α -albumine. Questa proteina è di particolare importanza in quanto si relaziona alla produzione di lattosio: si è scoperto essere una componente dell'enzima responsabile della produzione di questo nutriente, la lattosio-sintetasi (Farrell et al., 2004; Ng-Kwai-Hang, 2011).

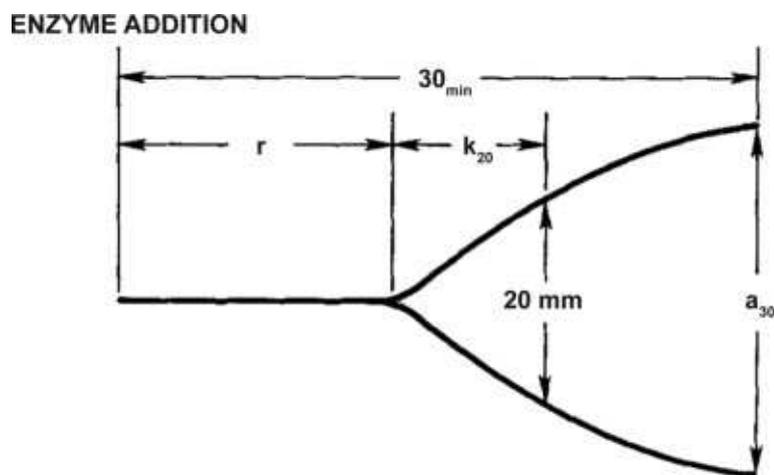
Di questa proteina sono state trovate solo 3 varianti genetiche indicate come A, B, C. Quella più diffusa nelle razze occidentali è la variante B, in quanto la A è presente solo nello zebù e la C nel *Bos javanicus* (Formaggioni et al., 1999; Farrell et al., 2004).

4. QUALITÀ TECNOLOGICA DEL LATTE

Quando si parla di qualità tecnologica del latte, si intende l'attitudine di questo alla produzione di un formaggio con una buona resa e caratterizzato da aspetti organolettico-nutrizionali di elevato valore.

Tradizionalmente, l'attitudine alla caseificazione di un latte viene valutata attraverso l'utilizzo del lattodinamografo, uno strumento che misura il comportamento di un pendolo oscillante immerso in un pozzetto pieno di latte a cui è stata aggiunta una data quantità di caglio. Dal grafico risultante vengono estrapolati i parametri di coagulazione (MCP dall'inglese Milk Coagulation Properties): tempo di coagulazione (RCT dall'inglese Rennet Coagulation Time, min), che esprime il tempo intercorso tra l'aggiunta del caglio e l'inizio della coagulazione; tempo di rassodamento (k_{20} , min), che indica il tempo passato tra l'inizio della coagulazione e il raggiungimento di un'oscillazione di 20 mm; consistenza del coagulo (a_{30} , mm), che misura l'ampiezza del grafico dopo 30 min dall'aggiunta del caglio (Bittante et al, 2012).

Figura 3: Esempio di Lattodinamogramma con indicati tempo di coagulazione ($r = RCT$, min), tempo di rassodamento (k_{20} , min) e consistenza del coagulo (a_{30} , mm) (McMahon and Brown, 1982).



In base all'analisi combinata di questi 3 parametri, il latte viene classificato come ottimale, subottimale, scarso o non coagulante.

Tuttavia nel corso degli anni sono stati evidenziati una serie di limiti che caratterizzano i parametri lattodinamografici: innanzitutto sono dati puntuali che non descrivono adeguatamente il processo di coagulazione nella sua interezza, con la conseguente perdita di numerose informazioni; inoltre mostrano un'ampia variabilità a causa dei numerosi fattori che influenzano il processo e che determinano una bassa ripetibilità dell'analisi; altro problema è la sempre maggior frequenza di campioni che non coagulano entro i 30 min dell'analisi, impedendo la rilevazione dei parametri; infine l'elevata correlazione genetica e

fenotipica esistente tra RCT e a_{30} rende ridondanti le informazioni conferite da questa analisi, già di per sé limitate (Bittante, 2011; Bittante et al., 2012).

Per poter superare queste problematiche recentemente sono state proposte una serie di soluzioni (Bittante et al., 2013):

- l'allungamento dei tempi di analisi fino a 60 min (massimo 90 min) per ridurre l'incidenza dei campioni che non coagulano;
- l'utilizzo di nuovi software di analisi che registrano le rilevazioni ogni 15 sec, aumentando i dati a disposizione;
- l'applicazione di un modello matematico a 4 parametri (Bittante et al., 2013) che permette di sfruttare al massimo le informazioni ottenute dalla lattodinamografia.

Tutte insieme queste soluzioni permettono di ottenere con la lattodinamografia una serie di informazioni più dettagliate sulla coagulazione del latte. Ciò è molto importante per poter comprendere appieno i fattori che influenzano il processo di coagulazione e di sineresi, il quale a sua volta influenza quello che è l'indice di profitto per l'industria casearia, ossia la resa di caseificazione.

La resa in formaggio per unità di latte lavorato (CY) rappresenta il carattere più importante per i trasformatori in quanto, associata al recupero dei nutrienti nella cagliata e alla loro perdita nel siero, definisce l'efficienza del processo di caseificazione (Banks, 2007). Questo carattere viene valutato calcolando il rapporto tra il peso di formaggio fresco (Cipolat-Gotet et al., 2013), la sostanza secca nella cagliata e l'acqua trattenuta in essa rispettivamente con il peso del latte processato ($\%CY_{CURD}$, $\%CY_{SOLIDS}$ e $\%CY_{WATER}$). Invece il recupero dei nutrienti dal latte alla cagliata viene stimato utilizzando il rapporto tra il peso del grasso, della proteina e della sostanza secca della cagliata con i rispettivi contenuti nel latte (REC_{FAT} , $REC_{PROTEIN}$, REC_{SOLIDS}).

Tutti questi caratteri, insieme alle MCP, descrivono il processo di coagulazione e di caseificazione del latte e sono fortemente influenzato da 2 fattori:

- la qualità del latte, intesa come composizione chimica della materia prima lavorata (Storry et al., 1983; Marziali & Ng-Kwai-Hang, 1986; O'Brien et al., 1999; Cassandro et al., 2008; Penasa et al., 2016);
- le condizioni di analisi e trasformazione della materia prima, come, ad esempio, il tipo e la concentrazione di caglio utilizzato, la temperatura,

strumentazione utilizzata ed operatore che la adopera (Kowalchuk et al., 1977; Okigbo et al., 1985; Nájera et al., 2003).

Per quanto riguarda la qualità del latte, è stato detto in precedenza che anche la composizione del latte è condizionata da una serie di fonti di variabilità che possono essere legate all'animale (endogene) oppure alle condizioni di allevamento (esogene); pertanto anche i caratteri della coagulazione e di efficienza di trasformazione ne subiscono l'influenza.

Tra gli elementi che definiscono la qualità del latte, tra quelli che hanno maggior impatto sul processo di caseificazione vi sono le frazioni proteiche.

Numerosi studi hanno attestato l'influenza delle proteine del latte sulla formazione del coagulo: ad esempio nello studio di Bonfatti et al. (2010a) è stato dimostrato che un elevato contenuto di κ -CN ha un effetto molto favorevole sull'RCT e, unito al contenuto di β -CN, migliora anche l' a_{30} ; mentre Wedholm et al. (2006) hanno messo in luce l'effetto sfavorevole di un elevato contenuto di β -LG sulla frazione caseinica e quindi sulle caratteristiche reologiche della cagliata. A questo poi si aggiungono anche gli effetti delle singole varianti genetiche che, come indicato nei capitoli precedenti, modificano sostanzialmente le proprietà coagulative del latte ed in generale l'attitudine casearia.

5. OBIETTIVI

Il contenuto proteico del latte è stato oggetto di numerosi studi per il miglioramento della qualità tecnologica con l'obiettivo di garantire una massima efficienza del processo di caseificazione in termini di resa in formaggio e di qualità organolettico-nutrizionale del prodotto. È nota l'importanza del contenuto caseinico per la produzione di formaggio, in quanto costituente principale della struttura della cagliata che ingloba tutti gli altri nutrienti; tuttavia sono ancora scarsi gli studi sugli effetti delle singole frazioni proteiche che caratterizzano il latte durante tutto il processo di caseificazione soprattutto nel caso di utilizzo di campioni individuali di latte.

Il presente studio rientra in un progetto di ricerca volto allo studio dell'attitudine casearia di vacche di razza Bruna allevate nella Provincia di Trento.

L'obiettivo della presente tesi è stato quello di valutare l'effetto del contenuto di ogni singola frazione proteica (α_{s1} -CN, α_{s2} -CN, β -CN, κ -CN, α -LA, β -LG) nei confronti dei caratteri che definiscono l'attitudine casearia di un latte e l'efficienza nel processo di caseificazione utilizzando campioni di latte prodotti da singoli animali; in particolare l'effetto delle frazioni proteiche è stato analizzato nei confronti: dei parametri lattodinamografici tradizionali (RCT, k_{20} , a_{30} , a_{45}) e di quelli derivanti da un modello matematico (RCT_{eq}, k_{CF} , k_{SR} , CF_p , C_{max} , t_{max}); della resa casearia distinta in 3 tipologie (%CY_{CURD}, %CY_{SOLIDS} e %CY_{WATER}) ed di quella espressa come la produzione giornaliera di formaggio per vacca (dCY_{CURD}, dCY_{SOLIDS}, dCY_{WATER}); del recupero dei nutrienti del latte nella cagliata (REC_{FAT}, REC_{PROTEIN}, REC_{SOLIDS}, REC_{ENERGY}). Sono stati inoltre inclusi ed analizzati gli effetti legati al singolo animale, come lo stadio di lattazione e l'ordine di parto, e quelli legati alla azienda intesa come singolo allevamento e tipologia di gestione aziendale.

6. MATERIALI E METODI

6.1 Disegno Sperimentale

La presente tesi rientra in un progetto multidisciplinare denominato “CowAbility” che ha visto la collaborazione del Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente (DAFNAE) dell’Università di Padova con la provincia autonoma di Trento. L’obiettivo ultimo di questo progetto è stato quello di valutare l’attitudine e la resa casearia del latte di bovine di razza Bruna, tenendo in considerazione tutti i fattori che possono influenzare il processo di produzione.

Durante la prova sperimentale che ha avuto luogo da febbraio 2010 ad aprile 2011 sono stati raccolti dei campioni di latte da 1.271 bovine di razza bruna provenienti da 85 allevamenti situati nella Provincia di Trento.

Gli allevamenti sono stati classificati in 4 tipologie in base al sistema di stabulazione, alimentazione e management aziendale:

1. Sistema tradizionale: aziende di modeste dimensioni con una superficie coltivata di 18,6 ha e una media di 28,2 vacche in lattazione tenute su posta fissa; per l’alimentazione viene utilizzato il fieno prodotto in azienda (60,9%SS ingerita su un totale di 68,3% rappresentato da foraggi) e costituenti commerciali (18,3%SS ingerita) distribuiti manualmente o tramite auto-alimentatori; viene praticata la transumanza estiva;
2. Sistema moderno senza uso di carro unifeed: aziende che presentano strutture moderne a stabulazione libera e una media di 39,3 vacche in lattazione; l’alimentazione è costituita da foraggi aziendali (53,7%SS ingerita su un totale di 62,0% rappresentato da foraggi) e costituenti commerciali (30,4%SS ingerita) somministrati in mangiatoia e durante la mungitura;
3. Sistema moderno con uso di carro unifeed e insilati: aziende che presentano strutture moderne a stabulazione libera e una media di 49,4 vacche in lattazione; l’alimentazione è costituita da unifeed di fieno (22,2%SS ingerita su un totale di 48,1% rappresentato da foraggi), insilato di mais (18,8%SS ingerita), fieno non aziendale (16,2%SS ingerita), concentrati che possono consistere in costituenti commerciali (14,5%SS ingerita) o mix di cereali (23,2%SS ingerita), farina di soia, polpe di barbabietola secche ed integratori;
4. Sistema moderno con uso di carro unifeed senza insilati: aziende che presentano strutture moderne a stabulazione libera e una media di 54,2 vacche in lattazione;

l'alimentazione è costituita da unifeed di fieno di elevata qualità (38,5%SS ingerita su un totale di 52,5% rappresentato da foraggi) e concentrati con aggiunta di acqua per incrementarne l'umidità fino a circa 50%.

I campioni sono stati prelevati durante la mungitura serale nell'ordine di 2 L per singolo animale e refrigerati a 4°C per il trasporto secondo la procedura indicata da Cipolat-Gotet et al. (2012). Il latte campionato è stato quindi diviso in due aliquote, di cui la prima è stata utilizzata per determinare: le frazioni proteiche (α_{s1} -CN, α_{s2} -CN, β -CN, κ -CN, α -LA, β -LG) tramite analisi con RP-HPLC (Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography). In questo caso, durante l'intervallo di tempo campionato-analisi, il latte è stato refrigerato (-20°C) e conservato tramite una soluzione di 2-Bromo2-Nitro-1,3-propanediol.

La seconda aliquota di latte invece è stata utilizzata per la determinazione dei parametri lattodinamografici utilizzando l'apparecchiatura Formagraph ed è stata sottoposta a micro-caseificazione (Cipolat-Gotet et al., 2013) per determinare le rese casearie (%CY_{CURD}, %CY_{SOLIDS} e %CY_{WATER}) e il recupero dei nutrienti del latte nella cagliata (REC_{FAT}, REC_{PROTEIN}, REC_{SOLIDS}, e REC_{ENERGY}).

Ai dati così raccolti presso il laboratorio “Qualità latte” del Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente (DAFNAE) dell'Università di Padova, sono stati affiancati le informazioni riguardanti lo stato fisiologico delle bovine raccolte durante i controlli funzionali operati dalla Federazione Provinciale Allevatori di Trento.

6.2 Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography

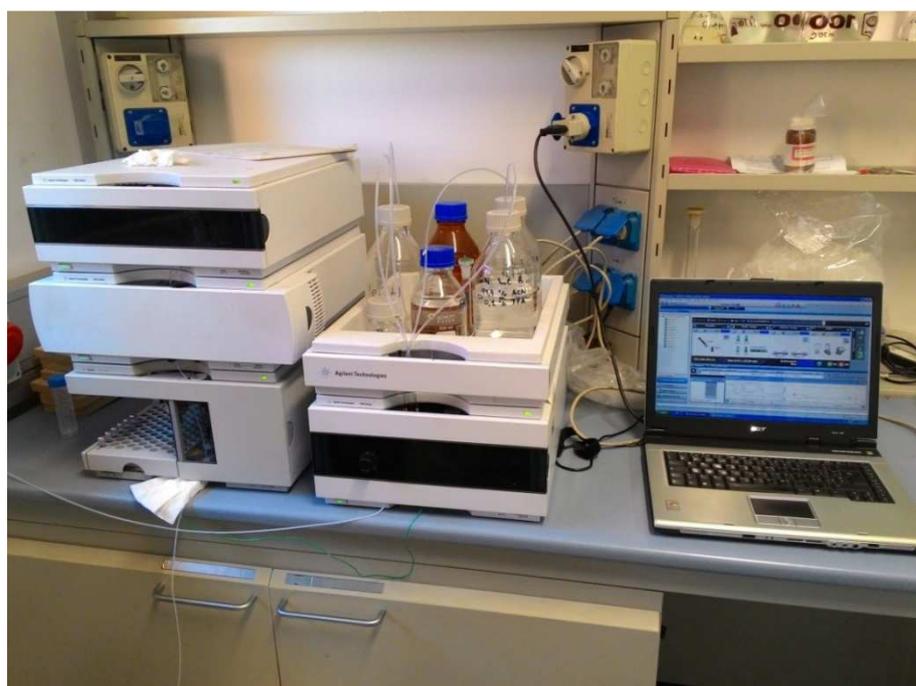
La Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) è un sistema di analisi per la separazione di peptidi e proteine che consiste nell'interazione dell'analita con 2 fasi del sistema: una fase stazionaria apolare e una fase mobile polare. Si basa sul legame idrofobico che il soluto instaura con il sorbente della fase stazionaria: questo è costituito da alchilsilice altamente idrofobica presente all'interno di una colonna in acciaio inox nella quale le proteine vengono iniettate in presenza di un buffer acquoso. L'interazione con la silice avviene attraverso dei ligandi posti sulla superficie di contatto e costituiti da catene carboniose di varia lunghezza; le colonne analitiche vengono classificate in base al numero di atomi di C che compongono tali catene: C4, C8, C18. Dopo l'iniezione del campione di proteine viene aggiunta una fase mobile costituita da una combinazione di

solventi organici che permettono l'eluizione delle proteine: questa può avvenire a condizioni isocratiche, ossia con concentrazione costante dei solventi, o per gradiente di eluizione, dove il volume di un solvente viene aumentato gradualmente durante un determinato periodo di tempo. L'ordine di eluizione delle proteine dipende dalla loro idrofobicità e la separazione può essere migliorata modificando la curva di gradiente dei solventi, la loro composizione e la temperatura della colonna (Aguilar, 2004).

Per questa analisi è stato utilizzato il metodo descritto da Bonfatti et al. (2008) e la strumentazione HPLC adoperata nel Laboratorio La-Chi presso il Dipartimento DAFNAE dell'Università degli Studi di Padova è costituita da:

- una pompa quaternaria Agilent 1260 Infinity (G1311B) che gestisce il flusso dei solventi;
- un autocampionatore Agilent 1100 series, (G1313A) che inietta il campione nella colonna;
- una colonna analitica a fase inversa Zorbax 300SB-C8 (Agilent Technologies) che contiene la fase stazionaria in silice ($3,5 \mu\text{m}$, 300 \AA ; $150 \times 4,6 \text{ I.D.}$) ed è equipaggiata con una pre-colonna C4 Security Guard Cartridge System ($4 \text{ mm} \times 3,0 \text{ mm}$; AJ0-4330, Phenomenex);
- un detector a raggi UV-Vis Agilent 1260 Infinity (G1315C) che registra l'eluizione delle proteine.

Figura 4: Strumentazione HPLC adoperata nel Laboratorio La-Chi presso il Dipartimento DAFNAE dell'Università degli Studi di Padova.



Ognuna di queste componenti è controllata dal software Chem-Station (Agilent Technologies) settato per la cromatografia liquida, il quale gestisce il gradiente e il flusso dei solventi, il volume di iniezione, la temperatura della colonna, l'acquisizione e l'elaborazione dei dati.

Per l'analisi è stata utilizzata una combinazione di 2 solventi che insieme costituiscono la fase mobile: un solvente A composto da 0,1% di Acido Trifluoroacetico (TFA) in acqua purificata e deionizzata (Milli-Q); un solvente B con 0,1% di TFA in Acetonitrile (CH₃CN).

Il programma dei gradienti dei 2 solventi utilizzati è stato: un gradiente lineare di solvente B da 33% a 35% in 5 min (0,4% B*min⁻¹), da 35% a 37% B in 4 min (0,5% B*min⁻¹), da 37% a 40% B in 9 min (0,33% B*min⁻¹), da 40% a 41% B in 4 min (0,25% B*min⁻¹); a seguire una eluizione isocratica al 41% B durata 5,5 min; poi un altro gradiente lineare da 41% a 43% B in 0,5 min (4% B*min⁻¹) e da 43% a 45% B in 8 min (0,25% B*min⁻¹); infine un ritorno lineare alle condizioni iniziali in 1 min e una fase di riequilibrio della colonna di 8 min. Il tempo totale di analisi per ciascun campione è stato di 45 min.

Inoltre nel software sono stati settati i seguenti parametri di analisi: velocità di flusso di 0,5 ml/min, volume di iniezione di 5 µl, temperatura della colonna di 45°C e lunghezza d'onda di rivelazione sui 214 nm.

Ogni campione è stato analizzato in seguito alla fase preparatoria descritta da Bobe et al. (1998): all'aliquota di latte viene aggiunta una soluzione acquosa in rapporto 1:1 contenente 0,1 M di BisTris buffer (pH 6,8), 6 M di Guanidina idrocloride (GdnHCl), 5,37 mM Citrato di sodio (Na₃C₆H₅O₇) e 19,5 mM Ditiotreitolo (DTT; pH 7); è quindi incubato a temperatura ambiente per 1 ora e poi centrifugato per 5 min a 16.000g; lo strato di grasso formatosi in superficie viene rimosso con una spatola e al campione solubilizzato viene aggiunta in rapporto 1:3 una soluzione di 4,5 M di GdnHCl in solvente A.

Per poter distinguere ogni proteina sono stati analizzati separatamente gli standard commerciali delle singole caseine e sieroproteine a diverse concentrazioni; ciò ha permesso la costruzione delle curve di calibrazione necessarie per quantificare le proteine in base ai picchi rilevati nei cromatogrammi.

6.3 Lattodinamografia

L'analisi lattodinamografica è stata effettuata attraverso l'utilizzo del Formagraph, uno strumento realizzato dalla ditta danese Foss Electric (Hillerod, Danimarca) che si compone di 2 moduli: il primo di servizio è costituito da una piastra che preriscalda i campioni di latte fino a una temperatura di 35°C e che la controlla durante l'analisi; il secondo invece è un modulo di registrazione a dieci canali, costituito da 10 pendoli ciascuno collegato ad un sistema ottico.

L'analisi è divisa nelle seguenti fasi:

- il rack, un blocco in acciaio inox dotato di 10 pozzetti, viene riempito con 10 campioni da 10 ml di latte individuale e posizionato sulla piastra riscaldante a 35°C;
- una volta raggiunta la temperatura desiderata vengono aggiunti per ogni campione 200 µl di una soluzione coagulante al 1,6% di caglio bovino liquido (Hansen standard 160 80 ± 5% chimosina e 20 ± 5% pepsina; 160 international milk clotting units (IMCU)/mL; Pacovis Amrein AG, Berna, Svizzera);
- subito dopo il rack viene posto su una piastra oscillante nel modulo di registrazione e in ogni pozzetto viene inserito il relativo pendolo: grazie all'oscillazione e all'aumento della viscosità del campione il pendolo inizia a muoversi e questo movimento viene registrato grazie a dei fasci luminosi riflessi da specchi collegati ai singoli pendoli e ottenendo così il lattodinamogramma.

Il grafico disegnato dall'oscillazione del pendolo rappresenta l'andamento della coagulazione espressa come "consistenza coagulo/tempo" (mm/min): fintanto che la gelificazione non avviene il grafico è costituito da una singola linea, la quale si apre con l'inizio dell'oscillazione del pendolo per la coagulazione del latte; la cosiddetta apertura a campana è dovuta ai fasci luminosi riflessi dagli specchi in diverse posizioni laterali (oscillazione trasversale), le quali vengono registrate dal sistema ottico. Quindi maggiore è la consistenza del coagulo, maggiore è l'oscillazione del pendolo e più ampia è la campana disegnata nel grafico. Il grafico viene aggiornato ogni 15 secondi e l'analisi nel totale dura 60 min.

Anche se l'analisi generalmente dura 30 min e permette di ottenere i tradizionali parametri di coagulazione (MCP) precedentemente descritti, aumentare a 60 min la durata di registrazione permette di ottenere altri dati quali:

- a_{45} , che misura l'ampiezza del grafico dopo 45 min dall'aggiunta del caglio;
- CF_{max} , che misura l'ampiezza massima raggiunta dal grafico durante l'analisi;
- t_{max} , che misura il tempo a cui la campana ha raggiunto la massima ampiezza.

6.4 Modellizzazione del tracciato lattodinamografico

Oltre ad aumentare la durata dell'analisi, in questa prova è stato utilizzato il modello matematico proposto da Bittante et al. (2013) che permette di sfruttare al massimo le informazioni ottenute dalla lattodinamografia. In questo modo è possibile superare alcune limitazioni dei parametri tradizionali come: la presenza di campioni che non coagulano, i problemi relativi all'acquisizione del k_{20} e la natura delle informazioni ottenute dal a_{30} . Inoltre è possibile ottenere nuovi parametri rilevanti per la descrizione del processo di coagulazione.

Il modello è il seguente:

$$CF_t = CF_p \times (1 - e^{-k_{CF} \times (t - RCT_{eq})}) \times e^{-k_{SR} \times (t - RCT_{eq})}$$

Dove:

CF_t = consistenza del coagulo (mm) al tempo t;

CF_p = massimo valore potenziale asintotico della consistenza del coagulo (mm) a tempo infinito;

k_{CF} = tasso costante di incremento della consistenza del coagulo (%/min);

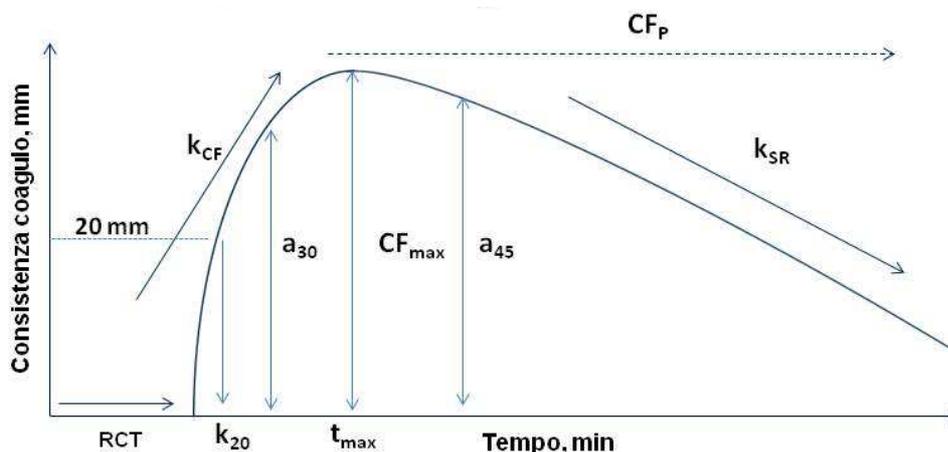
k_{SR} = tasso costante della sineresi della cagliata (%/min);

RCT_{eq} = tempo di coagulazione.

Il modello utilizza tutte le informazioni raccolte con l'analisi per stimare questi 4 parametri, i quali non rappresentano misurazioni puntuali come nel caso dei tradizionali: il parametro CF_p è concettualmente indipendente dalla durata dell'analisi e non è legato al RCT, diversamente dal a_{30} ; k_{CF} descrive un incremento della consistenza del coagulo verso il valore asintotico potenziale CF_p , mentre k_{SR} determina una perdita di consistenza dovuta alla sineresi della cagliata. Nelle prime fasi dell'analisi k_{CF} prevale su k_{SR} e si ha un incremento di CF_t fino a raggiungere la consistenza massima del coagulo (CF_{max}) al tempo t_{max} , momento in cui k_{CF} e k_{SR} si compensano equamente. In seguito, k_{SR} prevale e CF_t inizia a diminuire verso un valore asintotico nullo per effetto della sineresi della cagliata. E' importante infine sottolineare che RCT_{eq} si distingue dal tradizionale RCT per il fatto che viene stimato utilizzando tutti i dati

disponibili. Per migliorare la ripetibilità di quei caratteri rilevati solitamente nella seconda fase della coagulazione sono state proposte delle modifiche di calcolo dei parametri modellizzati: in particolare è stato fissato il CF_p sulla base del CF_{max} misurato utilizzando una regressione lineare ($CF_p = 1.34 * CF_{max}$) calcolata su dati osservati da Bittante et al., (2015).

Figura 5: Modellizzazione della consistenza del coagulo (CF) al tempo t (Bittante et al., 2013).



6.5 Micro-caseificazione

La micro-caseificazione dei campioni di latte individuale è stata svolta nel laboratorio “Qualità Latte” del Dipartimento DAFNAE dell’Università degli Studi di Padova secondo il metodo indicato da Cipolat-Gotet et al. (2013). Questa analisi è stata messa a punto per la rilevazione dei parametri di resa casearia e di recupero dei nutrienti nella cagliata. La strumentazione necessaria è composta da 4 bagnomaria, ognuno equipaggiato con un termostato digitale per il controllo della temperatura; in ciascun bagnomaria sono posti 5 pozzetti da 1500 ml per il latte, per un totale di 20 campioni analizzabili in contemporanea.

La procedura di analisi è divisa nelle seguenti fasi:

- riempimento di ogni pozzetto con 1500 ml di latte individuale refrigerato a 4°C durante la notte;
- pesata dei pozzetti riempiti di latte (al netto della tara) prima dell’immersione in bagnomaria;
- immersione dei pozzetti nel bagnomaria a temperatura di 35°C per riscaldamento;
- rilevamento del pH e della temperatura a 25 min;
- aggiunta di 8 ml di soluzione di caglio per pozzetto ($145\ \mu\text{l}$ di caglio liquido bovino diluito in 48 ml di acqua distillata; Hansen standard 160 $80 \pm 5\%$ chimosina e $20 \pm 5\%$ pepsina; 160 international milk clotting units (IMCU)/mL; Pacovis Amrein AG, Berna, Svizzera) a 30 min dall’inizio del riscaldamento;

- rilevazione manuale del RCT utilizzando un cucchiaino da laboratorio;
- dopo la coagulazione spostamento dei pozzetti in un secondo bagnomaria a 55°C per cottura della cagliata;
- rottura cagliata con taglio a scacchiera a 10 min dal rivelamento del RCT;
- separazione della cagliata dal siero dopo 10 min di sineresi e posizionamento in formella inserita dentro un pozzetto in acciaio per la raccolta del siero di sgrondo;
- pesata della cagliata e del siero 1 min dopo la separazione e campionamento del secondo per analisi della composizione chimica;
- riposo di 20 min della cagliata con rivoltamento ogni 2 min e misurazione di pH e temperatura al 18° minuto;
- dopo i 20 min di riposo, taglio a croce e spostamento della cagliata in formella più piccola con immersione nel siero spurgato per 10 min;
- pesata della cagliata e del siero a 30 min dalla separazione e analisi della composizione chimica del secondo;
- pressatura della cagliata di 30 min con rivoltamento ogni 10 min e pesatura finale;
- immersione della cagliata in salamoia (soluzione satura al 20% di NaCl) per 30 min e pesatura finale;
- inserimento delle forme ottenute in maturatore a 15°C e 85% U.R.

La composizione del latte iniziale e del siero è stata analizzata con strumentazione MilkoScan FT2 (Foss Electric A/S, Hillerod, Danimarca). Il peso degli input (latte) e degli output (cagliata e siero) assieme alla composizione chimica di latte e siero ha permesso il rilievo dei seguenti caratteri che descrivono il processo di caseificazione:

1. Resa della cagliata (CY_{CURD} , %): è il rapporto espresso in percentuale tra il peso in grammi della cagliata dopo l'estrazione dalla salamoia e il peso in grammi del latte di partenza.

$$\%CY_{CURD} = \frac{\text{cagliata (g)}}{\text{latte (g)}} \times 100$$

2. Resa della sostanza secca nella cagliata (CY_{SOLIDS} , %): è il rapporto espresso in percentuale tra il peso in grammi della sostanza secca nella cagliata, ottenuto per sottrazione della sostanza secca presente nel siero da quella nel latte, e il peso in grammi del latte di partenza.

$$\%CY_{\text{SOLIDS}} = \frac{\text{sostanza secca cagliata (g)}}{\text{latte (g)}} \times 100$$

3. Ritenzione dell'acqua nella cagliata (CY_{WATER} , %): è il rapporto espresso in percentuale tra il peso in grammi dell'acqua presente nella cagliata, ottenuto per sottrazione dell'acqua presente nel siero da quella nel latte, e il peso in grammi del latte di partenza.

$$\%CY_{\text{WATER}} = \frac{\text{acqua cagliata (g)}}{\text{latte (g)}} \times 100$$

Invece, con il monitoraggio della composizione chimica di latte e siero si è potuto stimare il recupero dei nutrienti del latte di partenza nella cagliata:

1. Recupero del grasso nella cagliata (REC_{FAT} , %): è il rapporto espresso in percentuale tra il peso in grammi del grasso nella cagliata, ottenuto per sottrazione del grasso presente nel siero da quello nel latte, e il peso in grammi del grasso nel latte di partenza.

$$REC_{\text{FAT}}(\%) = \frac{\text{grasso cagliata (g)}}{\text{grasso latte (g)}} \times 100$$

2. Recupero della proteina nella cagliata (REC_{PROTEIN} , %): è il rapporto espresso in percentuale tra il peso in grammi della proteina nella cagliata, ottenuto per sottrazione della proteina presente nel siero da quella nel latte, e il peso in grammi della proteina nel latte di partenza.

$$REC_{\text{PROTEIN}}(\%) = \frac{\text{proteina cagliata (g)}}{\text{proteina latte (g)}} \times 100$$

3. Recupero della sostanza secca nella cagliata (REC_{SOLIDS} , %): è il rapporto espresso in percentuale tra il peso in grammi della sostanza secca nella cagliata, ottenuto per sottrazione della sostanza secca presente nel siero da quella nel latte, e il peso in grammi della sostanza secca nel latte di partenza.

$$REC_{SOLIDS} (\%) = \frac{\text{sostanza secca cagliata (g)}}{\text{sostanza secca latte (g)}} \times 100$$

4. Recupero dell'energia nella cagliata (REC_{ENERGY} , %): è il rapporto espresso in percentuale tra l'energia nella cagliata, espressa in MJ e ottenuta per sottrazione dell'energia presente nel siero da quella nel latte, e l'energia nel latte di partenza, sempre espressa in MJ.

$$REC_{ENERGY} (\%) = \frac{\text{energia cagliata (MJ)}}{\text{energia latte (MJ)}} \times 100$$

Per stimare l'energia nel latte e nel siero è stata utilizzata l'equazione proposta dall'NRC (2001) per stimare i fabbisogni energetici della vacca in lattazione (grasso = 38,89 kJ/g; proteina = 23,90 kJ/g; lattosio = 16,53 kJ/g).

Le 3 tipologie di resa stimate sono state moltiplicate anche per la produzione giornaliera individuale di latte per determinare la produzione giornaliera per vacca di formaggio fresco (dCY_{CURD} , kg), della sostanza secca (dCY_{SOLIDS} , kg) e dell'acqua trattenuta nella cagliata (dCY_{WATER} , kg).

6.6 Analisi statistica

I dati raccolti sono stati analizzati con l'impiego delle procedure statistiche del pacchetto statistico SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC). L'analisi statistica dei dati ha previsto l'utilizzo di un modello lineare misto per l'analisi della varianza (ANOVA) che ha incluso gli effetti legati all'animale come lo stadio di lattazione e l'ordine di parto, e quelli legati alla azienda (singolo allevamento e tipologia aziendale). Inoltre sono state inclusi gli effetti fissi di ogni singola frazione proteica. Le variabili dipendenti testate utilizzando questo modello sono state: i parametri lattodinamografici distinti in tradizionali (RCT , k_{20} , a_{30} , a_{45}) e quelli ottenuti tramite l'utilizzo del modello matematico a quattro parametri (RCT_{eq} , k_{CF} , k_{SR} , CF_p , CF_{max} , t_{max}); la resa casearia distinta in 3 tipologie ($\%CY_{CURD}$, $\%CY_{SOLIDS}$ e $\%CY_{WATER}$); il recupero dei nutrienti del latte nella cagliata indicati come REC_{FAT} , $REC_{PROTEIN}$, REC_{SOLIDS} , e REC_{ENERGY} ; il quantitativo giornaliero di formaggio fresco, della sostanza secca e dell'acqua trattenuta nella cagliata (dCY_{CURD} , dCY_{SOLIDS} , dCY_{WATER}).

Il modello lineare misto utilizzato è stato il seguente:

$$y_{ijklmnopqrstu} = \mu + \text{tip. aziendale}_i + \text{herd}_j(\text{tip. aziendale})_i + \text{DIM}_k + \text{parity}_l + \alpha_{s1-CN}_m + \alpha_{s1-CN} \text{ph}_n + \alpha_{s2-CN}_o + \beta-CN_p + \kappa-CN_q + \alpha-LA_r + \beta-LG_s + \text{pozzetto}_t + e_{ijklmnopqrstu}$$

dove:

- $y_{ijklmnopqrstu}$ = variabili dipendenti (MCPs, $\%CY$ s, REC s e dCY s);
- μ = intercetta generale del modello;
- tip. aziendale_i = effetto fisso dell' i^{ma} classe di tipologia aziendale (tradizionale, moderna senza uso di carro unifeed, moderna con carro unifeed ed uso di insilati, moderna con carro senza insilati con aggiunta di acqua nella razione);
- herd_j = effetto random della j^{ma} classe di allevamento entro la i^{ma} classe di tipologia aziendale;
- DIM_k = effetto fisso della k^{ma} classe di stadio di lattazione della vacca (classe 1: $\text{DIM} \leq 60$ giorni; classe 2: $60 \text{ giorni} < \text{DIM} < 120$ giorni; classe 3: $120 \text{ giorni} < \text{DIM} < 180$ giorni; classe 4: $180 \text{ giorni} < \text{DIM} < 240$ giorni; classe 5: $240 \text{ giorni} < \text{DIM} < 300$ giorni; classe 6: $\text{DIM} \geq 360$ giorni);
- parity_l = effetto fisso della l^{ma} classe di ordine di parto della vacca ($j = \text{da } 1 \text{ a } \geq 5$);
- α_{s1-CN}_m = effetto fisso della m^{ma} classe di α_{s1-CN} (classe 1: $\alpha_{s1-CN} \leq 0,79$; classe 2: $0,79 < \alpha_{s1-CN} < 0,86$; classe 3: $0,86 < \alpha_{s1-CN} < 0,92$; classe 4: $0,92 < \alpha_{s1-CN} < 0,99$;

- classe 5: $0,99 < \alpha_{s1}\text{-CN} < 1,05$; classe 6: $1,05 < \alpha_{s1}\text{-CN} < 1,12$; classe 7: $\alpha_{s1}\text{-CN} \geq 1,12$);
- $\alpha_{s1}\text{-CN ph}_n$ = effetto fisso della n^{ma} classe di $\alpha_{s1}\text{-CN}$ fosforilata (classe 1: $\alpha_{s1}\text{-CN ph} \leq 0,024$; classe 2: $0,024 < \alpha_{s1}\text{-CN ph} < 0,036$; classe 3: $0,036 < \alpha_{s1}\text{-CN ph} < 0,048$; classe 4: $0,048 < \alpha_{s1}\text{-CN ph} < 0,060$; classe 5: $0,060 < \alpha_{s1}\text{-CN ph} < 0,072$; classe 6: $0,072 < \alpha_{s1}\text{-CN ph} < 0,084$; classe 7: $\alpha_{s1}\text{-CN ph} \geq 0,084$);
 - $\alpha_{s2}\text{-CN}_o$ = effetto fisso della o^{ma} classe di $\alpha_{s2}\text{-CN}$ (classe 1: $\alpha_{s2}\text{-CN} \leq 0,27$; classe 2: $0,27 < \alpha_{s2}\text{-CN} < 0,30$; classe 3: $0,30 < \alpha_{s2}\text{-CN} < 0,33$; classe 4: $0,33 < \alpha_{s2}\text{-CN} < 0,36$; classe 5: $0,36 < \alpha_{s2}\text{-CN} < 0,39$; classe 6: $0,39 < \alpha_{s2}\text{-CN} < 0,42$; classe 7: $\alpha_{s2}\text{-CN} \geq 0,42$);
 - $\beta\text{-CN}_p$ = effetto fisso della p^{ma} classe di $\beta\text{-CN}$ (classe 1: $\beta\text{-CN} \leq 1,00$; classe 2: $1,00 < \beta\text{-CN} < 1,08$; classe 3: $1,08 < \beta\text{-CN} < 1,15$; classe 4: $1,15 < \beta\text{-CN} < 1,23$; classe 5: $1,23 < \beta\text{-CN} < 1,31$; classe 6: $1,31 < \beta\text{-CN} < 1,38$; classe 7: $\beta\text{-CN} \geq 1,38$);
 - $\kappa\text{-CN}_q$ = effetto fisso della q^{ma} classe di $\kappa\text{-CN}$ (classe 1: $\kappa\text{-CN} \leq 0,26$; classe 2: $0,26 < \kappa\text{-CN} < 0,30$; classe 3: $0,30 < \kappa\text{-CN} < 0,33$; classe 4: $0,33 < \kappa\text{-CN} < 0,37$; classe 5: $0,37 < \kappa\text{-CN} < 0,41$; classe 6: $0,41 < \kappa\text{-CN} < 0,44$; classe 7: $\kappa\text{-CN} \geq 0,44$);
 - $\alpha\text{-LA}_r$ = effetto fisso della r^{ma} classe di $\alpha\text{-LA}$ (classe 1: $\alpha\text{-LA} \leq 0,063$; classe 2: $0,063 < \alpha\text{-LA} < 0,073$; classe 3: $0,073 < \alpha\text{-LA} < 0,082$; classe 4: $0,082 < \alpha\text{-LA} < 0,092$; classe 5: $0,092 < \alpha\text{-LA} < 0,101$; classe 6: $0,101 < \alpha\text{-LA} < 0,110$; classe 7: $\alpha\text{-LA} \geq 0,110$);
 - $\beta\text{-LG}_s$ = effetto fisso della s^{ma} classe di $\beta\text{-LG}$ (classe 1: $\beta\text{-LG} \leq 0,23$; classe 2: $0,23 < \beta\text{-LG} < 0,27$; classe 3: $0,27 < \beta\text{-LG} < 0,31$; classe 4: $0,31 < \beta\text{-LG} < 0,34$; classe 5: $0,34 < \beta\text{-LG} < 0,38$; classe 6: $0,38 < \beta\text{-LG} < 0,42$; classe 7: $\beta\text{-LG} \geq 0,42$);
 - pozzetto_t = effetto fisso dell t^{mo} livello del pozzetto di analisi (15 livelli sia per lattodinamografia che per micro-caseificazione);
 - $e_{ijklmnopqrstu}$ = errore casuale $\sim N(0, \sigma^2 e)$.

7. RISULTATI E DISCUSSIONE

In Tabella 1 sono indicate le statistiche descrittive della popolazione bovina oggetto di studio riguardanti la produzione giornaliera, la qualità del latte e il profilo proteico. Il confronto con i dati da noi ottenuti saranno confrontati con le medie nazionali riferite all'anno 2012, dato che il campionamento del latte è stato effettuato tra il 2010 e il 2012.

Le vacche di razza bruna campionate hanno presentato una media produttiva di 24,37 kg/d rispetto ai 23,24 kg/d di quella nazionale del 2012. Per quanto riguarda i caratteri qualitativi del latte, le medie relative sono state 13,88%, 4,38%, 3,75%, 2,88%, 4,76%, 2,98 e 6,64 rispettivamente per il contenuto di sostanza secca, grasso, proteina, caseina, lattosio, SCS e pH. Il grasso e la proteina in particolare hanno raggiunto dei valori superiori rispetto alle medie nazionali (3,98% e 3,55% rispettivamente per grasso e proteina; ANARB, 2013); i risultati del presente lavoro si sono mostrati più elevati anche rispetto alle medie registrate nella provincia di Trento, dove la produzione giornaliera è stata di 23,62 kg/d con un 4,04% per il grasso e il 3,60% per la proteina (ANARB, 2013). Il valore medio del lattosio (4,76%) si è dimostrato invece in linea con il 5,02% trovato da De Marchi et al. (2008) nel latte della stessa razza del presente studio; questo è un risultato atteso in quanto il lattosio rappresenta l'elemento con minore variabilità nel latte; questo nutriente infatti è legato fortemente alla capacità di sintesi della mammella e al suo stato sanitario. Anche le cellule somatiche sono un indicatore della salute della mammella poiché tendono ad aumentare in presenza di patologie a livello mammario come la mastite: nell'Unione Europea il limite legale stabilito per il latte destinato alla caseificazione è di ≤ 400.000 cellule/ml (Salvadori del Prato, 2001) e il valore medio di SCS (2,98) da noi registrato, corrispondente a circa 98.623 cellule/ml, rientra abbondantemente nel range ammesso.

Passando al contenuto in frazioni proteiche, la razza bruna italiana è attualmente sottoposta a selezione con l'obiettivo di produrre animali longevi e di buona mole, caratterizzati da una costituzione robusta, una conformazione corretta, una buona fertilità e con attitudine alla produzione di latte ad elevato titolo di grasso e proteina (ANARB, 2015). Questa strategia spiega l'elevato contenuto di proteina di questi campioni (3,75%), che risulta essere superiore al latte di altre razze allevate nella provincia di Trento, come la frisona che ha raggiunto il 3,42% nel 2012 (ANAFI, 2015). Inoltre, tra gli obiettivi di selezione, viene perseguito quello di aumentare la frequenza allelica della variante B della κ -CN nella popolazione, una variante genetica a cui è associato l'aumento del contenuto della κ -CN stessa e della proteina totale nel latte nonché un miglioramento delle proprietà coagulative di

questo (Bonfatti et al. (2010a). Per questa prova è stata fatta l'analisi dettagliata del profilo proteico e le medie ottenute sono state 0,95%, 0,05%, 0,34%, 1,19%, 0,35%, 0,09% e 0,33% rispettivamente per le frazioni di α_{s1} -CN, α_{s1} -CN fosforilata, α_{s2} -CN, β -CN, κ -CN, α -LA, β -LG espresse in percentuale sul latte. Nello studio di Bonfatti et al. (2010b) le frazioni proteiche sono state analizzate nel latte di pezzata rossa: questi autori hanno osservato un contenuto maggiore di tutte le frazioni proteiche rispetto al presente studio (1,14%, 0,42%, 1,30%, 0,16%, 0,37%, 0,13%, 0,37% rispettivamente per α_{s1} -CN, α_{s2} -CN, β -CN, γ -CN, κ -CN, α -LA, β -LG espresse in percentuale sul latte). Tuttavia, in confronto gli autori dell'articolo citato non hanno considerato la frazione fosforilata della α_{s1} -CN, distinguendo invece la frazione della γ -CN da quella della β -CN, e hanno riscontrato una concentrazione di caseine piuttosto elevata rispetto al contenuto di proteina (3,39% vs 3,88%). Al contrario, nel presente lavoro il rapporto tra il contenuto in caseina (2,89% sul latte) e la proteina grezza (3,71% sul latte) è risultato di circa di 0,78, in linea con il valore di 0,80 indicato in bibliografia (Bobe et al., 1998; Bonfatti et al., 2008).

Tabella 1: Statistiche descrittive relative a giorni di lattazione, ordine di parto, produzione giornaliera di latte, caratteri qualitativi e contenuto proteico.

Variabile	N	Media	P5	P95
Giorni lattazione	1204	180	25	388
Ordine di parto	1267	2,5	1	5
Produzione di latte, kg/d	1246	24,37	12,30	37,90
Caratteri qualitativi latte				
Sostanza secca, %	1267	13,88	12,35	15,49
Grasso, %	1229	4,38	3,18	5,75
Proteina, %	1229	3,75	3,08	4,46
Caseina, %	1229	2,88	2,36	3,42
Lattosio, %	1229	4,76	4,34	5,07
SCS ¹ , U	1229	2,98	0,21	6,20
pH	1265	6,64	6,50	6,77
Contenuto proteico				
Proteina grezza, % Latte	1229	3,71	3,03	4,43
Caseina, % Latte	1229	2,89	2,38	3,44
α_{s1} -CN, % Latte	1229	0,95	0,76	1,18
α_{s1} -CN ph ² , % Latte	1227	0,05	0,02	0,10
α_{s2} -CN, % Latte	1229	0,34	0,25	0,44
β -CN, % Latte	1229	1,19	0,95	1,44
κ -CN, % Latte	1229	0,35	0,23	0,46
α -LA, % Latte	1229	0,09	0,06	0,12
β -LG, % Latte	1229	0,33	0,22	0,45

¹SCS: $3+\log_2(\text{SCC}/100)$.

² α_{s1} -CN ph: α_{s1} -CN fosforilata.

P5: 5° percentile; P95: 95° percentile.

In Tabella 2 sono indicate le statistiche descrittive relative ai parametri lattodinamografici, alla resa casearia e ai recuperi dei nutrienti nella cagliata.

Partendo dai parametri lattodinamografici, l'RCT tradizionale medio rilevato tramite Formagraph è risultato essere di 19,91 min, in confronto con i 20,78 min dell' RCT_{eq} stimato tramite modello: questo parametro risulta più elevato rispetto ai 14,1 min medi della razza frisona indicati da Bittante et al. (2012), per il fatto che nel presente lavoro sono compresi anche gli RCT ottenuti dai campioni che hanno presentato la gelazione dopo i 30 min di analisi. Il k_{20} e l' a_{30} del presente lavoro hanno raggiunto i rispettivi valori medi di 5,25 min e 27,98 mm, contro i 9,2 min e i 29,9 mm della razza sopra citata. Non c'è riscontro con i 32,94 mm dell' a_{45} indicati in Tabella 2, poiché tradizionalmente l'analisi lattodinamografica viene interrotta a 30 min. Nella review di Bittante, rispetto alla frisona, il valore medio degli studi citati per la razza bruna è stato inferiore dell'11% per l'RCT e del 34% per il k_{20} , mentre l' a_{30} è stato più elevato del 39%, mostrando quindi un'attitudine alla coagulazione migliore. Un altro motivo di possibile differenza tra i parametri indicati nel presente lavoro e in review è attribuibile alle diverse condizioni di analisi: infatti spesso ci si limita a confrontare il dato tal quale senza considerare le differenze in termini di condizioni di analisi: ad esempio il tipo e la concentrazione di caglio utilizzato, la temperatura di lavorazione, la strumentazione utilizzata e l'operatore rappresentano delle fonti di variazione importanti che vanno considerato quando si vogliono confrontare diversi lavori scientifici.

Nel presente lavoro, l'allungamento dell'analisi a 60 min ha permesso di identificare ulteriori caratteri per la descrizione del processo di coagulazione del latte: la consistenza massima del coagulo è stata in media di 37,22 mm ed è stata raggiunta ad un t_{max} medio di 41,65 min, più del doppio dell'RCT. L' RCT_{eq} stimato di 20,78 min nel presente lavoro è molto vicino a quello indicato a 21,4 min da Malchiodi et al. (2014). Nello stesso articolo il CF_p e il k_{CF} sono risultati di 50,4 mm e 12,6%/min, sempre molto simili ai 49,87 mm e 13,02%/min riscontrati nella presente tesi. Il k_{SR} invece non è presente nel lavoro citato poiché per la modellizzazione del tracciato lattodinamografico è stato utilizzato un modello matematico a 3 parametri ricavato da Bittante (2011). Da notare che il valore k_{SR} stimato nel presente lavoro è stato di molto inferiore a quello del k_{CF} , ovvero 1,24%/min contro 13,02%/min: questo è un risultato atteso in quanto nel caso della specie bovina, la forza espressa dal campione di latte nella fase di rassodamento è nettamente maggiore rispetto quella osservabile durante la sineresi. Tutti questi parametri sono in linea anche con quelli ottenuti da Bittante et al. (2013): l'RCT è risultato sempre inferiore rispetto alla stima dell' RCT_{eq} (18,6 min e 19,3 min), anche se con tempistiche anticipate rispetto al presente

lavoro (19,91 min e 20,78 min); il k_{20} invece è risultato più elevato del nostro, in quanto la velocità di rassodamento del coagulo è stata stimata del 12%/min, in confronto al 13,02%/min della presente tesi; anche per questo motivo il CF_{max} ha raggiunto i 34,9 mm a 40,5 min, in confronto alla consistenza massima del coagulo di 37,22 mm raggiunta a 41,65 min indicata in Tabella 2. Le piccole differenze del presente lavoro osservate per i parametri modellizzati possono essere dovute anche alle modifiche apportate alle modalità di calcolo degli stessi.

Per quanto riguarda le rese, il valore medio della $\%CY_{CURD}$ dopo l'estrazione dalla salamoia è stato di 15,04%, mentre la $\%CY_{SOLIDS}$ e la $\%CY_{WATER}$ sono state del 7,22% e 7,80%: entrambe rappresentano circa la metà della $\%CY_{CURD}$. In particolare, la $\%CY_{SOLIDS}$ è composta quasi esclusivamente da grasso e proteina (principalmente caseina) trattenuti nella cagliata; invece la $\%CY_{WATER}$ definisce la ritenzione idrica nella cagliata e quindi indirettamente la sua espulsione del siero, dando una visione della capacità di sineresi del latte processato. È possibile confrontare questi risultati con quelli ottenuti da Cipolat-Gotet et al. (2016) sul latte di pecora Sarda e di bufala utilizzando la stessa metodica di micro caseificazione: partendo dalla $\%CY_{CURD}$, le due specie hanno raggiunto i valori rispettivi di 20,6% e 25,6%, ben 5% e 10% in più della vacca per via del latte più ricco in nutrienti; sempre per questo motivo hanno ottenuto una $\%CY_{SOLIDS}$ rispettiva di 10,1% e 12,7%; la $\%CY_{WATER}$ ha contribuito in tutti i casi per la metà della $\%CY_{CURD}$ (10,6% e 12,9%).

Con le informazioni dello stesso articolo si possono paragonare anche i recuperi dei nutrienti nella cagliata (RECs) e le rese espresse sulla produzione di latte giornaliera (dCYs).

Partendo dai RECs, il latte di vacca è risultato in posizione intermedia tra le due specie per il $REC_{PROTEIN}$, con un valore di 78,07% rispetto al 76,7% della pecora e 80,4% della bufala. Invece il REC_{FAT} è stato di 89,87%, molto inferiore ai 94,0% e 95,1% della Sarda e della bufala. Questo di conseguenza ha influenzato il REC_{SOLIDS} e il REC_{ENERGY} che sono stati rispettivamente di 52,05% e 67,31% per la vacca da latte, di 60,5% e 73,8% per la pecora e 66,7% e 79,3% per la bufala.

Infine considerando le dCYs, la vacca da latte ha superato le altre due specie con i valori medi di 3,63 kg/d, 1,74 kg/d e 1,88 kg/d rispettivamente per dCY_{CURD} , dCY_{SOLIDS} e dCY_{WATER} grazie alla sua superiore produzione giornaliera di latte. Invece la Sarda ha ottenuto 0,41 kg/d, 0,20 kg/d e 0,21 kg/d con una produzione di 1,98 kg/d, mentre la bufala 1,92 kg/d, 0,96 kg/d e 0,97 kg/d con una produzione di 3,19 kg/d. quando vengono effettuati questi confronti va ricordato comunque i minori costi di produzione (in particolare l'alimentazione) che caratterizzano queste due specie considerate minori rispetto la vacca da latte.

Tabella 3: Statistiche descrittive relative a: parametri lattodinamografici, resa casearia e recuperi dei nutrienti.

Variabile	N	Media	P5	P95
Parametri lattodinamografici tradizionali				
RCT, min	1247	19,91	12,30	31,30
k ₂₀ , min	1207	5,25	2,45	10,30
a ₃₀ , mm	1253	27,98	0,00	44,94
a ₄₅ , mm	1255	32,94	18,37	46,18
Parametri lattodinamografici da modello				
RCT _{eq} , min	1246	20,78	12,97	32,35
k _{CF} , %/min	1253	13,02	6,30	19,82
k _{SR} , %/min	1253	1,24	0,52	1,98
CF _p , mm	1253	49,87	34,30	66,37
CF _{max} , mm	1253	37,22	25,60	49,53
t _{max} , min	1253	41,65	26,50	67,25
Resa casearia				
%CY _{CURD} , %	1253	15,04	12,04	18,25
%CY _{SOLIDS} , %	1243	7,22	5,77	8,80
%CY _{WATER} , %	1247	7,80	5,85	9,95
Recupero nutrienti				
REC _{PROTEIN} , %	1248	78,07	73,99	81,88
REC _{FAT} , %	1236	89,87	82,61	94,48
REC _{SOLIDS} , %	1250	52,05	46,09	58,07
REC _{ENERGY} , %	1238	67,31	61,78	72,55
Resa casearia giornaliera				
dCY _{CURD} , kg/d	1234	3,63	1,80	5,73
dCY _{SOLIDS} , kg/d	1225	1,74	0,87	2,72
dCY _{WATER} , kg/d	1227	1,88	0,92	3,04

P5: 5° percentile; P95: 95° percentile.

In Tabella 3 sono presenti i risultati dell'ANOVA: con l'analisi della varianza si è potuto constatare che gli effetti non obiettivo di studio legati all'azienda e legati all'animale hanno avuto una certa rilevanza su molti dei caratteri testati.

La tipologia aziendale ha influito in modo significativo soprattutto sui caratteri che esprimono la resa casearia ed il recupero di nutrienti nella cagliata: in particolare questo fattore ha influenzato i caratteri legati alla produzione giornaliera di formaggio (dCYs); questo risultato è la conseguenza della significatività dell'effetto per la resa in percentuale della sostanza secca (%CY_{SOLIDS}) e al suo recupero (REC_{SOLIDS}) nella cagliata; quest'ultimo carattere ha determinato differenze anche per il REC_{ENERGY}. L'effetto del singolo allevamento invece è stato espresso come percentuale della varianza dei caratteri spiegata dal medesimo, evidenziando un'importante influenza nei confronti della resa casearia classica e della ritenzione in acqua (rispettivamente 35% e 46%). Per quanto riguarda le dCYs, l'allevamento ha avuto un'elevata importanza su tutti e tre i caratteri andando a spiegare più di 1/3 della loro variabilità, ma mantenendo un maggior peso sempre sulla ritenzione idrica della cagliata: il risultato è dato dal fatto che questi caratteri derivano dalla moltiplicazione della produzione giornaliera di latte con la resa specifica. Considerando l'effetto sui RECs, l'effetto azienda ha condizionato in particolar modo il recupero di grasso e proteina nella cagliata (30% per entrambi). Su tutti i caratteri relativi alla coagulazione, invece, questo fattore non ha dimostrato un effetto altrettanto eclatante (Tabella 3).

Tra gli effetti legati all'animale, lo stadio di lattazione è risultato rilevante per quasi tutti i caratteri considerati tranne che per il tasso di sineresi (k_{SR}), %CY_{SOLIDS}, REC_{SOLIDS} e REC_{ENERGY}. D'altra parte, l'ordine di parto ha invece influenzato solamente il tasso di rassodamento della cagliata (k_{CF}) e della sineresi (k_{SR}), t_{max} , %CY_{SOLIDS}, REC_{PROTEIN} e REC_{SOLIDS}. Anche questo fattore è risultato importante per la resa casearia espressa sulla produzione di latte giornaliera (dCYs): in questo caso il risultato è dovuto al forte effetto dell'ordine di parto nei confronti della produzione di latte.

Tabella 4: Risultati dell'analisi della varianza (ANOVA) relativi ai caratteri che definiscono l'attitudine casearia del latte.

Caratteri	Tipologia aziendale	Azienda ¹	Giorni lattazione	Ordine di parto	α_{s1} -CN	α_{s1} -CN ph ²	α_{s2} -CN	β -CN	κ -CN	α -LA	β -LG	Pozzetto	RMSE ³
Parametri lattodinamografici tradizionali													
RCT, min	0,84	13	14,08***	1,54	1,52	1,03	5,22***	1,52	2,31*	0,84	3,39**	1,25	4,90
k ₂₀ , min	0,70	4	11,70***	1,93	6,83***	1,19	0,79	0,86	26,60***	1,51	2,45*	4,87***	1,99
a ₃₀ , mm	0,80	8	9,76***	1,70	7,10***	0,40	3,97***	1,08	10,71***	1,16	3,87***	3,06***	11,05
a ₄₅ , mm	2,57*	10	3,80**	1,46	19,42***	0,73	2,87**	2,15*	9,27***	1,77	1,58	2,95***	7,04
Parametri lattodinamografici da modello													
RCT _{eq} , min	0,70	13	14,58***	1,52	1,58	1,28	4,94***	1,45	1,96	0,75	3,40**	1,07	4,95
k _{CF} , %/min	2,39	17	3,99**	8,42***	0,38	1,40	1,44	1,27	13,64***	1,03	1,34	9,98***	3,34
k _{SR} , %/min	2,85*	18	1,62	8,96***	0,25	1,53	1,63	0,97	10,20***	0,84	1,07	14,98***	0,37
CF _p , mm	1,33	19	6,41***	0,87	33,36***	0,73	1,12	2,44*	31,25***	1,89	3,82***	10,59***	6,50
CF _{max} , mm	1,33	19	6,41***	0,87	33,36***	0,73	1,12	2,44*	31,25***	1,89	3,82***	10,59***	4,85
t _{max} , min	1,41	12	8,44***	3,09*	1,36	1,14	3,31**	0,99	6,42***	1,01	2,98**	3,37***	10,72
Resa casearia													
%CY _{CURD} , %	1,59	35	2,89*	1,16	42,57***	7,36***	1,04	38,13***	18,65***	2,96**	12,92***	1,89*	0,99
%CY _{SOLIDS} , %	5,43***	18	0,63	3,04*	28,63***	5,26***	2,54*	16,27***	13,05***	1,05	4,99***	2,68***	0,61
%CY _{WATER} , %	0,42	46	3,72**	2,28	17,52***	3,46**	0,29	25,00***	10,43***	3,15**	9,05***	1,61	0,73
Recupero nutrienti													
REC _{PROTEIN} , %	1,18	30	4,37***	13,07***	27,44***	0,73	6,42***	10,25***	0,70	2,83**	52,95***	1,00	1,66
REC _{FAT} , %	1,98	30	13,22***	0,31	3,03**	1,40	0,41	1,97	19,14***	1,54	5,61***	1,30	2,71
REC _{SOLIDS} , %	5,44***	17	2,10	5,55***	21,56***	4,94***	1,34	8,68***	21,44***	0,67	7,97***	2,32**	2,41
REC _{ENERGY} , %	4,62**	19	1,79	1,57	17,72***	2,85**	2,39*	2,87**	16,49***	1,21	11,37***	2,20**	2,53
Resa casearia giornaliera													
dCY _{CURD} , kg/d	15,74***	38	24,34***	19,49***	6,54***	1,60	4,39***	1,51	0,53	3,52**	4,72***	1,16	0,72
dCY _{SOLIDS} , kg/d	19,63***	35	19,60***	24,41***	6,91***	1,78	4,79***	1,98	0,85	2,87**	3,77**	1,45	0,36
dCY _{WATER} , kg/d	11,15***	41	22,42***	13,64***	4,44***	1,13	3,85***	1,74	0,44	4,14***	4,82***	0,80	0,40

¹Azienda: percentuale (%) della varianza del carattere spiegata dall'effetto dell'allevamento campionato.

² α_{s1} -CN ph: α_{s1} -CN fosforilata.

³RMSE: Root means square error. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Grazie all'utilizzo dell'ANOVA, una volta corretti i dati da queste fonti di variabilità, si è potuto meglio quantificare l'effetto delle singole frazioni proteiche sui caratteri oggetto di studio.

I primi caratteri che sono stati analizzati in questa tesi sono quelli relativi alle proprietà coagulative del latte (MCP).

Partendo dai parametri lattodinamografici tradizionali, l'RCT è stato fortemente influenzato dalla α_{s2} -CN ($P < 0,001$) e dalla β -LG ($P < 0,01$); l'aumento in percentuale sul latte di queste frazioni proteiche ha determinato un rallentamento della coagulazione. Nel primo caso (α_{s2} -CN) l'RCT è risultato di 22,36 min per la classe con maggior contenuto della specifica frazione proteica, mentre per la β -LG, l'ultima classe ($\geq 0,42$) ha evidenziato una gelazione del latte pari a 21,71 min; abbiamo osservato un aumento lineare dell'RCT all'aumentare di queste due frazioni proteiche (Tabelle 6-10). Come atteso, l'aumento della κ -CN ($P < 0,05$) ha migliorato la velocità di gelazione mostrando l'RCT dell'ultima classe ($\geq 0,44$) delle LS-means pari a 18,31 min (Tabella 8), anche se in modo non lineare poiché le classi più estreme hanno presentato maggiori differenze rispetto a quelle intermedie, risultanti più ravvicinate tra loro in termini di tempo di gelazione del latte. Questi risultati sono sostenuti in parte da quanto trovato da Jõudu et al. (2008): secondo il loro studio i campioni il cui RCT ha superato i 30 min di analisi (classificati quindi come non coagulati) hanno presentato un contenuto di α_{s2} -CN superiore, a discapito della percentuale di κ -CN; non c'è stato però riscontro per l'effetto della β -LG, il cui contributo nel loro lavoro ha migliorato sia RCT che a_{30} . Va però sottolineato che nello studio citato il risultato è dovuto anche al fatto che le frazioni proteiche sono state espresse in percentuale sul totale della caseina, che ha determinato una maggiore relazione tra di loro. Invece l'effetto positivo della κ -CN è stato osservato anche da Wedholm et al. (2006; frazioni proteiche espresse sulla % del latte) e Bonfatti et al. (2010a; frazioni proteiche espresse sul contenuto totale di caseina) in quanto questa caseina rappresenta il principale fattore dell'aggregazione tra le micelle durante la coagulazione enzimatica rappresentando il substrato per la chimosina presente nel caglio; secondo questi studi, l'aumento del suo contenuto e della sua proporzione determina una superficie idrofila di contatto più ampia nelle micelle, quindi maggiori interazioni e probabilmente una maggiore facilità di gelazione del latte. In generale, invece, l'aumento della β -LG provoca un effetto inverso poiché comporta una riduzione delle concentrazioni relative delle caseine, con particolare riferimento alla κ -CN.

Sempre per lo stesso principio la κ -CN ($P < 0,001$) ha contribuito insieme alla α_{s1} -CN ($P < 0,001$) ad accorciare il k_{20} e ad influenzare positivamente l' a_{30} con un trend

sostanzialmente lineare (Tabelle 4-8). Questo è stato osservato in numerosi studi (Marziali & Ng-Kwai-Hang, 1986a; Politis & Ng-Kwai-Hang, 1988; Auld et al., 2004), in cui il maggior contenuto di entrambe le caseine ha aumentato la consistenza del coagulo, mentre un basso rapporto della κ -CN sulle altre caseine ha determinato un coagulo più debole; tuttavia negli stessi studi non sono stati riscontrati effetti significativi anche sull'RCT da parte della κ -CN; invece i due articoli precedentemente citati (Wedholm et al., 2006; Bonfatti et al., 2010a) sostengono che sia proprio l'accorciamento dei tempi di gelazione a conferire al coagulo più tempo per aumentare la sua consistenza entro i 30 min di analisi (Figura 10): questi due caratteri (RCT, min; a_{30} , mm) sono infatti in stretta relazione negativa tra di loro (Bittante et al., 2012). Oltre a questo, secondo altri studi (Niki et al., 1994; Walsh et al., 1998; Risso et al., 2007; Frederiksen et al., 2011) il contenuto di κ -CN risulta essere inversamente proporzionale alla dimensione delle micelle caseiniche: infatti all'aumentare del contributo di questa caseina aumenta anche la proporzione di micelle con diametro più piccolo, cosa che favorisce la loro coesione durante la coagulazione e riduce le perdite di nutrienti nel siero.

La α_{s2} -CN ($P < 0,001$) è risultata rilevante anche per l' a_{30} per la stretta relazione del carattere con RCT: in particolare l'aumento di questa frazione proteica ha mostrato un peggioramento lineare della consistenza del coagulo a 30 min. Questo effetto è stato riscontrato anche con l'aumento della concentrazione di β -LG ($P < 0,001$) per la conseguente riduzione del contenuto in caseina del latte e l'aumento delle proteine nel siero. Secondo Jõudu et al. (2008) l'aumento della α_{s2} -CN abbassa eccessivamente il rapporto κ -CN: α_s -CN (espresso sul contenuto totale di caseina).

A 45 minuti dall'inizio dell'analisi lattodinamografica svolta nel presente lavoro, la consistenza del coagulo è risultata influenzata negativamente solo dalla α_{s2} -CN ($P < 0,01$), mentre positivamente dalla β -CN ($P < 0,05$), dalla α_{s1} -CN e dalla κ -CN ($P < 0,001$). Il trend di questi effetti è stato essenzialmente lineare, tranne per quello della α_{s1} -CN che ha evidenziato andamento pressoché quadratico (Tabelle 4-6-7-8). Questo è l'unico caso in cui la β -CN è risultata significativa per i parametri tradizionali in questo studio, mentre in bibliografia l'effetto di questa frazione sulla coagulazione del latte riduce i tempi di rassodamento e aumenta la consistenza del coagulo (Marziali & Ng-Kwai-Hang, 1986a; Politis & Ng-Kwai-Hang, 1988; Auld et al., 2004; Bonfatti et al., 2010a).

Passando ai caratteri ottenuti dal modello matematico (Bittante et al., 2013), l'utilizzo di tale modello ha migliorato di molto la comprensione delle dinamiche di coagulazione del latte, evidenziando ulteriormente gli effetti delle singole frazioni proteiche in questo processo. Nelle Figure 6-12 sono rappresentate le curve di coagulazione ottenute per le LS-means di

ogni singola frazione proteica. Partendo dalle tempistiche di coagulazione, l' RCT_{eq} , che da un punto di vista biologico esprime lo stesso significato dell' RCT tradizionale ma presenta una migliore ripetibilità, ha subito la stessa influenza della α_{s2} -CN ($P < 0,001$) e della β -LG ($P < 0,01$) mentre non si è visto alcun effetto significativo da parte della κ -CN: va detto che comunque, anche in questo caso come per l' RCT tradizionale, le maggiori differenze tra le classi di κ -CN si sono osservate per le classi estreme.

Se per l' RCT_{eq} questa frazione non è risultata significativa, per tutti gli altri parametri derivanti dal modello matematico utilizzato, sono risultati influenzati significativamente. Infatti, all'accrescere di questa frazione proteica, il k_{CF} e il k_{SR} sono aumentati in modo significativo e con trend lineare ($P < 0,001$): come si può osservare in Figura 10, la pendenza della curva lattodinamografica aumenta all'incremento del contenuto di questa caseina nel latte, denotando una differenza della velocità di rassodamento del coagulo tra la prima e l'ultima classe di +5,32%/min e una conseguente riduzione del k_{20} ; dopo il raggiungimento della consistenza massima del coagulo la curva lattodinamografica si inverte per la sineresi, la cui velocità risente sempre positivamente della concentrazione di κ -CN (differenza di +0,51%/min tra la prima e l'ultima classe di κ -CN; Tabella 8). Ciò sottolinea l'importanza di questa frazione proteica durante tutte le fasi del processo di coagulazione, con particolare riferimento alla fase di rassodamento e sineresi.

Il CF_p ed il CF_{max} sono stati favoriti principalmente da α_{s1} -CN ($P < 0,001$), κ -CN ($P < 0,001$) e parzialmente dalla β -CN ($P < 0,05$). L'effetto favorevole della α_{s1} -CN e della β -CN sulla consistenza è imputabile al semplice fatto che rappresentano le principali frazioni proteiche del latte vaccino: come si può vedere dalle Figure 6-9, le curve delle diverse classi di caseina hanno presentato un andamento molto simile tra loro in termini di gelazione del latte, ma proseguendo con la fase di rassodamento diversa del coagulo fino a consistenze dissimili. Tuttavia si può notare un effetto maggiore da parte della α_{s1} -CN: infatti questa caseina ha evidenziato un trend quadratico con valori di 42,05 mm per CF_{max} e di 56,3 mm per CF_p nel caso dell'ultima classe delle medie corrette per l'effetto (Tabella 4 e Figura 6); la β -CN, invece, ha mostrato sempre nell'ultima classe i 38,13 mm e i 51,09 mm rispettivamente per questi due caratteri di consistenza (Tabella 7 e Figura 9). Al contrario, l'aumento dei livelli di β -LG ($P < 0,001$) ha determinato una maggiore perdita di proteine nel siero ($REC_{PROTEIN}$) e quindi un coagulo via via meno consistente all'aumentare di questa frazione proteica (differenze tra la prima e l'ultima classe di β -LG: -2,32 mm per CF_{max} e -3,1 mm per CF_p), cosa che naturalmente ha influito negativamente anche sul t_{max} (differenze tra la prima e l'ultima classe di β -LG +6,94 min) (Tabella 10 e Figura 12). Su quest'ultimo carattere ha

avuto un impatto negativo anche l'aumento di α_{s2} -CN ($P < 0,01$): questo aspetto riflette la riduzione dell' a_{30} come una conseguenza dell'allungamento delle tempistiche di coagulazione che riserva meno tempo alla fase di rassodamento nei 30 min di analisi, come è evidente in Figura 8. Per questi caratteri legati alla lattodinamografia non sono risultate significative le variazioni di concentrazione della α_{s1} -CN fosforilata e della α -LA; infatti non si denotano sostanziali differenze tra le curve delle diverse classi delle due proteine (Figure 7-11).

Per quanto riguarda la resa casearia (%CY), questo carattere è un importante indice di profitto per l'industria casearia ed è fortemente influenzato dal contenuto proteico e lipidico del latte, che rappresentano la materia utile del latte (Lucey & Kelly, 1994; Verdier-Metz et al., 2001; Pretto et al., 2012). Un recente studio riporta che esiste una correlazione positiva tra %CY e a_{30} (Pretto et al., 2012). Ciò è confermato anche dai presenti risultati: infatti le frazioni proteiche che hanno influito positivamente sulla coagulazione del latte hanno migliorato anche la resa.

Innanzitutto, la κ -CN ($P < 0,001$) riducendo le tempistiche di coagulazione ha dato più tempo alla cagliata di rassodarsi e trattenere i nutrienti nella struttura caseinica fino a circa un 1,79% in più di %CY_{CURD} (differenza tra la prima e l'ultima classe di κ -CN; Tabella 8). L'effetto della κ -CN è stato evidenziato anche da altri autori come Wedholm et al. (2006), dove l'aumento della sua concentrazione e della sua proporzione rispetto alle altre caseine ha migliorato le proprietà coagulative del latte e quindi la resa in cagliata.

Nello stesso studio citato, anche α_{s1} -CN e la β -CN hanno contribuito ad aumentare la resa in cagliata e soprattutto il suo contenuto in sostanza secca, cosa che è stata riscontrata anche nella presente prova con qualche eccezione. Infatti la α_{s1} -CN e la β -CN ($P < 0,001$) hanno influito positivamente sulle 3 rese in quanto maggiori costituenti della frazione caseinica del latte bovino: tuttavia la α_{s1} -CN ha evidenziato una differenza del 3,11% per la %CY_{CURD} tra le due classi estreme del fattore, con un contributo poco più accentuato nella crescita della %CY_{SOLIDS} rispetto alla %CY_{WATER} (+1,54% vs +1,39% differenze tra le due classi estreme del fattore inserito nell'ANOVA; Tabella 4); la β -CN ha mostrato una differenza del 2,38% tra le due classi estreme delle LS-means per la %CY_{CURD} principalmente grazie ad una maggiore ritenzione idrica (+0,9% vs +1,51% rispettivamente per %CY_{SOLIDS} e %CY_{WATER}; Tabella 7). Con entrambe le frazioni proteiche la crescita delle %CYs ha avuto un trend lineare. Questo contrasta in parte anche con quanto visto da Marziali & Ng-Kwai-Hang (1986b), i quali hanno osservato un beneficio per la resa in cagliata con l'aumento del contenuto di entrambe le frazioni, ma con un maggior impatto per la β -CN.

Oltre a queste, anche la α_{s1} -CN fosforilata ha aumentato tutte le rese, ma con un contributo molto limitato data la ridotta presenza di questa frazione (+0,80% di %CY_{CURD} dato da un +0,29% di %CY_{SOLIDS} e da un +0,47% di %CY_{WATER} tra le due classi estreme delle medie corrette per l'effetto); anche in questo caso il trend di crescita delle rese è stato lineare (Tabella 5).

Al contrario, la α_{s2} -CN è risultata non significativa o con un lieve effetto negativo ($P < 0,05$) per la resa della sostanza secca nella cagliata: questo può essere ricollegato a quanto visto in precedenza con le MCP, dove un eccesso di questa frazione ha allungato le tempistiche di gelazione dando luogo a coaguli meno consistenti e a cagliate più soffici. Non ci sono conferme di ciò in bibliografia poiché questa frazione spesso viene calcolata insieme alla α_{s1} -CN oppure non è considerata affatto.

Come atteso, completamente opposto è stato l'effetto della concentrazione crescente di β -LG ($P < 0,001$) sulle %CYs, che ha aumentato la frazione proteica del siero, mentre la α -LA ($P < 0,01$) ha determinato un aumento della resa in formaggio fresco (+0,49% differenze tra le due classi estreme di LS-means per l'effetto) favorendo la ritenzione idrica nella cagliata (Tabella 9). Questo va sempre in parte a contrastare con quanto trovato da Marziali & Ng-Kwai-Hang (1986b), dove i livelli crescenti delle due sieroproteine sono risultati entrambi favorevoli alla resa in cagliata. D'altro canto, secondo Wedholm et al. (2006) l'aumento della β -LG B può essere vantaggioso per la resa in quanto a questa variante genetica corrisponde un aumento del contenuto caseinico del latte e una minore percentuale della β -LG stessa.

Considerando questi caratteri espressi sulla produzione di formaggio giornaliera (dCY_{CURD}, dCY_{SOLIDS}, dCY_{WATER}) si nota che la α_{s1} -CN e la β -LG hanno mantenuto una elevata significatività per tutti e tre i caratteri ($P < 0,001$) con lo stesso trend di variazione visto per le %CYs (crescita lineare dei tre parametri con l'aumento della percentuale di α_{s1} -CN e abbassamento lineare nel caso della β -LG; Tabelle 4-10). Invece la frazione fosforilata della α_{s1} -CN non ha mostrato un effetto significativo come per le %CYs, indicando che la sua variazione di concentrazione non influenza la produzione giornaliera di latte. La stessa cosa è stata vista per la β -CN e la κ -CN. Al contrario la α_{s2} -CN, che per le %CYs è risultata non significativa o con un lieve effetto negativo, ha mostrato un effetto altamente significativo per le dCYs: tutte le rese giornaliere si sono ridotte con trend lineare all'aumentare di questa caseina (Tabella 6). Come per i RECs, anche per questi caratteri non è semplice fare un confronto effettivo con i risultati dei lavori in bibliografia, poiché non sono presenti degli studi che abbiano campionato un numero elevato di bovine effettuando la caseificazione a livello di singolo animale.

Passando ai RECs, caratteri legati al recupero delle diverse componenti nella cagliata, il passaggio della proteina dal latte alla cagliata è stato influenzato positivamente dalla α_{s1} -CN e dalla β -CN ($P < 0,001$), in quanto principali costituenti della frazione caseinica: più precisamente l'aumento con trend lineare della α_{s1} -CN ha permesso un recupero superiore di +4,13% della classe maggiore rispetto a quella minore di questa frazione proteica, il doppio rispetto al +2,01% della β -CN, confermando quindi quanto visto per le %CYs (Tabelle 4-7). La ritenzione dei lipidi invece è stata molto condizionata dalla κ -CN ($P < 0,001$) e parzialmente dalla α_{s1} -CN ($P < 0,01$): il REC_{FAT} ha evidenziato una differenza del +4,90% tra le due classi estreme di κ -CN (Tabella 8) e del +1,98% per effetto della α_{s1} -CN (Tabella 4). Per il REC_{SOLIDS} e il REC_{ENERGY}, la α_{s1} -CN, la α_{s1} -CN fosforilata, la β -CN e la κ -CN sono risultate tutte molto significative; tuttavia per il recupero dell'energia hanno contribuito maggiormente la α_{s1} -CN e la κ -CN grazie al loro effetto positivo sul REC_{FAT}.

Al contrario, in tutti e quattro i RECs l'effetto della β -LG è stato fortemente negativo ($P < 0,001$) in quanto l'aumento di questa frazione determina una quota superiore di proteina nel siero: infatti la riduzione del REC_{PROTEIN} (-5,81% tra le due classi estreme della frazione proteica) provoca la formazione di un coagulo meno strutturato, il quale trattiene meno nutrienti come il grasso (-2,6% di differenza per il REC_{FAT} tra le due classi estreme della frazione proteica); di conseguenza vengono sfavoriti anche il REC_{SOLIDS} e il REC_{ENERGY} (Tabella 9). L'effetto della β -LG è accompagnato anche da quello della α_{s2} -CN per il carattere REC_{ENERGY} ($P < 0,05$) e soprattutto per REC_{PROTEIN} ($P < 0,001$): infatti si è vista una perdita con trend lineare rispettivamente di -1,41% per il recupero di energia nella cagliata e di -2,04% per il recupero di proteina tra le due classi estreme di questa caseina (Tabella 6).

Tabella 5: Effetto dei livelli crescenti di α_{s1} -CN (LSM e P-values dei contrasti) sui caratteri che definiscono l'attitudine casearia del latte.

Caratteri	α_{s1} -CN							Contrasti, <i>P</i> -value		
	$\leq 0,79$	0,79-0,86	0,86-0,92	0,92-0,99	0,99-1,05	1,05-1,12	$\geq 1,12$	Lineare	Quadratico	Cubico
Parametri lattodinamografici tradizionali										
RCT, min	20,43	20,67	19,61	20,46	19,37	19,46	19,11	1,86	0,04	0,02
k ₂₀ , min	6,67	5,99	5,61	5,22	4,81	4,67	4,39	36,81 ^{***}	2,13	0
a ₃₀ , mm	20,77	24,02	27,44	27,14	30,89	30,68	33,18	30,78 ^{***}	2,84	0,05
a ₄₅ , mm	24,48	28,43	32,04	32,98	34,96	35,89	38,68	91,19 ^{***}	12,73 ^{***}	0,9
Parametri lattodinamografici da modello										
RCT _{eq} , min	21,15	21,60	20,47	21,29	20,18	20,35	19,91	1,62	0,09	0,21
k _{CF} , %/min	13,11	13,18	13,44	13,13	13,55	13,44	13,24	0,37	0,01	0,01
k _{SR} , %/min	1,27	1,27	1,29	1,25	1,28	1,27	1,23	0	0,03	0,05
CF _p , mm	39,44	44,20	48,25	49,90	53,07	54,43	56,35	178,68 ^{***}	13,19 ^{***}	0,7
CF _{max} , mm	29,43	32,98	36,00	37,24	39,60	40,62	42,05	178,68 ^{***}	13,19 ^{***}	0,7
t _{max} , min	42,86	42,72	40,60	42,38	40,34	40,67	39,37	1,72	0,08	0,01
Resa casearia										
%CY _{CURD} , %	13,63	14,12	14,82	15,23	15,70	16,01	16,74	198,46 ^{***}	4,22 [*]	0,56
%CY _{SOLIDS} , %	6,61	6,83	7,17	7,26	7,51	7,74	8,15	115,76 ^{***}	0,32	0,61
%CY _{WATER} , %	7,12	7,30	7,68	7,91	8,17	8,17	8,51	79,34 ^{***}	4,23 [*]	4,48 [*]
Recupero nutrienti										
REC _{PROTEIN} , %	75,68	76,45	77,35	77,93	78,49	79,21	79,81	142,99 ^{***}	1,2	0,33
REC _{FAT} , %	88,55	88,92	89,50	89,30	89,85	90,38	90,53	12,23 ^{***}	0,09	1,23
REC _{SOLIDS} , %	49,90	50,64	51,84	52,11	52,97	53,78	55,14	87,28 ^{***}	0,23	0,56
REC _{ENERGY} , %	65,03	65,96	67,05	67,27	67,99	68,95	70,22	71,53 ^{***}	0,34	2,36
Resa casearia giornaliera										
dCY _{CURD} , kg/d	3,27	3,34	3,65	3,64	3,72	4,00	3,97	29,2 ^{***}	0,05	1,62
dCY _{SOLIDS} , kg/d	1,57	1,61	1,77	1,73	1,79	1,93	1,94	26,89 ^{***}	0,13	3,04
dCY _{WATER} , kg/d	1,73	1,74	1,89	1,89	1,92	2,04	2,03	18,68 ^{***}	0,05	0,44

*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$.

Tabella 6: Effetto dei livelli crescenti di α_{s1} -CN fosforilata (LSM e P-values dei contrasti) sui caratteri che definiscono l'attitudine casearia del latte.

Caratteri	α_{s1} -CN fosforilata							Contrasti, P-value		
	$\leq 0,024$	0,024-0,036	0,036-0,048	0,048-0,060	0,060-0,072	0,072-0,084	$\geq 0,084$	Lineare	Quadratico	Cubico
Parametri lattodinamografici tradizionali										
RCT, min	19,77	20,27	19,45	20,36	20,22	19,55	19,49	0,01	0,58	0,63
k ₂₀ , min	5,58	5,47	5,32	5,51	5,44	5,10	4,95	1,71	0,23	1,64
a ₃₀ , mm	28,42	27,10	28,09	26,90	27,51	27,78	28,32	0,1	0,49	0,01
a ₄₅ , mm	31,82	32,08	31,76	32,48	32,80	32,95	33,56	1,74	0,11	0,08
Parametri lattodinamografici da modello										
RCT _{eq} , min	20,52	21,28	20,35	21,23	21,09	20,26	20,21	0,05	1,28	0,4
k _{CF} , %/min	13,79	13,25	13,53	12,86	12,97	13,07	13,63	2,57	0,77	0,08
k _{SR} , %/min	1,32	1,26	1,30	1,22	1,23	1,23	1,29	3,07	0,45	0,04
CF _p , mm	48,65	48,54	49,33	49,23	49,41	50,20	50,26	2,7	0,13	0,08
CF _{max} , mm	36,31	36,22	36,82	36,74	36,87	37,46	37,50	2,7	0,13	0,08
t _{max} , min	40,76	41,42	40,47	42,70	42,28	40,95	40,35	0,34	0,75	1,35
Resa casearia										
%CY _{CURD} , %	14,83	14,82	15,06	14,98	15,39	15,55	15,63	27***	3,18	0,01
%CY _{SOLIDS} , %	7,16	7,17	7,29	7,24	7,51	7,47	7,45	18,3***	0,42	0,65
%CY _{WATER} , %	7,68	7,62	7,77	7,79	7,83	8,02	8,15	9,37**	1,76	0,02
Recupero nutrienti										
REC _{PROTEIN} , %	77,94	77,75	77,97	77,84	78,01	77,71	77,70	0,08	0,26	1,66
REC _{FAT} , %	89,01	89,42	89,47	89,40	89,63	90,21	89,89	5,74*	0,43	2,43
REC _{SOLIDS} , %	51,67	51,73	52,30	51,95	52,95	52,91	52,87	17,12***	0,36	0,13
REC _{ENERGY} , %	66,96	67,01	67,52	67,23	67,97	68,11	67,69	11,36***	0,39	0
Resa casearia giornaliera										
dCY _{CURD} , kg/d	3,55	3,58	3,59	3,59	3,76	3,67	3,84	2,35	0	0,57
dCY _{SOLIDS} , kg/d	1,72	1,74	1,75	1,73	1,84	1,76	1,82	1,65	0,16	1,22
dCY _{WATER} , kg/d	1,85	1,85	1,86	1,88	1,92	1,88	2,00	1,02	0,03	0,69

*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$.

Tabella 7: Effetto dei livelli crescenti di α_{s2} -CN (LSM e P-values dei contrasti) sui caratteri che definiscono l'attitudine casearia del latte.

Caratteri	α_{s2} -CN							Contrasti, P-value		
	$\leq 0,27$	0,27-0,30	0,30-0,33	0,33-0,36	0,36-0,39	0,39-0,42	$\geq 0,42$	Lineare	Quadratico	Cubico
Parametri lattodinamografici tradizionali										
RCT, min	18,03	18,57	18,72	20,18	20,01	21,24	22,36	14,71 ^{***}	0,27	0
k ₂₀ , min	5,08	5,18	5,31	5,36	5,20	5,55	5,69	1,3	0	0,83
a ₃₀ , mm	30,96	30,37	30,02	27,39	27,22	25,31	22,85	10,53 ^{**}	0,4	0,12
a ₄₅ , mm	33,54	33,08	33,26	31,36	32,22	33,46	30,53	0,37	3,6	2,82
Parametri lattodinamografici da modello										
RCT _{eq} , min	18,89	19,35	19,65	20,94	20,79	22,17	23,15	14,53 ^{***}	0,43	0,04
k _{CF} , %/min	13,94	13,82	13,61	13,24	13,35	12,71	12,42	4,03 [*]	0,22	0,14
k _{SR} , %/min	1,36	1,33	1,30	1,25	1,26	1,20	1,16	5,57 [*]	0	0,14
CF _p , mm	50,47	50,22	50,08	48,77	49,13	48,81	48,14	2,76	0,09	0,39
CF _{max} , mm	37,66	37,48	37,37	36,40	36,67	36,43	35,93	2,76	0,09	0,39
t _{max} , min	38,66	38,64	39,69	41,67	41,22	43,21	45,84	6,88 ^{**}	0,2	0,07
Resa casearia										
%CY _{CURD} , %	15,38	15,22	15,12	15,11	15,04	15,22	15,16	1,23	4,64 [*]	0,15
%CY _{SOLIDS} , %	7,56	7,35	7,31	7,27	7,19	7,29	7,32	6,62 [*]	7,72 ^{**}	0,02
%CY _{WATER} , %	7,80	7,81	7,80	7,86	7,86	7,92	7,83	0,76	0,23	0
Recupero nutrienti										
REC _{PROTEIN} , %	78,92	78,28	77,97	77,78	77,76	77,33	76,88	22,33 ^{***}	2,35	3,66
REC _{FAT} , %	89,64	89,59	89,57	89,80	89,37	89,43	89,62	0,19	0,21	0,02
REC _{SOLIDS} , %	52,72	52,27	52,24	52,17	51,94	52,44	52,60	0,75	3,77	0,21
REC _{ENERGY} , %	68,51	67,90	67,59	67,45	66,92	67,02	67,10	11,97 ^{***}	1,52	0
Resa casearia giornaliera										
dCY _{CURD} , kg/d	3,93	3,81	3,76	3,75	3,56	3,50	3,28	10,06 ^{**}	0,18	0,23
dCY _{SOLIDS} , kg/d	1,93	1,83	1,81	1,81	1,70	1,67	1,59	14,89 ^{***}	0	1,2
dCY _{WATER} , kg/d	1,99	1,95	1,94	1,96	1,86	1,83	1,70	4,49 [*]	0,9	0,21

*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$.

Tabella 8: Effetto dei livelli crescenti di β -CN (LSM e P-values dei contrasti) sui caratteri che definiscono l'attitudine casearia del latte.

Caratteri	β -CN							Contrasti, <i>P</i> -value		
	$\leq 1,00$	1,00-1,08	1,08-1,15	1,15-1,23	1,23-1,31	1,31-1,38	$\geq 1,38$	Lineare	Quadratico	Cubico
Parametri lattodinamografici tradizionali										
RCT, min	20,97	20,00	19,28	20,12	20,05	19,31	19,39	2,06	0,85	4,74*
k ₂₀ , min	5,66	5,61	5,33	5,34	5,27	5,00	5,16	4,2*	0,02	0,2
a ₃₀ , mm	25,52	27,40	28,83	27,22	27,77	28,85	28,53	2,01	0,67	2,74
a ₄₅ , mm	30,79	31,49	32,63	33,65	32,59	33,72	32,58	6,71**	1,32	0,14
Parametri lattodinamografici da modello										
RCT _{eq} , min	21,74	20,93	20,10	20,92	20,94	20,11	20,21	1,99	0,63	4,14*
k _{CF} , %/min	13,18	13,41	13,87	13,14	12,92	13,34	13,23	0,15	0,4	3,57
k _{SR} , %/min	1,26	1,28	1,33	1,26	1,23	1,26	1,24	0,3	0,67	1,84
CF _p , mm	47,36	48,13	48,90	49,81	49,51	50,82	51,09	10,62**	0,09	0,29
CF _{max} , mm	35,34	35,92	36,49	37,17	36,95	37,92	38,13	10,62**	0,09	0,29
t _{max} , min	41,51	40,71	39,64	41,51	42,26	41,10	42,20	0,16	0,38	2,86
Resa casearia										
%CY _{CURD} , %	14,03	14,36	14,80	15,18	15,43	16,03	16,41	163,77***	0,47	0,72
%CY _{SOLIDS} , %	6,95	6,96	7,18	7,31	7,43	7,61	7,85	55,27***	0,79	0,42
%CY _{WATER} , %	7,06	7,42	7,61	7,87	7,98	8,36	8,57	112,77***	0,1	3,56
Recupero nutrienti										
REC _{PROTEIN} , %	76,83	77,04	77,61	77,87	78,17	78,56	78,84	46,97***	0,01	0,02
REC _{FAT} , %	89,98	90,18	89,90	89,47	89,48	89,23	88,78	4,56*	0,22	0,85
REC _{SOLIDS} , %	51,31	51,26	51,88	52,36	52,62	53,15	53,82	29,05***	0,54	0,68
REC _{ENERGY} , %	67,11	66,80	67,21	67,53	67,53	67,88	68,42	5,5*	0,61	0,81
Resa casearia giornaliera										
dCY _{CURD} , kg/d	3,64	3,67	3,74	3,71	3,60	3,72	3,49	0,04	0,19	1,67
dCY _{SOLIDS} , kg/d	1,83	1,78	1,82	1,78	1,73	1,77	1,65	1,45	0,05	0,11
dCY _{WATER} , kg/d	1,83	1,90	1,93	1,93	1,86	1,96	1,83	1,49	0,63	4*

*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$.

Tabella 9: Effetto dei livelli crescenti di κ -CN (LSM e P-values dei contrasti) sui caratteri che definiscono l'attitudine casearia del latte.

Caratteri	κ -CN							Contrasti, <i>P</i> -value		
	$\leq 0,26$	0,26-0,30	0,30-0,33	0,33-0,37	0,37-0,41	0,41-0,44	$\geq 0,44$	Lineare	Quadratico	Cubico
Parametri lattodinamografici tradizionali										
RCT, min	21,35	20,10	19,97	19,67	20,11	19,59	18,31	3,65	2,06	1,85
k ₂₀ , min	7,56	6,36	5,38	4,99	4,75	4,56	3,77	111,15***	21,67***	0,89
a ₃₀ , mm	20,34	24,35	26,81	28,25	29,42	29,97	34,97	37,9***	5,83*	0,3
a ₄₅ , mm	28,09	30,46	31,70	32,79	33,60	34,08	36,74	35,91***	3,54	0,2
Parametri lattodinamografici da modello										
RCT _{eq} , min	21,99	21,13	20,75	20,54	20,97	20,40	19,16	3,24***	1,23	1,1
k _{CF} , %/min	10,65	12,32	13,00	13,35	13,52	14,27	15,97	45,76***	5,46*	4,7*
k _{SR} , %/min	1,01	1,18	1,24	1,28	1,28	1,35	1,52	31,65***	5,36*	3,89*
CF _p , mm	41,78	45,41	48,20	49,66	51,50	52,99	56,08	142,65***	6,87**	1,03
CF _{max} , mm	31,18	33,89	35,97	37,06	38,44	39,54	41,85	142,65***	6,87**	1,03
t _{max} , min	47,07	42,77	41,76	41,07	41,36	39,39	35,50	17,55***	3,44	4,46*
Resa casearia										
%CY _{CURD} , %	14,27	14,73	15,07	15,16	15,34	15,63	16,06	78,83***	3,19	3,4
%CY _{SOLIDS} , %	6,86	7,13	7,24	7,34	7,46	7,49	7,76	50,59***	4,7*	0,4
%CY _{WATER} , %	7,37	7,56	7,81	7,86	7,85	8,09	8,34	38,01***	1,62	2,75
Recupero nutrienti										
REC _{PROTEIN} , %	77,69	77,59	77,82	77,83	77,98	77,95	78,06	2,29	0	0,59
REC _{FAT} , %	86,90	88,66	89,04	89,56	90,35	90,72	91,80	82,2***	5,01*	2,68
REC _{SOLIDS} , %	49,87	51,56	51,94	52,47	53,11	53,15	54,27	84,18***	12,28***	1,56
REC _{ENERGY} , %	65,34	66,56	67,05	67,55	68,31	68,24	69,44	64,58***	5,83*	0,01
Resa casearia giornaliera										
dCY _{CURD} , kg/d	3,54	3,67	3,69	3,65	3,69	3,65	3,69	0,58	1,59	0,42
dCY _{SOLIDS} , kg/d	1,70	1,78	1,78	1,77	1,80	1,75	1,77	0,59	3,03	0,1
dCY _{WATER} , kg/d	1,83	1,87	1,91	1,90	1,90	1,91	1,92	1,13	0,82	0,32

*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$.

Tabella 10: Effetto dei livelli crescenti di α -LA (LSM e P-values dei contrasti) sui caratteri che definiscono l'attitudine casearia del latte.

Caratteri	α -LA							Contrasti, P-value		
	$\leq 0,063$	0,063-0,073	0,073-0,082	0,082-0,092	0,092-0,101	0,101-0,110	$\geq 0,110$	Lineare	Quadratico	Cubico
Parametri lattodinamografici tradizionali										
RCT, min	20,07	19,69	19,76	19,57	20,50	20,16	19,36	0,28	0,72	0,55
k ₂₀ , min	4,98	5,25	5,19	5,28	5,77	5,39	5,51	3,57	0,37	0,66
a ₃₀ , mm	28,25	28,91	28,38	28,07	25,92	26,34	28,25	2,86	0,65	0,94
a ₄₅ , mm	32,85	32,51	33,49	32,90	31,56	31,15	32,98	2,73	2,48	0
Parametri lattodinamografici da modello										
RCT _{eq} , min	20,84	20,55	20,55	20,43	21,34	20,99	20,24	0,33	0,58	0,51
k _{CF} , %/min	13,76	13,86	13,24	13,38	12,97	12,79	13,09	4,26*	0,04	0,04
k _{SR} , %/min	1,30	1,31	1,25	1,28	1,25	1,21	1,26	2,48	0,12	0,09
CF _p , mm	50,16	49,02	49,93	49,77	48,19	48,45	50,10	2,54	0,26	0,07
CF _{max} , mm	37,43	36,58	37,26	37,14	35,96	36,16	37,39	2,54	0,26	0,07
t _{max} , min	40,81	40,28	40,93	40,54	42,69	42,76	40,93	2,22	0,92	0,19
Resa casearia										
%CY _{CURD} , %	15,01	15,04	14,93	15,19	15,32	15,27	15,50	4,57*	0,37	1,93
%CY _{SOLIDS} , %	7,29	7,33	7,25	7,29	7,32	7,34	7,47	0,2	0,36	0,06
%CY _{WATER} , %	7,71	7,67	7,69	7,86	8,04	7,94	7,95	8,55**	0,28	5,61*
Recupero nutrienti										
REC _{PROTEIN} , %	77,50	77,42	77,95	77,89	78,29	77,83	78,04	4,96*	2,51	4,29*
REC _{FAT} , %	89,02	89,38	89,29	89,73	89,41	89,97	90,25	3,06	0	0,7
REC _{SOLIDS} , %	52,25	52,42	52,12	52,26	52,23	52,37	52,73	0,01	0,21	0,24
REC _{ENERGY} , %	67,22	67,51	67,20	67,47	67,45	67,49	68,14	0,28	0	0,06
Resa casearia giornaliera										
dCY _{CURD} , kg/d	3,47	3,45	3,51	3,70	3,71	3,80	3,94	10,22**	0,31	1,05
dCY _{SOLIDS} , kg/d	1,68	1,67	1,71	1,78	1,77	1,83	1,91	7,04**	0,3	0,26
dCY _{WATER} , kg/d	1,78	1,76	1,80	1,92	1,95	1,99	2,03	14,32***	0,41	2,62

*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$.

Tabella 11: Effetto dei livelli crescenti di β -LG (LSM e P-values dei contrasti) sui caratteri che definiscono l'attitudine casearia del latte.

Caratteri	β -LG							Contrasti, <i>P</i> -value		
	$\leq 0,23$	0,23-0,27	0,27-0,31	0,31-0,34	0,34-0,38	0,38-0,42	$\geq 0,42$	Lineare	Quadratico	Cubico
Parametri lattodinamografici tradizionali										
RCT, min	18,75	18,89	19,79	19,76	19,15	21,05	21,71	4,87*	0,39	3,17
k ₂₀ , min	4,88	5,00	5,20	5,34	5,20	5,95	5,79	8,01**	0,96	2,25
a ₃₀ , mm	30,54	30,24	29,11	27,85	28,86	24,13	23,39	9,59**	1,93	1,96
a ₄₅ , mm	33,83	33,83	32,49	31,83	32,71	31,11	31,65	5,08*	0,02	0,15
Parametri lattodinamografici da modello										
RCT _{eq} , min	19,58	19,70	20,69	20,56	19,98	21,95	22,47	4,99*	0,45	3,51
k _{CF} , %/min	13,74	13,65	13,75	13,17	13,49	12,69	12,60	2,71	0,79	0,23
k _{SR} , %/min	1,28	1,29	1,31	1,24	1,29	1,21	1,24	1	0,93	0,01
CF _p , mm	51,48	51,01	49,93	48,94	49,35	46,54	48,38	16,64***	0,97	1,55
CF _{max} , mm	38,42	38,06	37,26	36,52	36,83	34,73	36,10	16,64***	0,97	1,55
t _{max} , min	38,48	39,35	40,36	41,88	40,11	43,33	45,42	5,42*	0	1,14
Resa casearia										
%CY _{CURD} , %	15,91	15,77	15,41	15,18	15,07	14,54	14,38	58,91***	1,03	0,8
%CY _{SOLIDS} , %	7,60	7,56	7,33	7,33	7,27	7,10	7,10	23,2***	0,01	0,39
%CY _{WATER} , %	8,25	8,18	8,03	7,80	7,83	7,44	7,33	34,92***	1,83	0,69
Recupero nutrienti										
REC _{PROTEIN} , %	80,90	79,56	78,51	77,68	77,05	76,14	75,09	260,23***	6,44*	2,43
REC _{FAT} , %	90,78	90,58	89,90	89,72	89,53	88,35	88,18	22,5***	1,42	1,69
REC _{SOLIDS} , %	53,92	53,36	52,57	52,25	52,04	51,24	51,01	40,76***	0,28	1,14
REC _{ENERGY} , %	69,53	68,83	67,66	67,39	67,08	66,17	65,83	56,62***	1,1	1,47
Resa casearia giornaliera										
dCY _{CURD} , kg/d	4,00	3,90	3,68	3,68	3,56	3,51	3,25	15,09***	0,98	0
dCY _{SOLIDS} , kg/d	1,91	1,88	1,75	1,77	1,71	1,71	1,61	11,04***	1,55	0,02
dCY _{WATER} , kg/d	2,08	2,02	1,92	1,89	1,86	1,81	1,66	15,42***	0,82	0,05

*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$.

Figura 6: Modellizzazione della consistenza del coagulo (CF) al tempo t in base ai livelli di α_{s1} -CN.

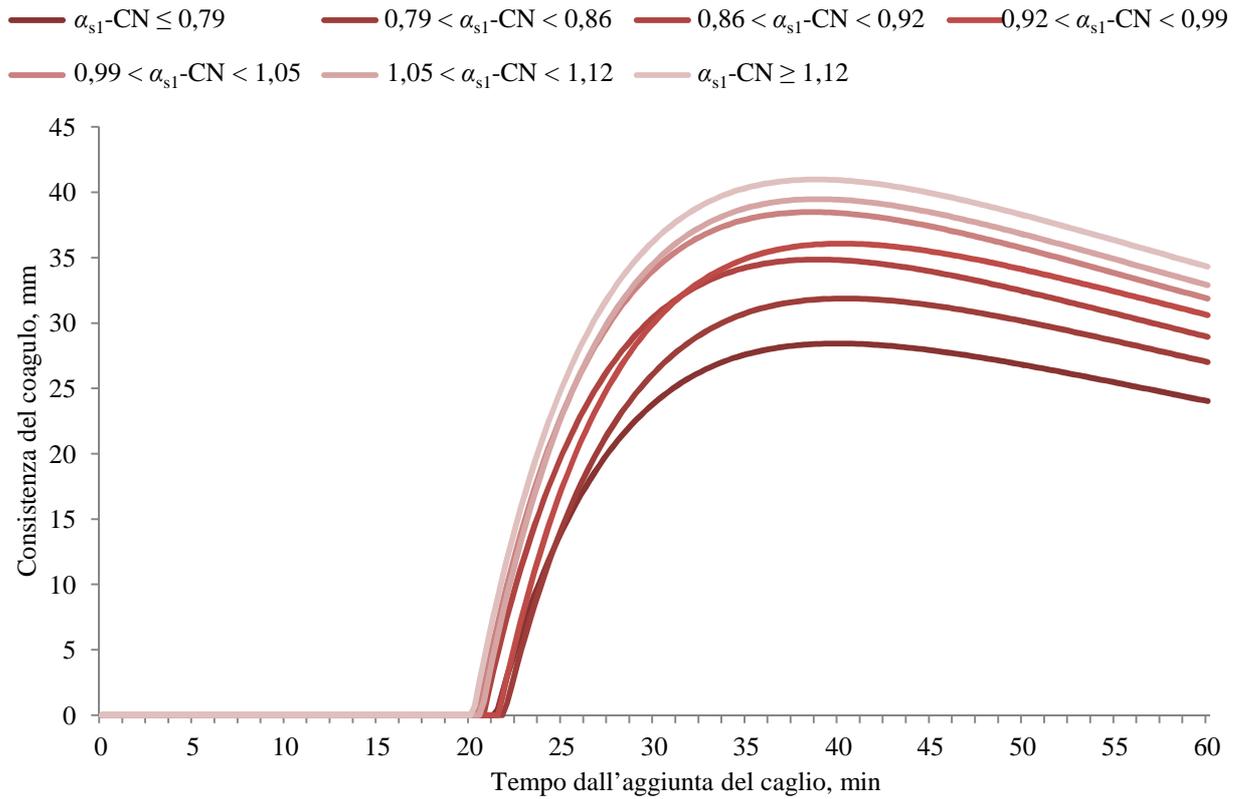


Figura 7: Modellizzazione della consistenza del coagulo (CF) al tempo t in base ai livelli di α_{s1} -CN fosforilata.

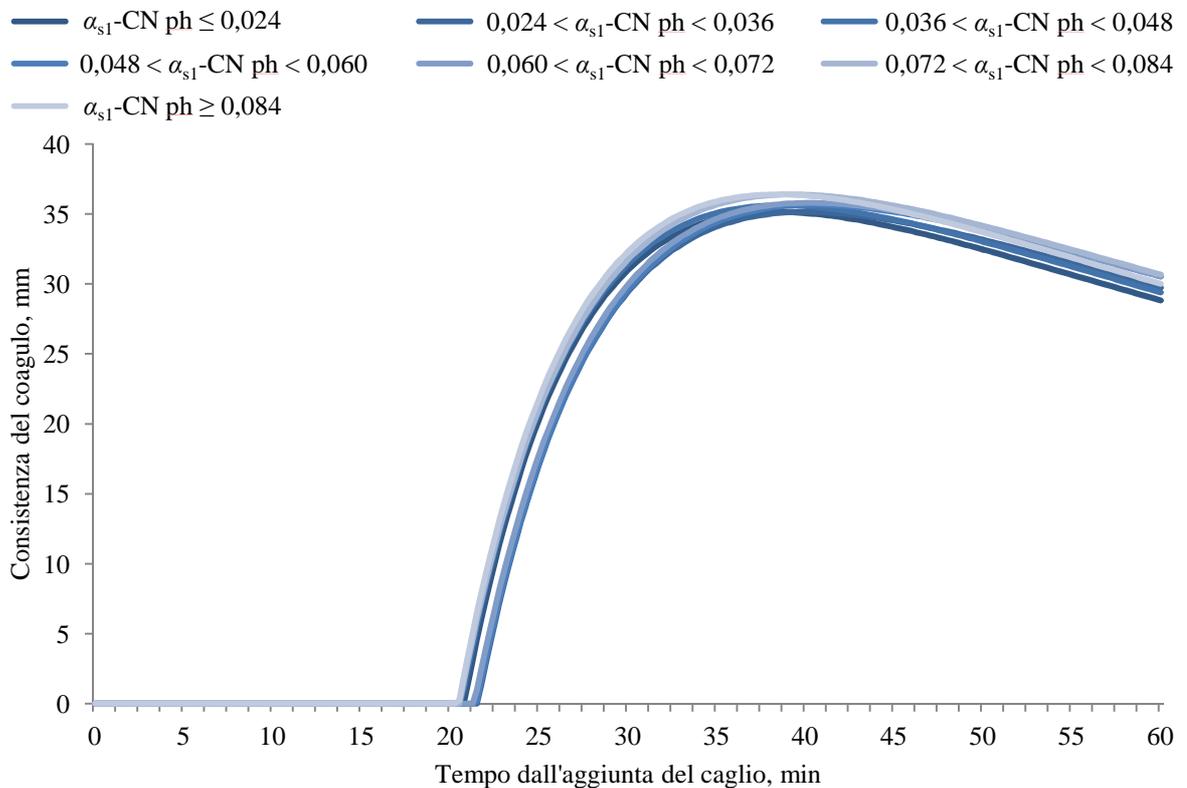


Figura 8: Modellizzazione della consistenza del coagulo (CF) al tempo t in base ai livelli di α_{s2} -CN.

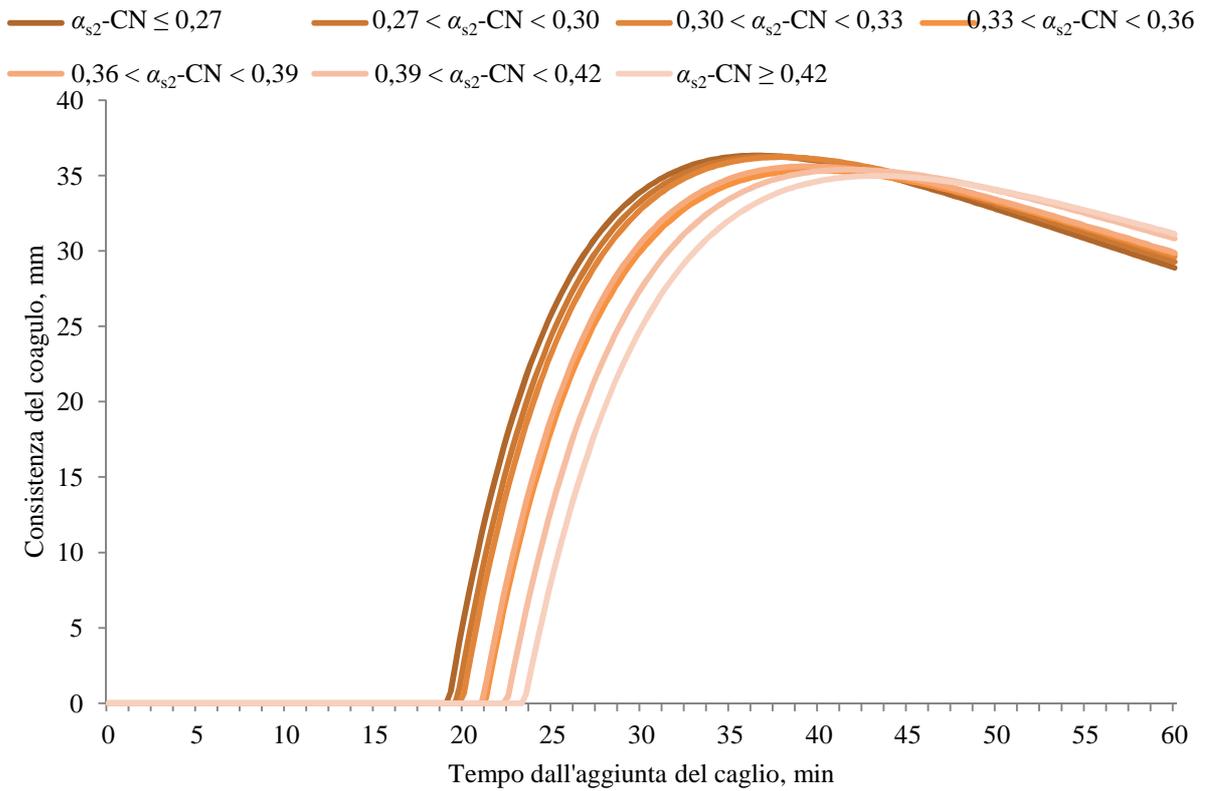


Figura 9: Modellizzazione della consistenza del coagulo (CF) al tempo t in base ai livelli di β -CN.

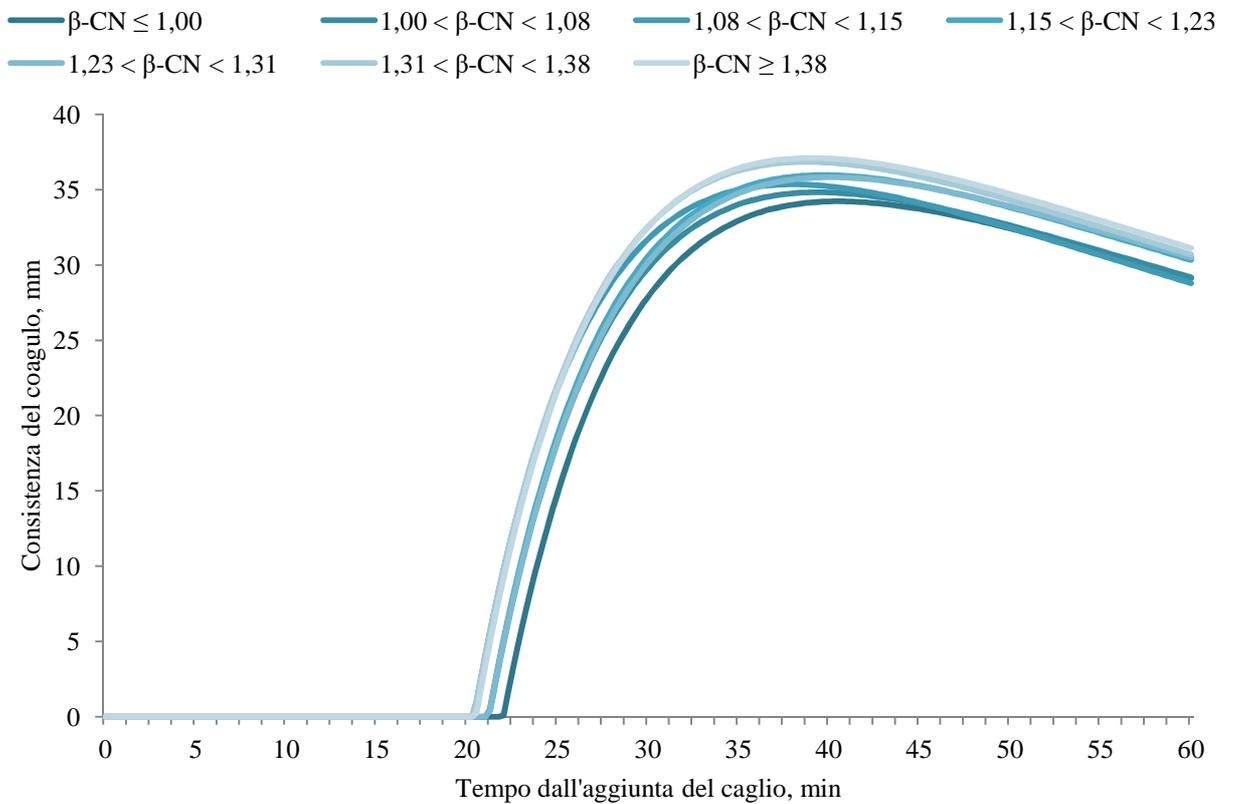


Figura 10: Modellizzazione della consistenza del coagulo (CF) al tempo t in base ai livelli di κ -CN.

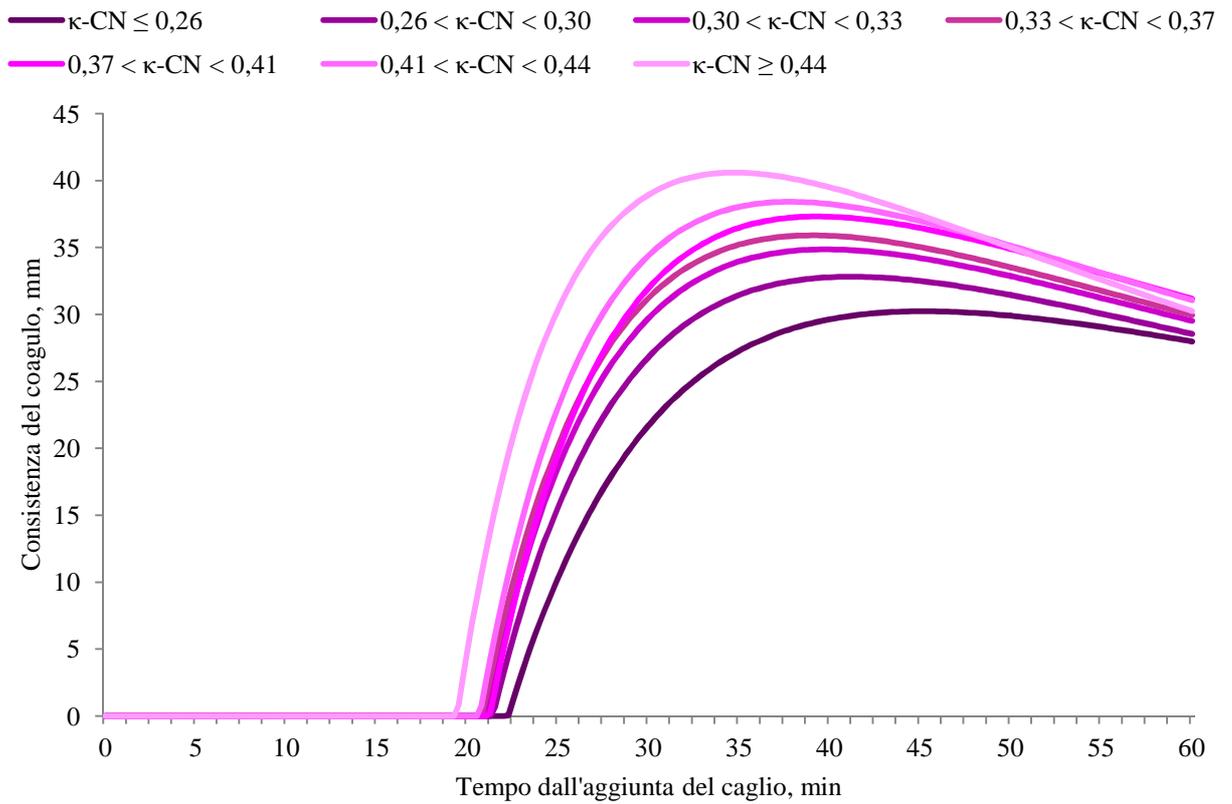


Figura 11: Modellizzazione della consistenza del coagulo (CF) al tempo t in base ai livelli di α -LA.

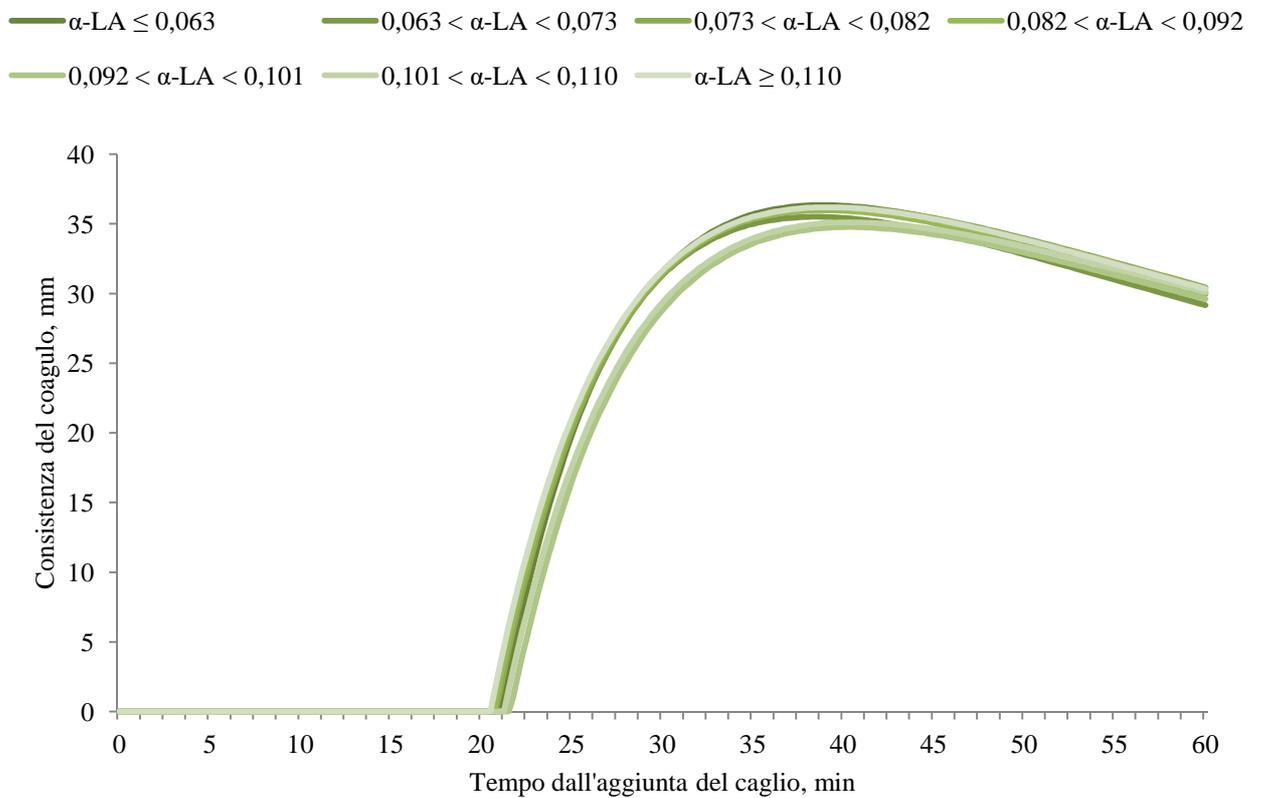
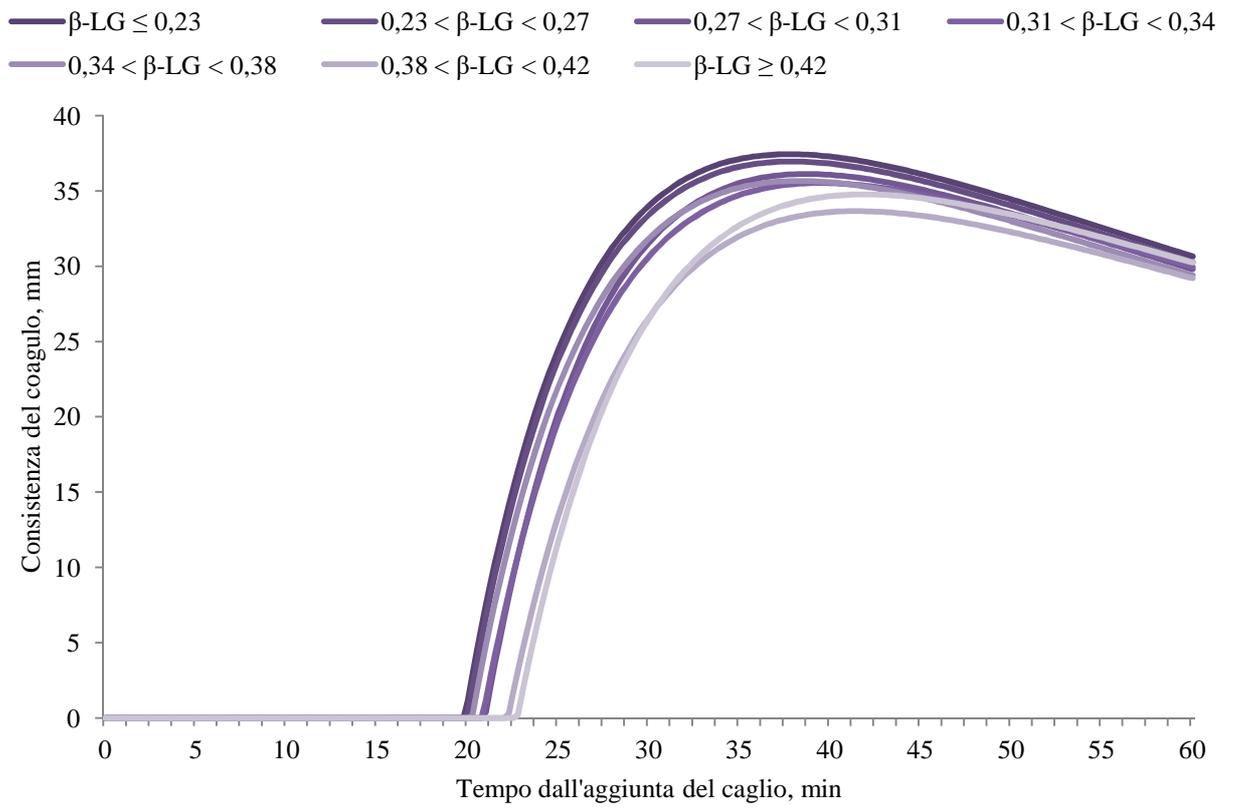


Figura 12: Modellizzazione della consistenza del coagulo (CF) al tempo t in base ai livelli di β -LG.



8. CONCLUSIONI

La presente tesi ha avuto l'obiettivo di valutare l'effetto del contenuto delle principali frazioni proteiche (α_{s1} -CN, α_{s2} -CN, β -CN, κ -CN, α -LA, β -LG) nei confronti dei caratteri che definiscono l'attitudine casearia di un latte e l'efficienza nel processo di caseificazione. Sono stati utilizzati campioni di latte individuale prodotti da animali di razza bruna italiana provenienti da allevamenti situati nella provincia di Trento.

Dai risultati ottenuti si è potuto constatare che i caratteri analizzati nel presente studio (MCP, %CY, REC e dCY) hanno mostrato una profonda relazione con il contenuto delle diverse frazioni proteiche del latte vaccino. Inoltre l'utilizzo della modellizzazione ha permesso di comprendere meglio il ruolo di queste frazioni nel processo di coagulazione, superando le limitazioni dei parametri tradizionali.

Più precisamente, le frazioni le cui maggiori concentrazioni hanno migliorato il processo di coagulazione sono state: la κ -CN con il suo effetto sulla riduzione delle tempistiche di gelazione e rassodamento, e la α_{s1} -CN con il miglioramento della consistenza del coagulo. Invece la α_{s2} -CN e la β -LG hanno influito con effetto negativo sugli stessi caratteri. Per il processo di caseificazione i livelli più alti di α_{s1} -CN e κ -CN hanno aumentato i recuperi di nutrienti (RECs) e quindi le rese finali (%CYs); insieme a queste anche la β -CN, la α_{s1} -CN fosforilata e, in parte, la α -LA hanno avuto effetto positivo. Nel caso delle rese espresse sulla produzione giornaliera di latte (dCYs), solo gli incrementi di α_{s1} -CN e di α -LA sono risultati significativi. Invece le concentrazioni crescenti di α_{s2} -CN e β -LG hanno sempre mantenuto un effetto opposto su %CYs, RECs e dCYs.

Visti questi risultati, sono altamente consigliati studi più approfonditi sull'argomento. Considerando che questi caratteri sono molto rilevanti per definire l'efficienza del processo di trasformazione casearia, può essere interessante affiancare a questi risultati uno studio che analizzi gli aspetti genetici e genomici che controllano tali caratteri e l'effetto delle varianti genetiche delle frazioni proteiche sull'intero processo di caseificazione.

Tuttavia le analisi operate durante questo studio sono particolarmente laboriose, quindi difficili da applicare a livello di popolazione: per semplificare questo tipo di studio, sarebbe interessante riassumere tutti questi caratteri in un indice unico che definisca l'attitudine casearia del latte e utilizzare metodi alternativi di analisi indiretta che siano più veloci, di facile utilizzo e a basso costo.

BIBLIOGRAFIA

- Aguilar, M. I. (2004). Reversed-phase high-performance liquid chromatography. *HPLC of peptides and proteins: Methods and protocols*, 9-22.
- Auldust, M. J., Johnston, K. A., White, N. J., Fitzsimons, W. P., & Boland, M. J. (2004). A comparison of the composition, coagulation characteristics and cheesemaking capacity of milk from Friesian and Jersey dairy cows. *Journal of Dairy Research*, 71(01), 51-57.
- Banks, J. M. (2007). Cheese yield. In *Cheese Problems Solved*. P. L. H. McSweeney, ed. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK, Pages 100–114.
- Bittante, G. (2011). Modeling rennet coagulation time and curd firmness of milk. *Journal of Dairy Science*, 94(12), 5821-5832.
- Bittante, G., Cipolat-Gotet, C., Malchiodi, F., Sturaro, E., Tagliapietra, F., Schiavon, S., & Cecchinato, A. (2015). Effect of dairy farming system, herd, season, parity, and days in milk on modeling of the coagulation, curd firming, and syneresis of bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 98(4), 2759-2774.
- Bittante, G., Contiero, B., & Cecchinato, A. (2013). Prolonged observation and modelling of milk coagulation, curd firming, and syneresis. *International Dairy Journal*, 29(2), 115-123.
- Bittante, G., Penasa, M., & Cecchinato, A. (2012). Invited review: Genetics and modeling of milk coagulation properties. *Journal of Dairy Science*, 95(12), 6843-6870.
- Bobe, G., Beitz, D. C., Freeman, A. E., & Lindberg, G. L. (1998). Separation and quantification of bovine milk proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(2), 458-463.

- Bonfatti, V., Cecchinato, A., Gallo, L., Blasco, A., & Carnier, P. (2011). Genetic analysis of detailed milk protein composition and coagulation properties in Simmental cattle. *Journal of Dairy Science*, 94(10), 5183-5193.
- Bonfatti, V., Di Martino, G., Cecchinato, A., Degano, L., & Carnier, P. (2010a). Effects of β - κ -casein (CSN2-CSN3) haplotypes, β -lactoglobulin (BLG) genotypes, and detailed protein composition on coagulation properties of individual milk of Simmental cows. *Journal of Dairy Science*, 93(8), 3809-3817.
- Bonfatti, V., Di Martino, G., Cecchinato, A., Vicario, D., & Carnier, P. (2010b). Effects of β - κ -casein (CSN2-CSN3) haplotypes and β -lactoglobulin (BLG) genotypes on milk production traits and detailed protein composition of individual milk of Simmental cows. *Journal of Dairy Science*, 93(8), 3797-3808.
- Bonfatti, V., Grigoletto, L., Cecchinato, A., Gallo, L., & Carnier, P. (2008). Validation of a new reversed-phase high-performance liquid chromatography method for separation and quantification of bovine milk protein genetic variants. *Journal of Chromatography A*, 1195(1), 101-106.
- Cassandro, M. (2003). Status of milk production and market in Italy. *Agriculturae Conspectus Scientificus (ACS)*, 68(2), 65-69.
- Cassandro, M., Comin, A., Ojala, M., Dal Zotto, R., De Marchi, M., Gallo, L., Carnier, P. & Bittante, G. (2008). Genetic parameters of milk coagulation properties and their relationships with milk yield and quality traits in Italian Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 91(1), 371-376.
- Cipolat-Gotet, C., Cecchinato, A., De Marchi, M., & Bittante, G. (2013). Factors affecting variation of different measures of cheese yield and milk nutrient recovery from an individual model cheese-manufacturing process. *Journal of Dairy Science*, 96(12), 7952-7965.

- Cipolat-Gotet, C., Cecchinato, A., De Marchi, M., Penasa, M., & Bittante, G. (2012). Comparison between mechanical and near-infrared methods for assessing coagulation properties of bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 95(11), 6806-6819.
- Cipolat-Gotet, C., Cecchinato, A., Pazzola, M., Dettori, M. L., Bittante, G., & Vacca, G. M. (2016). Potential influence of herd and animal factors on the yield of cheese and recovery of components from Sarda sheep milk, as determined by a laboratory bench-top model cheese-making. *International Dairy Journal*, 63, 8-17.
- Dalglish, D. G., & Corredig, M. (2012). The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3, 449-467
- De Marchi, M., Bittante, G., Dal Zotto, R., Dalvit, C., & Cassandro, M. (2008). Effect of Holstein Friesian and Brown Swiss breeds on quality of milk and cheese. *Journal of Dairy Science*, 91(10), 4092-4102.
- Farrell, H. M. (2011). Milk Proteins | Casein Nomenclature, Structure, and Association, In *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*, edited by John W. Fuquay, Academic Press, San Diego, Pages 765-771
- Farrell, H. M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G. T., Brown, E. M., Butler, J. E., Creamer, L. K., Hicks, C.L.,Hollar, C.M., Ng-Kwai-Hang, K.F. & Swaisgood, H. E. (2004). Nomenclature of the proteins of cows' milk—Sixth revision. *Journal of Dairy Science*, 87(6), 1641-1674.
- Formaggioni, P., Summer, A., Malacarne, M., & Mariani, P. (1999). Milk protein polymorphism: Detection and diffusion of the genetic variants in Bos genus. *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria dell' Università di Parma*, 19, 127-165.
- Fox, P.F. (2011) LACTOSE AND OLIGOSACCHARIDES | Lactose: Chemistry, Properties, In *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*, edited by John W. Fuquay, Academic Press, San Diego, Pages 173-181.

- Frederiksen, P. D., Andersen, K. K., Hammershøj, M., Poulsen, H. D., Sørensen, J., Bakman, M., Qvist, K. B., & Larsen, L. B. (2011). Composition and effect of blending of noncoagulating, poorly coagulating, and well-coagulating bovine milk from individual Danish Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 94(10), 4787-4799.
- Gaucheron, F. (2005). The minerals of milk. *Reproduction Nutrition Development*, 45(4), 473-483.
- Heck, J. M. L., Schennink, A., Van Valenberg, H. J. F., Bovenhuis, H., Visker, M. H. P. W., Van Arendonk, J. A. M., & Van Hooijdonk, A. C. M. (2009). Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 92(3), 1192-1202.
- Ikonen, T., Ahlfors, K., Kempe, R., Ojala, M., & Ruottinen, O. (1999). Genetic parameters for the milk coagulation properties and prevalence of noncoagulating milk in Finnish dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 82(1), 205-214.
- Jensen, H. B., Holland, J. W., Poulsen, N. A., & Larsen, L. B. (2012). Milk protein genetic variants and isoforms identified in bovine milk representing extremes in coagulation properties. *Journal of Dairy Science*, 95(6), 2891-2903.
- Jõudu, I., Henno, M., Kaart, T., Püssa, T., & Kärt, O. (2008). The effect of milk protein contents on the rennet coagulation properties of milk from individual dairy cows. *International Dairy Journal*, 18(9), 964-967.
- Kowalchuk, A. W., & Olson, N. F. (1977). Effect of temperature on the secondary phase of milk clotting by rennet. *Journal of Dairy Science*, 60:1256–1259
- Lucey, J., & Kelly, J. (1994). Cheese yield. *International Journal of Dairy Technology*, 47(1), 1-14.
- Malchiodi, F., Cecchinato, A., Penasa, M., Cipolat-Gotet, C., & Bittante, G. (2014). Milk quality, coagulation properties, and curd firmness modeling of purebred

Holsteins and first-and second-generation crossbred cows from Swedish Red, Montbéliarde, and Brown Swiss bulls. *Journal of Dairy Science*, 97(7), 4530-4541.

- Mariani, P. (1987). Rapporti tra variazioni della caseina e proprietà tecnologico-casearie del latte.". *Atti della Società Italiana di Buiatria*, 19, 65-69.
- Marziali, A. S., & Ng-Kwai-Hang, K. F. (1986a). Effects of milk composition and genetic polymorphism on coagulation properties of milk. *Journal of Dairy Science*, 69(7), 1793-1798.
- Marziali, A. S., & Ng-Kwai-Hang, K. F. (1986b). Relationships between milk protein polymorphisms and cheese yielding capacity. *Journal of Dairy Science*, 69(5), 1193-1201.
- Mayer, H. K., Ortner, M., Tschager, E., & Ginzinger, W. (1997). Composite milk protein phenotypes in relation to composition and cheesemaking properties of milk. *International Dairy Journal*, 7(5), 305-310.
- McLean, D. M., Bruce Graham, E. R., & Ponzoni, R. W. (1984). Effects of milk protein genetic variants on milk yield and composition. *The Journal of Dairy Research* 51:531–546.
- Mehta, B. M. (2015). Chemical Composition of Milk and Milk Products. *Handbook of Food Chemistry*, 511-553.
- Nájera, A. I., De Renobales, M., & Barron, L. J. R. (2003). Effects of pH, temperature, CaCl₂ and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk: a multifactorial study. *Food Chemistry*, 80(3), 345-352.
- Niki, R., Kohyama, K., Sano, Y., & Nishinari, K. (1994). Rheological study on the rennet-induced gelation of casein micelles with different sizes. *Polymer Gels and Networks*, 2(2), 105-118.

- Ng-Kwai-Hang, K. F. (2011). Milk Proteins | Heterogeneity, Fractionation, and Isolation, In *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*, edited by John W. Fuquay, Academic Press, San Diego, Pages 751-764
- O'Brien, B., Mehra, R., Connolly, J. F., & Harrington, D. (1999). Seasonal variation in the composition of Irish manufacturing and retail milks: 1. Chemical composition and renneting properties. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 53-64.
- Okigbo, L. M., Richardson, G. H., Brown, R. J., & Ernstrom, C. A. (1985). Interactions of Calcium, pH, Temperature, and Chymosin During Milk Coagulation 1, 2. *Journal of Dairy Science*, 68(12), 3135-3142.
- Penasa, M., Toffanin, V., Cologna, N., Cassandro, M., & De Marchi, M. (2016). Effects of dairy factory, milk casein content and titratable acidity on coagulation properties in Trentingrana dairy industry. *The Journal of Dairy Research*, 83(2), 242-248.
- Pereira, P. C. (2014). Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition*, 30(6), 619-627.
- Pieri, R. (2014). La valorizzazione del latte destinato alle Produzioni tutelate (DOP e IGP). In *Il mercato del latte:Rapporto 2014*, FrancoAngeli, Milano, Italy, 242-245
- Politis, I., & Ng-Kwai-Hang, K. F. (1988). Effects of somatic cell counts and milk composition on the coagulating properties of milk. *Journal of Dairy Science*, 71(7), 1740-1746.
- Pretto, D., De Marchi, M., Penasa, M., & Cassandro, M. (2013). Effect of milk composition and coagulation traits on Grana Padano cheese yield under field conditions. *Journal of Dairy Research*, 80(01), 1-5.
- Risso, P. H., Relling, V. M., Armesto, M. S., Pires, M. S., & Gatti, C. A. (2007). Effect of size, proteic composition, and heat treatment on the colloidal stability of proteolyzed bovine casein micelles. *Colloid and Polymer Science*, 285(7), 809-817.

- Salvadori del Prato, O. (1998) Cellule somatiche. In *Trattato di Tecnologia casearia*, 134-135. Bologna: Edagricole - Edizione Agricole della Calderini.
- Schaar, J., Hansson, B., & Pettersson, H. E. (1985). Effects of genetic variants of κ -casein and β -lactoglobulin on cheesemaking. *Journal of Dairy Research*, 52(03), 429-437.
- Schmidt, D. G. (1970). Differences between the association of the genetic variants B, C and D of α_{s1} -casein. *Biochimica et Biophysica Acta* 221:140–142.
- Schmidt, D. G. (1980). Colloidal aspects of casein [in milk products]. [A review article]. *Netherlands Milk and Dairy Journal*.
- St-Gelais, D., & Haché, S. (2005). Effect of β -casein concentration in cheese milk on rennet coagulation properties, cheese composition and cheese ripening. *Food Research International*, 38(5), 523-531.
- Storry, J. E., Grandison, A. S., Millard, D., Owen, A. J., & Ford, G. D. (1983). Chemical composition and coagulating properties of renneted milks from different breeds and species of ruminant. *Journal of Dairy Research*, 50(2), 215-229.
- Taylor M.W. & MacGibbon A.K.H. (2011) MILK LIPIDS | General Characteristics, In *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Second Edition), edited by John W. Fuquay,, Academic Press, San Diego, Pages 649-654.
- Veneto Agricoltura (2016). Rapporto "*Prime valutazioni 2015 sull'andamento del settore agroalimentare veneto*". Veneto Agricoltura, Legnaro. (SITO?)
- Verdier-Metz, I., Coulon, J. B., & Pradel, P. (2001). Relationship between milk fat and protein contents and cheese yield. *Animal Research*, 50(5), 365-371.

- Walsh, C. D., Guinee, T. P., Reville, W. D., Harrington, D., Murphy, J. J., T O'Kennedy, B., & FitzGerald, R. J. (1998). Influence of κ -casein genetic variant on rennet gel microstructure, cheddar cheesemaking properties and casein micelle size. *International Dairy Journal*, 8(8), 707-714.
- Wedholm, A., Larsen, L. B., Lindmark-Månsson, H., Karlsson, A. H., & Andrén, A. (2006). Effect of protein composition on the cheese-making properties of milk from individual dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 89(9), 3296-3305

SITOGRAFIA

- ANAFI (2015) Statistiche provincia di Trento <http://www.anafi.it/>
- ANARB (2013) Statistiche provincia di Trento e nazionali <http://www.anarb.it/pagina.asp?ID=2508&lang=it>
- ARAV (2015) Livelli di grasso e proteina nel latte bovino analizzati per il controllo Latte Qualità http://www.arav.it/STATISTICHE/lq/LQ%20Grasso_prot_arav.htm
- CLAL (2014) Produzioni di formaggi italiani DOP. http://www.clal.it/index.php?section=formaggi_dop
- CLAL (2016) Prezzi del Latte crudo alla stalla. http://www.clal.it/index.php?section=latte_lombardia