

**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**

FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA

Corso di Laurea di Medicina Veterinaria

**EFFETTO DELLE PROPRIETÀ COAGULATIVE DEL
LATTE INDIVIDUALE SULLA RESA CASEARIA
MISURATA MEDIANTE MINICASEIFICAZIONI
SPERIMENTALI**

Relatore: Ch.mo Prof. PAOLO CARNIER

Laureanda:

Correlatore: Dott.ssa VALENTINA BONFATTI

ANGELA GREGUOL

ANNO ACCADEMICO 2009-2010

Abstract

In order to assess the relationship between milk coagulation properties (MCP) and cheese yield, experimental cheese-making trials were made once a month for 5 times between January and June 2010. Six cows producing milk with good MCP and six cows producing milk characterized by having poor MCP have been selected, using CRM (Computerized Renneting Meter) analysis. Milk has been mixed to form four experimental milks: two milks were of extreme good and poor MCP, and two intermediate milks were prepared mixing the two extreme experimental milks in proportions of 67:33 and 33:67. 90-days-ripened chesses were obtained from each 10 liters vat. Analysis of the protein profile has been carried out vat milk by HPLC. Mid-infrared spectroscopy has been used to determine the percentage of protein, fat, casein, lactose, total solids, citric acid and urea in milk, and total solids, fat, protein and lactose content in whey. Near Infrared Reflectance was used to determine moisture, total solids, fat content, protein content and fat expressed on dry matter of curd. MCP of mixed milk showed a liner trend with the proportion of milk with good MCP mixed. Cheese yields were not significantly different across experimental milks as well as the composition of the curd and whey. α 1-CN, α 2-CN, glycomacropeptide content and the percentage of β γ -CN on total casein did not affect cheese yield. The effects of MCP on cheese yield could be hidden by the fact that the curd was cut depending on clotting time and not at a fixed time. Using a fixed cutting time, it might be possible to obtain variation in cheese yield due to MCP.

Riassunto

Considerata l'importanza delle proprietà coagulative del latte (MCP) sull'attitudine alla caseificazione, sono state effettuate 5 minicaseificazioni sperimentali ad intervalli di circa un mese tra gennaio e giugno 2010 per valutare la relazione tra MCP e resa casearia. Sono state selezionate sei bovine con buone MCP e sei bovine con scarse MCP mediante analisi lattodinamografica. Il latte individuale è stato quindi miscelato per costituire 4 tesi: due con caratteristiche estreme, e due diverse tesi intermedie in cui le due tesi estreme contribuivano per il 67% e 33%. A partire da 10 litri di latte per ogni tesi si sono ottenuti dei formaggi stagionati fino a 90 giorni. Sul latte sono state condotte le analisi HPLC per il profilo proteico. Mediante spettroscopia nel medio infrarosso è stata eseguita la determinazione della percentuale di proteina, di grasso, di caseina, di lattosio, dei solidi totali, dell'urea e dell'acido citrico per il latte, e del contenuto di grassi, di proteina, di lattosio e dei solidi totali per il siero. Mediante NIR (Near Infrared Reflectance), sono stati ottenuti i valori di umidità, dei solidi totali, del contenuto di grassi, delle proteine e del grasso su sostanza secca della cagliata. Le MCP del latte miscelato avevano andamento lineare mentre le rese casearie in tutte le misurazioni non sono risultate significativamente diverse tra tesi. In accordo con i risultati delle rese, anche la composizione, sia della cagliata che del siero, si mostrava per lo più omogenea. Pertanto il contenuto differenziale di α_{S1} -CN, α_{S2} -CN, glicomacropetide e la percentuale di $\beta\gamma$ -CN sulla caseina totale del latte di partenza non hanno influito sulla resa. Gli effetti delle MCP sulle rese casearie potrebbero essere stati annullati dal fatto che la cagliata è stata rotta in base al tempo di coagulazione e non ad un tempo predefinito. E' possibile che utilizzando un altro protocollo, con tempo fisso di rottura della cagliata, si possano ottenere delle variazioni di resa.

Indice

Abstract	3
Riassunto	5
1. Introduzione	9
1.1. Panorama nazionale ed internazionale del settore caseario	9
1.2. Attitudine casearia e proprietà di coagulazione (MCP)	10
1.3. Peggioramento delle proprietà di coagulazione del latte.....	14
1.4. Possibilità di miglioramento delle proprietà coagulative del latte.....	15
1.5. Relazione tra proprietà coagulative del latte e resa casearia.....	16
1.6. Fattori che influenzano le proprietà coagulative del latte.....	17
1.7. La proteina del latte e la resa casearia.....	19
1.8. Minicaseificazioni.....	21
2. Obiettivi.....	23
3. Materiale e Metodi.....	25
3.1. Composizione delle tesi sperimentali.....	25
3.1.1. Campionamento preliminare.....	25
3.1.2. Analisi pH e LDG.....	25
3.1.3. Selezione degli animali.....	26
3.2. Mini caseificazione.....	26
3.2.1. Preparazione delle tesi sperimentali.....	26
3.2.2. Minicaseificazione.....	27
3.2.3. Identificazione del tempo di coagulazione nelle mini-caldai.....	29
3.3. Analisi chimiche.....	31
3.3.1. Composizione della proteina del latte lavorato.....	31
3.4. Analisi statistica.....	32
3.4.1. Stima degli effetti delle tesi sperimentali sulle variabili considerate.....	32
3.4.2. Stima dell'effetto delle tesi sperimentali sulla resa casearia.....	33
3.4.3. Stima dell'effetto delle tesi sperimentali sulla cinetica della resa casearia.....	33
4. Risultati e discussione.....	35
4.1. Caratteristiche lattodinamografiche e pH delle tesi sperimentali.....	35
4.2. Composizione del latte delle tesi sperimentali.....	37
4.2.1. Contenuto di proteina e grasso	37

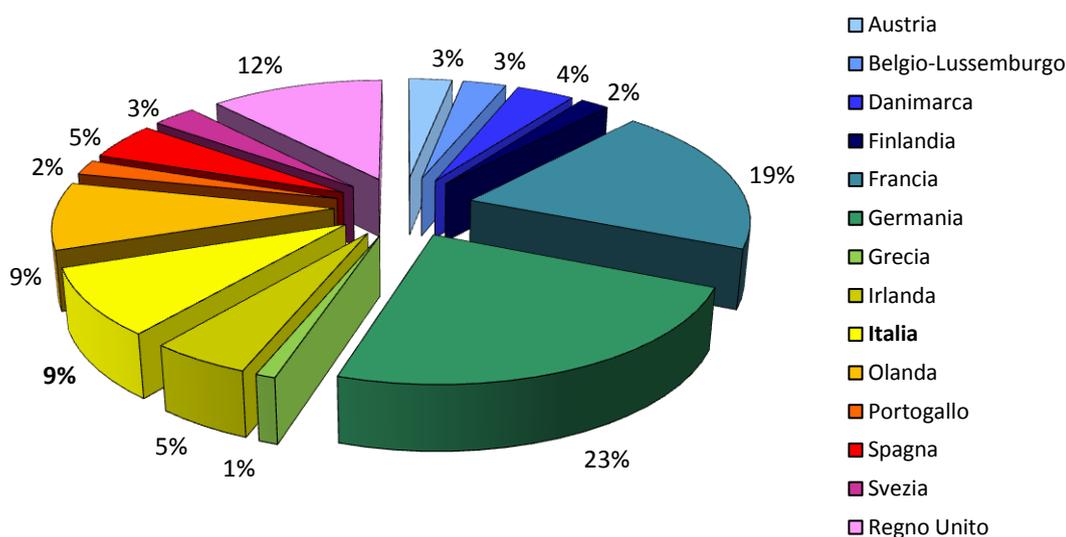
4.2.2. Acido citrico e Urea.....	40
4.2.3. Composizione della proteina misurata con HPLC.....	41
4.3. Effetto delle tesi sperimentali sulla resa casearia.....	46
4.4. Effetto delle tesi sperimentali sulla composizione del siero e della cagliata.....	49
4.4.1. Composizione del siero.....	49
4.5.2. Composizione della cagliata.....	51
5. Conclusioni.....	53
Bibliografia.....	55

Introduzione

1.1. Panorama nazionale ed internazionale del settore caseario

Nel 2007 la produzione mondiale di formaggi è stata pari a 21.3 milioni di tonnellate con un contributo importante dell'Europa e degli Stati Uniti che hanno rappresentato oltre il 62% del totale mondiale (ISMEA, 2008). In Europa parte essenziale della produzione di latte vaccino è destinata alla produzione casearia. Germania, Francia, Regno Unito, Paesi Bassi e Italia sono i paesi che consegnano quote maggiori di latte all'industria casearia (AIA, 2009)(Fig. 1.1.). All'interno dello scenario europeo, l'Italia ricopre un ruolo importante in questo settore per diversi aspetti. Da un punto di vista quantitativo, la quota di latte raccolta e destinata alla trasformazione casearia è superiore ai 100 milioni di quintali, oltre il 70% del latte totale (ISTAT, 2006), mentre da un punto di vista qualitativo il nostro paese presenta una tradizione casearia molto radicata vantando ben 33 prodotti di origine protetta (ISTAT, 2008) che rappresentano il 55% della produzione di formaggi italiani (Cassandro et al., 2008).

Figura 1.1. Incidenza della produzione di latte dei diversi Paesi europei



Secondo il Food and Agricultural Policy Research Institute (FAPRI, 2008), la produzione mondiale di formaggio dovrebbe crescere del 22.3% nell'arco di dieci anni, con gli USA e l'UE che contano per oltre il 64% della produzione. I trend per il periodo 2010-2017 del settore latte e formaggio in Europa saranno stazionari per il latte, ma è previsto un incremento del 10.8% per la produzione di formaggio. Nello stesso periodo, si prevede un calo (-0.3%) del consumo di latte, ma un notevole aumento (+12%) del consumo di formaggio. Oltre alla Francia, l'Italia è il Paese con il maggior numero di formaggi a produzione locale, oggi circa 400 prodotti. Il settore lattiero-caseario rappresenta il 13%

del fatturato dell'industria alimentare ed esercita un ruolo chiave per l'industria alimentare italiana a livello internazionale, coinvolgendo più di 2,000 impianti e strutture di trasformazione lattiero-casearie. L'Italia rappresenta il 9% della produzione di latte europeo, ma il 15% della produzione di formaggio (Pieri e Del Bravo, 2005).

Già prima dell'entrata in vigore della legislazione europea sui prodotti DOP e IGP (Reg. CEE 2081/92), numerosi formaggi già possedevano il marchio DOC (legge 125 del 1952). Tra i formaggi prodotti in Italia, accanto a specialità molto diffuse (Parmigiano Reggiano, Grana Padano, ecc.), coesistono prodotti molto localizzati (Formai de Mut della Valle Brembana, Sprezza delle Giudicarie, ecc.) di origine controllata. Il latte impiegato per la produzione di formaggi DOP è stato complessivamente pari a 5.5 milioni di tonnellate nel 2007, con una produzione di oltre 460,000 tonnellate di formaggi. Il Grana Padano rappresenta il prodotto caseario di maggior importanza con una produzione di 158,000 tonnellate, seguito dal Parmigiano Reggiano con 117,000 tonnellate (ISMEA, 2008). Il latte vaccino è quello maggiormente impiegato, essendo il 93.6% del latte totale destinato alla produzione casearia (ISTAT, 2006); oltre l'84% dei formaggi DOP è rappresentato da formaggi vaccini e misti, contro il 7% dei formaggi bufalini e l'8% di quelli ovini (ISMEA, 2008). Per la produzione della maggior parte di questi formaggi si utilizza solamente latte crudo, caglio e batteri lattici naturali, per cui il latte deve presentare una buona attitudine alla trasformazione (Bertoni et al., 2001).

L'importanza del settore lattiero caseario risulta evidente considerando i dati economici dell'Italia, il cui fatturato del 2008 era di 14,500 milioni di euro. L'analisi dell'export rivela che l'Italia vende in tutto il mondo soprattutto formaggi. La Francia è il miglior cliente coprendo il 19% dell'export caseario italiano, seguita dagli USA (12.8%), dalla Germania (12.6%) e dal Regno Unito (9.6%) (Assolatte, 2009). I flussi con l'estero di formaggi e latticini hanno una consistenza di 1,425 milioni di euro di cui i formaggi a pasta dura e semidura rappresentano il segmento di punta dell'export italiano per un valore di 1,063 milioni di euro, contro i formaggi a pasta molle e sfusi il cui export presenta un valore di 362 milioni di euro (AIA, 2009).

1.2. Attitudine casearia e proprietà di coagulazione (MCP)

La resa casearia è definita come la quantità di formaggio prodotto a partire da 100 kg di latte con un contenuto determinato di grassi e proteine (Lucy et al., 1994). Già da tempo è noto che la valutazione della resa fornisce all'industria casearia strumenti importanti per determinare i costi della trasformazione (Kindstedt et al., 1983) essendo direttamente legata al profitto dell'industria casearia.

La resa casearia diventa perciò un obiettivo fondamentale per la selezione delle bovine, da un lato, mentre dall'altro rappresenta un parametro di valutazione del latte conferito ai caseifici, utilizzabile per determinare eventuali premi o penalità per i conferenti.

Valutare la resa casearia con metodi diretti risulta difficoltoso poiché molto laborioso, per

cui oggi sono state elaborate delle nuove metodiche per effettuare delle valutazioni indirette, considerando le proprietà coagulative del latte (**MCP**). Queste ultime ricoprono un ruolo importante nella valutazione del latte destinato alla produzione di formaggi specialmente nei Paesi in cui la tradizione casearia è ben radicata, tra cui l'Italia.

L'attitudine specifica del latte alla coagulazione presamica rappresenta il requisito basilare per la tecnologia casearia, pertanto la valutazione di tale idoneità alla caseificazione assume rilievo sempre maggiore, soprattutto nel caso di formaggi a pasta dura e a lungo periodo di maturazione (Annibaldi, 1973), la cui produzione si basa essenzialmente sulla formazione e cottura di una cagliata lattico-presamica.

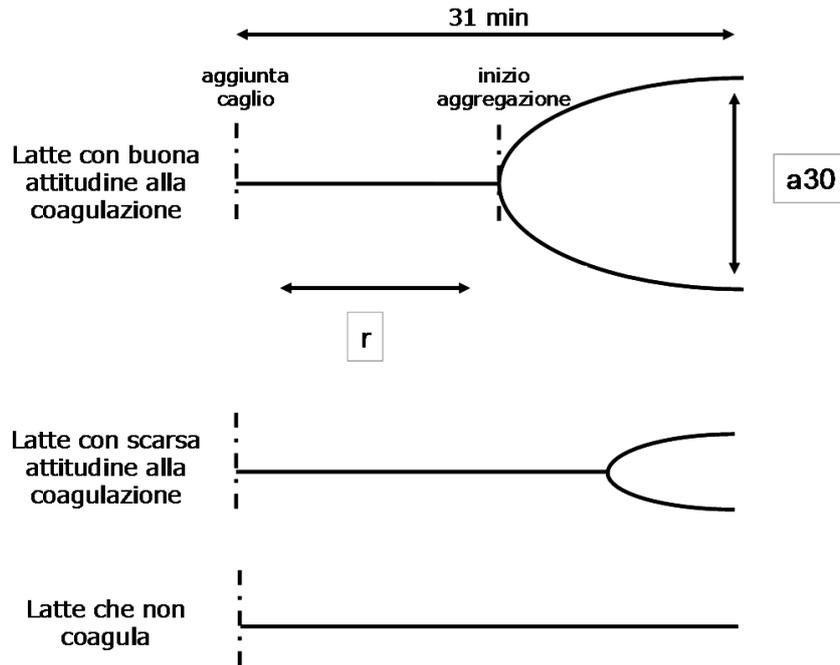
Tuttavia, la caseificazione è un processo molto complesso dal punto di vista biochimico e questo rende difficile l'individuazione di un metodo appropriato per la rilevazione dell'attitudine casearia. Oggi esistono differenti metodiche di laboratorio mirate alla valutazione dell'attitudine casearia del latte, basate su sistemi meccanici, rilevazioni oscillografiche, ultrasonografica, conducibilità elettrica, metodi ottici, ecc. (O'Callaghan et al., 2000), delle quali va poi presa in considerazione l'applicabilità, i costi di gestione e la facilità di esecuzione dell'analisi. La tecnica lattodinamografica (LDG) è da sempre considerata un buon criterio di valutazione complessiva dell'attitudine casearia del latte (Annibaldi, 1973; Annibaldi et al., 1977; Zannoni e Annibaldi, 1981; McMahon e Brown, 1982; Mayes e Sutherland, 1984; Aleandri et al., 1989). Il principio di funzionamento è di tipo meccanico e basato sull'attrito prodotto dall'aumento della viscosità del latte durante il processo di coagulazione. La prova inizia con l'aggiunta del caglio al campione di latte (10 ml) in esame e dura complessivamente 30 min, poiché, nella tecnologia di molti formaggi, è a questo punto che avviene la rottura della cagliata. Come risultato si ottiene un grafico in funzione del tempo: il tracciato lattodinamografico. I tracciati permettono di valutare la diversa attitudine casearia del latte (Fig. 1.2.).

Lo strumento più utilizzato per questo scopo fino ad oggi è stato il Formagraph (*Foss America, Fishkill, NY*). Tradizionalmente sono associate al Formagraph tre misurazioni raccolte dal movimento oscillatorio lineare di un pendolo, immerso nel latte cagliato. Ad ogni oscillazione del pendolo, viene emesso un piccolo flash che va ad imprimere l'immagine dell'oscillazione su di una carta fotografica. La normale misurazione del Formagraph dura 30 min, con la carta fotografica che avanza ad una velocità costante.

Il Computerized Renneting Meter (**CRM**) è un'apparecchiatura computerizzata per la valutazione dell'attitudine del latte alla caseificazione, composta da un'unità di gestione integrata nel PC e da un modulo di misura, che ha sostituito il vecchio Formagraph in molte applicazioni. Il modulo di misura multiplo consente l'analisi contemporanea di 10 campioni. Il principio di misura si basa sul controllo di un'oscillazione eseguita da un campo elettromagnetico su un pendolo. Un sistema di rilevamento misura le differenze di

campo magnetico che si vengono a creare a seguito della coagulazione del latte, in pratica riducendo l'ampiezza dell'oscillazione. La classificazione del latte è automatica e i risultati delle analisi vengono registrati, comprensivi di tracciato grafico, automaticamente. L'analisi può essere eseguita su qualsiasi tipo di latte.

Figura 1.2. Tracciato lattodinamografico di latte a diversa attitudine alla coagulazione. Le proprietà di coagulazione che derivano dal tracciato sono: tempo di coagulazione (R) in minuti e consistenza finale del coagulo (A_{30}) in mm.



La valutazione dell'attitudine alla caseificazione del latte viene effettuata mediante due indicatori: il tempo di coagulazione del latte (r , min) e la consistenza del coagulo caseoso (A_{30} , mm). Il tempo di coagulazione rappresenta il tempo che intercorre tra l'aggiunta del caglio e l'inizio dell'aggregazione, cioè l'intervallo necessario alla separazione delle braccia del grafico, mentre la consistenza del coagulo è un indicatore della consistenza della cagliata dopo 30 minuti dall'aggiunta del caglio (Ikonen et al., 2004) e rappresenta la distanza tra le braccia del grafico al termine della misurazione.

Il tempo di coagulazione è l'indicatore della fase enzimatica (primaria) della coagulazione, quella in cui la chimosina contenuta nel caglio scinde la κ -caseina (κ -CN) in para- κ -CN e macropeptide, favorendo l'inizio dell'aggregazione delle micelle. La consistenza della cagliata descrive la fase secondaria non enzimatica della coagulazione, in cui le micelle si aggregano passando dallo stato di sol a quello di gel. Nella tecnologia casearia, la situazione ottimale è rappresentata dal latte che coagula in un tempo relativamente veloce, in grado di inglobare più caseina e grasso nel coagulo, con una buona capacità di rassodamento e di un'adeguata consistenza della cagliata che, una volta rotta, sia in grado di eliminare efficacemente il siero

(Mariani et al., 2002).

Una classificazione dell'attitudine casearia del latte sulla base dei parametri lattodinamografici è stata proposta da Zannoni e Annibaldi (1981), i quali hanno individuato diversi "tipi" di latte:

- tipo D: latte rapido, che coagula in un tempo compreso fra 6 e 11 minuti. Questa situazione si osserva di norma nel latte con elevato contenuto di caseina oppure lievemente acido;
- tipo A: latte ottimale, che coagula in un tempo compreso fra 11,5 e 18 min e ha una consistenza idonea per la sineresi;
- tipo B: latte buono, caratteristico di bovine a fine lattazione. La coagulazione presamica, tendenzialmente lenta, è seguita da un rapido rassodamento della cagliata che raggiunge in breve un'elevata consistenza;
- tipo C: latte discreto, tipico di bovine all'inizio della lattazione. Ad una fase primaria tendenzialmente rapida segue una lenta formazione del coagulo che non raggiunge nei tempi tecnici d'analisi una sufficiente consistenza;
- tipo E: latte "lento", che coagula in un tempo compreso tra 18,5 e 25 minuti. Tipico di bovine affette da mastiti o da disordini secretori della mammella con elevati livelli di cellule somatiche;
- tipo F: latte di scarso valore tecnologico, che coagula in un tempo compreso tra 25 e 30 minuti (latte molto lento). In questo caso il latte accenna solamente ad un inizio di flocculazione. Si riscontra prevalentemente nel latte di bovine mastitiche con elevati contenuti di cellule somatiche e/o marcata ipoacidità.

Due ulteriori classi, rappresentanti le situazioni estreme, sono state in seguito descritte (Cassandro e Marusi, 2001):

- tipo DD: latte che coagula in meno di 6 min (latte troppo rapido) e da cui deriva un coagulo molto resistente. Si riscontra frequentemente nel latte ipoacido o molto maturo;
- tipo FF: latte che non coagula entro il tempo limite di 30 min della prova e non idoneo alla caseificazione.

Si ritiene che r e A_{30} forniscano indicazioni tecnologicamente utili ai fini della valutazione complessiva del comportamento del latte in presenza di caglio. Tuttavia, dato che questi valori sono tra loro correlati, tali informazioni possono risultare talvolta parziali. Ciò si verifica soprattutto quando ci si allontana dalle normali condizioni acidimetriche di sviluppo della reazione enzimatica, per cui, ad esempio, ad un eccessivo allungamento di r corrisponde quasi automaticamente una riduzione di A_{30} , fatto non necessariamente dovuto a minori contenuti di caseina e/o di fosfato di calcio colloidale, costituenti cui tale caratteristica è in gran parte legata (Mariani et al., 1997).

Il latte che presenta buone proprietà coagulative (ridotto r ed elevati valori di A_{30}) presumibilmente darà più formaggio con una miglior composizione, rispetto al latte con

caratteristiche peggiori in termini di proprietà coagulative (Ikonen et al., 1999a). Secondo alcuni autori, l'A₃₀ influenza la resa casearia, la tessitura (Okigbo et al., 1985b) e l'umidità del formaggio (Johnson et al., 2001), per cui la selezione degli animali diretta al miglioramento genetico delle proprietà coagulative del latte potrebbe rappresentare una maniera efficace per incrementare la sua attitudine alla trasformazione (Ikonen et al., 2004) e quindi la resa, e il pagamento del latte in base al suo profilo lattodinamografico potrebbe rispecchiare meglio l'effettiva resa del latte in formaggio.

Sembra infatti che il latte che coagula velocemente intrappoli più caseina e grassi nella cagliata prima che avvenga la rottura della stessa rispetto al latte con peggiori proprietà coagulative. Le caseine e i grassi costituiscono il 90% della sostanza secca del formaggio per cui la quantità di caseina e grassi persi nel siero hanno un effetto sostanziale nell'efficienza della trasformazione casearia (Ikonen, 2000). Dunque un formaggio prodotto a partire da latte con buone proprietà coagulative presenta un maggior tenore di sostanza secca e un minor contenuto di grassi e caseine nel siero (Ikonen, 1999a).

1.3. Peggioramento delle proprietà di coagulazione del latte

Le proprietà di coagulazione del latte (**MCP**) rappresentano un aspetto fondamentale nella produzione di formaggio, in particolare in quei Paesi dove il settore lattiero-caseario si basa su prodotti tradizionali (Cassandro et al., 2008). Un generale peggioramento delle MCP è stato osservato in diversi Paesi.

Un peggioramento progressivo nel corso degli anni delle MCP, a livello fenotipico, è stato evidenziato da alcuni autori (Mariani et al., 1992; Cassandro e Marusi, 1999; Sandri et al., 2001) per il latte prodotto in allevamenti ubicati in zone tradizionali per la produzione di formaggio in Italia.

Un confronto tra latte svedese prodotto nel periodo 1970-1996 (Lindmark-Månsson et al., 2003) ha evidenziato che sebbene non vi fosse alcuna differenza nella concentrazione di proteine totali, la percentuale di caseina in rapporto alle proteine totali era significativamente diminuita.

Anche se non esistono dati pubblicati sulla variazione delle MCP nel corso degli ultimi decenni, in Finlandia, secondo le osservazioni fatte nei caseifici, la capacità di coagulazione media del latte si è andata deteriorando nel corso degli ultimi 20-30 anni, e l'incidenza delle bovine che producono latte che non coagula entro 30 minuti dall'aggiunta del caglio è aumentata (Ikonen et al., 1999a).

Una stagnazione delle rese casearie, nonostante l'aumento della concentrazione di proteine totali del latte, è stata segnalata anche in Francia (Coulon et al., 2001). Di conseguenza, la resa in formaggio è diminuita, accentuando la necessità di fornire caseifici con un latte maggiormente adatto alla trasformazione.

Negli ultimi decenni l'obiettivo della selezione per la produzione di latte è stato rivolto all'aumento dei kg di proteine del latte, ma il contenuto proteico totale del latte è uno

scarso indicatore di MCP. In uno studio condotto da Ikonen et al. (2004), né proteine, né il contenuto di caseina del latte sono stati ritenuti idonei per la realizzazione di una selezione indiretta volta a migliorare le MCP. La correlazione genetica tra loro era quasi uno, il che indica che il tenore di proteine riflette perfettamente il contenuto di caseina, mentre le correlazioni genetiche tra MCP e tenore di proteina e caseina del latte sono risultate pari a zero.

1.4. Possibilità di miglioramento delle proprietà coagulative del latte

Nell'ultimo decennio, l'attività di selezione delle razze bovine da latte è stata mirata al miglioramento della qualità del latte in termini di tenori di grasso proteina e, recentemente, si è assistito anche alla ridefinizione degli obiettivi di selezione introducendo aspetti di natura tipicamente qualitativa, funzionale e sanitaria. Tuttavia, quest'interesse nei confronti dei caratteri non produttivi richiede informazioni e registrazioni a livello individuale di aspetti non ancora considerati nell'ambito dei controlli funzionali, pertanto attualmente mancano informazioni specifiche relative all'attitudine del latte alla trasformazione casearia. A oggi, infatti, sono disponibili esclusivamente informazioni legate solo indirettamente alla caseificabilità del latte, quali la quantità e la percentuale di materia proteica ed il contenuto di cellule somatiche, mentre mancano informazioni specifiche ed individuali relative l'attitudine del latte alla trasformazione casearia. E' infatti noto ormai da tempo che un aumento delle cellule somatiche determina un peggioramento in termini di resa (Barbano et al., 1991) e che avviene il contrario selezionando del latte con maggior contenuto di caseina (Lucey et al., 1994). Secondo alcuni autori il miglioramento genetico delle MCP potrebbe essere un buon mezzo per migliorare l'efficienza della trasformazione casearia. Pertanto un miglioramento della resa casearia potrebbe essere ottenuto mediante la selezione diretta per tali caratteristiche oppure per mezzo della selezione indiretta di proprietà legate ad esse (Ikonen, 2000). La selezione diretta resta senza dubbio il metodo più efficace data la buona ripetibilità delle MCP anche se si tratta di una misurazione complessa e difficile da rendere routinaria. Ciò significherebbe misurare le MCP, sulla base della loro ripetibilità, almeno tre volte nel corso di una lattazione per ciascun animale (Tyrisevä, 2008), per ottenere una corretta valutazione genetica degli animali.

In anni recenti sono emerse altre tecniche più automatizzate, come la spettroscopia nel medio infrarosso (Dal Zotto et al., 2008), che permetterebbero la misurazione delle MCP in modo routinario, ma ad oggi la determinazione dell'attitudine casearia del latte è ancora un compito piuttosto laborioso per essere applicato su larga scala, tanto che la ricerca sta prendendo in considerazione altri caratteri, associati ad esse, ma di più semplice misurazione. Per esempio, le varianti genetiche delle proteine del latte hanno dimostrato essere associate alla composizione delle proteine e quindi alle proprietà

tecnologiche del latte (Buchberger e Dovč, 2000). Inoltre, la scoperta di geni candidati per la mancata coagulazione del latte (Tyrisevä et al., 2008) potrebbero presentare nuove possibilità di selezione genetica per quanto riguarda il miglioramento delle MCP.

Lo studio della selezione indiretta ha analizzato diversi fattori, tra cui produzione latte, salute della mammella, contenuto in proteina e caseina, pH del latte e prevalenza di latte che non coagula. I risultati hanno indicato che, sebbene questi aspetti in parte influenzino le proprietà coagulative del latte, non determinano un miglioramento effettivo delle MCP tale da poter essere considerati nella selezione (Ikonen, 2004; Tyriseva, 2008).

L'applicazione più immediata delle MCP è ai fini della valutazione del latte conferito ai caseifici. L'utilizzo del profilo lattodinamografico nei sistemi di pagamento del latte infatti, già in uso nei caseifici della zona di produzione del Parmigiano-Reggiano ma anche in alcuni caseifici del Veneto, permetterebbe di assegnare premi ai conferenti il cui latte garantirebbe le rese maggiori.

Tenuto conto di tali opzioni, sarebbe auspicabile migliorare la conoscenza riguardo gli effetti delle MCP sulla resa casearia, che sono stati fino ad ora poco studiati.

1.5. Relazione tra proprietà coagulative del latte e resa casearia

Alla luce del fatto che vi è un crescente interesse verso il possibile impiego della tecnica lattodinamografica quale strumento di valutazione dell'attitudine casearia del latte, ma anche quale obiettivo di selezione indiretto per il miglioramento genetico della resa casearia, nonché carattere di studio per identificare le possibili fonti di variazione dell'attitudine alla trasformazione del latte, lo studio della relazione tra resa casearia e MCP risulta di fondamentale importanza. La relazione tra MCP e resa casearia non è ancora del tutto chiara e sono molto pochi gli studi che hanno riportato gli effetti esercitati dalla lavorazione di latte con diverse caratteristiche lattodinamografiche sulla resa casearia.

In ambito scientifico, vi è un diffuso scetticismo sulla capacità della lattodinamografia di rispecchiare la reale attitudine casearia del latte in ambito industriale, dove i processi di caseificazione prevedono l'utilizzo di starter, acidificazione del latte, tempi di riposo, rottura della cagliata, cottura, formatura, pressatura, ecc. fasi che non sono considerate nell'analisi lattodinamografica, ma soprattutto dove i volumi di latte lavorato sono molto maggiori di quelli usati per l'analisi lattodinamografica.

L'ostacolo maggiore nel condurre esperimenti per mettere in relazione MCP e resa casearia è proprio la misurazione della resa, che implica la presenza di caseifici sperimentali o la collaborazione con realtà produttive nelle quali l'attività di ricerca è difficilmente integrabile. Inoltre, i volumi di latte minimi richiesti per condurre la lavorazione in caldaia o nelle polivalenti di tipo industriale molto spesso impediscono di poter lavorare latte con caratteristiche estreme.

Inoltre, una questione sorta negli anni recenti è se vi sia o meno un effetto lineare delle

MCP e soprattutto del tempo di coagulazione sulla resa casearia, ovvero se lavorando latte caratterizzato da un diverso r (latte con buona vs. scarsa attitudine casearia), si possano rilevare differenze di resa e se mescolando latte a diversa attitudine casearia in proporzioni crescenti, si possa rilevare un analogo comportamento anche sulla resa.

Per rendere più agevole lo studio delle rese casearie, in anni recenti alcuni autori (Shakeel Ur Rehman et al., 1998; Ikonen et al., 1999a; Hynes et al., 2000; Johnson et al., 2001; Othmane et al., 2002; Milesi et al., 2007) hanno condotto delle prove sperimentali utilizzando delle micro-caseificazioni, durante le quali venivano rispettate tutte le fasi di lavorazione che normalmente vengono condotte in caseificio, ma utilizzando volumi di latte da 500 ml a 2 L.

1.6. Fattori che influenzano le proprietà coagulative del latte

Alcuni dei fattori che possono influenzare le MCP del latte individuale sono l'ordine di parto, lo stadio di lattazione, la stagione, il pH e le cellule somatiche del latte. In particolare, lo stadio di lattazione sembra influenzare fortemente le MCP, che mostrano valori molto buoni a inizio e a fine lattazione e i valori peggiori a metà lattazione (Fig. 1.3.) (Ikonen et al., 1999b).

Un recente studio conferma che le proteine del latte, le caseine e le frazioni caseiniche riducono il tempo di coagulazione e incrementano la consistenza del coagulo caseoso (Jõudu et al., 2008). Infatti, il contenuto di grassi, proteine e caseine è parallelo a quello del tempo di coagulazione e della consistenza del coagulo (Ikonen, 2004). Inoltre, valori alti di cellule somatiche sono stati evidenziati negli stessi stadi di lattazione in cui le proprietà coagulative sono peggiori (Ikonen, 2004).

Il pH è stato abbondantemente studiato in relazione alle proprietà coagulative del latte. In letteratura già negli anni '80 si era dimostrata una correlazione positiva tra pH e tempo di coagulazione e una correlazione negativa tra pH e consistenza del coagulo caseoso (Okigbo et al., 1985b). Un pH acido quindi favorisce le MCP.

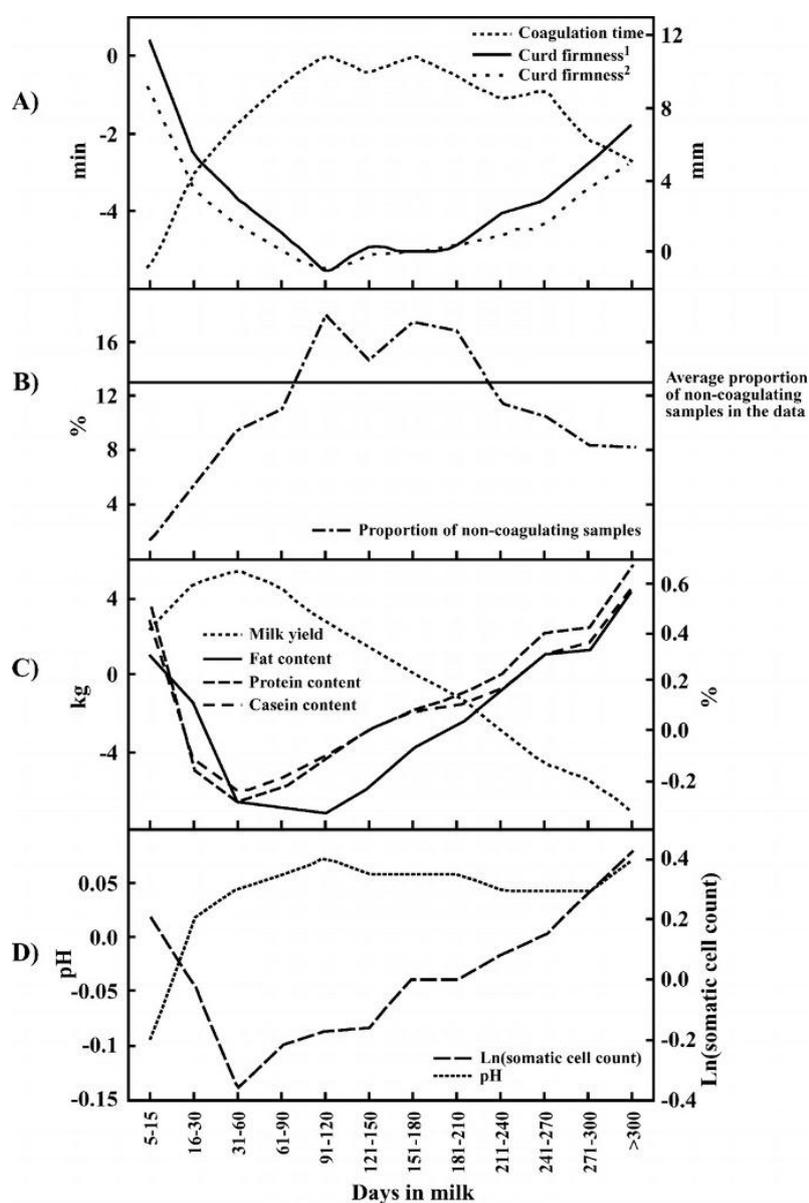
Anche il pH varia nel corso della lattazione, presentando valori molto ridotti nelle prime fasi dopo il parto. Durante il primo terzo di lattazione si assiste ad un incremento del pH che in seguito rimane stabile a valori relativamente alti, come mostrato in figura 1.3.

Ad eccezione dell'ultimissima parte della lattazione, ai cambiamenti di pH seguono quindi dei cambiamenti di r , e a pH più bassi corrisponde una riduzione del tempo di coagulazione (Ikonen, 2004). Abbassando il pH del latte si ottiene la solubilizzazione del fosfato di calcio micellare, la diminuzione della carica netta delle molecole di caseina e la dissociazione della caseina dalle micelle (Najera et al., 2003). L'abbassamento del pH da 7 a 5.2 causa una conseguente riduzione di r , in quanto il pH ottimale per l'idrolisi della κ -CN è tra 5.2 e 5.3 (Najera et al., 2003).

Allo stesso modo A_{30} è fortemente connesso al valore di pH del latte e secondo alcuni autori una riduzione a valori inferiori a 6.4 permette di migliorare notevolmente l' A_{30}

(Okigbo et al., 1985a, Daviau et al., 2000). Valori inferiori a 5.0 non sono però efficienti ai fini della coagulazione presamica (Najera et al., 2003). Anche la temperatura può determinare un aumento della consistenza del coagulo caseoso, addirittura in maniera più marcata rispetto al pH (Kowalchyk e Olson, 1977). Dunque, nella trasformazione casearia vengono utilizzati sia dei batteri lattici per ridurre il pH prima dell'aggiunta del caglio, ma anche l'innalzamento della temperatura del latte che a sua volta permette di ottenere una diminuzione del pH (Okigbo et al., 1985a). Purtroppo, data la mancanza di una strumentazione adeguata per poter misurare il pH in sala di mungitura, il miglioramento genetico delle proprietà coagulative basato sulle informazioni relative al pH risulta purtroppo inattuabile (Ikonen et al., 2004).

Figura 1.3. Andamenti delle proprietà coagulative, del contenuto di grasso e proteina e dei valori di pH durante la lattazione (tratto da Ikonen et al., 2004)

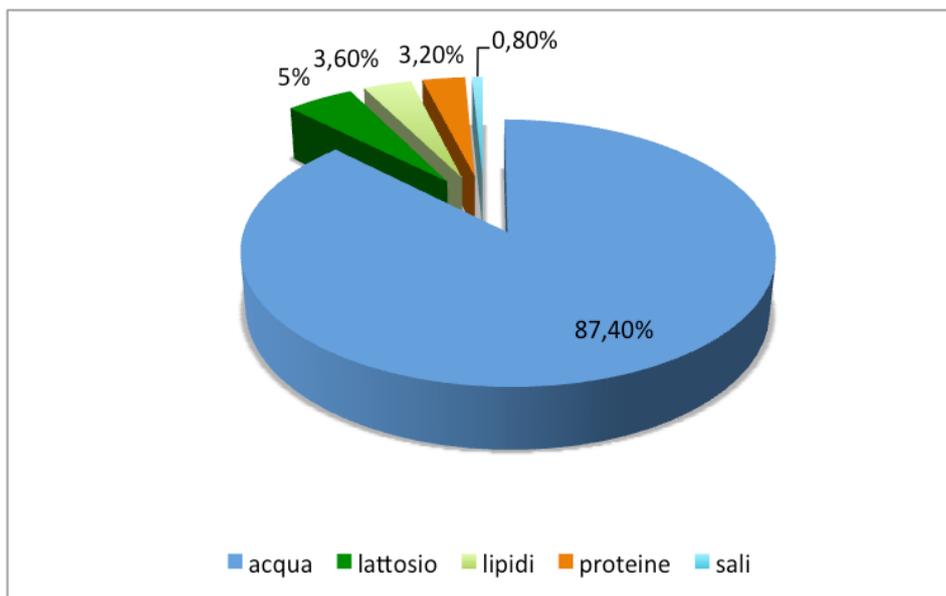


1.7. La proteina del latte e la resa casearia

Le proprietà del latte che sembrano svolgere un ruolo importante nella trasformazione casearia sono tradizionalmente considerate quelle relative alla sua composizione. Quindi ogni fattore ambientale o genetico che incida sulla composizione del latte rappresenta una possibile fonte di variazione della sua attitudine casearia (Aleandri et al., 1990).

Il latte vaccino è costituito per l'87,3% da acqua che quindi rappresenta la frazione più consistente, per il 3,9% da grassi che mostrano notevoli variazioni entro razza, per il 3,2 % da proteine di elevato valore biologico e per il 4,6% da lattosio (Agguggini et al., 2004) (Fig. 1.4.). Il lattosio per anni è stato considerato un componente importante e necessario per la trasformazione casearia nonostante il suo scarso valore. Nel siero infatti, che è un sottoprodotto della lavorazione del formaggio, il lattosio rappresenta addirittura il 70% della sostanza secca (Welper and Freeman, 1992); tuttavia riveste un importante ruolo nella produzione di formaggi in quanto rappresenta un substrato ideale per molte fermentazioni microbiche.

Figura 1.4. Composizione del latte vaccino



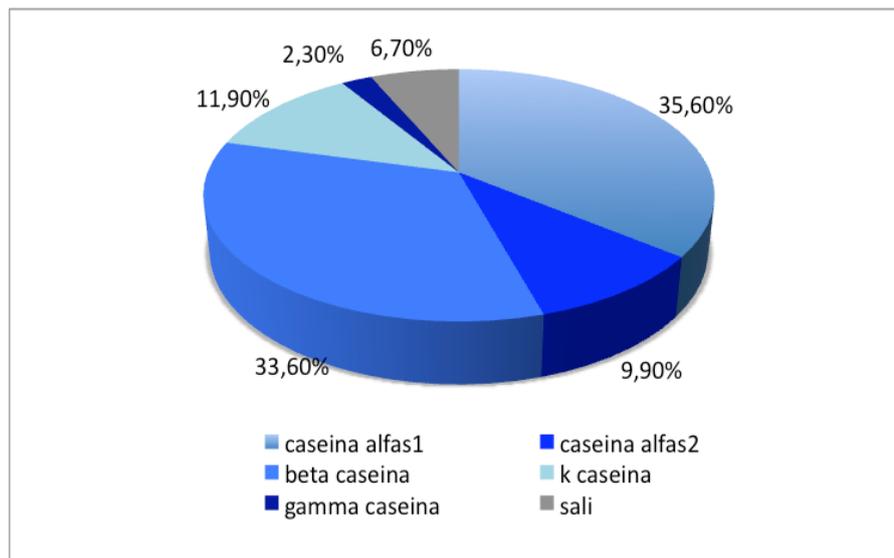
Le principali proteine del latte di bovino sono costituite da caseine, α -lattoalbumina (α -LA), β -lattoglobulina (β -LG), sieralbumina, immunoglobuline, lattoferrina, transferrina, proteine componenti la membrana del globulo lipidico ed enzimi (Agguggini et al., 2004). Per caseine si intende quella parte di fosfoproteine che è insolubile a pH 4.6 a 20°C e rappresentano circa l'80% dell'azoto nel latte mentre il rimanente 20% è costituito da sieroproteine (Jennes et al., 1956; Bordin et al., 2001; Agguggini et al., 2004). Ogni proteina può presentare polimorfismi genetici determinati da alleli autosomici e codominanti i quali hanno mostrato associazioni con i caratteri produttivi e proprietà

nutrizionali e tecnologiche del latte (Formaggioni et al., 1999).

Le caseine possono essere identificate e classificate in quattro famiglie in base alla loro struttura primaria (sequenza aminoacidica): α_{S1} -CN, α_{S2} -CN, β -CN e κ -CN (Fig. 1.5.); già da tempo erano state differenziate tali quattro diverse frazioni in base alla loro mobilità tramite gel elettroforetico (Farrell et al., 2004). Oltre a queste, viene considerata anche una quinta frazione, la γ -CN, che rappresenta però un frammento peptidico ottenuto dalla proteolisi della β -CN ad opera dell'enzima plasmina (Farrell et al., 2004).

La κ -CN, date le sue proprietà anfoteriche è responsabile della formazione delle micelle. Consta di una componente maggiore e un minimo di 6 componenti minori caratterizzate da diversi gradi di fosforilazione e glicosilazione (Farrell et al., 2004). La κ -CN ha la proprietà di stabilizzare l'assetto micellare delle altre caseine distribuendosi sulla superficie periferica della micella mentre le α - e β -CN si riscontrano prevalentemente al centro. Il fosfato di calcio inoltre assume un ruolo importante nel mantenere unite le diverse submicelle (Agguggini et al., 2004). Ogni micella è composta quindi da migliaia di molecole di tutte e quattro le caseine che mantiene le porzioni idrofobiche internamente e espone all'esterno le frazioni idrofiliche della κ -CN (Formaggioni et al., 1999).

Figura 1.5. Composizione della caseina nel latte vaccino



Più del 35% della massa delle micelle caseiniche è in genere rappresentata dall' α_{S1} -CN, che consta di una componente maggiore (chiamata α_{S1} -CN) e di una minore (chiamata α_{S0} -CN). Entrambe le proteine sono polipeptidi a singola catena con la stessa sequenza aminoacidica che differiscono solamente per il diverso grado di fosforilazione (Farrell et al., 2004). La variante più diffusa è l' α_{S1} -CN B che è presente in tutte le razze con una frequenza del 90-95%; solamente in alcune razze come la Jersey, la Bruna, la Reggiana e la Modenese si evidenzia una frequenza inferiore (75-85%) favorendo la variante C (Formaggioni et al., 1999).

L' α_{s2} -CN costituisce solo il 10% delle caseine ed è la più idrofobica e la più suscettibile alla proteolisi da parte degli enzimi plasmina e chimosina (Farrell et al., 2004). Sono note solamente 4 varianti di questa caseina e la più comune nelle razze occidentali è la A (Formaggioni et al.1999).

La famiglia delle β -CN, rappresenta circa il 45% delle caseine del latte bovino ed è piuttosto complessa a causa dell'azione della proteasi endogena plasmina (Eigel et al., 1984). Le varianti più comuni sono la A¹ e A² con una leggera prevalenza della A² nelle razze più numerose. Anche la variante B è molto diffusa, soprattutto nella razza Bruna, sebbene presenti una frequenza inferiore alle prime due (Formaggioni et al.,1999).

La κ -CN invece presenta ben undici varianti genetiche, tra le quali si evidenziano la A e la B che sono predominanti rispetto alle altre. La variante G è presente solo nelle razze alpine mentre la H è stata individuata nella Pinzgauer (Farrel et al.2004).

Le siero proteine sono proteine solubili globulari composte maggiormente da β -LG e α -LA in rapporto 3:1 (Bordin et al., 2001). La β -LG presenta due principali varianti genetiche (A e B) che sono diffuse in tutte le razze. La variante D mostra una frequenza inferiore ed è stata identificata nella Bruna e nella Rendena (Formaggioni et al., 1999). La α -lattoalbumina è importante nella sintesi del lattosio, andando a costituire l'enzima lattosio sintetasi. La variante più comune è la B mentre le varianti A e D sono meno frequenti. Sembra inoltre che vi sia una variante C, ma non è ancora stata confermata (Farrell et al., 2004).

1.8. Minicaseificazioni

Lo studio delle fonti di variazione della resa casearia implica la standardizzazione del processo di caseificazione e la misurazione delle rese in modo agevole, e soprattutto la necessità di ottenere latti sperimentali con caratteristiche quanto più differenti tra loro, che è difficilmente ottenibile nei caseifici, a causa degli elevati volumi di lavorazione.

In letteratura sono riportate diverse procedure per effettuare caseificazioni in laboratorio con quantità ridotte di latte al fine di analizzare degli aspetti relativi ai formaggi prodotti, tra cui rese casearie, composizione, caratteristiche biochimiche e microbiologiche. I diversi protocolli tengono in considerazione le differenti procedure di lavorazione dei formaggi che si vogliono studiare. Nel 2000 alcuni autori hanno prodotto a partire da latte intero pastorizzato formaggi di circa 40 g. La procedura effettuata prevede che si versi il latte di partenza in bottiglie in quantità di 400 ml che viene portato a 32°C e vi si inoculi prima lo starter ed in seguito il caglio. Il tempo di coagulazione si determina facendo oscillare le bottiglie e quindi valutando visivamente l'adesione della cagliata sulle pareti dei contenitori. Successivamente si attende lo stesso tempo (circa 20 minuti) per ottenere la consistenza desiderata ed in seguito si effettua la rottura della cagliata. Secondo la tradizione casearia del Cheddar cheese, a cui gli autori hanno fatto riferimento, le bottiglie si inseriscono in un agitatore meccanico per 20 minuti. La cagliata viene sottoposta a

centrifugazione tre volte per un totale di quasi due ore. In seguito le forme vengono poste in una salamoia al 33% per 5 minuti e successivamente si lasciano stagionare a 12°C per 28 giorni (Hynes et al., 2000).

In un lavoro successivo sul formaggio “Cremoso argentino” sono stati prodotti in laboratorio dei formaggi di 200 g. Il latte utilizzato era latte massale pastorizzato in quantità di 2 litri che, secondo il protocollo, viene introdotto in dei contenitori posti in una vasca d'acqua a 37°C. Dopo l'aggiunta del clorito di calcio e dello starter si attendono 15 minuti prima di introdurre il caglio. La determinazione del tempo di coagulazione e la rottura della cagliata avvengono come detto nel precedente protocollo. Dopo il taglio della cagliata, i frammenti ottenuti vengono lasciati riposare per tre minuti e poi mescolati per cinque minuti; quest'ultima operazione viene ripetuta tre volte. In seguito avviene l'espulsione del siero e la cagliata viene modellata in degli stampi e cotta in un forno a 45°C fino al raggiungimento di un pH pari a 5,2-5,3. Le forme vengono poi messe in salamoia al 20% per dieci minuti. Dopo essere state asciugate, le forme iniziano una stagionatura di sessanta giorni a 5°C (Milesi et al., 2007).

In entrambi i lavori si è deciso di utilizzare un metodo di valutazione visiva da parte di casari esperti per determinare il tempo di coagulazione e quindi il momento migliore per la rottura della cagliata. In un altro studio sul Cheddar cheese addirittura il casaro era ignaro del tempo trascorso e determinava la rottura della cagliata in base al raggiungimento di una determinata consistenza del coagulo caseoso (Johnson et al., 2001). In alcuni studi sulle mini caseificazioni sono stati utilizzati tempi standard per procedere con il taglio della cagliata. In un lavoro sul formaggio pecorino si è deciso di attendere un'ora dopo l'aggiunta del caglio, indipendentemente dalla valutazione visiva da parte del casaro (Othmane et al., 2002) mentre in un'altra pubblicazione sul Cheddar cheese il protocollo prevede che la rottura avvenga dopo 40-50 minuti dall'aggiunta del caglio (Shakeel Ur Rehman et al., 1998). In uno studio volto a valutare l'effetto delle proprietà coagulative del latte di massa sulla resa casearia dell'Emmental, un casaro esperto ha valutato la consistenza del coagulo caseoso con un a spatola però, nonostante vi fossero differenze tra le cagliate prodotte con il latte dotato di migliori proprietà coagulative e quelle con il latte con peggiori proprietà, ha dato inizio alla rottura della cagliata trentacinque minuti dopo l'aggiunta del caglio (Ikonen et al., 1999a).

Già da tempo si riconosce l'importanza di determinare più oggettivamente il momento della rottura della cagliata sia per perfezionare il processo di trasformazione casearia (Richardson et al., 1985) che per standardizzare le procedure di laboratorio. Una nuova tecnologia per il monitoraggio on-line della coagulazione del latte e l'espulsione del siero è stata studiata per migliorare la qualità del formaggio mediante l'utilizzo di sensori a retrodiffusione CoAguLite (Fagan et al., 2007) ed è stata utilizzata in questa tesi per standardizzare la trasformazione casearia. Questi strumenti sono in grado di determinare il T_{max} , ovvero il parametro che indica il momento in cui l'aggregazione delle caseine è al suo massimo (O'Callaghan et al., 2002).

2. Obiettivi

Dato l'incremento dell'interesse per le proprietà coagulative del latte ai fini di aumentare le rese casearie risulta importante verificare l'effettivo vantaggio che un miglioramento dell'attitudine casearia, così come viene attualmente valutata, apporterebbe all'industria lattiero casearia.

La caseificazione stessa rappresenta un ostacolo per la valutazione delle relazioni tra le proprietà di coagulazione del latte e la resa casearia essendo un processo particolarmente complesso. Una possibile soluzione a questo problema è l'utilizzo di minicaseificazioni sperimentali che permettono in primo luogo la lavorazione di latte con caratteristiche estreme, dato il ridotto volume di lavorazione impiegato, e secondariamente rendono possibile una maggiore standardizzazione e controllo dell'intero processo di caseificazione e un costante monitoraggio della resa casearia.

Spesso tali procedure non sono compatibili con la realtà industriale dei caseifici, nei quali risulta difficoltoso valutare le rese ottenute a partire da latte con caratteristiche estreme a causa degli elevati volumi di latte lavorato.

La presente tesi si propone quindi di valutare l'effetto delle proprietà di coagulazione del latte sulla resa casearia mediante minicaseificazioni sperimentali verificando se vi sia un effetto lineare del tempo di coagulazione del latte sulla resa casearia ottenuta.

3. Materiale e metodi

3.1. Composizione delle tesi sperimentali

3.1.1. Campionamento preliminare

La raccolta dei campioni di latte per la presente sperimentazione è avvenuta tra gennaio e giugno del 2010 presso l'Azienda Agraria Sperimentale "Lucio Toniolo" dell'Università di Padova. Lo studio prevedeva 5 caseificazioni ad intervalli di un mese che sono state effettuate in un minicaseificio sperimentale situato nella stessa azienda. Al fine di creare delle tesi sperimentali caratterizzate da diversi tempi di coagulazione, prima di ciascuna mini-caseificazione si è proceduto ad un'analisi preliminare del latte prodotto da ciascuna bovina in lattazione presente in azienda.

I campionamenti preliminari, ciascuno condotto pochi giorni prima della giornata destinata alla minicaseificazione, hanno riguardato un totale di 187 campioni di latte individuali. Le bovine campionate appartenevano a nove razze differenti (Frisona Italiana, Jersey, Bruna Italiana, Grigio Alpina, Burlina, Pezzata rossa Italiana, Pinzgauer, Pustertaler, Rendena) ed erano eterogenee per ordine di parto e stadio di lattazione.

Un'aliquota di conservante (Bronopol, 2-bromo-2-nitropropan-1,3-diol, 0.35 ml, 0.6:100 v/v) è stata immediatamente aggiunta al campione al momento del prelievo per ridurre la crescita microbica. I campionamenti si sono effettuati nelle mungiture del mattino e il latte è stato trasportato a fine mungitura direttamente al laboratorio DNA del Dipartimento di Scienze Animali dell'Università di Padova, nel quale sono state effettuate le analisi lattodinamografiche. Le analisi sono state condotte entro poche ore dalla raccolta dei campioni.

3.1.2. Analisi pH e LDG

Presso il laboratorio DNA si è svolta l'analisi del pH dei singoli campioni (pH-Burette 24, Crison, Barcellona, Spagna). Terminata la misurazione del pH si è proseguito con l'analisi lattodinamografica mediante l'uso di un Computerized renneting meter (CRM-48, Polo Trade, Monselice, PD).

Utilizzando una pipetta elettrica dieci pozzetti sono stati riempiti con 10 ml di latte e posizionati su una piastra riscaldata per essere portati ad una temperatura di 35°C. Nei campioni a temperatura sono stati aggiunti con dei cucchiari 0,2 ml di soluzione di caglio (Hansen standard 160, 80% chimosina, titolo 1:14,900, Pacovis Amrein AG, Berna, Svizzera) diluito con acqua distillata (1.6% vol/vol) e sono stati mescolati con decisione. I pozzetti sono stati in seguito posti sotto ai pendoli del modulo di misura del CRM. L'analisi inizia nel momento in cui viene aggiunto il caglio e ha una durata complessiva di 31 minuti. I parametri relativi alle proprietà coagulative vengono rilevati in base alla variazione di ampiezza dell'oscillazione del pendolo causata dalle variazioni di consistenza

del coagulo. I dati registrati sono il tempo di coagulazione (r) e la consistenza del coagulo caseoso (A_{30}).

3.1.3. Selezione degli animali

In base ai risultati del CRM sono state selezionate le 6 bovine con il miglior tempo di coagulazione (r) e le sei bovine con il peggior r .

Sono state escluse dalla selezione le vacche in fase colostrale e quelle che presentavano una mastite clinicamente rilevabile o trattate per mastite e soggette alle restrizioni imposte dai tempi di sospensione. Dalla selezione sono state esclusi anche gli individui il cui latte era non coagulato.

Il latte delle 6 bovine con i tempi di coagulazioni più favorevoli, mescolato in parti uguali, ha costituito la prima tesi sperimentale (T100). Analogamente, il latte ottenuto dalle 6 bovine con MCP peggiori ha costituito una seconda tesi sperimentale (T0). Il latte di queste due tesi è stato poi miscelato in proporzioni diverse per ottenere due tesi con caratteristiche intermedie.

Le tesi oggetto di questo studio erano quindi 4: T100, costituita dal latte miscelato ottenuto con il contributo delle sei bovine con i migliori r in proporzioni uguali; T0, che comprendeva il latte delle bovine con i peggiori r in proporzioni uguali; T67, ottenuta miscelando un 67% di T100 con un 33% di T0; T33, costituita da una miscela di latte in cui T0 contribuiva con il 67% mentre T100 con il 33%.

A parità di caratteristiche lattodinamografiche del latte, sono state scelte le bovine che permettevano di bilanciare per quanto possibile le tesi estreme per contenuto di grasso e proteina al fine di ridurre l'influenza che esercitano tali fattori sulla resa casearia (Bertoni et al., 2001; Wedholm et al., 2006; Jöudu et al., 2008).

3.2. Mini caseificazione

3.2.1. Preparazione delle tesi sperimentali

Durante la mungitura del mattino sono stati prelevati 4 litri di latte per ogni singola bovina selezionata sulla base dei risultati del campionamento preliminare e un campione di 50 ml di latte con conservante per effettuare l'analisi lattodinamografica (Fig. 3.1.).

Nel minicaseificio, ubicato nella stessa Azienda Agraria Sperimentale "L.Toniolo", subito dopo la mungitura, il latte delle sei bovine con i migliori tempi di coagulazione è stato mescolato per ottenere la tesi T100 e il latte delle sei bovine con i peggiori tempi di coagulazione è stato miscelato per formare la tesi T0.

Entrambe le tesi erano costituite di 10 litri di latte con contributo uguale del latte dei singoli individui. Le tesi T67 e T33 sono state preparate nello stesso momento mediante la miscelazione in diverse proporzioni delle tesi T100 e T0 però mantenute a temperatura di refrigerazione fino all'inizio della caseificazione, ovvero all'incirca un'ora dopo l'inizio della lavorazione delle prime due tesi.

Dal latte miscelato delle quattro diverse tesi sperimentali sono stati misurati pH e temperatura e successivamente è stato prelevato un campione di 50 ml di latte a cui si è aggiunto il conservante che è stato inviato al laboratorio per effettuare l'analisi al CRM nella stessa mattinata della caseificazione.

3.2.2. Minicaseificazione

Il latte delle tesi sperimentali è stato trasformato per la produzione di un formaggio semistagionato e semicotto, con maturazione di 90 giorni e con cottura della cagliata a temperatura di 38°C, nel minicaseificio dell'Azienda Agraria Sperimentale "L.Toniolo", tramite l'utilizzo di 4 mini-caldaie della capacità di 10 L (Cuve à fromage 10L, Pierre Guérin Technologies, Mauze, France) connesse ad un sensore a fibre ottiche (CoAguLite™, Reflectronics, Inc., Lexington, KY, USA) utilizzato per monitorare la coagulazione del latte. Il latte non ha subito alcun trattamento termico o di scrematura prima della lavorazione.

Figura 3.1. Prelievo mediante secchi del latte individuale e preparazione dei campioni.



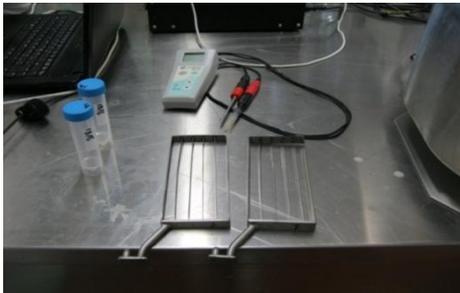
Il latte è stato versato in caldaia e portato alla temperatura di 32°C. Dopo aver atteso 30 minuti circa perché la temperatura si stabilizzasse sono stati aggiunti 2 g di starter liofilizzato per caldaia (DELVO-TEC LL-50 X DSL starter cultures, DSM Food Specialties, Delft, Olanda) (Fig. 3.2.). Il tempo di incubazione dello starter era pari a 40 min, al quale seguiva la misurazione del pH e della temperatura post-starter. Terminata questa operazione si procedeva con l'aggiunta del caglio liquido (Caglio Camoscio® clb 105/75, DSM Food Specialties, Delft, Olanda) in quantità di 4 ml per ciascuna caldaia, diluito con acqua distillata (diluizione 1:9).

Figura 3.2. Aggiunta dello starter



Il momento preciso per la prima rottura della cagliata veniva individuato grazie all'ausilio del software CoAguLite™, il cui principio di funzionamento sarà illustrato più in dettaglio in seguito. La rottura della cagliata era di tipo meccanico e veniva effettuata grazie a dei coltelli precedentemente inseriti nella caldaia (Fig. 3.3.). Questa operazione di taglio veniva effettuata altre tre volte per un totale di quattro tagli intervallati da pause per lasciar riposare la cagliata. Il primo e il secondo taglio erano della durata di 15 secondi alla velocità di 30 rpm a cui seguiva una sosta di 1 minuto. Il terzo taglio invece avveniva alla velocità di 40 rpm per 15 secondi e veniva fatta una pausa di 5 minuti. L'ultimo taglio aveva una durata di 45 secondi alla velocità di 40 rpm. In corrispondenza dell'ultimo taglio i bagni termostati venivano settati alla temperatura di 39°C in previsione della cottura della cagliata. Dopo l'operazione di rottura, i frammenti della cagliata tendono ad unirsi saldamente tra di loro, precipitando sul fondo della caldaia e formando la vera e propria "massa caseosa" con un processo che si chiama sineresi della cagliata. La massa caseosa inizia a contrarsi lasciando trasudare il siero, ricco in lattosio, vitamine e sali minerali solubili.

Figura 3.3. Rottura meccanica della cagliata mediante coltelli



Lo spurgo del siero (3 litri) veniva effettuato mediante l'apertura di un foro in ciascuna caldaia (Fig. 3.4.). In seguito venivano versati 3 litri d'acqua alla temperatura di 55°C per portare la cagliata a 38°C. Il tutto veniva poi agitato per 5 minuti. Dopo 5 minuti il siero veniva completamente scaricato dalla caldaia e la cagliata veniva coperta con del materiale plastico per evitare che si raffreddasse. Dopo 7 minuti, la cagliata veniva tagliata in tre pezzi per favorire la completa fuoriuscita del siero e quindi lasciata riposare per altri 8 minuti. Successivamente la cagliata veniva posta su tre fascere in modo tale da ottenere tre formelle per caldaia (Fig. 3.5.). Le formelle così ottenute erano sottoposte a pressatura con pressioni pari a 3 bar (pressa formaggi inox, OMT, Triaca s.r.l., Prata C.(SO), Italia) per un totale di 5 ore e 20 minuti, intervallata da tre rilevazioni del peso. La prima pesata veniva effettuata dopo 20 minuti di pressatura, la seconda dopo 2 ore di pressatura e la terza dopo 3 ore, mediante una bilancia di precisione (Bilancia Gibertini Elettronica s.r.l., mod. TM 4600 AR, Novate, Milano, Italia). Terminata questa operazione, le forme venivano trasferite in salamoia ad una concentrazione del 20% di NaCl per 5 ore (Fig. 3.5.), previa iscrizione del numero e della lettera identificativi.

Figura 3.4. Spurgo del siero e disposizione della cagliata nelle formelle



Terminata questa operazione le forme erano poste in un incubatore (incubatore per prova di stabilità mod. M 250-RH, mpm instruments s.r.l., Bernareggio, Italia) alla temperatura costante di 15°C e con un'umidità relativa pari all'80%, per 90 giorni. Le forme venivano quindi pesate al termine della salamoia, dopo 24 ore dalla salamoia, al 7°, 14°, 30°, 45°, 60°, 75° e 90° giorno di maturazione. I formaggi prodotti venivano rivoltati dopo 24 ore e altre due volte ogni 7 giorni nelle due settimane successive. La prima pulizia è stata eseguita dopo 15 giorni dalla produzione impiegando una soluzione salina al 20% e successivamente con cadenza settimanale fino al termine della maturazione.

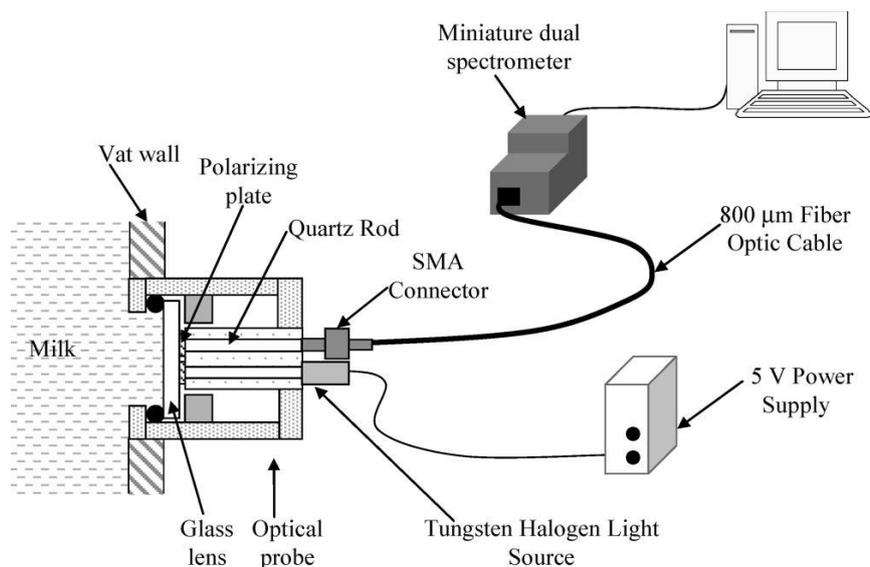
Figura 3.5. Pressatura delle forme e salamoia



3.2.3. Identificazione del tempo di coagulazione nelle mini-caldaie

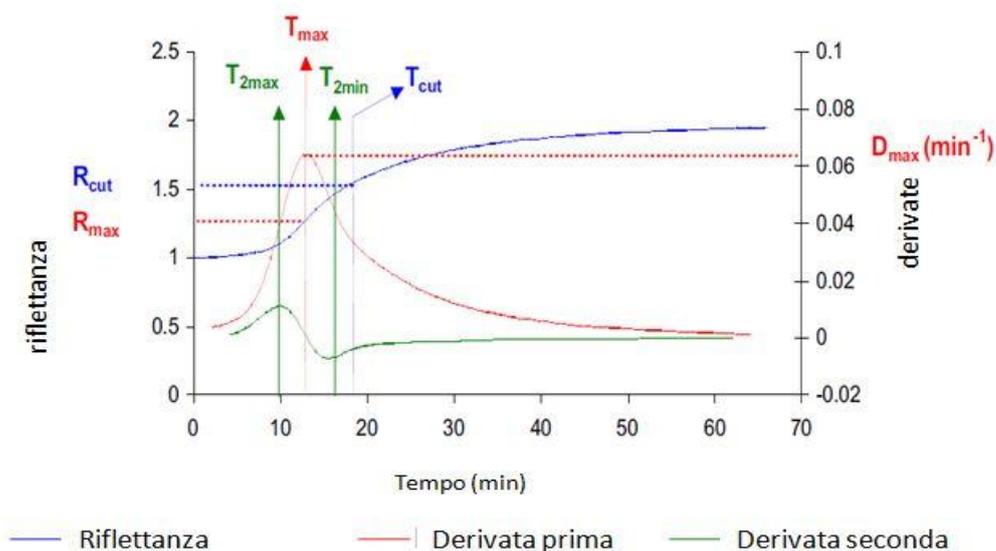
Per monitorare la coagulazione e la sineresi e per determinare il tempo di coagulazione e di rottura della cagliata è di fondamentale importanza l'utilizzo di un sistema di analisi in tempo reale di parametri relativi alla trasformazione casearia. La completa automazione del processo di caseificazione dipende dallo sviluppo della tecnologia di monitoraggio delle sue singole fasi, che influenza la qualità del formaggio e che permette di standardizzare le procedure (Fagan et al., 2007b). In questo studio, il momento della "presa della cagliata", cioè il momento che corrisponde all'inizio della coagulazione del latte nelle caldaie, è stato individuato mediante l'utilizzo di un sensore a fibre ottiche (CoAguLite, Reflectronics, Inc., Lexington, KY, USA) inserito nella parete della caldaia (Fig. 3.6.).

Figura 3.6. Schema dello strumento ottico (CoAguLite) usato per identificare il tempo di coagulazione all'interno delle mini-caldaie (tratto da Fegan et al., 2007)



Il sensore utilizza le radiazioni con lunghezza d'onda di 880 nm e consiste in due fibre ottiche del diametro di 600 µm. Una fibra trasmette la radiazione infrarossa nel campione di latte mentre l'altra fibra trasmette la radiazione riflessa dalle particelle presenti nel latte a un rilevatore di fotoni (Fagan et al., 2007). In questo modo è possibile calcolare la riflettanza, ovvero il rapporto tra l'intensità del flusso radiante riflesso dalle particelle del latte e l'intensità del flusso ad esse incidente. Il voltaggio è stato misurato ogni 2 secondi, registrando la media di tre misure consecutive. La media delle prime dieci registrazioni di voltaggio corrette rispetto al valore di partenza di riflettanza ha costituito il voltaggio iniziale.

Figura 3.7. Tipico profilo di riflettanza fornito dal CoAguLite (tratto da Castillo et al., 2003)



Il sistema ha calcolato in tempo reale la riflettanza (R), che variando con il tempo ha costituito il profilo di riflettanza (Fig. 3.7.). La riflettanza è stata calcolata dividendo il voltaggio nel tempo t per il voltaggio iniziale. Si è anche calcolato in tempo reale la derivata prima di R rispetto al tempo t (R'). In forma analoga è stata calcolata anche la derivata seconda (R''). I parametri ottenuti a partire dal profilo di riflettanza sono: T_{max} , tempo che intercorre tra l'aggiunta del caglio e il valore massimo di R' , espresso in min; D_{max} , valore massimo di R' , espresso in min^{-1} ; R_{max} , riflettanza al tempo T_{max} che è adimensionale; T_{2min} , tempo che intercorre tra l'aggiunta del caglio e il valore minimo di R'' , espresso in min (grafico n) (Castillo et al., 2003). Nel presente studio, T_{max} è stato utilizzato come indicatore dell'inizio della coagulazione e, al fine di standardizzare la procedura di caseificazione, la rottura della cagliata è stata effettuata ad un tempo standard (T_{cut}) pari a 4 minuti dopo T_{max} .

3.3. Analisi chimiche

Un campione di 50 ml di latte a cui è stato aggiunto il conservante (Bronopol, 2-bromo-2-nitropropan-1,3-diol, 06:100 vol/vol) e un campione di siero sono stati prelevati da ciascuna tesi sperimentale e trasportati in mattinata al laboratorio DNA del Dipartimento di Scienze Animali, adeguatamente conservati a temperatura di refrigerazione.

I campioni di latte sono stati analizzati mediante HPLC per la composizione della proteina, è stata eseguita la misurazione del pH e sono stati oggetto di analisi lattodinamografica. Anche il siero delle quattro tesi è stato campionato per analizzarne la composizione proteica.

Oltre alla composizione proteica analizzata mediante HPLC, sui campioni di latte sono stati misurati la percentuale di proteina, di grasso, di caseina e di lattosio, i solidi totali, l'urea e l'acido citrico mediante spettroscopia nel medio infrarosso (MilkoScan FT 120, type 71200, Foss Electric, Padova, Italia). La stessa strumentazione è stata utilizzata per il siero per la determinazione del contenuto di grassi, di proteina, di lattosio e dei solidi totali. Mediante NIR (Near Infrared Reflectance), ulteriori analisi sono state effettuate sulla cagliata per la determinazione dell'umidità, dei solidi totali, del contenuto di grassi, di proteine e di grasso su sostanza secca (FoodScan™ Dairy Analyser, Foss Electric, Padova, Italia).

3.3.1. Composizione della proteina del latte lavorato

L'analisi per la composizione della proteina è stata effettuata su tutti i campioni prelevati da ciascuna tesi sperimentale per separare e quantificare le diverse frazioni caseiniche e sieriche del latte fornendo la quantificazione delle varianti A_1 , A_2 , B e I della β -CN, A e B della κ -CN e A, B della β -LG. Le analisi sono state condotte utilizzando la strumentazione HPLC (high performance liquid chromatography), secondo il metodo proposto da Bonfatti et al. nel 2008.

La strumentazione consisteva di un cromatografo Agilent serie 1100 (Agilent Technologies)

fornito di pompa binaria (Agilent serie 1100, G1312A). Come rilevatore, è stato utilizzato un detector UV (Agilent serie 1200, G1314B). Il controllo del sistema, nonché l'acquisizione e l'elaborazione dei cromatogrammi è stato operato dal software Agilent Chem Station for LC Systems. La separazione delle proteine del latte avveniva tramite l'utilizzo di una colonna analitica a fase inversa C8 (Zorbax 300SB-C8 RP, Agilent Technologies) con un riempimento a base di silice (3,5 μm 300Å, 150x4,6 I.D.). Un Security Guard Cartridge System (prodotto n° AJ0-4330, Phenomenex) è stato impiegato come precolonna (widepore, C4 4x3,0 mm). I campioni in attesa dell'analisi venivano mantenuti a una temperatura di 4°C per mezzo di un refrigeratore liquido (Agilent serie 1200, G1330B) e iniettati con autocampionatore (Agilent serie 1200, G1329 A). Per ottenere il giusto gradiente di eluizione, che permette la separazione delle diverse frazioni, è stata utilizzata la miscela di due solventi, A e B. Il solvente A era composto da 0,1% di acido trifluoroacetico (TFA) in acqua ultrapura. Il solvente B era invece composto da 0,1% TFA in acetonitrile. Ogni singola corsa aveva una durata di 36 minuti, il flusso era pari a 0,5 ml/min e la colonna durante l'analisi veniva mantenuta alla temperatura costante di 45°C. La rilevazione è stata effettuata alla lunghezza d'onda di 214 nm.

Il metodo prevedeva di aggiungere al campione un'aliquota di buffer nel rapporto di 1:1 (v:v). Il buffer era costituito da Bis Tris Buffer 0,1M, guanidina idrocloruro 6M, sodio citrato 5,37mM e ditiotreitolo 19,5M. Dopo un'incubazione di un'ora a temperatura ambiente, il campione è stato centrifugato per 5 min a 4°C, a 14.800 rpm, permettendo l'affioramento del grasso, successivamente allontanato con una spatola. Un'aliquota del soluto veniva prelevata e aggiunta di una soluzione (3:1; v:v) di guanidina idrocloruro 4,5M e solvente C (acetonitrile, acqua e acido trifluoroacetico nel rapporto di 100:900:1; v:v:v). Il campione così preparato veniva filtrato nei vials e iniettato.

La caseina totale è definita come la somma delle frazioni α_{S1} -CN, α_{S2} -CN, β -CN, κ -CN, mentre le siero-proteine totali sono calcolate come la somma di α -LA e β -LG. La proteina totale viene espressa come la somma di caseine e siero-proteine e l'indice caseinico, infine, viene calcolato come il rapporto tra caseina e proteina totale.

3.4. Analisi statistica

3.4.1. Stima degli effetti della tesi sperimentali sulle variabili considerate

L'effetto delle tesi sperimentali sulle variabili di composizione del latte e sulle caratteristiche lattodinografiche, composizione del siero e della è stato stimato usando la procedura GLM di SAS (versione 9.2, SAS Institute Inc., Cary NC). Il modello lineare includeva i seguenti fattori:

$$y_{ijk} = \text{DAY}_i + \text{TESI}_j + e_{ijk}$$

Dove:

y_{ijk} sono le variabili dipendenti (composizione del latte, del siero, della cagliata e MCP);
 DAY_i è l'effetto fisso della data di caseificazione (5 livelli);
 $TESI_j$ è l'effetto fisso della tesi sperimentale valutata (4 livelli);
 e_{ijk} è il termine d'errore.

Lo studio della linearità della composizione e delle caratteristiche lattodinamografiche in relazione alle miscele del latte eseguite per ottenere le 4 tesi sperimentali è stato effettuato tramite l'utilizzo di contrasti ortogonali (opzione *contrast* della PROC GLM di SAS).

3.4.2. Stima dell'effetto delle tesi sperimentali sulla resa casearia

Lo studio dell'effetto esercitato dalle tesi sperimentali sulla resa casearia è stato effettuato tramite l'utilizzo della procedura GLM di SAS (versione 9.2, SAS Institute Inc., Cary NC), con lo stesso modello usato per valutare le differenze di composizione tra tesi sperimentali. Questo modello è stato usato come indagine preliminare per evidenziare eventuali differenze di resa presenti entro ciascun intervallo di stagionatura valutato.

3.4.3. Stima dell'effetto delle tesi sperimentali sulla cinetica della resa casearia

L'effetto delle tesi sperimentali sulla cinetica della resa casearia è stato stimato usando la procedura GLM di SAS (versione 9.2, SAS Institute Inc., Cary NC). La curva di cinetica della resa casearia è stata modellizzata secondo una curva logaritmica del tempo di stagionatura. Il modello lineare generalizzato includeva i seguenti fattori:

$$y_{ijkl} = DAY_i + TESI_j + (DAY \times TESI)_{ij} + TIME_k + (TIME \times TESI)_{jk} + e_{ijkl}$$

Dove:

y_{ijkl} sono le variabili dipendenti (resa casearia misurata a diversi periodi di stagionatura);
 DAY_i è l'effetto fisso della data di caseificazione (5 livelli);
 $TESI_j$ è l'effetto fisso della tesi sperimentale valutata (4 livelli);
 $(DAY \times TESI)_{ij}$ è l'effetto fisso dell'interazione tra data di caseificazione e tesi;
 $TIME_k$ è l'effetto del logaritmo dei giorni di stagionatura;
 $(TIME \times TESI)_{jk}$ è l'effetto dell'interazione tra logaritmo dei giorni di stagionatura e tesi;
 e_{ijkl} è il termine d'errore.

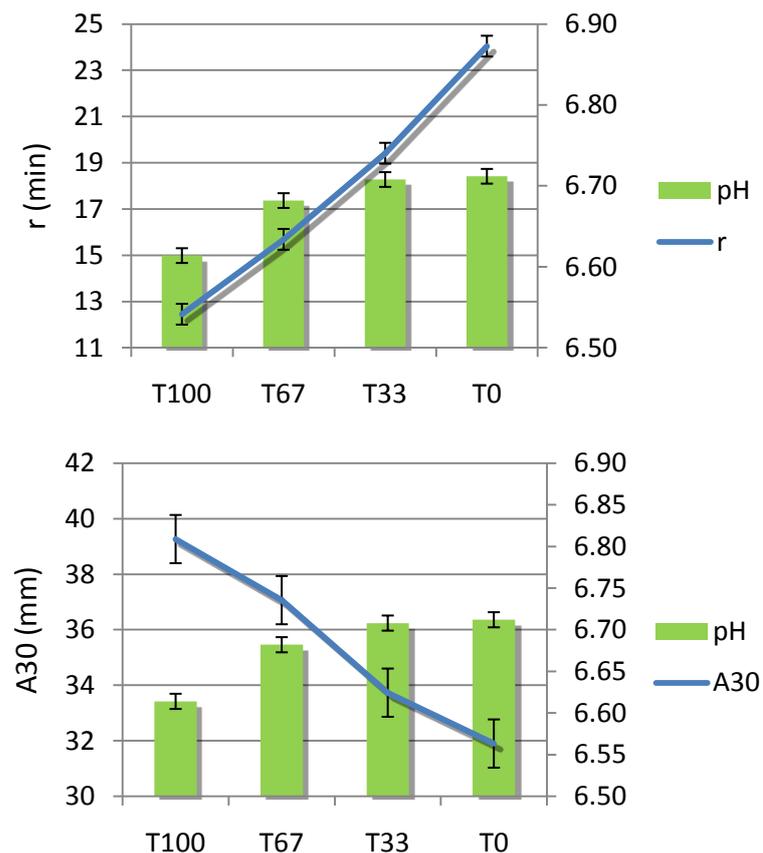
L'effetto della data di caseificazione e della tesi sono stati testati sulla linea d'errore dell'interazione $DAY \times TESI$ mentre l'effetto del tempo di stagionatura e l'interazione $TIME \times TESI$ sono stati testati sull'errore residuo del modello.

4. Risultati e discussione

4.1. Caratteristiche lattodinamografiche e pH delle tesi sperimentali

Le caratteristiche lattodinamografiche del latte prelevato dalle mini-caldai durante le caseificazioni e del latte individuale campionato nelle giornate delle selezioni sono risultate invariate e non si sono verificate deviazioni significative rispetto ai valori attesi (dati non riportati). Dai campioni preliminari analizzati mediante CRM sono state selezionate le bovine per comporre le due tesi estreme le cui medie di r erano rispettivamente 12.44 minuti per la tesi T100 e 24.39 minuti per la T0, mentre le tesi intermedie non si sono discostate significativamente dalle proporzioni attese (67:33 e 33:67) sia per r che per A_{30} . Questo risultato indica che miscelando il latte con minor attitudine alla coagulazione con latte con buone caratteristiche coagulative si otterrà un miglioramento delle MCP, considerazione in disaccordo con quanto riportato in letteratura, dalla quale emerge una relazione non lineare tra latti con diverse MCP e sembra che l'aggiunta di latte con buone MCP fornisca soltanto lievi miglioramenti dell'attitudine casearia del latte con scarse MCP (Okigbo et al., 1985d).

Figura 4.1. Relazione tra pH e tempo di coagulazione (r) e tra pH e consistenza del coagulo (A_{30}).



Le 4 tesi sperimentali, create scegliendo latte a diverso r , erano effettivamente caratterizzate da un diverso tempo di coagulazione e da una diversa consistenza del coagulo ($P < 0.001$) misurati tramite LDG, confermando la riuscita della selezione (Fig. 4.1). Le tesi con r più ridotto hanno mostrato avere una maggiore consistenza del coagulo, in accordo con quanto riportato da studi precedenti (Okigbo et al., 1985b; Ikonen et al., 2004; Comin et al., 2005; Dal Zotto et al., 2008; Cassandro et al., 2008; Jöudu et al., 2008). Tale fenomeno è spiegato dal fatto che la coagulazione e il rassodamento sono due stadi consecutivi dello stesso processo e, dato che l'analisi LDG prevede un tempo limitato (30 min) per la misurazione di r e A_{30} , i campioni che coagulano in un tempo più breve sono quelli che otterranno una consistenza migliore.

Anche il pH ha mostrato differenze significative ($P < 0.001$) tra tesi sperimentali, assumendo valori più bassi in corrispondenza delle tesi con r più breve, in accordo con quanto riportato da diversi autori (Kowalchuk et al., 1977; Okigbo et al., 1985 a ; Okigbo et al., 1985 b; Bastian et al., 1991; Daviau et al., 2000; Ikonen, 2000; Najera et al., 2003; Ikonen et al., 2004; Comin et al., 2005; Tyrisevä, 2008), e aumentando in modo non lineare rispetto alle miscele effettuate (Fig. 4.3.). Il pH è un parametro che riveste un ruolo particolarmente importante nella coagulazione del latte in quanto correlato negativamente con r e positivamente con A_{30} . In letteratura, la correlazione riportata tra pH e R assume valori compresi tra 0.29 e 0.58 (Okigbo et al., 1985 b; Ikonen et al., 2004; Cassandro et al., 2008; Jöudu et al., 2008).

Con la riduzione del pH le micelle di caseina subiscono cambiamenti chimico fisici tali da rendere l'acidificazione del latte una pratica comune anche nelle tecnologie casearie che si basano sulla coagulazione presamica. La concentrazione idrogenionica assume un significato molto importante in tutte le fasi della coagulazione: reattività tra caseina e caglio, velocità di aggregazione delle micelle di paracaseina (tempo di rassodamento del coagulo), consistenza e capacità di sineresi della cagliata. Riducendo il pH del latte infatti si raggiungono i valori ottimali per la stabilità e la attività della chimosina (5.5-6.0), enzima responsabile della prima fase della coagulazione. La chimosina rompe il legame peptidico 105-106 della κ -caseina che, di conseguenza, perde la sua porzione C-terminale fortemente idrofila, ricca di acido sialico (glicomacropeptide) e, quindi, anche la proprietà di proteggere le caseine α_{s1} , α_{s2} e β dall'azione precipitante degli ioni calcio (Mariani et al., 2001). L'acidificazione in generale favorisce anche lo sviluppo della fase secondaria, sia direttamente, in conseguenza della diminuzione di stabilità delle micelle di paracaseina (processo di neutralizzazione delle cariche) (de Kruif, 1999), sia indirettamente attraverso la liberazione degli ioni calcio dai relativi composti solubili e colloidali. Il pH inoltre solubilizza il fosfato di calcio colloidale che mantiene la stabilità delle sub micelle e, insieme alla temperatura, regola l'equilibrio tra fosfato di calcio solubile e colloidale nel latte (Zhang and Aoki, 1996; Schrader et al., 1997). Alcuni autori riportano che, in seguito alla riduzione del pH, le forze responsabili dell'integrità della micella priva di fosfato di calcio colloidale sono molto diverse rispetto a quelle del latte a pH normale (Lucy e Singh,

1998). Quando il coagulo si ottiene per via "prevalentemente" enzimatica, l'abbassamento del pH rende più incisiva l'azione del caglio e provoca una parziale solubilizzazione dei sali di calcio; ciò, entro limiti ben determinati, favorisce la formazione di legami secondari tra le micelle di paracaseina e i filamenti del reticolo, migliorando la capacità di contrazione, la permeabilità e, in definitiva, la eliminazione del siero. Intorno a valori pari a 6,0-6,2, però, a causa della demineralizzazione delle micelle, l'effetto benefico del pH viene completamente meno e la forza del coagulo diminuisce in misura considerevole (Mariani et al., 2001).

Un altro fattore che influenza la stabilità delle micelle è la temperatura, sia indirettamente riducendo il pH del latte, sia direttamente, essendo la carica superficiale delle micelle caseiniche fortemente temperatura-dipendente. Come descritto in letteratura la carica superficiale alla temperatura di 60°C è approssimativamente pari a 0, pertanto aumenta la velocità di aggregazione micellare e il tasso di legami tra aggregati micellari che andranno a costituire il gel caseinico (Okigbo et al., 1985a). Per lo stesso motivo anche il grado di liberazione delle caseine dipende dalla riduzione del pH è strettamente legato alla temperatura. A 30° infatti un abbassamento di pH virtualmente non causa liberazione di caseine, mentre a 4°C, circa il 40% delle caseine vengono rilasciate nel siero a pH 5.5 (Lucy e Singh, 1998). Nel presente studio quindi, al fine di favorire l'aggregazione micellare, si sono portate tutte e quattro le tesi alle temperature di 35°C in laboratorio per eseguire le analisi lattodinamografiche, e 32°C in caseificio per effettuare le caseificazioni sperimentali. In questo modo si è cercato inoltre di limitare le variazioni nelle proprietà del latte determinate da tale fattore.

4.2. Composizione del latte delle tesi sperimentali

Le statistiche descrittive della composizione e delle caratteristiche del latte appartenente alle 4 tesi sperimentali lavorate sono riportate in Tabella 4.1. Le tesi sperimentali avevano caratteristiche chimiche che rientravano nei normali range di composizione del latte.

I contenuti di grasso, proteina e caseina presentavano valori omogenei e compatibili con quanto illustrano alcuni autori (Aguggini et al., 2004). I valori di pH erano equiparabili a quelli indicati in letteratura (Barbano et al., 1991; Ikonen et al. 1999 a; Cecchi et al., 2002; Summer et al., 2004), come quelli di acido citrico (Aguggini et al., 2004; Formaggioni et al., 2004) e di urea (Coulon et al., 1998; Mariani et al., 1998; Ghavi Hossein-Zadeh e Ardalan, 2010). I solidi totali, che, secondo un studio sulla coagulazione acida, sembrerebbero influenzare la consistenza e l'elasticità del coagulo acido (Gastaldi et al., 1997), non erano significativamente diversi tra tesi sperimentali differenti e rientravano nei range riportati da alcuni autori (Jay et al., 2009).

4.2.1. Contenuto di proteina e grasso

Le bovine non sono state selezionate solo in base al tempo di coagulazione, ma anche in

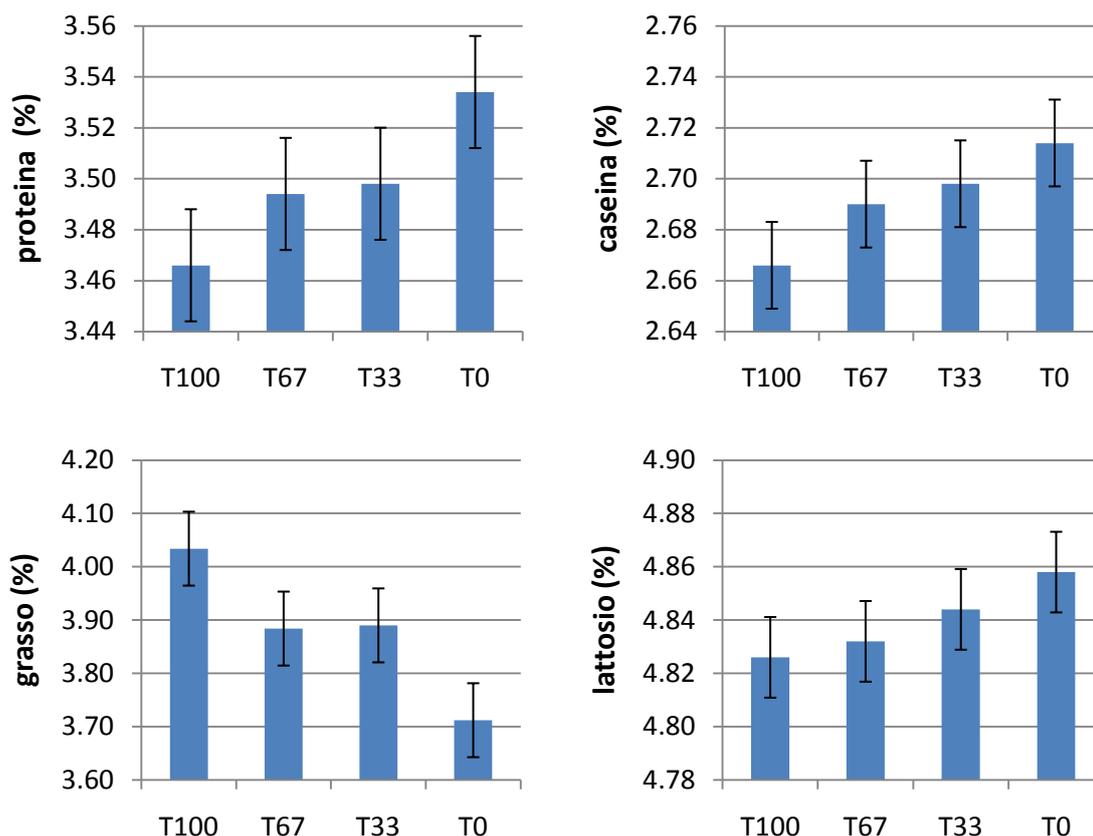
base alla composizione del latte in grassi e proteine per bilanciare per quanto possibile le tesi in relazione a questi due parametri. Il campionamento effettuato durante le caseificazioni ha confermato l'assenza di differenze significative per la proteina e il contenuto di caseina totale ($P>0.05$), mentre, per quanto concerne la percentuale di grasso, le quattro tesi sperimentali sono risultate significativamente differenti ($P<0.05$) (Fig. 4.2.).

Tabella 4.1. Statistiche descrittive (media \pm DS) di composizione e caratteristiche del latte appartenente alle quattro tesi sperimentali lavorate¹.

Variabile ²	T100	T67	T33	T0
Solidi totali, %	13.18 \pm 0.68	13.08 \pm 0.59	13.10 \pm 0.58	12.97 \pm 0.55
Proteina MIR, %	3.47 \pm 0.10	3.49 \pm 0.08	3.50 \pm 0.05	3.53 \pm 0.05
Grasso, %	4.03 \pm 0.72	3.88 \pm 0.63	3.90 \pm 0.60	3.71 \pm 0.54
Caseina MIR, %	2.67 \pm 0.06	2.70 \pm 0.03	2.70 \pm 0.02	2.71 \pm 0.04
Lattosio, %	4.83 \pm 0.13	4.83 \pm 0.13	4.84 \pm 0.11	4.86 \pm 0.12
Composizione della proteina, HPLC				
Proteina, g/l	38.46 \pm 1.23	37.19 \pm 2.05	36.93 \pm 0.96	36.53 \pm 1.99
Caseina, g/l	33.78 \pm 1.28	32.86 \pm 1.60	32.34 \pm 0.82	31.91 \pm 1.71
α_{S1} -CN, g/l	12.36 \pm 0.51	11.88 \pm 1.01	11.63 \pm 0.50	11.38 \pm 0.86
α_{S2} -CN, g/l	4.79 \pm 0.24	4.59 \pm 0.27	4.47 \pm 0.13	4.36 \pm 0.19
$\beta\gamma$ -CN, g/l	13.05 \pm 0.76	13.00 \pm 0.43	12.81 \pm 0.47	12.81 \pm 0.71
B β -CN, %	1.81 \pm 1.15	1.54 \pm 1.41	1.58 \pm 1.24	1.54 \pm 1.36
A ¹ β -CN, %	3.38 \pm 0.46	2.81 \pm 1.54	3.72 \pm 0.54	3.76 \pm 0.42
A ² β -CN, %	7.22 \pm 0.52	6.84 \pm 1.46	6.93 \pm 1.02	6.92 \pm 1.57
κ -CN, g/l	3.57 \pm 0.28	3.38 \pm 0.15	3.41 \pm 0.11	3.35 \pm 0.11
Gmp, g/l	1.67 \pm 0.17	1.53 \pm 0.07	1.51 \pm 0.07	1.45 \pm 0.06
B κ -CN	0.64 \pm 0.11	0.56 \pm 0.10	0.58 \pm 0.06	0.54 \pm 0.09
Siero-proteina, g/l	4.69 \pm 0.27	4.33 \pm 0.47	4.60 \pm 0.26	4.62 \pm 0.37
β -LG, g/l	3.51 \pm 0.20	3.36 \pm 0.57	3.50 \pm 0.19	3.54 \pm 0.27
B β -LG	0.58 \pm 0.12	0.52 \pm 0.11	0.60 \pm 0.09	0.59 \pm 0.09
α -LA, g/l	1.18 \pm 0.09	0.97 \pm 0.25	1.10 \pm 0.07	1.08 \pm 0.11
Composizione della caseina				
α_{S1} -CN, %	36.61 \pm 1.33	36.12 \pm 1.49	35.99 \pm 1.00	35.66 \pm 1.09
α_{S2} -CN, %	14.18 \pm 0.63	13.97 \pm 0.43	13.84 \pm 0.42	13.67 \pm 0.40
$\beta\gamma$ -CN, %	38.63 \pm 1.31	39.59 \pm 1.53	39.64 \pm 1.01	40.17 \pm 1.01
κ -CN, %	10.57 \pm 0.55	10.30 \pm 0.20	10.53 \pm 0.32	10.50 \pm 0.32
Composizione della sieroproteina				
β -LG, %	74.82 \pm 0.73	77.82 \pm 2.36	76.14 \pm 0.54	76.69 \pm 1.00
Indice caseinico, %	87.80 \pm 0.83	88.39 \pm 1.81	87.55 \pm 0.54	87.37 \pm 0.58
Acido citrico, g/dl	0.13 \pm 0.02	0.13 \pm 0.02	0.12 \pm 0.02	0.12 \pm 0.02
Urea, g/dl	0.03 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01
pH	6.61 \pm 0.06	6.68 \pm 0.10	6.71 \pm 0.09	6.71 \pm 0.09

¹ T100 = tesi costituita dal latte miscelato ottenuto con il contributo delle sei bovine con i migliori r in proporzioni uguali; T0 = tesi che comprendeva il latte delle bovine con i peggiori r in proporzioni uguali; T67 = tesi ottenuta miscelando il 67% di T100 con il 33% di T0; T33 = tesi costituita da una miscela di latte in cui T0 contribuisce con il 67% mentre T100 con il 33%. ² Proteina e caseina MIR = proteina e caseina misurate tramite spettroscopia nel medio infrarosso; Proteina = caseina + siero-proteina; Caseina = α_{S1} -CN+ α_{S2} -CN+ β -CN+ κ -CN; Siero-proteina = α -LA + β -LG; Indice caseinico = caseina/proteina. Solidi totali = grasso+proteina+lattosio+ceneri; B κ -CN = B κ -CN/ (A κ -CN+ B κ -CN); B β -LG = B β -LG/ β -LG totale.

Figura 4.2. Contenuto in proteina, caseina, grasso e lattosio delle tesi sperimentali



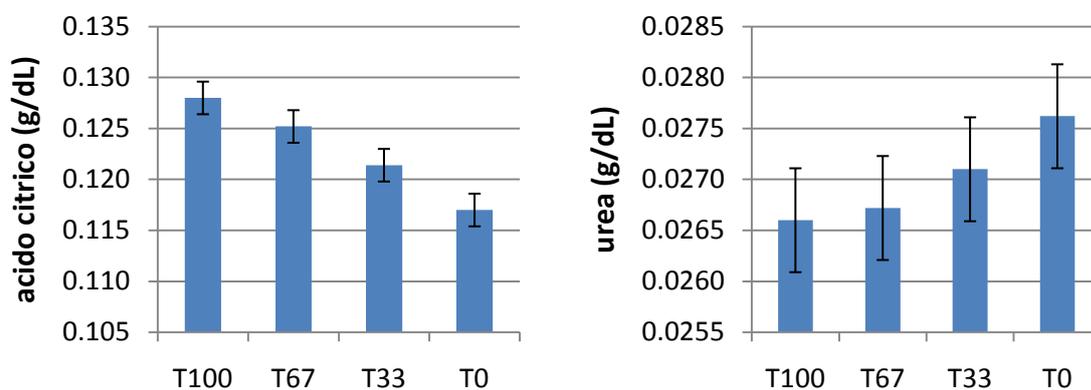
Sulla relazione che intercorre tra grasso e proteina del latte e MCP vi sono risultati discordanti in letteratura. Alcuni studi evidenziano un effetto favorevole della proteina sulle MCP (Bertoni et al., 2001; Jõudu et al., 2008), mentre in altri lavori la correlazione tra MCP e proteina è trascurabile (Comin et al., 2005; Ikonen et al., 2004) oppure nulla (Cassandro et al., 2008). Dei risultati inattesi sono stati ottenuti in un lavoro condotto in Finlandia su bovine di razza Finnish Ayrshire e Finnish Friesian, il quale riporta un peggioramento delle MCP nel latte con un alto contenuto di proteina (Ikonen et al., 1999b). Secondo un altro studio proteina e grasso non influenzano significativamente r e A_{30} , pur determinando effetti favorevoli sui processi caseari (De Marchi et al., 2007). Uno dei primi studi al riguardo indica che non vi è una correlazione tra proteina ed r , mentre un aumento del grasso del latte comporta un miglioramento di r (Lindström et al., 1984). Numerosi sono gli autori che evidenziano come un aumento del contenuto in proteina migliori la resa casearia (Muir et al., 1983; Bertoni et al., 2001; Guo et al., 2004; Hallén et al., 2010) essendo gli aggregati che si formano durante la coagulazione di natura proteica. Gli spazi tra tali aggregati vengono occupati da grassi e siero pertanto anche il contenuto di grasso influenza la resa casearia come riportato da diversi studi (Barbano e Sherbon, 1984; Marziali e Ng-Kwai-Hang, 1986; Mistry, 2001; Guo et al., 2004; Summer et al., 2004; Wedholm et al., 2006; Hallén et al., 2010).

Nella presente tesi, al fine di evitare che grasso e proteina determinassero possibili variazioni di resa non dipendenti dalle MCP, si è deciso di bilanciare le tesi per questi due parametri. Tuttavia il contenuto di grasso ha mostrato valori maggiori nella tesi T100 e minori nella tesi T0 (Fig. 4.2.), in accordo con quanto riportato da Lindström et al. (1984).

4.2.2. Acido citrico e Urea

Il contenuto di acido citrico è risultato significativamente diverso tra tesi sperimentali ($P < 0.01$). La tesi sperimentale a maggior concentrazione di citrato era la tesi T100 mentre nelle tesi T67, T33 e T0 è stata notata una diminuzione lineare di tale componente (Fig. 4.3.). Per ciò che concerne il contenuto di urea, invece le tesi non mostravano differenze statisticamente significative. I risultati di questi due componenti sono in contrasto con quanto riportato in letteratura (Martin et al., 1997; Tsioulpas et al., 2007).

Figura 4.3. Contenuto di acido citrico e urea delle tesi sperimentali



Uno studio sul latte individuale di bovine di razza Frisona, riporta una lieve correlazione positiva tra citrato e r ed evidenzia come il citrato migliori la stabilità delle micelle di caseina (Tsioulpas et al., 2007). Secondo altri lavori in cui si è aggiunto al latte di partenza del citrato trisodico, questo componente è responsabile sia della riduzione degli ioni calcio presenti nel campione (Udabage et al., 2001; Tsioulpas, 2010) che dell'aumento del pH del latte (Tsioulpas, 2010). In quest'ultimo studio sono state aggiunte delle concentrazioni più di dieci volte maggiori rispetto ai valori normali del latte vaccino, pertanto ciò può giustificare l'aumento di pH che nella presente tesi non è stato rilevato. Al pH del latte il citrato è presente nelle forme di idrogeno citrato e ione citrato. Solo quest'ultimo chela il calcio e il magnesio (Linzell et al., 1976). La proporzione dello ione citrato rispetto all'idrogeno citrato aumenta progressivamente all'aumentare del pH (essendo il pK_a 4.1) per cui avremmo un progressivo aumento della percentuale di ione citrato rispetto all'idrogeno citrato passando dalla tesi T100 alla tesi T0. Pertanto, la maggior attività chelante del citrato si manifesta appunto nelle tesi caratterizzate da alto pH. Questo potrebbe giustificare le peggiori MCP manifestate dalle tesi a pH più elevato.

Secondo uno studio condotto su bovine alimentate con dieta ricca di azoto, il latte ricco in urea è caratterizzato da una minor attitudine alla caseificazione rispetto al latte che

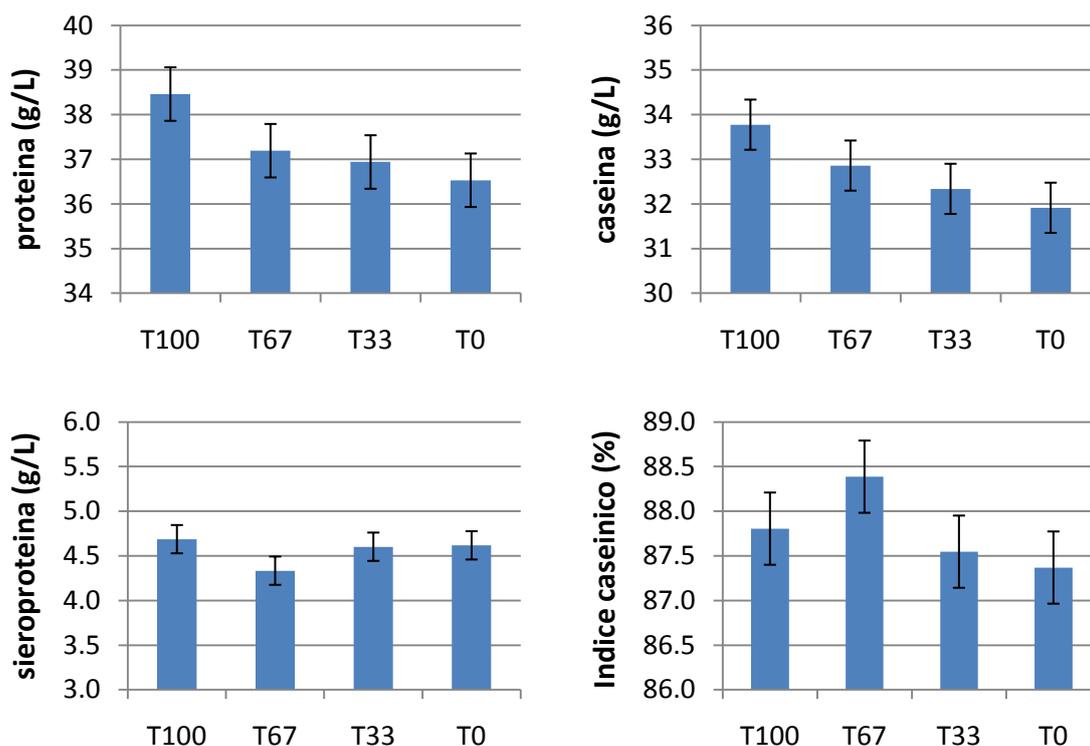
presenta valori di urea nella norma. In caseificio si è notato infatti che sia la velocità di formazione del coagulo che la consistenza della cagliata 30 minuti dopo l'aggiunta del caglio sono peggiori nel latte con alto contenuto di urea, e le rese a 30 giorni del formaggio prodotto sono leggermente inferiori rispetto a quelle del formaggio prodotto a partire da latte con valori di normali di urea (Martin et al., 1997).

Nella presente tesi i valori di urea, come mostra la figura 4.3, non erano statisticamente diversi tra tesi per cui si può escludere che le caratteristiche lattodinamografiche delle tesi sperimentali siano state influenzate dal contenuto di urea.

4.2.3. Composizione della proteina misurata con HPLC

I valori di composizione media della proteina ottenuti mediante analisi HPLC per ciascuna tesi sperimentale sono riportati in tabella 4.1. I contenuti di proteina e caseina totale, anche se caratterizzati da valori progressivamente decrescenti nelle tesi con r più sfavorevole, non hanno mostrato differenze statisticamente significative ($P > 0.05$) tra tesi sperimentali. Di conseguenza, le tesi erano caratterizzate anche dallo stesso indice caseinico (Fig. 4.4.). Alla luce di questi risultati quindi, i diversi profili lattodinamografici che caratterizzavano le tesi sperimentali oggetto di questo studio non sembrerebbero essere stati influenzati dal contenuto di proteina e caseina totale.

Figura 4.4. Contenuto in proteina, contenuto in caseina, contenuto in siero-proteina, indice caseinico delle tesi sperimentali

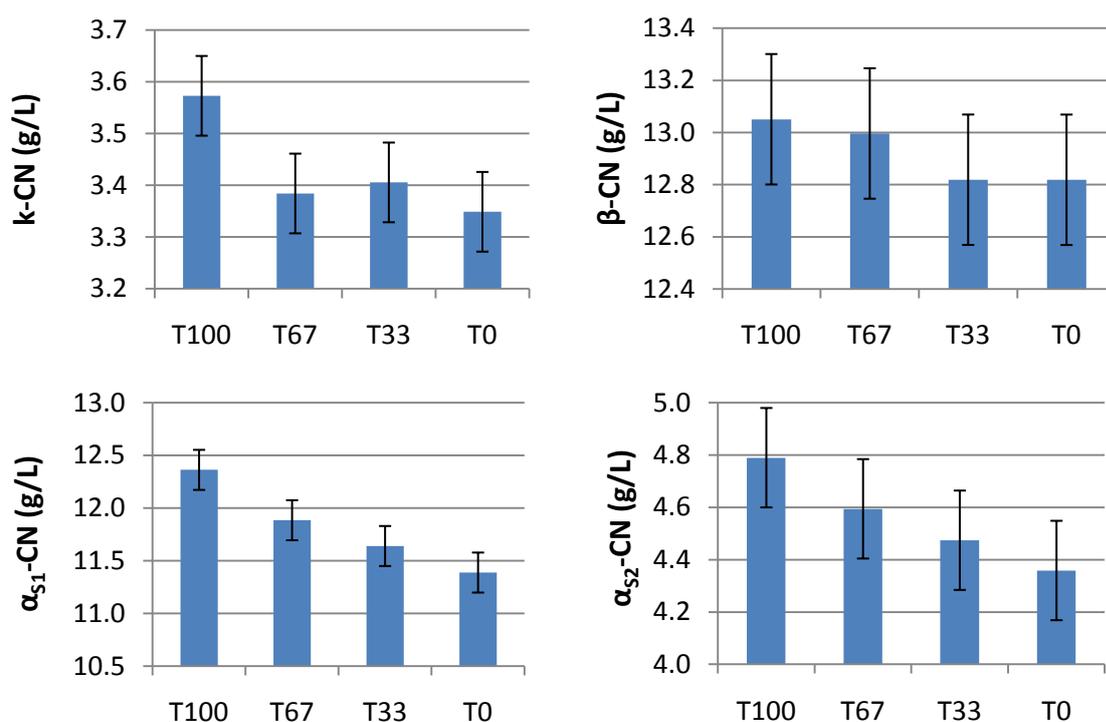


In letteratura, i lavori riguardanti le correlazioni tra contenuto proteico e caseinico e proprietà coagulative portano a conclusioni discordanti. Alcuni studi condotti negli anni

'80 evidenziano l'importanza della caseina nel migliorare la consistenza del coagulo caseoso (Okigbo et al., 1985b; Marziali e Ng-Kwai-Hang , 1986) e altri studi più recenti riportano l'esistenza di una correlazione fenotipica tra contenuto di caseina e MCP favorevole (Cassandro et al., 2008; Jöudu et al., 2008).

Tuttavia, Ikonen et al. (2004), analizzando 4664 campioni di latte di Finnish Ayrshire, hanno riportato una correlazione tra contenuto di caseina e MCP trascurabile. Gli stessi autori hanno infine concluso che le proprietà coagulative non sono geneticamente correlate con il contenuto di proteina e caseina del latte.

Figura 4.5. Contenuto di κ -CN, β -CN, di α_{s1} -CN e α_{s2} -CN delle tesi sperimentali

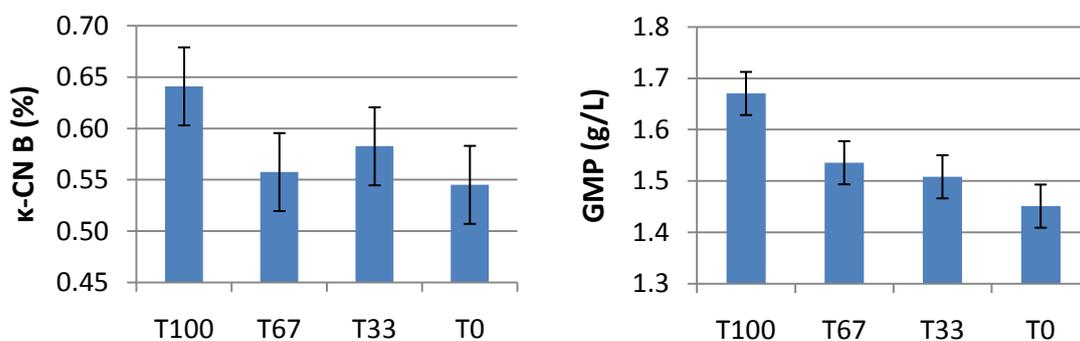


Per quanto riguarda le singole frazioni proteiche, il contenuto di κ -CN non è risultato significativamente diverso tra tesi (Fig. 4.5). Tale dato è in disaccordo con diversi studi che mostrano un miglioramento delle MCP all'aumentare del contenuto di κ -CN (Okigbo et al., 1985c; Wedholm et al., 2006; Jöudu et al., 2008; Bonfatti et al., 2010). Secondo alcuni studi si riscontra anche una maggior percentuale di κ -CN sulla caseina totale nel latte che presenta maggiori A_{30} (Marziali e Ng-Kwai-Hang , 1986a) e r migliori (Bonfatti et al., 2010), ma tale risultato non è stato riscontrato nel presente lavoro, in cui la κ -CN% non è risultata significativamente differente tra le tesi sperimentali a diversa attitudine alla coagulazione. Anche i contenuti relativi delle due varianti genetiche di κ -CN, A e B, si sono mantenuti costanti (Fig. 4.6). In letteratura è presente un numero elevato di studi che indicano degli effetti favorevoli della variante B della κ -CN sulle proprietà coagulative (Marziali et al., 1986; Mariani et al., 1997b; Mayer et al., 1997; Ikonen et al., 1999a; Ikonen et al., 1999b;

Kubarsepp et al., 2005; Bonfatti et al., 2010) sia dovuti all'aumento del contenuto di κ -CN associato a questo allele (Mayer et al., 1997; Ikonen et al., 1999b; Bonfatti et al., 2010) che alla riduzione delle dimensioni micellari che determinano un miglioramento di A_{30} (Bonfatti et al., 2010). Nella presente tesi non sono stati riscontrati contenuti significativamente diversi di questa variante nelle diverse tesi sperimentali, pertanto si può affermare che le MCP non sono state migliorate dal maggior contenuto di κ -CN B rispetto alla variante A.

Il glicomacropetide (**GMP**), risultato significativamente diverso nelle quattro tesi sperimentali ($P < 0.05$) (Fig. 4.6), è la frazione glicosilata della κ -CN che protende all'esterno della micella caseinica (Anema, 1997). Nella presente tesi sono stati riscontrati alti valori di GMP in T100, mentre valori inferiori di GMP in T0. Inoltre, le medie corrette delle tesi intermedie non si discostavano significativamente dalle proporzioni attese ($P > 0.05$). In base a questi risultati, è possibile ipotizzare un ruolo del GMP nella determinazione delle MCP. In letteratura sono assenti lavori che mettano in relazione il GMP con le MCP, sebbene questo componente sia stato ampiamente studiato soprattutto in relazione alle caratteristiche strutturali della micella (Ruettimann e Ladisch, 1987).

Figura 4.6. Contenuto in GMP e percentuale della κ -CN B sulla caseina totale delle tesi sperimentali



L'importante funzione che il GMP svolge nella trasformazione lattiero casearia è dovuta alla sua liberazione nel siero per opera dell'enzima chimosina. Infatti, essendo un frammento idrofilo e carico negativamente, una volta disperso nel siero causa uno sbilanciamento nelle forze intermolecolari del latte determinando un incremento delle cariche positive e delle interazioni idrofobiche a carico della superficie delle micelle caseiniche, favorendo l'aggregazione di queste ultime (Gerung, 2005). Da un recente studio è emerso infatti che a pH bassi lo spessore dello strato rappresentato dal GMP e quindi anche la sua attività di stabilizzazione sterica, si riducono a tal punto da rendere necessaria l'idrolisi di un minor quantitativo di κ -CN al fine di indurre l'aggregazione (Li e Dalgleish, 2006). Inoltre, all'aumentare della proporzione di κ -CN nella micella, di cui il GMP è la componente idrofilica esterna, si riduce il diametro micellare (Ruettimann e Ladisch, 1987; Walsh et al., 1998). Dato che la presenza di micelle più piccole è stata

associata ad una maggior reattività del caglio e a una maggior velocità di formazione del coagulo caseoso (Summer et al., 2002), questa riduzione delle dimensioni delle micelle potrebbe essere uno dei fattori che determinano le migliori MCP manifestate dalle tesi ad alto contenuto di GMP.

Per ciò che concerne la β -CN, le tesi sperimentali non mostravano differenze statisticamente significative nel suo contenuto (Fig. 4.5). In uno studio effettuato negli anni '80, un minor contenuto di β -CN era stato riscontrato nel latte di vacche a scarsa attitudine alla caseificazione (Okigbo et al., 1985c). Studi più recenti, condotti su un maggior numero di animali, hanno confermato che il contenuto di β -CN è negativamente correlato con r e positivamente correlato con A_{30} (Jõudu et al., 2008; Bonfatti et al., 2010). Nel presente studio è invece possibile affermare che la diversa attitudine alla coagulazione delle differenti tesi sperimentali non sia dovuta ad un effetto del contenuto di κ -CN e β -CN.

Per quanto riguarda la percentuale di β -CN sulla caseina totale, le tesi sperimentali mostravano differenze significative ($P < 0.01$) indicando che quando la proporzione di β -CN sulla caseina totale è più bassa, il coagulo caseoso si forma in minor tempo ed è più consistente (Fig. 4.7). Questo risultato contraddice quanto emerso da uno studio sulla Pezzata Rossa nel quale una minor percentuale di β -CN sulla caseina totale era stata rilevata nel latte a scarsa attitudine casearia (Bonfatti et al., 2010), mentre conferma un lavoro condotto su bovine in gran parte di razze estoni (Jõudu et al., 2008).

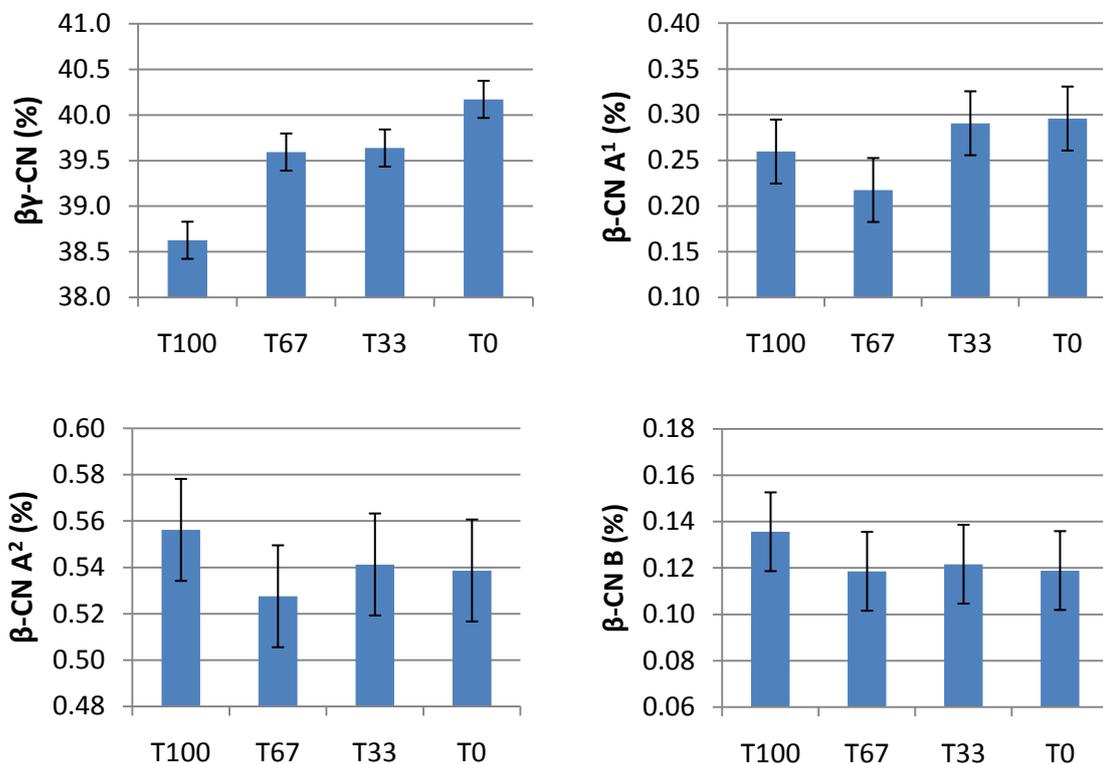
Tuttavia appare utile sottolineare che il contenuto di β -CN rilevato nella presente tesi comprende anche il contenuto di γ -CN. La γ -CN è un frammento peptidico ottenuto dalla proteolisi della β -CN ad opera della plasmina (Farrell et al., 2004), enzima secreto dalla ghiandola mammaria che può indurre la lisi della β -CN anche prima dell'inizio della mungitura (Bastian e Brown, 1996). Mentre secondo alcuni autori l'attività della plasmina non influisce sulle MCP (Bastian et al., 1991), in uno studio su alcuni animali con scarsa attitudine alla coagulazione si erano riscontrati alti valori di questo frammento caseinico (Okigbo et al., 1985c) e studi successivi riportano che la γ -CN sia associata a scarse MCP (Bastian e Brown, 1996; Srinivasan e Lucey, 2002). Valori più elevati di $\beta\gamma$ -CN in corrispondenza delle tesi a peggiore attitudine casearia potrebbero quindi essere imputabili ad un maggiore contenuto di γ -CN, piuttosto che ad una diversa proporzione di β -CN.

I contenuti relativi delle tre varianti genetiche principali di β -CN (A^1 , A^2 e B) si sono mantenuti costanti nelle diverse tesi sperimentali, anche se è stato possibile notare un contenuto leggermente superiore di β -CN B nella tesi con le migliori MCP (Fig. 4.7).

Secondo alcuni studi il latte contraddistinto da β -CN B è più sensibile all'azione del caglio rispetto a quelli che contengono la β -CN A e presenta valori di r ridotti e a migliori A_{30} (Mariani et al., 1997b; Bonfatti et al., 2010). Da alcuni studi effettuati in Finlandia emerge che sia la variante A^1 che la variante B siano associate a buone MCP (Ikonen et al., 1999a; Ikonen, 2000). La maggior concentrazione di $\beta\gamma$ -CN B che pare mostrare il latte della

T100, potrebbe essere dovuta al fatto che le bovine di razza Jersey, che secondo alcuni autori mostrano la maggior frequenza della variante B (Formaggioni et al., 1999), siano state selezionate sempre per le tesi T100, in quanto presentavano le migliori MCP.

Figura 4.7. β -CN% sulla caseina totale e percentuale delle varianti A¹, A² e B sulla β -CN

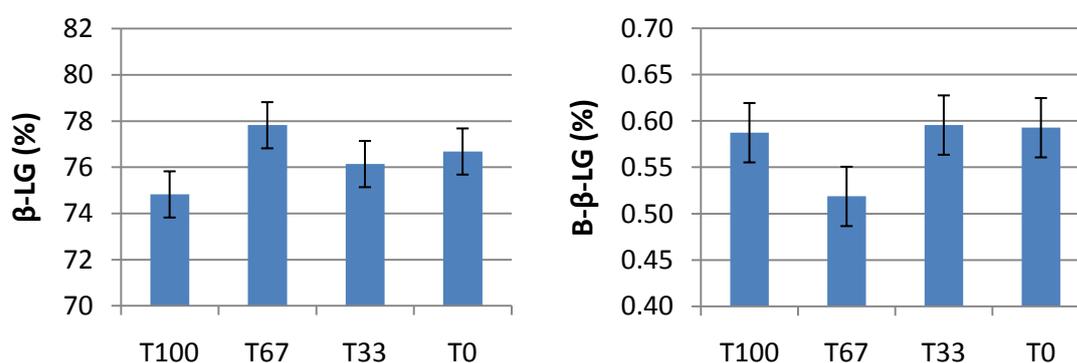


Il contenuto di α_{S1} -CN era significativamente differente tra le quattro tesi sperimentali ($P < 0.05$), in accordo con quanto presente in letteratura sulla influenza significativa del contenuto di α_{S1} -CN su r e A_{30} (Jõudu et al., 2008). La tesi T100 e la tesi T0 infatti presentavano rispettivamente un alto e un basso contenuto di tale frazione caseinica, mentre le tesi T67 e T33 mostravano contenuti intermedi (Fig. 4.5.). Anche la differenza tra tesi sperimentali in relazione alla proporzione di α_{S1} -CN sulla caseina totale era statisticamente significativa ($P < 0.05$) e potrebbe confermare la lieve correlazione negativa tra percentuale di α_{S1} -CN sulla caseina totale e r descritta in un recente studio (Jõudu et al., 2008). Infatti, mentre la tesi T100 che mostrava alte percentuali di α_{S1} -CN era caratterizzata da migliori MCP, la tesi T0, con scarsa attitudine alla coagulazione, presentava valori inferiori di α_{S1} -CN%. Le medie corrette per le tesi intermedie non si sono discostate significativamente dalle proporzioni attese. In analogia con quanto osservato per il contenuto di α_{S1} -CN, anche la concentrazione di α_{S2} -CN ha mostrato un andamento crescente e lineare ($P > 0.05$) in relazione al miglioramento delle MCP nelle differenti tesi sperimentali (Fig. 4.5.). I risultati della presente tesi in merito alla α_{S2} -CN si contrappongono con quanto riportato dallo studio condotto da Jõudu et al. (2008) nel

quale il latte che non coagulava in 30 minuti presentava alte concentrazioni di α_{S2} -CN, e anche con quanto riportato da Bonfatti et al. (2010) in uno studio condotto su più di 2,000 campioni individuali di latte.

Anche la proporzione di β -LG sulla proteina del siero ha mostrato differenze significative tra tesi ($P < 0.05$). Tali differenze sono tuttavia imputabili a valori più ridotti di β -LG% in corrispondenza della tesi T67 rispetto alle altre tesi sperimentali (Fig. 4.8.). Il contenuto relativo delle due varianti genetiche di β -LG non ha invece mostrato differenze significative. Il contenuto di siero-proteina totale e la sua composizione non sembrerebbero quindi essere responsabili delle diverse proprietà lattodinamografiche delle tesi sperimentali.

Figura 4.8. Percentuale di β -LG sulla siero-proteina totale e percentuale della variante B β -LG sulla β -LG totale



4.3. Effetto delle tesi sperimentali sulla resa casearia

L'effetto delle tesi sperimentali sulla resa casearia misurata a diversi tempi di stagionatura è riportato in figura 4.9, mentre in figura 4.10 è mostrato l'andamento della resa casearia nel tempo. Nel presente studio, le forme ottenute a partire dalle quattro tesi sperimentali, non mostravano differenze significative di resa in tutte le misurazioni effettuate e nemmeno l'analisi della cinetica della resa casearia nelle 4 tesi sperimentali ha evidenziato differenze significative nel calo di peso nel corso della stagionatura.

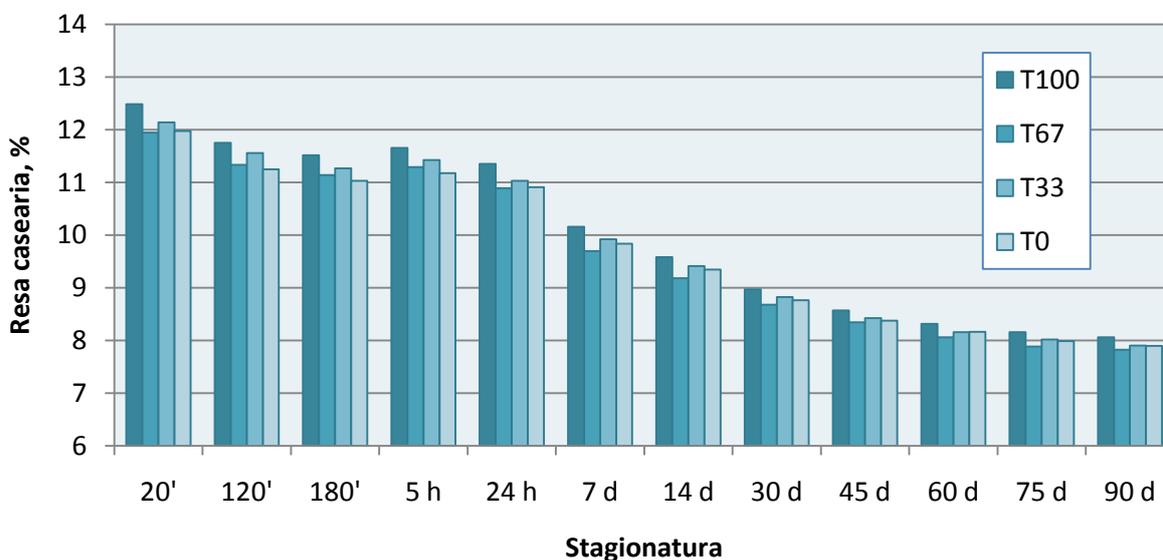
Secondo uno studio in cui sono stati prodotti formaggi a partire da latte individuale, le concentrazioni di α_{S1} -CN, β -CN e κ -CN sono state associate ad una maggior resa casearia (Wedholm et al., 2006), constatazione in contrasto con i risultati di questo studio. Mentre per la β -CN e la κ -CN il latte delle tesi non presentava differenze significative, i contenuti di α_{S1} -CN, significativamente diversi nel latte di partenza delle quattro tesi del presente studio, secondo quanto riportato dagli autori, avrebbero dovuto influire positivamente sulla resa dei formaggi prodotti a partire dalle tesi T100 rispetto a quelli prodotti con le tesi T0. Da un altro lavoro in cui sono state eseguite delle micro caseificazioni con campioni di 10 ml di latte emerge l'associazione tra α_{S1} -CN e resa casearia favorevole (Hallén et al., 2010), risultato non in linea con la presente tesi. Neppure il maggior

contenuto di grasso delle tesi caratterizzate da migliori MPC è risultato essere influente in termini di resa casearia, contrariamente a quanto riportato in letteratura (Wedholm et al., 2006).

Questo lavoro, in cui è stato preso in considerazione solo un ristretto numero di animali da un solo allevamento e i quantitativi di latte lavorato erano ridotti, conferma un precedente studio condotto su grandi quantità di latte massale di partenza e un ampio numero di bovine coinvolte, appartenenti a diversi allevamenti (Ikonen et al., 1999a). Infatti gli autori, a partire da latte massale avente caratteristiche coagulative estreme, non hanno rilevato differenze significative tra le rese in Emmental (Ikonen et al., 1999a).

Tale risultato si contrappone a quanto invece ottenuto da uno studio sul Cheddar Cheese, in cui si è utilizzato del latte di partenza con diverso contenuto di κ -CN AA e BB (Walsh et al., 1998). Il latte ricco in κ -CN BB presentava MCP più favorevoli del latte con alto contenuto di κ -CN AA e anche la resa casearia è risultata significativamente maggiore nel latte con κ -CN BB.

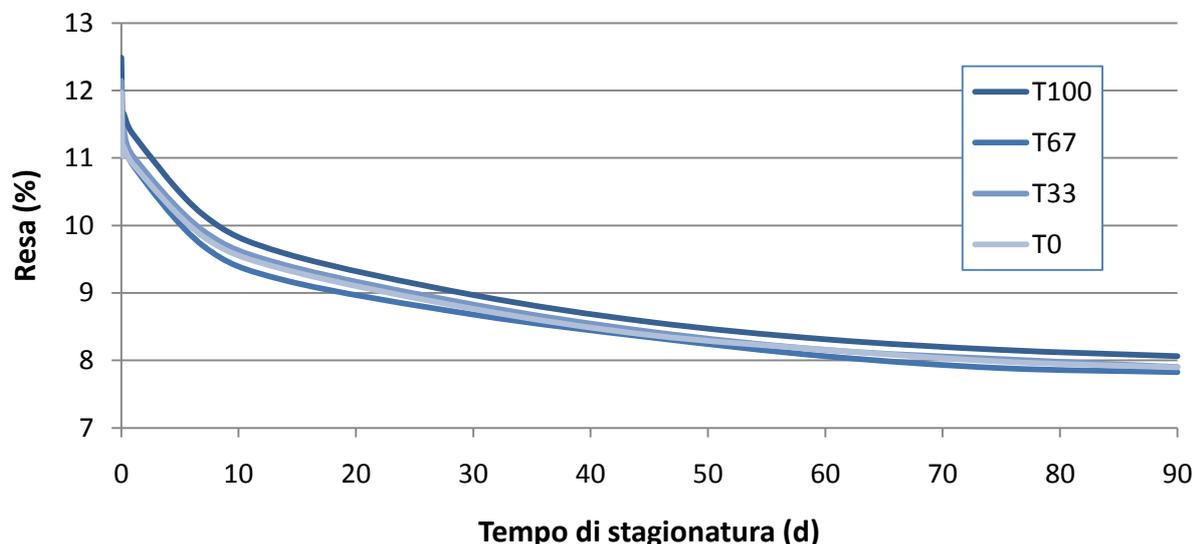
Figura 4.9. Effetto delle tesi sperimentali sulla resa casearia misurata a diversi tempi di stagionatura (n.s.)



Entrambi questi studi presentano una metodica che li differenzia dal protocollo caseario utilizzato nella presente tesi, nella quale il momento della rottura della cagliata veniva determinato grazie al sistema CoAguLite, il quale indica il momento in cui si ha la massima velocità di aggregazione (R'). La rottura della cagliata veniva eseguita 4 minuti dopo R' , quindi ad un tempo che dipendeva dal momento di inizio della coagulazione. Pertanto, per la tesi sperimentale T100, che era caratterizzata da un tempo di coagulazione in caldaia ridotto, la rottura della cagliata avveniva presto, mentre per la tesi T0, caratterizzata da un r maggiore, che quindi presentava il valore massimo di R' più tardi rispetto alla T100, il taglio avveniva più tardi. A differenza della presente tesi, nello studio

di Ikonen et al. (1999a) la cagliata veniva rotta a tempo costante, indipendentemente dal tempo di coagulazione, pertanto il latte che coagulava più rapidamente aveva a disposizione più tempo per il rassodamento ed è possibile ipotizzare che la maggiore consistenza al taglio delle cagliate prodotte a partire da latte con buone MCP fosse dovuta al maggior tempo che intercorre tra la formazione del coagulo caseoso e la rottura della cagliata rispetto alle tesi peggiori.

Figura 4.10. Andamento della resa casearia misurato nelle tesi sperimentali



In alcuni lavori quindi il protocollo di caseificazione potrebbe aver influito sulla resa più delle caratteristiche del latte di partenza, visto che alcuni studi dimostrano come aumentando la consistenza della cagliata alla rottura si possano ottenere più redditizie rese casearie (Riddel Lawrence et al., 1989; Johnson et al., 2001). Secondo Riddel Lawrence (1989) se la consistenza del coagulo al momento del taglio è maggiore, la resa in sostanza secca risulta maggiore. Tale risultato viene confermato in uno studio più recente secondo il quale la cagliata rotta a consistenze maggiori risulta caratterizzata da una maggior umidità che determina un miglioramento della resa casearia, compensando la maggior perdita di grassi nel siero (Johnson et al., 2001). Nel lavoro di Walsh et al. (1998), la rottura della cagliata viene invece effettuata una volta raggiunta una certa consistenza della massa caseosa. Pertanto si era notato che il tempo tra l'aggiunta del caglio e la rottura della cagliata era circa il doppio per la κ -CN AA, dotata di peggiori MCP. In quest'ultimo studio gli autori hanno quindi cercato di ridurre l'effetto della consistenza del coagulo alla rottura della cagliata sulla resa casearia, annullando però l'effetto delle MCP di partenza sulla consistenza del coagulo.

Nel presente studio r e T_{max} erano positivamente correlati ($r=0.83$), in accordo con uno studio in cui si riporta che T_{max} è fortemente correlato sia con il tempo di flocculazione visibile che con l' r del Formagraph (O'Callaghan et al., 2002). Pertanto la rottura della cagliata è avvenuta in tempi più brevi nel latte che aveva coagulato prima (T100) mentre è

stata eseguita in media circa 5 minuti più tardi nel latte caratterizzato da peggiori MCP (T0) concedendo maggior tempo al latte caratterizzato da r più lunghi per poter raggiungere una consistenza adeguata. Nel presente lavoro, pertanto, gli effetti delle MCP sulla resa casearia potrebbero essere stati bilanciati adeguando il tempo di rottura della cagliata al tempo di coagulazione e per questo motivo risultare non significativi. Nella pratica casearia impiegata su scala industriale, tuttavia, il momento del taglio è in genere prestabilito, per cui differenze di MCP potrebbero effettivamente produrre rese casearie diverse.

4.4. Effetto delle tesi sperimentali sulla composizione del siero e della cagliata

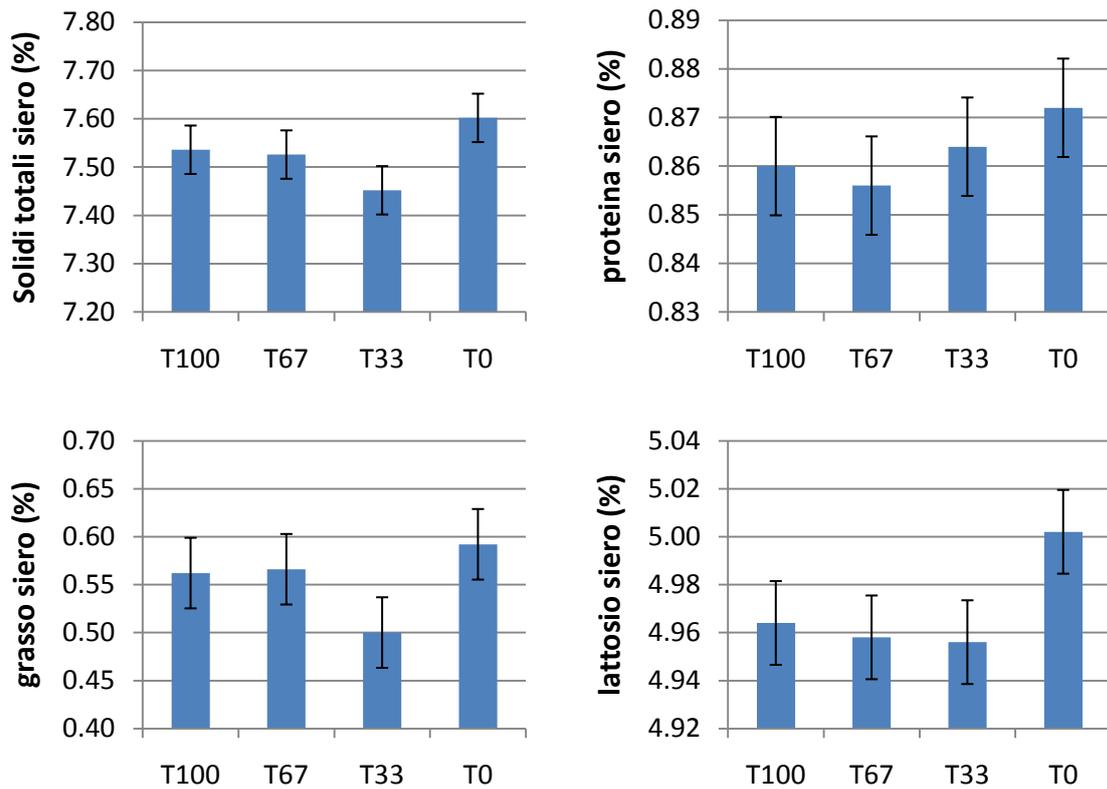
4.4.1. Composizione del siero

Le caratteristiche che presentava il siero delle quattro tesi sperimentali sono illustrate in figura 4.12. Le percentuali di proteina, grasso, lattosio e solidi totali non erano significativamente diverse tra tesi sperimentali, pertanto, il siero era omogeneo per composizione. Anche i risultati dell'analisi del profilo proteico hanno mostrato che non vi erano differenze statisticamente significative tra contenuto in proteina, siero-proteina, caseina e singole frazioni proteiche tra le quattro tesi (dati non riportati).

Questi risultati sono in accordo con quelli ottenuti per la resa casearia, dai quali non ci si attendevano differenze di composizione del siero dovute a una diversa capacità della cagliata di trattenere proteine e grasso. Alcuni studi, nei quali diverse MCP si traducono in una diversa resa casearia, hanno riportato infatti che l'aumento del contenuto di grasso nel siero è spesso associato a latte con minor attitudine alla caseificazione (Walsh et al., 1998; Ikonen et al., 1999a; Johnson et al., 2001; Summer et al., 2004).

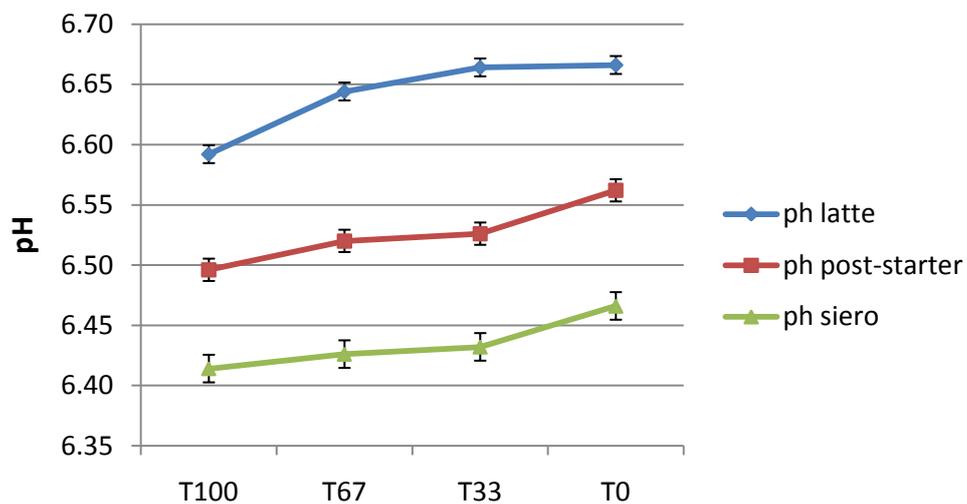
In uno di questi studi (Johnson et al., 2001), per esempio, a parità di tempo di coagulazione, è stata evidenziata una differenza significativa nel contenuto di grasso solo tra il siero ottenuto dalle cagliate rotte a 25 minuti dall'aggiunta del caglio e quello rotte a 65 minuti, mentre non vi erano differenze tra i sieri delle cagliate rotte a 25 e 48 minuti dall'aggiunta del caglio. Pertanto, dato che nella presente tesi i tempi tra l'inizio della coagulazione e la rottura della cagliata delle tesi sperimentali erano costanti, si può ipotizzare che una maggior o minore liberazione di grasso nel siero non sia stata rilevabile. Anche il contenuto di proteina del siero era omogeneo tra le tesi sperimentali. In uno studio sulle caratteristiche coagulative del latte di Bruna e di Frisona e le rispettive rese in Parmigiano Reggiano si evidenziava una differenza significativa nel contenuto di proteina del siero. Il siero della Bruna, caratterizzata da MCP più favorevoli e da rese migliori, presentava un maggior contenuto proteico, probabilmente giustificato dal maggior contenuto in proteina e caseina del latte di partenza (Summer et al., 2004). Tuttavia, anche in quest'ultimo studio, le differenze di resa erano apprezzabili.

Figura 4.12. Effetto delle tesi sperimentali sulla composizione del siero



Come previsto, il pH del siero era invece diverso tra le tesi (Fig. 4.13.) e presentava una buona correlazione con il pH misurato dopo l'incubazione dello starter ($r=0.92$) e con il pH iniziale del latte ($r=0.83$). Il pH presentava valori inferiori nella tesi T100 e valori maggiori nella T0 e mostrava un andamento lineare nelle tesi intermedie ($P<0.05$).

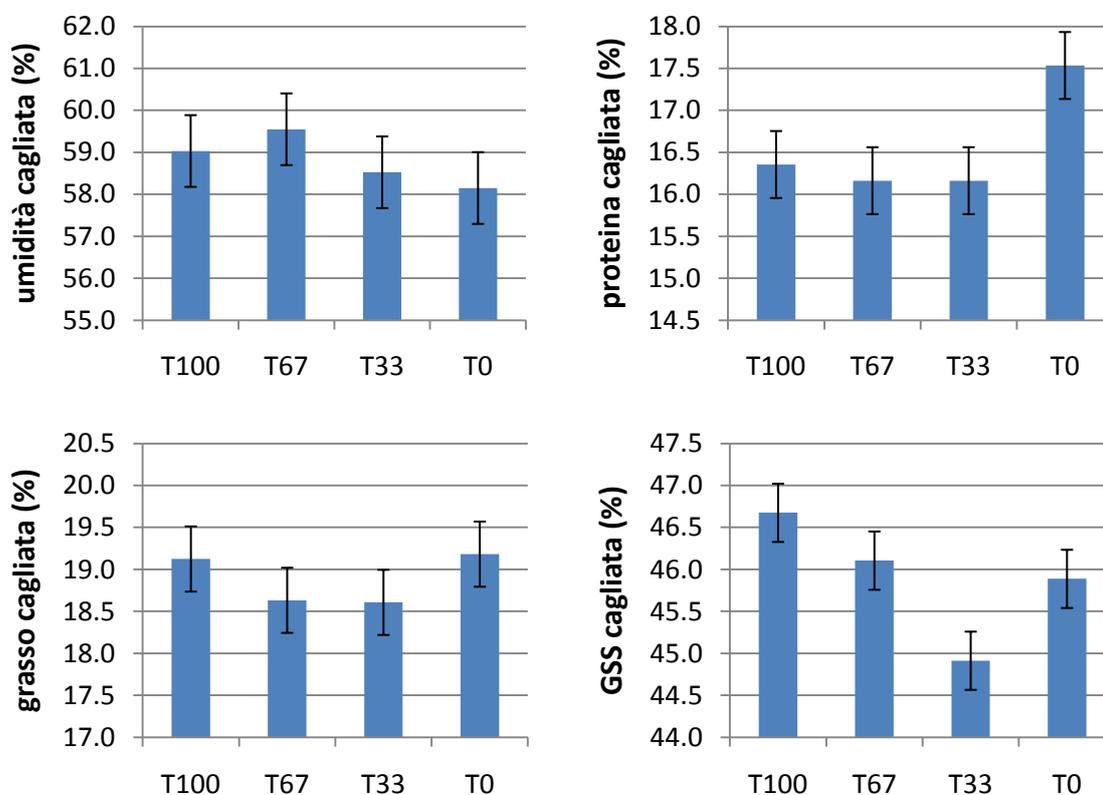
Figura 4.13. pH (pH siero) del siero e pH iniziale (pH latte) e dopo l'incubazione dello starter (pH post starter) del latte nelle diverse tesi sperimentali



4.5.2. Composizione della cagliata

La composizione della cagliata era omogenea nelle diverse tesi sperimentali (Fig. 4.14.) ad eccezione della percentuale di grasso espresso sulla sostanza secca (**GSS**) ($P < 0.05$). La tesi T0 mostrava bassi valori di GSS rispetto alla tesi T0, ma tale parametro non assumeva un comportamento lineare nelle tesi intermedie. Infatti, mentre la tesi T67 si mostrava in linea con le proporzioni attese, la tesi T33 inaspettatamente presentava un valore addirittura più basso della tesi T0. Ad eccezione dell'anomalia riscontrata nella tesi T33, la maggior presenza di GSS nella cagliata associata a minori r è stata riscontrata anche in altri studi in cui il latte di partenza era omogeneo per contenuto di grassi (Walsh et al., 1998). In un altro studio in cui le lavorazioni dei diversi formaggi prevedevano protocolli differenti, la tesi in cui il tempo che intercorreva tra l'aggiunta del caglio e la rottura della cagliata era minore, la percentuale di GSS era più elevata (Johnsons et al., 2001). Pertanto, oltre ad un r più breve, anche una consistenza del coagulo più soffice al momento della rottura pare influenzare il contenuto di GSS della cagliata.

Figura 4.14. Effetto delle tesi sperimentali sulla composizione della cagliata



Come la percentuale di proteina del siero, anche il contenuto di proteina della cagliata non presentava valori diversi nelle differenti tesi, essendo bilanciata la composizione proteica del latte selezionato per migliori MCP e per peggiori MCP. Questo risultato è in accordo con quanto riportato da uno studio che prevede la rottura della cagliata con MCP

differenti a tempo fisso (Ikonen et al., 1999a) e anche con altri lavori in cui il latte non era stato selezionato per le MCP di partenza e in cui la consistenza della cagliata era differente al momento della rottura (Bynum e Olson, 1982; Riddel Lawrence et al., 1989). Pertanto sia le caratteristiche coagulative del latte che il protocollo di caseificazione utilizzato non sembrano influenzare il contenuto di proteina finale del formaggio. La differenza tra tesi nel contenuto di grasso nel formaggio non era statisticamente significativa in accordo con quanto riportato in letteratura (Ikonen et al., 1999a). Questo risultato si contrappone a quanto emerso da uno studio effettuato sulle differenze di attitudine alla caseificazione di latte ricco rispettivamente in κ -CN AA e κ -CN BB. Gli autori infatti riportano un maggiore contenuto di grasso nelle cagliate ottenute dal latte ricco in κ -CN BB caratterizzato da migliori MCP, ma anche da una resa maggiore (Walsh et al, 1998).

5. Conclusioni

Le proprietà di coagulazione del latte misurate tramite lattodinamografia sono da tempo considerate degli indicatori dell'attitudine alla caseificazione del latte, e si presume che minori tempi di coagulazione associati a una maggiore consistenza del coagulo apportino un effettivo miglioramento alla resa casearia. Tale supposizione viene smentita dai risultati della presente tesi in cui non si sono riscontrate delle differenze significative di resa tra formaggi ottenuti a partire da latte con tracciati lattodinamografici differenti.

Il pH si conferma un fattore che riveste un importante ruolo nel processo di coagulazione del latte. Le frazioni caseiniche α_{s1} -CN, α_{s2} -CN e il GMP erano presenti in misura maggiore nelle tesi caratterizzate da migliori proprietà di coagulazione. Pertanto è possibile ipotizzare un effetto positivo di questi componenti sul processo di coagulazione, ma non sulla resa casearia. Anche il maggior contenuto di grassi delle tesi a miglior attitudine alla coagulazione non ha determinato miglioramenti in termini di resa casearia.

Mentre la procedura generale di selezione delle bovine, di lavorazione di ridotti volumi di latte e di misurazione delle rese è risultata agevole grazie alle minicaseificazioni sperimentali, il protocollo di lavorazione potrebbe aver determinato una standardizzazione delle rese casearie tale per cui è risultato impossibile evidenziare l'effetto eventualmente prodotto dal diverso tempo di coagulazione.

Pertanto i risultati di questo studio vanno valutati con cautela in quanto non è possibile escludere con certezza che le caratteristiche lattodinamografiche influenzino le rese casearie. Si rende perciò necessario effettuare ulteriori studi per valutare in che modo il momento della rottura delle cagliate ottenute da latte con proprietà di coagulazione differenti influenzino le rese casearie, soprattutto valutando le rese ricavate da cagliate rotte ad un tempo predeterminato, metodo diffuso nella pratica casearia.

Bibliografia

Aguggini G., Beghelli V. e Giulio L., Utet, 2004. Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia. Pagg. 817-824.

Aia (Associazione Italiana Allevatori), 2009. Quadro economico e relazione attività 2009. http://www.aia.it/downloads/relazione_2009.pdf

Alais C., Tecniche nuove, 2000. Scienza del latte. 3a edizione. Pagg.223-226.

Aleandri R., Buttazzoni L.G. and Schneider J.C., 1990. The effects of milk protein polymorphisms on milk components and cheese-producing ability. *J. Dairy Sci.* 73:241-255.

Aleandri R., Schneider J.C., Buttazzoni L.G., 1989. Evaluation of milk for cheese production based on milk characteristics and Formagraph measurements. *J. Dairy Sci.* 72:1967-1975.

Anema S.G., 1997. The effect of chymosin on κ -casein-coated polystyrene latex particles and bovine casein micelles. *Int. Dairy J.* 7:553-558.

Annibaldi S., 1973. Applicazioni della lattodinamografia, della gelometria e della tensiometria nella valutazione dell'attitudine del latte alla caseificazione. *Atti Corso Aggiornamento Tecnico Produzione Parmigiano-Reggiano*, Ed. Age, Reggio Emilia, pp.129-145.

Annibaldi S., Ferri G. and Mora R., 1977. Nuovi orientamenti nella valutazione tecnica del latte: tipizzazione lattodinamografica. *Sci. Tecn. Latt.-Cas.* 28:115-126.

Assolatte, 2009. Nel 2008 l'industria lattiero-casearia si conferma il primo settore alimentare italiano. http://www.assolatte.it/assolatte/download1.jsp?file=/assolatte/images/informa/news/allegati/1245395038879_completo.pdf

Auldish M.J., Johnston A.K., White N.J., Fitzsimons W.P., and Boland M.J., 2004. A comparison of the composition, coagulation characteristics and cheesemaking capacity of milk from Friesian and Jersey dairy cows. *J. Dairy Res.* 71:51-57.

Barbano D.M., Rasmussen R.R., and Lynch J.M., 1991. Influence of milk somatic cell count and milk age on cheese yield. *J. Dairy Sci.* 74:369-388.

Barbano D.M., and Sherbon J.W., 1984. Cheddar cheese yields in New York. *J Dairy Sci.* 67:1873-1883.

Bastian E.D., Brown R.J., and Ernstrom C.A., 1991. Plasmin Activity and Milk Coagulation. *J. Dairy Sci.* 74:3677-3685.

Bastian E.D., and Brown R.J., 1996. Plasmin in milk and dairy products: un update. *Int. Dairy J.* 6:435-457

Bertoni G., Calamari L. and Maianti M.G., 2001. Producing specific milks for speciality cheeses. *Proceedings of the Nutrition Society*, 60:231–246.

Blake A. J., Powers J. R., Luedecke L. O., and Clark S., 2005. Enhanced lactose cheese milk does not guarantee calcium lactate crystals in finished Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 88:2302–2311.

Bonfatti V., Di Martino G., Cecchinato A., Degano L., and Carnier P., 2010. Effects of CSN2-CSN3 haplotypes, BLG genotypes and detailed protein composition on coagulation properties of individual milk of Simmental cows. *J. Dairy Sci.* 93(8):3809–3817.

Bonfatti V., Grigoletto L., Cecchinato A., Gallo L., and Carnier P., 2008. Validation of a new reversed-phase high-performance liquid chromatography method for separation and identification of bovine milk protein genetic variants. *J. Chromatogr. A* 1195:101–106.

Bordin G., Cordeiro Raposo F., de la Calle B. and Rodriguez A.R., 2001. Identification and quantification of major bovine milk proteins by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 928:63–76.

Buchberger J., and Dovč P., 2000. Lactoprotein genetic variants in cattle and cheese making ability. *Food technol. biotechnol.* 38(2):91–98.

Cassandro M., Comin A., Ojala M., Dal Zotto R., De Marchi M., Gallo L., Carnier P., and Bittante G., 2008. Genetic Parameters of milk coagulation properties and their relationships with milk yield quality traits in Italian Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 91: 371-376.

Cassandro, M., and Marusi, M. 2001. La caseificabilità del latte di razza Frisone Italiana. [Milk coagulation ability in Italian Holstein-Friesian breed]. *Bianco Nero*. 9:43-47.

Castillo M., Payne F.A., González R., López M.B., and Laencina J., 2003. Determinación on-line del tiempo de coagulación en leche de cabra mediante dispersión de radiación NIR. *An.Vet.Murcia* 19:23-36.

Cecchi F., Summer A., and Leotta R., 2002. The variability of milk coagulation parameters in Italian Fresian dairy cows. *Annal. della Fac. di Med. Vet. Di Pisa*. LV:233-254.

Comin A., Cassandro M., Povinelli M., and Bittante G., 2005. Genetic aspects of milk coagulation properties in Italian Holstein cows. *Ital. J. Anim. Sci.* 4:10-12.

Coulon J.B., Dupont D., Pochet S., Pradel P. and Duployer H., 2001. Effect of genetic potential and level of feeding on milk protein composition. *J. of dairy Res.* 68(4):569-577.

Coulon J.B., Pradel P., Cochard T., and Poutrel B., 1998. Effect of Extreme Walking Conditions for Dairy Cowson Milk Yield, Chemical Composition, and Somatic Cell Count. *J. Dairy Sci.* 81:994–1003.

Daviau C., Famelart M.H., Pierre A., Goudédranche H., and Maubois J.L., 2000. Rennet coagulation of skim milk and curd drainage: effect of pH, casein concentration, ionic strength and heat treatment. *Lait.* 80:397-415.

Dal Zotto R., De Marchi M., Cecchinato M., Penasa M., Cassandro M., Carnier P., Gallo L., and Bittante G., 2008. Reproducibility and repeatability of measures of milk coagulation properties and predictive ability of mid-infrared reflectance spectroscopy. *J. Dairy Sci.* 91:4103-4112.

De Kruif C. G., 1999. Casein micelle interactions. *Int. Dairy J.* 9:183-188.

De Marchi M., Dal Zotto R., Cassandro M., and G. Bittante, 2007. Milk coagulation ability of five dairy cattle breeds. *J. Dairy Sci.* 90:3986–3992.

Eigel W. N., Butler J. E., Ernstrom C. A., Farrel H. M., Harwalkar V. R., Jennes R. and Whitney R. McL., *Nomenclature of Proteins of Cow's Milk: Fifth Revision.* *J. of Dairy Sci.* 67:1599-1631.

FAPRI (Food and Agricultural Policy Research Institute), 2008. World Dairy Products: FAPRI 2008 Agricultural Outlook.<http://www.fapri.iastate.edu/outlook/2008/text/16Dairy.pdf>

Farrell H. M. Jr., 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. and Swaisgood H. E., 2004. Nomenclature of the proteins of cows' milk-sixth revision. *J. Dairy Sci.* 87:1641–1674

Fagan C.C., Leedy M., Castillo M., Payne F.A., O'Donnell C.P. and O'Callaghan D.J., 2007. Development of a light scatter sensor technology for on-line monitoring of milk coagulation and whey separation. *J. of Food Engineering* 83:61-67.

Fagan C.C., Leedy M., Castillo M., Payne F.A., O'Donnell C.P. and O'Callaghan D.J., 2007b. Novel on-line sensor technology for continuous monitoring of milk coagulation and whey separation in cheesemaking. *J. Agric. and Food Chem.* 55:8836-8844.

Formaggioni P., Pecorari M., Franceschi P., Sabbioni A., Malacarne M., Summer A., Mariani P., 2004. Composizione chimica, coagulazione presamica e resa del latte nella caseificazione Parmigiano-Reggiano: variazioni stagionali. *Ann. Fac. Medic. Vet. di Parma XXIV*:327-343

Formaggioni P., Summer A., Malacarne M. and Mariani P., 1999. Milk protein polymorphism: Detection and diffusion of the genetic variants in *Bos* genus. *Annal. della Fac. di Med. Vet. Di Parma XIX*:127–165.

Gataldi E., Lagaude A., Marchesseau S., and Tarodo De La Fuente B., 1997. Acid milk gel formation as affected by total solids content. *J. of Food Sci.* 62:671-687.

Gerung A., 2005. Physical properties of emulsion stabilized by κ -casein before and after treatment with chymosin. Thesis of Texas A&M University. Master Of Science. <http://hdl.handle.net/1969.1/3323>

Ghavi Hossein-Zadeh N., and Ardalan M., 2010. Genetic relationship between milk urea nitrogen and reproductive performance in Holstein dairy cows. *Animal*. DOI:10.1017/S1751731110001606

Guo M., Park Y. W., Dixon P. H. Gilmore J. A., and Kindstedt P. S., 2004. Relationship between the yield of cheese (Chevre) and chemical composition of goat milk. *Small Ruminant Research.* 52:103–107.

Hadjiponayiotou, 1995. Composition of ewe, goat and cow milk and of colostrum of ewes and goats. *Small Ruminants Research.*18:255-262

Hallén E., Lundén A., Allmere T., and Andrén A., 2010. Casein retention in curd and loss of casein into whey at chymosin-induced coagulation of milk. *J. Dairy Res.* 77: 71–76.

Hynes E., Ogier J.C., Delacroix-Buchet A., 2000. Protocol for the manufacture of miniature washed-curd cheeses under controlled microbiological conditions. *International Dairy Journal* 10:733-737.

Ikonen T., Ahlfors K., Kempe R., Ojala M., and O. Ruottinen O., 1999b. Genetic parameters for the milk coagulation properties and prevalence of noncoagulating milk in Finnish dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:205–214.

Ikonen T., 2000. Possibilities of genetic improvement of milk coagulation properties of dairy cows. Ph.D. Diss., Univ. Helsinki, Helsinki, Finland. <https://oa.doria.fi/handle/10024/3114>

Ikonen T., Morri S., Tyrisevä A.M., Ruottinen O. and Ojala M., 2004. Genetic and phenotypic correlations between milk coagulation properties, milk production traits, somatic cell count, caseine content, and pH of milk. *J. Dairy Sci.* 87:458-467.

Ikonen T., Ruottinen O., Syvaaja, Saarinen K., Pahkala E. and Ojala M., 1999a. Effect of milk coagulation properties of herd bulk milks on yield and composition of Emmental cheese. *Agricultural and Food Science in Finland.* 8:411-422.

Ismea (Istituto di Servizi per il Mercato Agricolo Alimentare), 2008. Outlook dell'agroalimentare italiano, rapporto annuale. <http://www.ismea.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/3921>

Istat (Istituto Nazionale di Statistica), 2006. Produzione di latte e produzione lattiero-casearia. Anno 2004. http://www.istat.it/salastampa/comunicati/non_calendario/20060112_00/

Istat (Istituto Nazionale di Statistica), 2008. I prodotti agroalimentari di qualità dop e igp. Al 31 dicembre 2007. http://www.istat.it/salastampa/comunicati/non_calendario/20080912_00/

Jay J.M., Loessner M.J., and Golden D.A., Springer Verlag Italia, 2009. *Microbiologia degli alimenti.* Pagg. 164-166.

Jenness R., Larson B.L., McMeekin T.L., Swanson A.M., Whitnah C.H. and Whitney R., 1956. Nomenclature of the Proteins of Bovine Milk: Report of the Committee on Milk Protein Nomenclature, Classification, and Methodology of the Manufacturing Section of A.D.S.A.. *J. Dairy Sci.* 39:536-541.

Johnson M.E., Chen C.M. e Jaeggi J.J., 2001. Effect of rennet coagulation time on composition, yield, and quality of reduced-fat cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 84:1027-1033.

Jõudu I., Henno M., Kaart T., Püssa T., and Kärt O., 2008. The effect of milk protein contents on the rennet coagulation properties of milk from individual dairy cows. *International Dairy Journal.* 18:964-967.

Kindstedt P.S., Duthie A.H. and Nilson K.M. 1983. Estimation of casein from total protein in

commingled milk. J. Dairy Sci.66:2459-2463.

Kowalchuk A. W. and Olson N. F., 1977. Effects of pH and temperature on the secondary phase of milk clotting by rennet. J. Dairy Sci. 60:1256-1259.

Kubarsepp I., Henno M., Viinalass H., and Sabre D., 2005. Effect of κ -casein and β -lactoglobulin genotypes on the milk rennet coagulation properties. Agronomy Research 3(1):55-64.

Li J., and Dalgleish D.G., 2006. Controlled proteolysis and the properties of milk gels. J. Agric. Food Chem. 54:4687-4695.

Lindmark-Månsson H, Fondén R. and Pettersson H.E., 2003. Composition of Swedish dairy milk. International dairy journal. 13:409-425.

Lindmark-Månsson H, 2008. Fatty acids in bovine milk fat. DOI: 10.3402/fnr.v52i0.1821.

Lindström U.B., Antila V., and Syväjärvi J., 1984. A note on some genetic and nongenetic factors affecting clotting time of Ayrshire milk. Acta Agric. Scand. 34: 349 - 355.

Linzell J. L., Mepham T. B., and Peaker M., 1976. The secretion of citrate into milk. J. Physiol. 260:739-750.

Lucey J. and Kelly J., 1994. Cheese yield. International journey of dairy technology. 47:1-14.

Lucy J.A., and Singh H., 1998. Formation and physical properties of acid milk gels: a review. Food Research International. 30(7):529-542.

Macheboeuf D., Coulon J.-B., and D'Hour P., 1993. Effect of breed, protein genetic variants and feeding on cows' milk coagulation properties. J. Dairy Res. 60: 43-54.

Mariani P., P. Serventi and E. Fossa, 1997b. Contenuti di caseina, varianti genetiche ed attitudine tecnologica-casearia del latte delle vacche di razza Bruna nella produzione del formaggio Grana. Allegato La razza Bruna italiana n. 2/1997.

Mariani P., Summer A., Formaggioni P., Beltrami A., Sandri S., 1998. Andamento mensile delle principali caratteristiche di coagulazione del latte di singoli allevamenti di vacche di razza Frisona con particolare riguardo alla velocità di formazione del coagulo. Ann. Fac. Med. Veter., Univ. Parma. XVIII:65-83.

Mariani P., Summer A., Formaggioni P., M. Malacarne, 2002. La qualità casearia del latte di differenti razze bovine. Riv. La razza Bruna. 1: 7-13.

Mariani P., Summer A., Formaggioni P., Malacarne M., and Battistotti B., 2001. Rilievi sui principali requisiti tecnologico-caseari del latte per la produzione di formaggio grana. Scienza e Tecnica Lattierocasearia. 52: 49–91.

Mariani P., Summer A., Zanzucchi G., Fieni S., 1997. Relazione tra la consistenza del coagulo - valutata con differenti criteri mediante Formagraph - e il contenuto in caseina del latte. Ann. Fac. Med. Veter., Univ. Parma. XVII:195-204.

Mariani P., Zanzucchi G., Bonatti P., Fossa E., Pecorari M., 1992. Caratteristiche di coagulazione del latte in rapporto al tipo genetico della β -caseina in vacche di razza Bruna. Sci. Tecn. Latt.-Cas. 43:7-17.

Marziali A.S., and Ng-Kwai-Hang K.F., 1986a. Effects of milk composition and genetic polymorphism on coagulation properties of milk. J. Dairy Sci. 69:1793-1798.

Marziali A.S., and Ng-Kwai-Hang K.F., 1986b. Relationships between milk protein polymorphisms and cheese yielding capacity. J. Dairy Sci. 69:1193-1201.

Macheboeuf D., Coulon J.-B., and D'Hour P., 1993. Effect of breed, protein genetic variants, feeding and age on cows' milk coagulation properties. INRA Productions Animales 6(5):333-344.

Mayer H.K., Ortner M., Tschager E., and Ginzinger W., 1997. Composite milk protein phenotypes in relation to composition and cheesemaking properties of milk. Int. dairy J. 7:305-310.

Mayes J.J. and Sutherland B.J., 1984. Coagulum firmness and yield in Cheddar cheese manufacture. The role of the curd firmness instrument in determining cutting time. Australian J. Dairy Tech. 39:69-73.

McMahon D.J. and Brown R.J., 1982. Evaluation of Formagraph for comparing rennet solutions. J. Dairy Sci. 65:1639-1642.

Milesi M.M., Candiotti M. and Hynes E., 2007. Mini soft cheese as a simple model for biochemical studies on cheese-making and ripening. LWT 40: 1427-1433.

- Mistry V. V., 2001. Low fat cheese technology. *International Dairy J.* 11:413–422
- Muir D.D., Banks J.M., Powell A.K., and Sweetsur A. W. M., 1983. Milk composition-manufacturing properties. *Proc. Nutr. Soc.* 42:385-397.
- Najera A. I., de Renobalesb M. and 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.* 80:345–352.
- Ng-Kwai-Hang K.F., Hayes J.F., Moxley J.E. and Monardes H.G., 1982. Environmental influences on protein content and composition of bovine milk. *J. Dairy Sci.* 65:1993-1998.
- Ng-Kwai-Hang K.F., Hayes J.F., Moxley J.E. and Monardes H.G., 1986. Relationships between milk protein polymorphisms and major milk constituents in Holstein-Friesian cows. *J. Dairy Sci.* 69:22-26.
- Okigbo L. M., Richardson G. H., Brown R. J. and Ernstrom C. A., 1985c. Casein composition of cow's milk of different chymosin coagulation properties. *J Dairy Sci* 68:1887-1892
- Okigbo L. M., Richardson G. H., Brown R. J. and Ernstrom C. A., 1985a. Interactions of calcium, pH, temperature and chimosine during milk coagulation. *J. Dairy Sci.* 68:3135-3142.
- Okigbo L. M., Richardson G. H., Brown R. J. and Ernstrom C. A., 1985b. Variation in coagulation Proprieties of Milk from Individual Cows. *J. Dairy Sci.* 68:822-828.
- O'Callaghan D.J., O'Donnel C.P. and Payne F.A., 2002. Review of systems for monitoring curd settings during cheesemaking. *International Journal of Dairy Technology.* 55:65-74.
- Othmane M.H., Carriedo J.A., de la Fuente Crespo L.F. and San Primitivo F., 2002. An individual laboratory cheese-making method for selection in dairy ewes. *Small Ruminant research* 45:67-73.
- Pieri R. and Del Bravo F., 2005. Il mercato del latte - Rapporto 2005. Osservatorio sul mercato dei prodotti lattiero-caseari, ISMEA.
- Politis I. Ng-Kwai-Hang K.F., 1988. Effects of somatic cell count and milk composition on cheesecomposition and cheese making efficiency. *J. Dairy Sci.* 71:1711-1719
- Richardson G.H., Okigbo L.M. and Thorpe, 1985. Instruments for measuring milk coagulation in cheese vats. *J. Dairy Sci.* 68:32-36.

Ruettimann K.W., and Ladisch M.R., 1987. Review. Casein micelles: structure, properties and enzymatic coagulation. *Enzyme Microbiol. Technol.* 9:578-589.

Rutherford K.J., and Gill H.S., 2000. Peptides affecting coagulation. *British J. of Nutrition.* 84(1):S99-S102.

Sandri S., F. Tosi, M.S. Mariani, P. Vecchia, Malacarne M. and Summer A. , 2001. Osservazioni sull'andamento delle principali caratteristiche casearie del latte per il parmigiano-reggiano durante gli anni '90. *Annal. della Fac. di Med. Vet. Di Parma.* XXI:235-247.

Schrader K., Buchheim W., and Morr C. V., 1997. High pressure effects on the colloidal calcium phosphate and the structural integrity of micellar casein in milk. Part 1. High pressure dissolution of colloidal calcium phosphate in heated milk systems. *Molecular Nutrition & Food Research/ Nahrung.* 41(3):133-138.

Shakeel Ur Rehman, McSweeney P.L.H. and Fox P.F., 1998. Protocol for the manufacture of miniature cheeses. *Lait* 78:607-620.

Srinivasan M. and Lucey J. A., 2002. Effects of added plasmin on the formation and rheological properties of rennet-induced skim milk gels. *J. Dairy Sci.* 85:1070–1078.

Summer A., Malacarne M., Martuzzi F., and Mariani P., 2002. Structural and functional characteristic of modenese cow milk in Parmigiano - Reggiano cheese production. *Ann. Fac. Medic. Vet. di Parma.* XXII:163-174.

Summer A., Pecorari M., Fossa E., Malacarne M., Formaggioni P., Franceschi P., Mariani P., 2004. Protein fractions, rennet coagulation properties and Parmigiano Reggiano cheese yield of milk from italian brown cow. <http://www.anarb.it/Bruna2004/inglese/Presentazioni/papers/summer.pdf>

Thomas W.R., Harper W.J., and Gould I.A. 1954. Free Fatty Acid Content of Fresh Milk as Related to Portions of Milk Drawn. *J. Dairy Sci.*, 37: 717.

Tsioulpas A., Lewis M.J., and A.S. Grandison, 2007. Effect of minerals on casein micelle stability of cows' milk. *J. of Dairy Research.* 74:2:167-173.

Tyrisevä A.-M., 2008. Option for selecting dairy cattle for milk coagulation ability. Ph.D. Diss., Univ. Helsinki, Helsinki, Finland. <https://oa.doria.fi/handle/10024/37567>

Udabage P., McKinnon I. R., and Augustin M. A., 2001. Effects of mineral salts and calcium chelating agents on the gelation of renneted skim milk. *J. Dairy Sci.* 84:1569–1575.

Wedholm A., Larsen L.B., Lindmark-Mansson H., Karlsson A.H., and Andrén A., 2006. Effect of protein composition on the cheese-making properties of milk from individual dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89:3296-3305.

Welper R.D. and Freeman A.E., 1992. Genetic parameters for yield traits of Holsteins including lactose and somatic cell score. *J. Dairy Sci.* 75:1342-1348.

Zhang Z.P., and Aoki T., 1996. Behavior of calcium and phosphate in bovine casein micelles. *Int. Dairy J.* 6:769-780.

Zannoni M. and Annibaldi S., 1981. Standardization of the renneting ability of milk by Formagraph. *Sci. Tec. Latt. Cas.* 32: 79-94.

Zeng S.S., 1996. Comparison of goat milk standards with cow milk standards for analyses of somatic cell count, fat and protein in goat milk. *Small Ruminant Research* 21:221-225.

Ringraziamenti

A conclusione di questa tesi vorrei ringraziare tutte le persone che mi hanno permesso di realizzare questo progetto e a tutti coloro che mi hanno aiutata a migliorare sia dal punto di vista intellettuale che dal punto di vista umano.

Al prof. Carnier che mi ha permesso di intraprendere questo percorso che mi ha arricchita molto.

A Valentina, brillante correlatrice, che mi ha seguita con attenzione e che mi ha guidata nell'elaborazione di questa tesi.

A Giada, per avermi aiutata e sostenuta a tutte le ore.

Al Dott. Simonetto e a tutto il personale dell'Azienda Sperimentale L.Toniolo per la grande disponibilità concessami.

A Nicola, a Claudio e al personale del Dipartimento di Scienze Animali che mi hanno affiancata ed aiutata in caseificio e in laboratorio.

A tutti i miei amici e compagni di corso, a Lugugnana, a Padova, in Italia e in Europa, per essermi sempre rimasti accanto indipendentemente dalla lontananza e per avermi sopportata sempre e comunque (soprattutto prima degli esami).

Ad Antonio, senza il cui straordinario supporto emotivo, intellettuale e culinario non sarei mai riuscita a raggiungere questo obiettivo.

Un ultimo particolare ringraziamento alla mia famiglia, che mi ha permesso di studiare a Padova e a Murcia, ma che soprattutto mi ha donato entusiasmo, sostegno e amore.

