



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse Naturali e
Ambiente (DAFNAE)

Corso di Laurea magistrale in Biotecnologie per l'Alimentazione

TESI DI LAUREA

**Effetto della caseificazione di caciotte con microparticolato su
composizione, resa e concentrazione di tioli a basso peso
molecolare**

Relatore:

Prof. Cassandro Martino

Correlatore:

Prof. Masi Antonio

Dott.ssa Sturaro Alba

Laureando:

Niero Giovanni

Matricola n°

1034700

ANNO ACCADEMICO 2012/2013

INDICE

Riassunto e parole chiave	III
Abstract and keywords	V
1.INTRODUZIONE	1
1.1 Il latte	1
1.1.1 Composizione chimica.....	1
1.1.2 Qualità tecnologiche.....	3
1.2 Il siero	4
1.2.1 Breve storia.....	4
1.2.2 Composizione del siero.....	4
1.2.3 Trattamenti del siero.....	7
1.2.4 Utilizzo del siero.....	11
1.3 Proprietà antiossidanti del siero	14
1.3.1 Stress ossidativo, specie reattive e radicali liberi dell'ossigeno.....	14
1.3.2 Attività antiossidante del glutatione.....	16
1.3.3 Biosintesi del glutatione.....	17
1.3.4 Gli antiossidanti nel siero.....	18
1.4 Scopo	18
2. MATERIALI E METODI	21
2.1 Prove di mini caseificazione	21
2.1.1 Disegno sperimentale.....	21
2.1.2 Raccolta dei campioni.....	22
2.1.3 Mini caseificazioni.....	22
2.1.4 Tempo di coagulazione della cagliata.....	23
2.1.5 Composizione del formaggio e resa casearia.....	24
2.2 Determinazione della composizione proteica del siero	24
2.3 Rilevazione e quantificazione dei composti tiolici	25
2.3.1 Preparazione dei campioni.....	26
2.3.2 Riduzione e derivatizzazione dei campioni.....	26
2.3.3 Determinazione cromatografica della concentrazione dei tioli.....	26
2.3.4 Rette di taratura.....	27
2.4 Analisi statistica	27

3. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	29
3.1 Effetto della caseificazione sul tempo di coagulazione (RCT), sulla composizione e resa di cagliata e caciotte.....	29
3.2 Effetto della caseificazione sulla composizione del siero.....	39
3.3 Effetto della caseificazione sulla concentrazione di tioli a basso peso molecolare.....	43
4. CONCLUSIONI.....	47
5. BIBLIOGRAFIA.....	49

Riassunto e parole chiave

Negli ultimi anni il sistema economico delle attività industriali su larga scala è sempre più orientato verso modelli di produzione sostenibili. La gestione e l'ottimizzazione dei processi produttivi gioca un ruolo fondamentale per la minimizzazione del consumo di materie prime, energia e quantità di rifiuti prodotti. La valorizzazione dei reflui lattiero-caseari rappresenta un interessante esempio di questo tipo di approccio.

Storicamente il siero di caseificazione è stato considerato a lungo come uno scarto, rappresentando per l'industria casearia italiana un problema per l'elevato costo di smaltimento e per l'importante carico inquinante (Chemical Oxygen Demand compreso tra 35 e 45 Kg/L).

Solo recentemente si sono iniziate ad attuare una serie di procedure che mirano alla valorizzazione del siero attraverso il recupero dei suoi principali costituenti (lattosio, siero proteine, tioli a basso peso molecolare), utili in diversi ambiti, come quello del settore alimentare e farmaceutico, o per la produzione di biocombustibili.

Le tecniche più comunemente impiegate per il recupero dei costituenti nobili presenti nel siero sono basate sull'uso di tecnologie a membrana. Nell'industria casearia il siero viene fatto fluire inizialmente attraverso membrane da ultrafiltrazione, in grado di concentrare il siero di circa 10 volte; successivamente le siero proteine concentrate subiscono processi di microparticolazione che portano alla produzione di aggregati proteici (microparticolato), utilizzabili in diversi settori dell'industria alimentare per il loro elevato potere gelificante.

Questo lavoro di tesi si è proposto l'obiettivo di indagare come il microparticolato (MP) aggiunto nelle lavorazioni casearie influenzi le proprietà coagulative del latte, la concentrazione di tioli a basso peso molecolare, la composizione e la resa del formaggio.

In particolare sono state effettuate delle mini caseificazioni testando concentrazioni di microparticolato del 3 e 4% (vol/vol) su tre diversi tipi di latte, con rapporti di proteina/grasso pari a 0.8, 0.9, 1.0, ottenuti rispettivamente con alto, medio e basso contenuto di grasso e mantenendo stabile il livello proteico a 3.5%.

La composizione chimica del latte di partenza e dei formaggi prodotti è stata determinata utilizzando MilkScan e FoodScan rispettivamente. La composizione chimica del siero e dei tioli a basso peso molecolare è stata determinata utilizzando tecnologia RP-HPLC con rivelatore DAD e fluorimetrico rispettivamente.

Ciò che si osserva è che le due tesi di microparticolato testate non influiscono sui principali parametri relativi alla caseificazione (RCT e resa); al contrario risulta molto importante la composizione del latte. Emerge infatti che basse percentuali di grasso nel latte di partenza sono associate a un peggioramento degli stessi indici. La concentrazione dei tioli a basso peso molecolare risulta infine piuttosto stabile, sia al variare della percentuale di microparticolato impiegata, sia al variare del rapporto proteina/grasso. L'effetto della caseificazione inoltre porta alla perdita di tali molecole nel siero; da questo punto di vista quindi non sembra conveniente usare un latte ricco di tioli per le caseificazioni: al di là di una certa concentrazione infatti queste molecole non vengono trattenute nella cagliata ma vengono rilasciate nel siero, nonostante la presenza del microparticolato.

Ulteriori studi dovranno essere condotti per comprendere meglio le proprietà dei tioli durante il processo di caseificazione e per approfondire come varino resa e composizione di formaggi, yogurt e gelati prodotti con microparticolato.

Parole chiave

Microparticolato, Siero, RP-HPLC, Latte, Tioli.

Abstract and keywords

In recent years the economic system of industrial activities on a large scale is more and more oriented towards sustainable production patterns. The management and the optimisation of production processes plays a key role in minimizing the consumption of raw materials, energy and amount of waste produced. The re-utilization of the waste produced by the dairy industries represents an interesting example of this type of approach.

Historically, milk whey has been considered an industrial waste, because of its high cost of disposal and because of its polluting potential (Chemical Oxygen Demand between 35-45 Kg/L).

Nowadays several procedures are available to whey constituents' recovery (e.g. lactose, whey protein, low molecular weight thiols) which are useful in food and pharmaceutical industries or for the production of biofuels.

The most common techniques for the recovery of noble constituents of the whey are based on the use of membrane technologies. In the dairy industry whey is processed initially through ultrafiltration membranes, capable of concentrating the whey of about 10 times; thereafter, the whey protein concentrate undergo processes that lead to the production of protein aggregates (microparticulated), useful in different sectors of the food industry for their high gelling power.

This thesis has proposed the objective of investigating how the microparticulated (MP) added in dairy processes, influences milk coagulation properties, the concentration of low molecular weight thiols, the composition and yield of cheese. In particular mini-cheese making trial with MP (3-4% vol/vol) were used with three different types of milk, with ratios protein/fat of 0.8, 0.9, 1.0 respectively, at stable level of protein.

The chemical composition of the starting milk and cheese products was determined using MilkScan and FoodScan respectively. The chemical composition of the whey and low molecular thiols were analyzed by RP-HPLC.

We observed that the two theses of microparticulated tested do not affect the main parameters related to cheese making (RCT and yield); on the other hand we found that a low percentage of fat in the starting milk is associated with a worsening of the same parameters. The concentration of low molecular weigh thiols is finally quite stable, both to vary the percentage of microparticulated or the protein/fat ratio; moreover beyond a certain concentration, these molecules are not retained in the curd, but are released in the

whey. For this reason, does not appear convenient to use rich thiols milk for cheese making: further studies should be conducted in order to investigate the properties of thiols during the cheese making process, but also to the yield and composition of cheese produced with microparticulated.

Keywords

Microparticulated, Whey, RP-HPLC, Milk, Thiols.

1. INTRODUZIONE

1.1 Il latte

1.1.1 Composizione chimica

Il latte è il fluido prodotto dalla secrezione delle ghiandole mammarie di mammiferi di sesso femminile. La legislazione italiana definisce il latte (senza ulteriori specificazioni) come prodotto ottenuto dalla mungitura regolare, ininterrotta e completa di vacche lattifere in buono stato di salute e nutrizione. Il latte non vaccino invece deve essere indicato con il nome della specie animale da cui proviene (“latte di capra”).

Il latte è una miscela di componenti che possono essere presenti in soluzione (sali e vitamine idrosolubili), in fase colloidale (proteine, parte dei fosfati e citrati di calcio) o in emulsione (lipidi e proteine liposolubili). Il latte contiene anche altre componenti in misura minore, come enzimi, ormoni, elementi in tracce e gas disciolti (diossido di carbonio, ossigeno e azoto).

Il latte possiede un pH tra 6.5 e 6.7; al di fuori di questo range le proprietà chimiche e fisiche del latte vengono alterate, con conseguenze negative sui processi di caseificazione. Le fluttuazioni di pH possono essere causate da una dieta povera, da mastiti o dalle diverse fasi dello stadio di lattazione.

In media il latte ha una densità di 1.032 g/ml, un punto di congelamento ed ebollizione rispettivamente pari a -0.55 °C e >100 °C, con un contenuto calorico di 712 kcal/kg (Secchieri, 2008).

Tabella 1. Composizione chimica media del latte vaccino (Salvadori del Prato, 1998).

Componente	g/L	% p/p
Acqua	900-910	86.9-88.5
Grasso	35-45	3.3-4.5
Lattosio	47-52	4.8-5.1
Sostanze azotate	33-36	2.8-3.3
Ceneri	9.0-9.5	0.6-0.7
Solidi totali	125-130	11-13

La composizione chimica media del latte vaccino è mostrata nella Tabella 1. Quasi il 90% del latte è costituito da acqua in cui si trovano disciolti i carboidrati, per la maggior parte costituiti dal lattosio (disaccaride composto da D-glucosio e da D-galattosio) oltre che da

carboidrati legati alle proteine che contribuiscono alla stabilizzazione delle caseine e intervengono nel processo di sintesi del lattosio (Corradini, 1995). Essendo il lattosio biodisponibile, esso costituisce il principale substrato per le fermentazioni microbiche del latte e dei prodotti caseari (formaggi e yogurt).

Il tenore di grasso nel latte di vacca, tra il 3.3 e il 4.5%, presenta il range di variazione più elevato di tutte le componenti. I trigliceridi costituiscono il 98 – 99% della frazione grassa, mentre il rimanente 1 – 2% è costituito da fosfolipidi, steroli, carotenoidi, dalle vitamine liposolubili A, D, E, K, e da qualche traccia di acidi grassi (Webb e Johnson, 1965). Le proporzioni che sussistono tra queste componenti dipendono in buona parte da fattori quali la specie, la razza, stadio di lattazione, tipologia e quantità di alimenti somministrati. La quantità di ceneri nel latte costituisce un valore indice della quantità di minerali in esso contenuti. Le ceneri contengono sostanze derivanti da composti organici e inorganici del latte (K_2O , CaO , Na_2O , MgO , P_2O_5) (Webb e Johnson, 1965). Nel latte vaccino il contenuto di ceneri risulta piuttosto stabile, attorno allo 0.7%; un valore superiore allo 0.9% può essere determinato da condizioni anormali delle ghiandole mammarie (Webb e Johnson, 1965).

Il latte di vacca contiene mediamente il 3.5% (g/l) di sostanze azotate, rappresentate in gran parte da molecole organiche come le proteine; di queste circa il 78% sono caseine, circa il 20% è costituito da proteine del siero, mentre il restante 2 – 3% è costituito da componenti non proteiche non dializzabili (urea, nucleotidi, aminoacidi). Le caseine del latte esistono sotto forma di diverse frazioni. La più abbondante di queste è la α -caseina (proteina eterogenea, con numerose varianti, quali la α -s1 e la α -s2), seguita dalla β -caseina, dalla κ -caseina (fondamentale in fase di caseificazione) e dalla γ -caseina (che deriva dalla degradazione della β -caseina). Le tre principali proteine del siero sono invece la β -lattoglobulina, la α -lattoalbumina e l'albumina di siero bovino; esse rappresentano rispettivamente il 50, il 20 e il 10% della frazione siero proteica (Hallen, 2008); il restante 20% è composto da immunoglobuline e proteine ad attività enzimatica. Durante il processo di caseificazione, e in particolare in fase di coagulazione, le proteine del siero non vengono inglobate nella cagliata e vengono perciò rimosse assieme al siero.

Altri costituenti sono sostanze aromatiche, che conferiscono al latte il tipico aroma, e pigmenti idrosolubili e liposolubili quali caroteni e riboflavina, che conferiscono riflessi giallognoli al latte intero e tonalità verdognole al latte scremato.

1.1.2 Qualità tecnologiche

Uno dei principali utilizzi del latte, soprattutto in Italia, risulta essere la trasformazione casearia; nel nostro paese oltre il 70% del latte è destinato alla produzione di formaggi (Salvadori del Prato, 1998). La coagulazione del latte implica la formazione di grossi aggregati micellari di caseina, che nel loro insieme formano ciò che viene definita cagliata. Vi sono due metodi per indurre l'aggregazione delle caseine in micelle, e quindi la caseificazione: la prima tecnica è enzimatica, e sfrutta l'azione della chimosina e della pepsina contenute nel caglio, la seconda tecnica prevede che la coagulazione avvenga per acidificazione.

Le proprietà coagulative del latte (MCP) sono influenzate da diverse caratteristiche intrinseche del latte. Le più importanti sono il pH, l'acidità titolabile, la concentrazione di calcio e la temperatura: il tempo di coagulazione diminuisce al diminuire del pH, all'aumentare della temperatura e in presenza di elevati livelli di calcio, libero o legato.

Un ulteriore fattore che certamente influenza le MCP è da individuarsi nei polimorfismi dei geni codificanti per le proteine del latte: le varianti B della k-caseina e della β -lattoglobulina favoriscono la coagulazione del latte e la formazione della cagliata (Ikonen, 2000). La variante B della k-caseina porta ad un aumento della concentrazione delle caseine e delle k-caseine, nonché a una dimensione ottimale delle micelle caseiniche (Van den Berg et al., 1992).

Tra le caratteristiche estrinseche che influenzano le proprietà di coagulazione sono da ricordare lo stadio di lattazione, il management aziendale e il numero di parti. Per quel che riguarda le fasi di lattazione, secondo alcuni autori le migliori proprietà coagulative del latte si registrano all'inizio e alla fine della lattazione (Tyriseva et al., 2004). In particolare nelle prime fasi della lattazione il pH del latte raggiunge i livelli più bassi mentre la concentrazione di calcio è ai livelli più alti (Ostensen et al., 1997).

Anche il management aziendale, per quel che riguarda la quantità di concentrati somministrati agli animali e la frequenza con la quale le vacche vengono alimentate, influenza le MCP (Tyriseva et al., 2004); inoltre, come dimostrato da alcuni autori, gli allevatori possono influire sulla qualità del latte e sulle sue proprietà coagulative attraverso la selezione della razza (Auldish et al., 2004; De Marchi et al., 2007; De Marchi et al., 2008). Infine gli studi che valutano l'effetto del numero di parti sulle MCP, così come quelli che approfondiscono l'effetto della stagione sulle MCP, risultano essere contraddittori.

1.2 Il siero

1.2.1 Breve storia

Il siero è un prodotto secondario che si ottiene dal processo di caseificazione e in generale dalle lavorazioni dell'industria casearia. Si tratta della frazione liquida risultante dalla coagulazione del latte e dalla successiva separazione della cagliata. Il siero ha un colore giallastro/verdognolo, talvolta con riflessi blu, a seconda della tipologia e della qualità del latte di partenza (Smithers, 2008). Per ogni chilo di formaggio prodotto si ottengono in media circa 9 litri di siero; da questo dato è facile immaginare e capire come i grossi caseifici ne producano in enormi quantità (nell'ordine di 10^5 litri al giorno) (Jelen, 2003). L'attività casearia ha avuto origine circa 8000 anni fa, probabilmente nella regione della Mezzaluna Fertile, in seguito a trattamenti di acidificazione del latte e alla conseguente separazione della cagliata e del siero. Il riscaldamento del siero e la separazione dei solidi in esso contenuti portarono poi alla produzione della ricotta. Originariamente il siero in eccesso veniva usato come mangime per maiali, come fertilizzante, o semplicemente scartato. In tempi più recenti, attorno alla metà del 1600, il siero divenne una bevanda di moda nelle città inglesi, con l'apertura di "*whey houses*" che potremmo definire come l'analogo degli odierni caffè; nel XIX secolo il siero veniva utilizzato come ingrediente in molte bevande, mentre nel XX secolo vi fu un fiorire di studi per l'estrazione delle sue componenti che venivano poi utilizzate nelle industrie cosmetiche e farmaceutiche. Il crescente interesse nelle applicazioni industriali del siero ha portato allo sviluppo di processi per il recupero di questo prodotto e delle sue componenti. In Italia, negli anni 90, vennero istituiti i primi centri per il recupero e la concentrazione del siero.

1.2.2 Composizione del siero

Il siero è una miscela complessa di tipo acquoso contenente circa il 7% di solidi in soluzione. Tali solidi sono composti dal 10-12% di proteine, dal 74% di lattosio, dall'8% di minerali, dal 3% di grasso e da un ulteriore 3% di acido lattico (Morr, 1989). I fattori che influenzano maggiormente la composizione del siero sono la qualità del latte e la tecnica di produzione del formaggio (temperatura di coagulazione e tempo di taglio della cagliata).

Il lattosio, disaccaride composto da glucosio e galattosio, è presente in soluzione in due forme: la forma α , solubile a elevate temperature, e la forma β , solubile in normali condizioni ambientali. La dolcezza del lattosio in soluzione è pari al 20% della dolcezza

del saccarosio. Il lattosio costituisce un'importante risorsa di energia nella dieta quotidiana e dal punto di vista funzionale favorisce l'assorbimento del calcio a livello intestinale.

Il siero contiene inoltre proteine solubili, indicate solitamente come siero proteine. Comparato ad altri alimenti ricchi in proteine, nel siero risultano particolarmente abbondanti aminoacidi ramificati, come la valina, l'isoleucina e la leucina. In particolare quest'ultima è un importante fattore per la crescita e la riparazione dei tessuti. Le proteine del siero sono ricche anche di aminoacidi contenenti zolfo, quali cisteina e metionina, in grado di promuovere la sintesi intracellulare di glutatione (Marshall, 2004). Le proteine del siero sono la β -lattoglobulina (β -LG), la α -lattoalbumina (α -LA), la albumina di siero bovino (BSA), il caseino macropeptide (CMP), le immunoglobuline (Ig), la lattoferrina (LF), la lattoperossidasi e una piccola quantità di altri enzimi e proteine, come il proteosopeptone (PP). Le frazioni proteiche e la relativa funzione biologica sono state descritte da Marshall (1998) e sono riassunte in Tabella 2.

Tabella 2. Composizione e funzione biologica delle siero proteine nel latte bovino (Marshall, 1998).

Proteina	g/L	Funzione biologica
Per il vitello		
β -LG	3.2	Trasportatore pro vitamina A
α -LA	1.2	Sintesi del lattosio
BSA	0.4	Trasportatore degli acidi grassi
IgG	0.8	Immunità passive
Generale		
LF	0.2	Agente batteriostatico
LP	0.03	Agente antibatterico
Enzimi	0.03	Indicatori di salute
PP	>1	Attività oppioide

β -LG β -lattoglobulina, α -LA α -lattoalbumina, BSA albumina di siero bovino, IgG immunoglobulina G, LF lattoferrina, LP lattoperossidasi, PP proteoso-peptone

La proteina più abbondante del siero è la β -lattoglobulina (β -LG) che rappresenta approssimativamente la metà delle proteine del siero bovino. Il latte vaccino può contenere due varianti di β -lattoglobulina in miscela, la variante A e la variante B. Le abbondanze relative di una e dell'altra forma di β -lattoglobulina sono caratteristiche geneticamente determinate. In soluzione, a un pH di 5.2, la β -lattoglobulina esiste prevalentemente in forma dimerica, le cui singole unità sono unite da legami non covalenti. Le variazioni di pH possono portare alla dissociazione della proteina nei suoi

monomeri, mentre a $\text{pH} > 8$ si può osservare l'ossidazione dei gruppi SH. Le β -lattoglobuline sono una ricca risorsa di cisteina, un aminoacido essenziale che stimola la sintesi del glutatione (tripeptide prodotto dal fegato ad azione antiossidante).

La seconda proteina del siero in termini di abbondanza è la α -lattoalbumina (α -LA), che costituisce il 20-25% delle proteine del siero e contiene una grande varietà di aminoacidi, inclusi aminoacidi a catena laterale ramificata e aminoacidi essenziali. A $\text{pH} < 4$ la α -lattoalbumina va incontro a denaturazione; in questa conformazione può essere attaccata e digerita dalla pepsina a livello dello stomaco. La funzione biologica della α -lattoalbumina è quella di supportare la biosintesi del lattosio, importante risorsa di energia per il neonato (Marshall, 1998).

L'albumina di siero bovino (BSA) è una grossa proteina che costituisce il 10-15% delle proteine del siero di latte. La BSA viene trasportata nel sangue legata ad acidi grassi liberi insolubili e arriva nel latte passando attraverso le giunzioni dei vasi sanguigni presenti a livello delle ghiandole mammarie. Si tratta di una proteina che costituisce un'importante risorsa di aminoacidi essenziali e che probabilmente gioca un importante ruolo per la biosintesi del glutatione a livello del fegato.

Il caseino macropeptide è una proteina che costituisce il 10-15% delle proteine totali del siero. Deriva dalla degradazione della k-caseina in seguito all'azione della chimosina del caglio durante il processo di caseificazione. Il caseino macropeptide possiede un'elevata percentuale di aminoacidi a catena ramificata, come la fenilalanina, il triptofano e la tirosina (Marshall, 2004).

Nel siero sono presenti anche immunoglobuline (Ig); la specie dominante delle immunoglobuline è costituita dalle IgG, le quali giocano un importante ruolo nell'immunità passiva del vitello.

La lattoferrina, una glicoproteina che lega il ferro, costituisce un antiossidante non enzimatico che si trova nel latte, nel siero e nel colostro. La lattoferrina del siero è composta da una singola catena peptidica con due siti di legame per gli ioni ferro. La concentrazione della lattoferrina nel latte vaccino e nel colostro è rispettivamente di 0.2 mg/mL e 1.5 mg/mL. Le sue principali funzioni consistono nella capacità di rendere il ferro disponibile per l'assorbimento a livello degli organi e nella sua attività antibatterica a livello delle ghiandole mammarie. In ogni caso l'attività antimicrobica della lattoferrina è tanto maggiore nei confronti di quei microorganismi che richiedono il ferro per replicarsi (Marshall, 2004).

La frazione del proteoso peptone è composta prevalentemente da polipeptidi provenienti dalla frammentazione della β -caseina, in seguito all'azione delle proteasi e in particolar modo della plasmina. Il proteoso peptone contiene peptidi A1 derivanti dalla β -caseina, associati ad attività oppioide (Laugesen et al., 2003).

Il siero contiene anche diverse tipologie di enzimi ad attività idrolitica, quali proteasi e lipasi, in grado di catalizzare l'idrolisi di legami chimici di proteine e lipidi, ma anche transferasi e liasi in grado di catalizzare la formazione di nuovi doppi legami. L'enzima più abbondante del siero è la lattoperossidasi che catalizza la riduzione dell' H_2O_2 . La maggior parte della lattoperossidasi presente nel latte si rinviene nel siero in seguito al processo di caseificazione. La lattoperossidasi non viene inattivata dai processi di pastorizzazione; si tratta quindi di un enzima molto stabile, in accordo anche con la sua funzione di "conservante". La lattoperossidasi svolge anche una funzione anti microbica nelle ghiandole mammarie e nel tratto digestivo del vitello.

I minerali presenti nel siero giocano un importante ruolo nella regolazione dei flussi d'acqua per osmosi a livello cellulare. Il siero presenta un basso tenore di sodio/potassio, fatto importante per prevenire l'elevata pressione sanguigna. Calcio e fosfati supportano la crescita e il mantenimento di ossa e denti.

Il siero contiene anche zinco, ferro e iodio. Lo zinco svolge molte funzioni, come quella di stimolare l'attività dell'insulina per l'assorbimento del glucosio del sangue. Il ferro costituisce una parte fondamentale di alcune metallo proteine (emoglobina, lattoferrina, lattoperossidasi). Lo iodio costituisce una componente importante dell'ormone tiroideo che gioca un ruolo fondamentale nella regolazione della crescita e nello sviluppo del neonato.

Le vitamine presenti nel siero sono idrosolubili. Esse supportano funzioni fisiologiche dell'organismo, quali il metabolismo di carboidrati, grassi e proteine (vitamina B₅), la crescita e la riparazione dei tessuti (vitamina B₂) (de Wit et al., 2001).

1.2.3 Trattamenti del siero

In passato il siero veniva considerato come un sottoprodotto del processo di caseificazione con basso o nullo valore commerciale. Lo smaltimento del siero comportava inoltre gravi conseguenze a livello ambientale (Clément et al., 2007).

Recentemente, anche con il progressivo aumento della consapevolezza dei consumatori in materia di nutrizione, qualità e rispetto dell'ambiente, l'industria casearia ha riconosciuto il valore delle componenti del siero (Jayaprakasha e Brueckner, 1999) che contiene circa il 50% dei solidi totali del latte, tra cui il 100% di lattosio e il 20% di proteine (Smithers, 2008). Inoltre il siero assunto attraverso la dieta ha effetti benefici per le sue capacità antiossidanti, antiipertensive, antitumorali, ipolipodemiche, antivirali, antibatteriche (Marshall, 2004).

Per queste ragioni sono state sviluppate diverse tecnologie di valorizzazione e trattamento del siero che mirano al recupero e al riutilizzo delle sue componenti, oltre che all'abbattimento del suo potere inquinante. Proprio a questo proposito, di recente, sono state introdotte delle limitazioni per lo smaltimento del siero, a causa della sua elevata *Chemical Oxygen Demand* (COD) (35-45 Kg/L) (Marwaha e Kemmedy, 1988).

Trattamenti biologici

Il siero può essere usato come materia prima per diversi trattamenti biologici. Durante questi processi il lattosio, le proteine e la materia organica riescono a essere recuperati. L'efficienza dei processi di recupero viene monitorata valutando la riduzione della richiesta biochimica di ossigeno (BOD) e la riduzione della domanda chimica di ossigeno (COD).

I trattamenti biologici descritti in letteratura sono la digestione aerobica e anaerobica, l'idrolisi e la fermentazione.

I primi studi per la trasformazione del siero iniziarono a partire dagli anni '70, con l'applicazione dei processi di digestione aerobica, caratterizzati da una degradazione della materia organica relativamente veloce, a una temperatura di 22-24°C. I sistemi aerobici hanno mostrato tuttavia una bassa riduzione degli inquinanti, senza alcuna valorizzazione dei prodotti ottenuti dal trattamento. Al contrario nei trattamenti anaerobici il lattosio viene utilizzato come substrato per la produzione di composti di valore, ottenendo al contempo la riduzione degli inquinanti nelle acque reflue. Durante i trattamenti di tipo anaerobico gli inquinanti vengono convertiti in prodotti gassosi come il diossido di carbonio e il metano che può essere usato come fonte di energia alternativa (Prazeres et al., 2012). La digestione anaerobica del siero viene condotta normalmente in condizioni mesofile (35-37°C). Essa porta alla biodegradazione delle proteine con formazione di polipeptidi, aminoacidi e ammoniaca. Altri trattamenti mirano alla conversione del siero nei suoi prodotti di idrolisi, come polipeptidi, aminoacidi, ammoniaca, glucosio,

galattosio ma anche in prodotti di fermentazione come l'etanolo e l'acido lattico utilizzabili in diverse applicazioni industriali. L'idrolisi del lattosio può essere effettuata in modo chimico o enzimatico. L'idrolisi chimica è caratterizzata da alte temperature (>150°C) e da condizioni acide (pH<1.5), che si raggiungono mediante aggiunta di acido solforico. L'idrolisi chimica presenta diversi svantaggi come la denaturazione delle proteine, la necessità di una precedente fase di demineralizzazione, la formazione di colorazioni e prodotti indesiderati in seguito a attivazione della reazione di Maillard. La via enzimatica risulta la migliore per l'idrolisi del lattosio; essa è promossa da enzimi che scindono il lattosio in glucosio e galattosio (Prazeres et al., 2012).

La fermentazione alcolica del siero rappresenta un'alternativa per la produzione di derivati del lattosio. Questa tipologia di fermentazione non è molto competitiva dal punto di vista economico, tuttavia essa rimane una pratica ancor oggi in uso, poiché permette allo stesso tempo la riduzione del potere inquinante e la conversione del lattosio in etanolo. La produzione di etanolo può essere sostenuta soltanto da quei microorganismi in grado di utilizzare il lattosio; una possibile alternativa all'utilizzo di questi microorganismi prevede un primo step di idrolisi enzimatica del lattosio con l'utilizzo della β -galattosidasi, cui deve far seguito un secondo step di fermentazione alcolica. L'etanolo prodotto a partire dal siero può essere usato nell'industria alimentare, chimica, farmaceutica e cosmetica, o anche come fonte energetica alternativa (Prazeres et al., 2012).

Il siero di latte può costituire un'opzione economicamente interessante anche per la produzione di idrogeno e metano. I processi di fermentazione anaerobica del siero portano alla produzione di idrogeno (con una resa teorica di 8 moli di idrogeno per mole di lattosio), di metano (CH₄) e di anidride carbonica (CO₂). La fermentazione anaerobica è promossa da diversi ceppi di microorganismi anaerobi obbligati come ad esempio i Clostridi in condizioni mesofile o termofile. L'idrogeno costituisce una forma di energia pulita che non contribuisce alla formazione di gas serra e piogge acide (Prazeres et al., 2012).

Il siero può essere utilizzato anche per la produzione di acido lattico attraverso fermentazioni che coinvolgono Lattobacilli o Streptococchi o entrambe le tipologie di microorganismi. L'acido lattico viene utilizzato nell'industria alimentare e nell'industria chimica, rispettivamente come conservante e acidificante.

Trattamenti chimico-fisici

I trattamenti chimico-fisici del siero rappresentano una buona opportunità per la valorizzazione di questo prodotto per la loro capacità di concentrare, frazionare e convertire le componenti del siero con costi contenuti (Donnelly e Mehra, 1993). Lo scopo di tali trattamenti, che risultano essere i più diffusi a livello industriale, rimane quello di abbattere il potere inquinante del siero recuperando allo stesso tempo le sostanze nobili in esso contenute.

I trattamenti chimico-fisici comprendono la precipitazione isoelettrica, la coagulazione e la separazione attraverso membrana.

La precipitazione delle proteine del siero può avvenire a elevate temperature (*thermal precipitation*), a temperature moderate con l'aggiunta di calcio (*thermocalcic precipitation*), o a bassi valori di pH, fino al raggiungimento del punto isoelettrico delle micelle (*isoelectric precipitation*). In ogni caso il processo prevede l'attuazione di due fasi: una prima fase di precipitazione delle proteine mediante riscaldamento o raggiungimento del punto isoelettrico, e una seconda fase che consiste nella concentrazione delle proteine mediante centrifugazione o filtrazione. L'inconveniente della precipitazione termica consiste nella denaturazione delle proteine (Prazeres et al., 2012).

In alternativa, la precipitazione delle proteine mediante l'utilizzo di agenti coagulanti come il sodio polifosfato, il sodio esametafosfato, i sali di ferro e i polielettroliti, rappresentano metodologie efficienti in termini di recupero delle proteine.

Tra i trattamenti chimico-fisici del siero, quelli basati su membrana sono ampiamente utilizzati in larga scala per ottenere concentrati di proteine e lattosio. Le separazioni che utilizzano membrane si suddividono in microfiltrazione (MF), ultrafiltrazione (UF), nanofiltrazione (NF), e osmosi inversa (RO). La separazione avviene attraverso membrane semipermeabili, usando un gradiente di pressioni idrostatiche. La microfiltrazione è usata per la rimozione di batteri e grasso del siero, utilizzando membrane con pori relativamente grandi ($>0.1 \mu\text{m}$). L'ultrafiltrazione è utilizzata per la separazione delle proteine del siero, ed è caratterizzata da membrane con pori più piccoli ($0.1-0.001 \mu\text{m}$). La nanofiltrazione è utilizzata per frazionare le molecole più piccole e prevede l'utilizzo di membrane con pori di piccolissime dimensioni ($0.001-0.0001 \mu\text{m}$). L'osmosi inversa viene applicata invece per la rimozione di acqua in presenza di una pressione osmotica; non si tratta quindi di un processo che utilizza la filtrazione, ma di

una tecnologia che sfrutta il principio dell'osmosi (raramente applicata a livello industriale).

L'ultrafiltrazione è un processo ampiamente utilizzato nell'industria casearia. Le maggiori applicazioni dell'ultrafiltrazione consistono nella concentrazione del siero con la produzione di siero proteine concentrate (whey protein concentrates WPCs) o siero proteine isolate (whey protein isolates WPIs). Queste frazioni vengono indicate come retentato, e contengono rispettivamente l'80 e il 90% delle proteine del siero.

Il siero deproteinizzato, indicato con il nome di permeato, costituisce circa il 90% del volume iniziale del siero, contiene tra l'80 e l'85% dei solidi del siero e più del 90% del lattosio del siero (Ko e Chipley, 1983).

L'attuazione di determinati trattamenti termici sul retentato ottenuto dall'ultrafiltrazione portano alla formazione di legami tra le proteine che andando incontro ad aggregazione formano un prodotto conosciuto con il nome di microparticolato di siero proteine (Nicolai, 2007; Nicolai e Durand, 2007). Il microparticolato può essere utilizzato nell'industria alimentare come agente schiumogeno, gelificante, emulsionante, stabilizzante, con un miglioramento delle qualità sensoriali e della texture del prodotto finale (Mangino, 1984).

1.2.4 Utilizzo del siero

In passato il siero era considerato come un sottoprodotto derivante dalla produzione del formaggio. Recentemente alcuni studi hanno dimostrato le sue proprietà benefiche nei confronti di diverse patologie, tanto che viene già impiegato per alcune applicazioni nei centri termali o come nutraceutico in alcuni centri di cura. Oggigiorno circa il 50% del siero prodotto a livello mondiale viene trattato e processato per poi essere riutilizzato nell'industria alimentare. Di questa parte, il 45% viene utilizzato direttamente in forma liquida, il 30% come siero di latte in polvere, il 15% come prodotto a base di lattosio o derivati del lattosio, e il resto come siero proteine concentrate (Gonzalez Siso, 1996).

Senza alcun trattamento il siero di latte può essere aggiunto all'acqua di abbeveraggio di animali da reddito.

Altre possibilità di utilizzo del siero prevedono dei trattamenti preliminari per ottenere diversi tipi di prodotti quali il siero condensato, il siero in polvere acido, dolce, demineralizzato, delattosidato, deproteinizzato. Il siero in forma condensata e il siero in polvere mantengono a lungo le qualità del siero fresco, facilitandone il trasporto e la trasformazione.

Oggi i potenziali utilizzi delle componenti del siero come additivi funzionali e nutrizionali sono numerosi.

Le applicazioni nel campo della nutrizione umana, in particolare nei prodotti dolciari e da forno, rappresentano un'importante possibilità di utilizzo del siero e dei prodotti da esso derivati; il siero dolce è un ingrediente ampiamente usato in questi settori per le sue capacità di migliorare il sapore e per le sue proprietà nel rendere più teneri i prodotti. Aggiungendo nelle farine una combinazione di emulsionanti e siero di latte in polvere, si ottiene una ottimizzazione di volume, texture, consistenza e mantenimento della freschezza nel prodotto finito. Inoltre, l'elevata qualità nutrizionale delle proteine del siero, la presenza di specifici fattori di crescita e di calcio, rendono questo prodotto un importante ingrediente, in particolare per la produzione di latte in polvere e per gli alimenti destinati agli anziani. Il lattosio contribuisce al raggiungimento della colorazione e dell'aroma adeguati per tali prodotti alimentari.

Riassumendo quindi, la polvere dolce di siero è ampiamente utilizzata in caseifici, panifici, industrie dolciarie, industrie di trasformazione della carne, nell'acqua di abbeveraggio e nelle industrie specializzate nella produzione del latte per gli infanti.

La polvere acida di siero ha invece un utilizzo più limitato; essa viene usata prevalentemente come agente coagulante nei processi di caseificazione acida. La polvere acida di siero viene utilizzata anche per la produzione di sorbetti, salse di formaggio (nelle quali si cerca di raggiungere un sapore sapido e piccante) e bevande a base di frutta (per mantenere un pH basso) (Kosikowski, 1979).

Le proteine del siero di latte vengono utilizzate in zuppe, principalmente per la loro capacità emulsionante, ma anche in salse e conserve, per la loro buona solubilità in ambiente acido e per la loro capacità di trattenere molta acqua nei processi di riscaldamento.

Attualmente il latte destinato all'alimentazione degli infanti in sostituzione del latte materno, è ottenuto prevalentemente dal latte di vacca. Tuttavia il latte a base di siero potrebbe rappresentare un'alternativa poiché contiene il giusto rapporto proteine/caseine (60/40) e un ridotto contenuto di minerali. Tutti i nutrienti richiesti dal neonato nei primi 4-6 mesi di vita potrebbero essere forniti da latte a base di siero, additivato con ferro, fluoro e vitamina D.

Il siero può essere utilizzato anche come substrato per la crescita di microorganismi produttori di aminoacidi (lisina, treonina, acido glutammico), vitamine e diversi acidi utili nell'industria alimentare (acetico, propionico, lattico, citrico).

Un ulteriore utilizzo del siero consiste nella produzione di metano, idrogeno e etanolo mediante digestione anaerobica. Questi prodotti possono essere utilizzati come una fonte di energia “in situ” per il trattamento dei rifiuti industriali.

Lattosio

Il lattosio, componente principale del siero, può essere impiegato come supplemento nel latte destinato all'allattamento dei neonati; inoltre, la sua consistenza, il suo sapore neutro e il basso grado di dolcezza lo rendono adatto ad essere impiegato come eccipiente in terapie farmacologiche (Yves, 1979). In particolare i derivati del lattosio, come gli acidi lattobionici e il lattulosio (disaccaride ottenuto dall'isomerizzazione del lattosio in soluzione alcalina), risultano di elevato valore commerciale e sono di grande importanza nel settore farmaceutico. Dal punto di vista funzionale il lattulosio stimola la proliferazione dei Bifidobatteri nel tratto intestinale. La sua dolcezza è pari al 50-60% di quella del saccarosio. Il lattulosio, essendo il precursore della lactosilurea, utilizzata come fonte di azoto non proteico per l'alimentazione dei ruminanti, viene impiegato anche nel settore zootecnico.

L'idrolisi del lattosio produce galattosio, che può essere utilizzato al posto del sorbitolo, più costoso. Le soluzioni di lattosio idrolizzato possiedono una dolcezza maggiore del lattosio e trovano impiego nelle industrie dolciarie e dei gelati, dove vengono utilizzate al posto del saccarosio e dello sciroppo di amido.

È in fase di sviluppo un metodo innovativo per la conversione del lattosio in galattosio che sfrutta l'attività di isomerasi immobilizzate. Il trattamento del siero che prevede la fermentazione del lattosio con produzione di etanolo sta diventando una pratica sempre più comune tanto che sono già stati sviluppati diversi impianti su larga scala per l'attuazione di questo processo. Distillerie che producono etanolo a partire dal siero sono diffuse in Irlanda, USA e in particolare in Nuova Zelanda, dove circa il 50% del siero di latte viene impiegato per la produzione di etanolo (Gonzalez Siso, 1996).

Proteine del siero

Il valore biologico delle siero proteine è assai elevato, arrivando addirittura a superare il valore biologico delle proteine dell'uovo (Sienkiewicz et al., 1990); basti pensare che la percentuale in aminoacidi solforati risulta maggiore nel siero piuttosto che nel latte (1.35% e 0.36% rispettivamente). Le proteine del siero hanno inoltre una buona solubilità e funzionalità. Per queste loro proprietà biochimiche le proteine del siero possono essere

competitive con altre fonti di proteine (quali la soia) utilizzate come supplemento negli alimenti, ma possono anche trovare impiego nell'ambito delle produzioni alimentari per via delle loro interessanti caratteristiche tecnologiche; in particolare, nell'ambito dell'industria casearia, l'uso di proteine del siero porta a un aumento del valore nutrizionale dei prodotti e a un miglioramento delle qualità sensoriali (Hinrichs, 2001). Per le loro proprietà emulsionanti le siero proteine possono essere utilizzate anche nella produzione di gelato, portando all'ottenimento di un prodotto di consistenza e corpo ottimali (Innocente et al., 2001). Infine, grazie alle loro capacità schiumogene possono essere utilizzate per stabilizzare prodotti alimentari esposti all'aria.

1.3 Proprietà antiossidanti del siero

1.3.1 Stress ossidativo, specie reattive e radicali liberi dell'ossigeno

Le cellule producono energia riducendo l'ossigeno molecolare in acqua. Nel corso di questo processo si generano piccole quantità di forme reattive dell'ossigeno, come inevitabile sottoprodotto della respirazione mitocondriale. Tali specie reattive dell'ossigeno, dette anche radicali liberi, possono danneggiare lipidi, proteine e DNA. Le cellule sono dotate di meccanismi di difesa per prevenire questo tipo di danno. Uno squilibrio tra i sistemi di produzione e di eliminazione dei radicali a favore dei primi porta a stress ossidativo, situazione che è stata associata al danno cellulare in molte condizioni patologiche. I radicali liberi sono coinvolti in una serie di processi fisiopatologici come il danno chimico e da irradiazione, il danno da ischemia-riperfusion (indotto dal ripristino del flusso in un tessuto ischemico), l'invecchiamento cellulare e l'uccisione di microrganismi mediata dai fagociti. I radicali liberi sono specie chimiche che possiedono un singolo elettrone spaiato sull'orbitale esterno; l'energia creata da questa configurazione instabile viene liberata attraverso reazioni con le molecole adiacenti, inorganiche o organiche. Inoltre i radicali liberi innescano reazioni autocatalitiche per mezzo di molecole con cui essi reagiscono, le quali vengono a loro volta trasformate in radicali liberi in grado di propagare la catena del danno (Droge, 2002). La produzione intracellulare di radicali liberi può essere innescata in diversi modi:

- Assorbimento di energia radiante (luce ultravioletta, raggi X e altre radiazioni ionizzanti);
- Metabolismo enzimatico di sostanze chimiche esogene o da farmaci;

- Reazioni di ossido-riduzione che si attuano nei normali processi metabolici. Durante il normale processo respiratorio, l'ossigeno molecolare viene ridotto per generare acqua con l'aggiunta di 4 elettroni. Tale conversione avviene per mezzo di enzimi ossidativi nel reticolo endoplasmatico, citosol, mitocondri, perossisomi e lisosomi. In questi processi possono essere prodotte piccole quantità di prodotti tossici intermedi, quali l'anione superossido (O_2^-), il perossido di idrogeno (H_2O_2) e lo ione idrossile (OH);
- Metalli di transizione come ferro e rame donano o accettano elettroni liberi durante le reazioni intracellulari e catalizzano la formazione di radicali liberi, come avviene nella reazione di Fenton ($H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH + OH$);
- Il monossido di azoto (NO), importante mediatore chimico generato da cellule endoteliali, macrofagi e neuroni, può agire come radicale libero ed essere convertito nell'anione perossinitrito ($ONOO^-$) altamente reattivo.

I radicali dell'ossigeno, e in generale tutte le specie radicaliche, possono reagire con svariate molecole, modificandole drasticamente sul piano chimico e conseguentemente anche su quello biologico (Siliprandi et al., 2008). Gli effetti di queste specie reattive sono a largo spettro, anche se per quel che riguarda il danno cellulare sono particolarmente importanti tre reazioni. La prima consiste nella perossidazione lipidica della membrana plasmatica e delle membrane degli organelli. La seconda porta ad alterazioni ossidative delle proteine (ossidazione delle catene laterali degli aminoacidi, formazione di legami crociati proteina-proteina attraverso legami disolfuro e ossidazione della catena proteica che ne causa la frammentazione). La terza reazione è quella che danneggia il DNA, in particolare attraverso la dimerizzazione di timine adiacenti con conseguente rottura del filamento (processo coinvolto nell'invecchiamento cellulare e nella trasformazione neoplastica delle cellule).

Le cellule hanno sviluppato diversi meccanismi per rimuovere i radicali liberi e minimizzarne il danno. Le molecole che agiscono come antiossidanti possono essere di origine enzimatica o non enzimatica. Tra gli enzimi che agiscono come sistemi di disinnesco dei radicali liberi, inattivando il perossido di idrogeno e l'anione superossido, troviamo la catalasi presente all'interno dei perossisomi (catalizza la reazione $2 H_2O_2 \rightarrow O_2 + H_2O$), la superossido dismutasi localizzata nei mitocondri e nel citosol (catalizza la reazione $2 O_2^- + 2 H \rightarrow H_2O_2 + O_2$), la glutatione perossidasi o GSH perossidasi (catalizza la reazione $H_2O_2 + 2 GSH \rightarrow GSSG + 2 H_2O$). Tali enzimi sono localizzati in prossimità delle sedi di produzione degli agenti ossidanti. Gli antiossidanti che appartengono invece

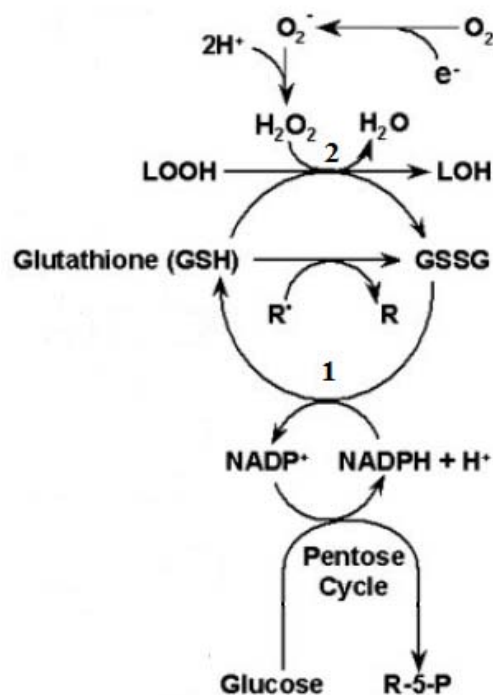
ai meccanismi di difesa non enzimatici sono in grado di bloccare la formazione dei radicali e di limitarne il danno; tra di essi i principali sono le vitamine liposolubili E ed A, l'acido ascorbico e il glutathione (γ -glutamyl-cisteinyl-glycine o GSH) nel citosol (Robbins et al., 2008).

Il glutathione gioca un ruolo importante in diverse reazioni cellulari. Una delle principali funzioni del glutathione è quella di inattivare i radicali e le specie reattive dell'ossigeno (Fang et al., 2002).

1.3.2 Attività antiossidante del glutathione

L'attività antiossidante del glutathione si espleta principalmente in due modi (Figura 1). In primo luogo il glutathione in forma ridotta può essere ossidato, portando alla neutralizzazione di specie radicaliche ($R^{\cdot} \rightarrow R$); a sua volta il glutathione ossidato viene nuovamente ridotto dalla glutathione reduttasi NADPH-dipendente tornando ad essere disponibile per reazioni analoghe. In secondo luogo, l'enzima glutathione perossidasi GSH-dipendente catalizza la riduzione del perossido di idrogeno ($H_2O_2 \rightarrow H_2O$) e dei perossidi di natura lipidica ($LOOH \rightarrow LOH$) (Wu et al., 2003).

Figura 1. Attività antiossidante del glutathione (Wu et al., 2003).



1 = Glutathione reduttasi NADPH-dipendente; 2 = Glutathione perossidasi GSH-dipendente

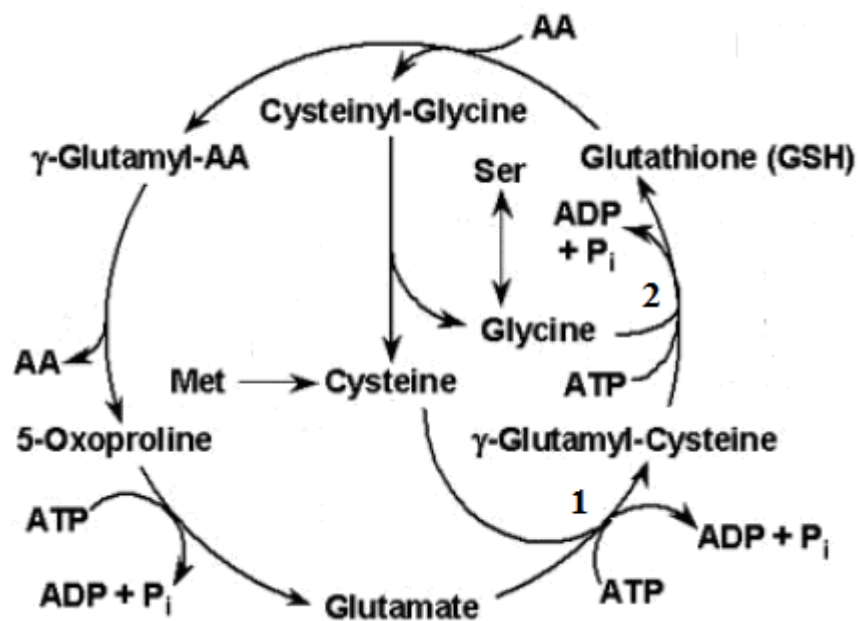
1.3.3 Biosintesi del glutathione

Il glutathione è un piccolo peptide composto da glicina, glutammato e cisteina.

Nei mammiferi la biosintesi del glutathione avviene proprio a partire dagli aminoacidi che lo compongono (Figura 2), ed è catalizzata da due enzimi citosolici: la γ -glutamilcisteina sintetasi (GCS) e la GSH sintetasi che condividono la γ -glutamilcisteina come intermedio anabolico comune (Griffith, 1999). Questa pathway avviene in linea di principio in tutte le cellule, anche se gli epatociti risultano essere di gran lunga i maggiori produttori ed esportatori di GSH.

Altri precursori indiretti nella biosintesi del glutathione sono la serina che può essere convertita in glicina, la cisteinilglicina e la metionina, che possono essere convertite in cisteina, aminoacido che possiede un tiolo (-SH) libero in grado di agire come antiossidante, prevenendo l'ossidazione e il danneggiamento dei tessuti (Wu et al., 2003).

Figura 2. Biosintesi del glutathione (Wu et al., 2003).



1 = γ -glutamilcisteina sintetasi (GCS); 2 = GSH sintetasi

1.3.4 Gli antiossidanti nel siero

Il siero ha una elevata attività antiossidante, principalmente per il suo contenuto in proteine ricche in cisteina, elemento chiave nella biosintesi del glutatione. I concentrati di proteine del siero hanno quindi attratto l'attenzione della comunità scientifica come possibili sostanze ad elevato potere antiossidante. Gli aminoacidi precursori del glutatione, presenti in buona dose nel siero, potrebbero produrre l'aumento della quantità di glutatione a livello tissutale, la stimolazione del sistema immunitario e favorire i processi di detossificazione in presenza di potenziali cancerogeni: in alcuni studi su modelli animali nei quali è stato indotto il cancro al colon, il trattamento con siero si è rivelato protettivo in termini di insorgenza della neoplasia (Hakkak et al., 2000).

Non sono soltanto gli aminoacidi a contribuire alle proprietà antiossidanti e benefiche del siero: è stato osservato a questo proposito che la lattoferrina ha la capacità di inibire la metastasi tumorale in modelli murini (Yoo et al., 1998) mentre l'albumina di siero bovino è in grado di rallentare la crescita di linee cellulari tumorali del seno (Laursen et al., 1990). Le proteine del siero sembrano possedere anche un effetto protettivo nei confronti della mucosa gastrica per la presenza di cisteina, aminoacido in grado di agire esso stesso come antiossidante e in grado di stimolare la sintesi del GSH.

Studi condotti nell'uomo hanno osservato che le proteine del siero aumentano le funzioni cognitive di individui sottoposti a stress elevati (Markus et al., 2002).

Infine, la presenza di proteine nobili, di aminoacidi essenziali e non essenziali, rendono il siero un prodotto interessante per gli sportivi che intendano aumentare la massa muscolare (Burke et al., 2001).

In campo medico i prodotti a base di proteine del siero sono utilizzati come fonte di cisteina per aumentare i livelli intracellulari di glutatione. La mancanza di GSH è un problema comune in pazienti affetti da HIV; proprio per questo sono in corso diversi studi che prevedono la somministrazione delle proteine del siero a questi soggetti, nel tentativo di aumentare i livelli di cisteina e, in ultima analisi, di glutatione (Micke et al., 2002).

1.4 Scopo

Questo lavoro di tesi si inserisce nel contesto della valorizzazione del siero come sottoprodotto dell'industria casearia. Attualmente nei grossi caseifici il siero viene raccolto e concentrato mediante processi di ultrafiltrazione e microparticolazione, fino all'ottenimento di un prodotto denso-viscoso (microparticolato) costituito

prevalentemente da proteine aggregate. Nell'industria lattierocasearia il microparticolato viene già utilizzato come additivo per la produzione di formaggi, dolci freschi e congelati, yogurt e gelati.

Nelle prove sperimentali svolte in questa tesi il microparticolato è stato utilizzato come additivo del latte destinato a mini caseificazioni sperimentali. In particolare è stato valutato l'effetto della caseificazione di diverse tipologie di latte (con rapporti proteina/grasso pari a 0.8, 0.9 e 1.0) con l'aggiunta del microparticolato sulla resa, sulla composizione dei formaggi prodotti, nonché sulla concentrazione dei tioli a basso peso molecolare.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Prove di mini caseificazione

2.1.1 Disegno sperimentale

Le prove sono state strutturate in modo da valutare l'effetto della caseificazione di tre tipologie di latte con concentrazioni di microparticolato del 3 e 4% (vol/vol). Il latte iniziale di ciascuna giornata è stato standardizzato in modo da ottenere tre rapporti proteina/grasso, mantenendo stabile il livello proteico a 3.5%; in particolare i rapporti usati sono stati 0.8, 0.9, 1.0, rispettivamente con alto, medio e basso contenuto di grasso.

Le prove si sono svolte in sei giornate, in ciascuna delle quali sono state prodotte tre caciotte, per un totale di 18 mini caseificazioni. Nelle prime tre giornate sono state prodotte le caciotte con una percentuale di microparticolato fissa al 3% (vol/vol); entro ogni giornata sono stati testati i rapporti proteina/grasso allo 0.8, 0.9 e 1.0. Nelle successive tre giornate i medesimi rapporti proteina/grasso sono stati testati nuovamente, questa volta con una percentuale di microparticolato pari al 4% (vol/vol).

I rapporti proteina/grasso vengono raggiunti additivando il latte di massa con latte concentrato e panna o latte scremato, in misura opportuna a seconda del rapporto proteina/grasso desiderato e a seconda dei parametri di composizione dello stesso latte di massa.

Nella Tabella 3 vengono riportate le composizioni medie del latte di partenza, del microparticolato e dei prodotti addizionati per la standardizzazione del latte nelle 6 giornate di prova.

La resa della cagliata, la composizione del siero, la composizione del formaggio, la resa casearia e i parametri del processo di coagulazione vengono determinati per ciascuna mini caseificazione di ciascuna delle giornate di prova.

Tabella 3. Composizione media percentuale del latte di partenza, latte concentrato, latte scremato, microparticolato e panna usati nelle prove sperimentali.

Prodotto,% p/p	Media	DS	Minimo	Massimo
Latte di partenza				
Grasso	3,75	0,10	3,57	3,86
Proteina	3,29	0,04	3,26	3,37
Lattosio	4,84	0,02	4,83	4,87
Solidi totali	12,81	0,06	12,76	12,94
Latte concentrato				
Grasso	0,03	0,03	0,00	0,06
Proteina	9,56	0,03	9,53	9,59
Lattosio	5,28	0,04	5,22	5,31
Solidi totali	16,27	0,07	16,19	16,37
Latte scremato				
Grasso	0,119	0,01	0,11	0,13
Proteina	3,366	0,04	3,34	3,42
Lattosio	4,883	0,10	4,82	5,03
Microparticolato				
Grasso	0,73	0,01	0,72	0,75
Proteina	6,44	0,15	6,23	6,69
Lattosio	5,41	0,06	5,29	5,46
Solidi totali	12,04	0,18	11,69	12,21
Panna				
Grasso	32,30	1,93	29,20	34,06
Proteina	2,13	0,15	1,98	2,31
Lattosio	3,05	0,22	2,82	3,30
Solidi totali	38,42	1,78	35,59	39,94

2.1.2 Raccolta dei campioni

Il latte utilizzato per le caseificazioni è ottenuto dal latte di massa raccolto dai soci allevatori del caseificio Soligo (Soligo, Italia), nel mese di Luglio 2013. Il latte utilizzato in ciascun giorno viene analizzato al MilkScan FT2 (Foss Electric, Hillerod, Denmark), presso il laboratorio preposto al controllo della qualità dei prodotti del caseificio. La panna, il latte scremato e il latte concentrato, aggiunti al latte di massa per il raggiungimento delle condizioni sperimentali desiderate, vengono raccolti nello stesso periodo, all'inizio di ciascuna delle giornate di prova, e analizzati con lo stesso strumento dopo opportuna omogeneizzazione del campione a temperatura ambiente.

2.1.3 Mini caseificazioni

Il latte utilizzato per le mini caseificazioni è stato prelevato nel caseificio, prima dei trattamenti di pastorizzazione. Contestualmente vengono campionati il microparticolato,

la panna, il latte scremato e il latte concentrato, che vengono aggiunti al latte nelle quantità opportune per il raggiungimento delle condizioni sperimentali precedentemente illustrate. Tali prodotti additivati al latte nelle prove provengono dalla medesima produzione.

Per le mini caseificazioni è stata utilizzata una caldaia con una capacità di dieci litri; questo tipo di caldaia viene usata prevalentemente per scopi di ricerca in ambito caseario (Fagan et al. 2008; e Mateo et al. 2009). Ciascuna prova di mini caseificazione prevede la lavorazione di dieci litri di latte; la caldaia è dotata di un doppio rivestimento (*camicia*) all'interno del quale scorre acqua che viene pompata da un bagnetto termostato (modello SB24, Falc Instrument, Treviglio, Italia). Grazie a questo sistema di controllo della temperatura il latte presente nella caldaia viene lentamente scaldato, fino al raggiungimento di una temperatura di 35 °C. A questo punto al latte viene aggiunta una coltura starter liofilizzata composta da *Streptococcus thermophiles* e *Lactobacillus bulgaricus* (TB, MicroMilk, Crema, Italia). Successivamente in dieci minuti la temperatura viene portata a 38 °C. Raggiunta questa temperatura viene aggiunta una soluzione di caglio liquido commerciale (75 chimosina :25 pepsina bovina, caglio di vitello De Longhi Michele & C. S.a.s., Treviso, Italia) diluito in acqua (in proporzione 1:3). L'utilizzo del sensore *CoAguLite* (CL) (Reflectronics Inc., Lexington, KY), collegato direttamente alla caldaia, permette di monitorare costantemente il livello di coagulazione e aggregazione raggiunto (Fagan et al., 2007). Il sensore CL permette di effettuare la rottura della cagliata al momento più opportuno (in particolare 6 minuti dopo il T_{max} fornito in output dal software del CoAguLite). Infine la cagliata viene estratta dalla caldaietta e posta in uno stampo, che permette la separazione del siero residuo. Lo stampo viene posto in incubatore termostato a 37 °C per circa 3 ore, fino al raggiungimento di un pH<5.5. La forma è posta in una soluzione salina per un'ora (1.14 kg di NaCl per L) per poi essere messa in apposite sale refrigerate per la stagionatura (10 giorni a 4 °C e 85% di umidità relativa).

Un campione di cagliata viene analizzato subito dopo la caseificazione; la stessa analisi viene ripetuta sul formaggio dopo i 10 giorni di stagionatura.

2.1.4 Tempo di coagulazione della cagliata

La coagulazione del latte all'interno della caldaia e la sineresi della cagliata sono state monitorate utilizzando il sensore *CoAguLite* (model 5, Reflectronics Inc., Lexington, KY) che sfrutta la tecnologia del vicino infrarosso attraverso due fibre di diametro pari a

600 μm . Attraverso la prima fibra il sensore produce una radiazione di lunghezza d'onda pari a 880 nm (vicino infrarosso), che viene trasmessa all'interno del latte presente nella caldaia. La seconda fibra invece trasmette la radiazione riflessa dalle particelle di latte a una fotocellula. Il segnale di riflettanza rilevato dalla fotocellula è registrato dal sensore CoAguLite che fornisce un valore in tempo reale dell'andamento della coagulazione; in particolare il punto massimo della derivata prima del segnale registrato (t_{max}) permette di ottenere il valore ottimale del tempo di taglio (t_{cut}), usando l'equazione proposta da Payne et al., (1993) per cui vale che $t_{\text{cut}}^* = \beta * t_{\text{max}}^*$ dove β è una costante.

2.1.5 Composizione del formaggio e resa casearia

I contenuti in grasso, proteine e umidità delle diverse cagliate e dei relativi formaggi sono stati determinati mediante l'utilizzo del FoodScan Infratec 1255 Food Analyzer (Foss Tecator AB, Hillerod, Denmark), rispettivamente nelle giornate di caseificazione e dopo 10 giorni di stagionatura.

Il siero risultante da ciascuna caseificazione è stato analizzato presso il laboratorio del caseificio di Soligo per il contenuto in grasso, proteine, lattosio e solidi totali, utilizzando il MilkScan FT2 (Foss Electric, Hillerod, Denmark). Gli stessi campioni di siero sono stati analizzati anche per la composizione delle frazioni proteiche utilizzando la tecnologia RP-HPLC Agilent 1260 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) presso il laboratorio del Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse Naturali e Ambiente (DAFNAE) (Legnaro, Italia).

La resa casearia è espressa in percentuale, ed è stata ottenuta moltiplicando per 100 il rapporto tra il peso del formaggio e il peso del latte utilizzato per la caseificazione. La resa in grasso, proteine e materia secca del formaggio è ottenuta moltiplicando per 100 il rapporto tra grasso, proteine, materia secca del formaggio e grasso, proteine, materia secca del latte.

2.2 Determinazione della composizione proteica del siero

Lo strumento RP-HPLC (*Reverse Phase – High Pressure Liquid Chromatography*) consiste in un cromatografo Agilent 1260 Series (Agilent Thecnologies, Santa Clara, CA, USA), dotato di pompa quaternaria (Agilent 1260 Series, G1311B) e di un detector a tecnologia DAD (*Diode Array Detector*, Agilent 1260 Series, G1315C). Le analisi, l'acquisizione e il trattamento dei dati sono stati effettuati con il software *Agilent Chem-Station for LC systems*.

La separazione delle frazioni proteiche è avvenuta su una colonna analitica RP (*Reverse Phase*) di tipo C8 (Zorbax 300SB-C8 RP, Agilent Technologies) con un impaccamento Poroshell (5 μ m, 300 Å, 2.1 x 75 mm) dotata di precolonna.

L'eluizione a gradiente viene effettuata con l'utilizzo di due solventi. Il solvente A composto dallo 0.1% di acido trifluoroacetico (TFA) e dal 5% di acetonitrile in acqua, e il solvente B composto dallo 0.1% di TFA in acetonitrile. Il gradiente utilizzato prevede una fase iniziale al 95% di fase A; nel primo minuto si arriva all'82% di fase A, nel secondo minuto la % è portata al 70%. Al quinto minuto si giunge all'equilibrio tra le fasi A e B, entrambe al 50%, per poi tornare alle condizioni iniziali alla fine della corsa.

L'analisi di un campione di siero dura 11 minuti e il volume di campione iniettato in colonna è pari a 2 μ l; prima dell'iniezione e dell'analisi del campione successivo la colonna viene riequilibrata per 2 minuti, tornando alle condizioni di partenza. Il flusso è fissato a 2.5 ml/min e la temperatura della colonna è mantenuta a 70 °C. La detection degli analiti in uscita dalla colonna viene effettuata a una lunghezza d'onda pari a 214 nm. Le proteine standard del siero purificate, α -La (ALA), β -LgA (BLGa), β -LgB (BLGb), albumina di siero bovino (BSA) e lattoferrina (Lf), sono state fornite dalla Sigma. Le proteine del caseino macropeptide e del proteoso peptone sono state purificate rispettivamente secondo i metodi proposti da Mollè et al. (2006) e Paquet et al. (1988). Le proteine purificate sono state analizzate e utilizzate per l'allestimento di curve di calibrazione, ottenute associando l'intensità del segnale prodotto dallo strumento a un titolo proteico noto. Le curve così ottenute sono servite successivamente per la quantificazione delle frazioni proteiche presenti nei campioni di siero utilizzando le regressioni lineari prodotte dalla calibrazione del sistema.

2.3 Rilevazione e quantificazione dei composti tiolici

La determinazione del contenuto dei tioli a basso peso molecolare nei campioni di latte utilizzato per le caseificazioni e dei campioni di siero ottenuti in seguito a caseificazione, è stata effettuata tramite analisi cromatografica, dopo l'applicazione di un protocollo di derivatizzazione che prevede di marcare le molecole di interesse con un molecola fluorescente.

L'ammonio 7-fluoro-2,1,3-benzoossadiazolo-4-sulfonato (SBD-F) reagisce specificatamente con i gruppi -SH del glutatione (gsh) e degli altri tioli, come γ -glutamilsteina (ggc), cisteina (cys) e cisteinilglicina (cys gly) dando prodotti

fluorescenti. Le molecole derivatizzate sono poi separate in HPLC e quantificate usando un rivelatore fluorimetrico (Masi et al., 2002).

2.3.1 Preparazione dei campioni

I campioni di latte e siero vengono centrifugati per 10 minuti a 12000 rpm per promuovere la separazione della frazione grassa dalla frazione solubile. A un'aliquota di 250 μ l della frazione solubile vengono addizionati 34 μ l di HCl 4M per la precipitazione proteica. I campioni vengono quindi centrifugati per ulteriori 10 minuti a 14000 rpm. Si ottiene così un precipitato denso, contenente proteine ad alto peso molecolare, e un surnatante contenente proteine e molecole tioliche a basso peso molecolare.

2.3.2 Riduzione e derivatizzazione dei campioni

In tubi eppendorf da 1.5 ml viene preparata una miscela composta da 50 μ l di surnatante (ottenuto come da istruzioni precedenti), 117 μ l di Tampone Borato 1M (pH 10.5), 33 μ l di Tributyl-fosfina (TBP) 1% e 33 μ l di SBD-F 0.3%. La TBP è dotata di forte potere riducente in ambiente alcalino e dopo 10 minuti d'incubazione determina la rottura dei ponti disolfuro di tutti i tioli in soluzione: così facendo i gruppi -SH liberi saranno poi in grado di legarsi all'SBD-F. La miscela ottenuta è stata incubata per 60 minuti in bagno termostato Dubnoff a 60°C e mantenuta in agitazione. Le provette sono state quindi trasferite in ghiaccio e dopo 2-3 minuti addizionate con HCl 4M al fine di bloccare la reazione di derivatizzazione e stabilizzare i coniugati fluorescenti.

2.3.3 Determinazione cromatografica della concentrazione dei tioli

Aliquote dei campioni derivatizzati (20 μ l) sono state iniettate in un sistema HPLC (Beckman Coulter System Gold 126) ed i composti sono stati separati attraverso una colonna RP C18 (150 mm x 4,6 mm, dimensione delle particelle 3 μ m: Luna, Phenomenex) utilizzando come fase mobile un tampone NH₄-formiato 75 mM (pH 2.9) – metanolo (97:3). Il metodo prevede una eluizione isocratica con un flusso di 0.3 ml/minuto a temperatura ambiente.

I derivati fluorescenti sono stati rilevati con un fluorimetro Yasco 821 FP (λ_{ex} 386 nm; λ_{em} 516 nm) e identificati confrontando i tempi di ritenzione con quelli di composti standard. La quantificazione dei derivati fluorescenti di cisteina, γ -glutamilcisteina, cisteinilglicina e glutatione è stata ottenuta attraverso una curva di calibrazione.

2.3.4 Rette di taratura

La quantificazione dei tioli presenti nei campioni di latte e siero prevede anzitutto la calibrazione del sistema cromatografico utilizzando soluzioni a titolo noto per ciascuno dei tioli in questione.

Le diluizioni seriali di standard sono state prodotte a partire da soluzioni madri 50 μ M in HCl 0.1 M. Le concentrazioni finali di tali diluizioni risultano diverse a seconda del tiolo e della sua capacità di emettere fluorescenza. Per la cisteina e la γ -glutamilmcisteina il range di concentrazioni va da 0.625 a 7.5 μ M, per la cisteinilglicina da 1.25 a 17.5 μ M, mentre nel caso del glutatione (caratterizzato da un fattore di risposta minore) le concentrazioni per la retta di taratura vanno da 25 a 125 μ M (Tabella 4).

Tabella 4. Diluizioni seriali per l'allestimento di rette di taratura.

Cisteina (μ M)	Cisteinilglicina (μ M)	γ -Glutamilmcisteina (μ M)	Glutatione (μ M)
0,625	1,25	0,625	25
1,25	3,75	1,25	50
2,5	7,5	2,5	75
5	12,5	5	100
7,5	17,5	7,5	125

Per ciascuna di queste diluizioni si prelevano 50 μ l che verranno derivatizzati e separati in HPLC come da istruzioni riportate per la derivatizzazione e la separazione dei campioni. I risultati ottenuti da queste analisi verranno utilizzati per l'allestimento di rette di taratura, una per ciascuno dei tioli in questione.

2.4 Analisi statistica

I dati di coagulazione, di composizione del siero, della cagliata e della caciotta, le rese e le concentrazioni dei tioli a basso peso molecolare sono stati analizzati con un modello lineare, utilizzando la procedura GLM del SAS (SAS 9.2, 2008).

Nel modello sono stati inclusi gli effetti fissi della concentrazione del microparticolato (due livelli), del rapporto proteina/grasso (tre livelli) e della loro interazione. La data di caseificazione è stata inserita nel modello come effetto nested rispetto alla concentrazione di microparticolato. L'effetto della concentrazione di microparticolato è stato testato sul livello di errore corrispondente all'effetto nested.

Le medie corrette per lo studio delle differenze tra tesi sono state ottenute dal test di Bonferroni e la significatività è stata posta con $P \leq 0.05$.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Effetto della caseificazione sul tempo di coagulazione (RCT), sulla composizione e resa di cagliata e caciotte.

Nelle prove sperimentali è stato valutato l'effetto della caseificazione con l'utilizzo di microparticolato al 3 e 4% per tre differenti tipologie di latte (grasso, standard e magro) sulle proprietà coagulative, chimiche e di resa.

Il latte utilizzato nelle mini caseificazioni, dopo opportuna standardizzazione per ottenere i rapporti proteina (3.5%) su grasso desiderati (0.8, 0.9 1.0), mostra una composizione chimica media molto stabile. Le statistiche descrittive sono presentate nella Tabella 5, dove vengono mostrati media, deviazione standard (DS), minimo e massimo della composizione del latte di massa destinato alle prove di caseificazione.

Tabella 5. Statistiche descrittive della composizione media del latte.

Composizione, p/p %	Media	DS	Minimo	Massimo
Grasso	3.90	0.33	3.46	4.34
Proteine	3.48	0.03	3.40	3.50
Caseina	2.62	0.03	2.53	2.66
Lattosio	4.83	0.05	4.71	4.89
Solidi Totali	13.20	0.35	12.71	13.68

Il latte impiegato risulta avere una composizione media simile a quella riportata da altri autori (Ikonen, 2004; Cassandro et al., 2008; Cecchinato et al., 2011) con percentuale di grasso di 3.90 ± 0.33 , proteine al $3.48\% \pm 0.03$, caseina al $2.62\% \pm 0.03$, lattosio al $4.83\% \pm 0.05$ e solidi totali al $13.20\% \pm 0.35$.

Nelle prove di caseificazione sono state testate diverse percentuali di grasso che risulta il costituente con maggior variabilità, come si nota dai valori di deviazione standard (DS) (0.33) e dai valori di minimo (3.46%) e massimo (4.34%) con quasi un punto percentuale di differenza. Ne consegue una elevata variabilità anche per i solidi totali, con DS pari a 0.35 e valori che vanno da un minimo di 12.71% ad un massimo di 13.68%. Risultano stabili proteine e caseine con DS di 0.03 in entrambi i casi. Il motivo che spiega la bassa variabilità di tali valori è da ricercarsi nella stesura del disegno sperimentale, che prevede di mantenere la percentuale proteica fissa al 3.5.

L'effetto della caseificazione di questo latte è stata analizzata valutando le sue proprietà coagulative, la composizione e la resa di cagliate e caciotte. Per i caratteri elencati, nella Tabella 6 vengono presentate le statistiche descrittive con media, deviazione standard, minimo e massimo.

Tabella 6. Statistiche descrittive per il tempo di coagulazione (RCT), composizione e resa di cagliata e caciotta.

Caratteri, % p/p	Media	DS	Minimo	Massimo
RCT, min	13.76	1.84	7.80	15.60
Composizione Cagliata				
Grasso	19.51	1.28	17.20	21.10
Proteine	15.69	1.40	12.50	17.70
Umidità	66.96	1.10	65.20	69.20
Solidi totali	35.19	1.58	32.30	37.15
Resa Cagliata	20.94	0.92	19.08	22.44
Composizione Caciotta				
Grasso	26.87	1.50	24.30	30.00
Proteine	22.76	1.77	19.53	25.30
Umidità	48.70	1.56	46.60	51.70
Solidi totali	50.37	2.06	47.30	54.63
Resa Caciotta				
Totale	11.22	0.67	10.10	12.36
Grasso	77.32	2.96	71.14	83.31
Proteine	73.15	3.34	65.57	78.64
Peso Secco	42.86	3.31	37.90	48.37

Il tempo di coagulazione (RCT) medio è pari a 13.76 minuti \pm 1.84, con minimo e massimo pari a 7.80 e 15.60 minuti rispettivamente. L'RCT trovato in queste prove sperimentali risulta confrontabile con quello individuato negli studi di Bittante et al. (2012) e Cecchinato et al. (2012) ma anche inferiore rispetto all'RCT riscontrato nello studio di De Marchi et al. (2008). Le differenze che sussistono tra gli RCT sono dovute principalmente alle diverse tecniche di analisi impiegate in laboratorio, alla tipologia di caglio utilizzata, alle temperature di coagulazione (Pretto et al., 2011) e al diverso contributo delle razze bovine sul latte di massa destinato alle caseificazioni (De Marchi et al., 2008).

Per quanto riguarda la composizione percentuale della cagliata, il parametro più variabile risulta essere quello dei solidi totali (35.19% \pm 1.58), soprattutto per l'elevata variabilità di proteine (15.69% \pm 1.40) e grasso (19.51% \pm 1.28).

L'umidità media dopo 10 giorni di stagionatura arriva a valori di 48.70% \pm 1.56, mentre la composizione percentuale media per grasso, proteine e solidi totali della caciotta risulta

rispettivamente di $26.87\% \pm 1.50$, $22.76\% \pm 1.77$ e $50.37\% \pm 2.06$. Le percentuali di proteine e grasso presenti nelle caciotte prodotte in queste prove sperimentali risultano inferiori rispetto a quelle presenti in altri formaggi (Ikonen et al., 1999). Tale scostamento potrebbe essere dovuto al fatto che il disegno sperimentale prevede di lavorare a una concentrazione stabile di proteine.

La resa della cagliata risulta pari a 20.94% con una DS di 0.92. Si tratta di un dato difficile da confrontare con la bibliografia, dal momento in cui tale valore varia ampiamente a seconda del tempo che intercorre tra lo scarico della caldaia e la pesata della cagliata. La resa totale della caciotta ($11.22\% \pm 0.67$) risulta in linea con le rese medie ottenute in altri studi scientifici (Lanciotti et al., 2006, Rudan et al., 1998) in cui non viene impiegato il microparticolato.

L'analisi della varianza per i caratteri del tempo di coagulazione (RCT), della composizione e resa delle cagliate e delle caciotte, è stata condotta valutando l'effetto del microparticolato (MP), dei rapporti (Rapporto), della loro interazione (MP*Rapporto) e della giornata di caseificazione (Data(MP)); i risultati vengono mostrati nella Tabella 7.

Tabella 7. Analisi della varianza per il tempo di coagulazione (RCT), composizione e resa di cagliata e caciotta.

Caratteri, % p/p	Data (MP)	MP	Rapporto	MP*Rapporto	RMSE	R²
RCT, min	1.62	0.15	17.92 ^{**}	8.99 ^{***}	0.92	0.88
Composizione cagliata						
Grasso	2.75	0.69	15.64 ^{**}	2.38	0.70	0.86
Proteine	4.15 [*]	0.00	2.44	1.02	1.03	0.75
Umidità	2.85	0.37	3.86	1.90	0.80	0.75
Solidi totali	15.04 ^{***}	0.10	3.89	1.63	0.73	0.90
Resa cagliata	0.58	14.55 [*]	6.07 [*]	2.2 [*]	0.64	0.77
Composizione caciotta						
Grasso	2.40	0.80	22.03 ^{***}	0.71 [*]	0.77	0.88
Proteine	2.62	2.92	7.46 [*]	0.82 [*]	1.12	0.81
Umidità	3.59	0.62	1.45	2.99	1.11	0.76
Solidi totali	1.88	2.95	0.47	0.68	1.76	0.66
Resa caciotta						
Totale	2.91	0.21	16.86 ^{**}	1.00 [*]	0.37	0.86
Grasso	4.05 [*]	0.02	0.44	1.13	2.33	0.71
Proteine	2.07	2.83	0.04	0.32	2.88	0.65
Peso secco	2.38	1.55	0.99	1.20	2.69	0.69

L'effetto della data è risultato altamente significativo solo per i solidi totali della cagliata; una significatività minore è stata ottenuta per la composizione percentuale in proteine della cagliata e per la resa in grasso della caciotta.

L'effetto del microparticolato è risultato statisticamente significativo solo per la resa della cagliata; la composizione della cagliata e della caciotta e la resa dopo stagionatura non risultano influenzati dal microparticolato.

L'effetto del rapporto ha mostrato la maggior influenza sui caratteri analizzati: i diversi rapporti proteina/grasso vanno ad influenzare in modo altamente significativo la percentuale di grasso della cagliata e della caciotta. Anche le rese della cagliata e della caciotta e l'RCT risultano statisticamente influenzati dal rapporto proteina/grasso.

Al contrario, se si considera il livello di recupero di grasso, proteine e solidi totali nella caciotta, si nota come non vi sia nessuna significatività. La fluttuazione dei valori della resa totale quindi è dovuta principalmente alla variabilità del latte iniziale utilizzato per le caseificazioni, caratterizzato per l'appunto da diversi rapporti proteina/grasso.

L'effetto dell'interazione (MP*Rapporto) risulta influenzare in modo significativo il tempo di coagulazione, la resa della cagliata e della caciotta, la percentuale di grasso e proteine nella caciotta.

Dopo l'analisi della varianza sono state stimate le medie corrette per gli effetti del rapporto (Rapporto), microparticolato (MP) e della loro interazione (MP*Rapporto).

Nella Tabella 8 sono riportate le medie corrette per i diversi rapporti proteina/grasso, relative al tempo di coagulazione (RCT), alla composizione in grasso, proteine e solidi di cagliata e caciotta, alla resa della cagliata, nonché alla resa della caciotta totale, alla resa in grasso, in proteine e in peso secco.

Tabella 8. Medie corrette del tempo di coagulazione (RCT), composizione e resa di cagliata e caciotta per i diversi rapporti proteina/grasso.

Caratteri, % p/p	0.8	0.9	1.0
RCT, min	11.93 ^a	14.68 ^b	14.66 ^b
Composizione Cagliata			
Grasso	20.40 ^a	19.88 ^a	18.23 ^b
Proteine	14.99 ^a	15.76 ^a	16.30 ^a
Solidi totali	35.39 ^a	35.65 ^a	34.53 ^a
Resa Cagliata	21.43 ^a	21.17 ^{ab}	20.21 ^b
Composizione Caciotta			
Grasso	28.48 ^a	26.52 ^b	25.61 ^b
Proteine	21.61 ^a	22.59 ^a	24.08 ^b
Solidi totali	49.90 ^a	50.88 ^a	50.31 ^a
Resa Caciotta			
Totale	11.82 ^a	11.24 ^{ab}	10.60 ^b
Grasso	78.05 ^a	76.99 ^a	76.96 ^a
Proteine	73.31 ^a	72.86 ^a	73.27 ^a
Peso Secco	43.42 ^a	43.56 ^a	41.60 ^a

Il tempo di coagulazione del latte aumenta in modo significativo all'aumentare del rapporto proteina/grasso, ovvero al diminuire della quantità di grasso che concorre a tale rapporto. Questa evidenza è in accordo con quanto riportato da diverse fonti bibliografiche, per cui le proprietà coagulative del latte migliorano in presenza di percentuali di grasso più elevate (Thomson et al., 2001; Auldish et al., 2004).

La composizione della cagliata risulta influenzata dal rapporto utilizzato solo a livello della quantità di grasso, infatti dalle medie stimate si osserva che il grasso cala all'aumentare del rapporto; tale variabilità è in accordo con la stesura del disegno sperimentale. La percentuale di proteine nella cagliata e i solidi totali invece non mostrano medie statisticamente differenti al variare del rapporto.

La resa della cagliata è più elevata in corrispondenza di bassi rapporti proteina/grasso, e quindi in corrispondenza di latte con maggiori quantità di grasso.

In accordo con quanto osservato nella composizione della cagliata, anche nella composizione della caciotta si osserva un trend decrescente della percentuale di grasso in corrispondenza dei rapporti proteina/grasso più elevati. Risulta esserci inoltre un aumento della percentuale proteica al diminuire della percentuale di grasso. Questo dato risulta in accordo con altri lavori scientifici nei quali bassi livelli di grasso sono associati ad un aumento della percentuale di proteine (Gilles et al., 1985; Guinee et al., 2000).

La resa della caciotta totale risulta essere influenzata dai rapporti presi in considerazione; in particolare si osservano rese decrescenti al diminuire della percentuale di grasso, ovvero inversamente proporzionali al rapporto proteina/grasso. Il dato è in accordo con quanto riportato in bibliografia, per cui le rese più elevate sono associate a percentuali di grasso maggiori (Fenelon et al., 1999; Auldish et al., 2004). Le rese in grasso, proteina e peso secco non mostrano medie statisticamente differenti per i rapporti testati; si osserva però un trend decrescente nella resa in grasso all'aumentare del valore dei rapporti, quindi al diminuire del grasso utilizzato nel latte di partenza.

Sono state inoltre stimate le medie corrette del tempo di coagulazione (RCT), della composizione percentuale e della resa di cagliate e caciotte, per le due percentuali di microparticolato testate (3 e 4%) (Tabella 9)

Tabella 9. Medie corrette del tempo di coagulazione (RCT), composizione e resa di cagliata e caciotta per le diverse percentuali di MP.

Caratteri, % p/p	MP 3%	MP 4%
RCT, min	13.86 ^a	13.65 ^a
Composizione Cagliata		
Grasso	19.27 ^a	19.73 ^a
Proteine	15.70 ^a	15.67 ^a
Solidi totali	34.97 ^a	35.40 ^a
Resa Cagliata	20.49 ^a	21.37 ^b
Composizione Caciotta		
Grasso	26.62 ^a	27.12 ^a
Proteine	22.03 ^a	23.48 ^b
Solidi totali	51.34 ^a	49.38 ^b
Resa Caciotta		
Totale	11.29 ^a	11.15 ^a
Grasso	77.15 ^a	77.49 ^a
Proteine	71.51 ^a	74.79 ^b
Peso Secco	44.08 ^a	41.64 ^a

L’RCT non risulta influenzato dalla percentuale di microparticolato infatti le medie corrette risultano stabili, così come la composizione percentuale della cagliata in grasso, proteine e solidi totali che non subiscono variazioni significative tra tesi.

Al contrario la resa della cagliata aumenta sensibilmente in corrispondenza della percentuale di microparticolato maggiore, passando dal 20.49% per il 3% di microparticolato al 21.37% per il 4% di microparticolato.

La composizione della caciotta rimane invariata per quanto riguarda la percentuale di grasso, in accordo con altri studi sperimentali nei quali il microparticolato viene usato come additivo nelle caseificazioni (Romeih et al., 2002; Zalazar et al., 2002; Kavas et al., 2004); al contrario all’aumentare della percentuale di microparticolato, si registra un aumento significativo nella percentuale di proteine presenti nel formaggio. Questo dato è in linea con quanto riportato da altri autori che osservano un titolo proteico più elevato in formaggio Cheddar caseificato con microparticolato (Drake et al., 1996); allo stesso tempo il dato è in contrasto con quanto osservato da Zalazar et al. (2002) che non riporta differenze statisticamente significative per la percentuale proteica nel formaggio in funzione della percentuale di microparticolato utilizzata. La percentuale dei solidi totali nella caciotta passa da 51.34% a 49.38% quando il microparticolato viene usato dal 3 al 4%. Questo dato è in accordo con altri studi che documentano il rapporto inversamente proporzionale tra la percentuale di solidi totali e la percentuale di microparticolato utilizzata (Lobato et al., 2001; Koka et al., 2004; Jooyandeh et al., 2009).

La resa della caciotta infine si dimostra sostanzialmente invariata per le diverse percentuali di microparticolato, fatta eccezione per la resa in proteine, che risulta maggiore nelle caciotte prodotte con il 4% di microparticolato rispetto a quelle prodotte con il 3% di microparticolato. Si osserva inoltre una diminuzione della resa in peso secco delle caciotte per percentuali più elevate di microparticolato, ma non risulta statisticamente significativa; tale aspetto risulta più evidente in altri studi nei quali si osserva una maggior capacità di ritenzione dei liquidi nei formaggi caseificati con una percentuale di microparticolato più alta (Punidades et al., 1999).

Infine, i risultati delle medie stimate per l'interazione microparticolato per rapporto, vengono mostrati nella Figura 3 in cui sono presentati solo i caratteri risultati significativamente differenti tra le tesi: tempo di coagulazione (RCT), resa della cagliata, proteine e grasso della caciotta, e resa della caciotta. La completa interpretazione di tali caratteri è quindi fornita dall'interazione delle tesi in questione (Tabella 7). Le caratteristiche di coagulazione e di resa sono infatti influenzate da un effetto sinergico tra la percentuale di microparticolato addizionata e la composizione del latte di partenza.

Per quanto riguarda il tempo di coagulazione (RCT) (Figura 3 a), si può osservare che il tempo più breve (10.53 min) si registra in corrispondenza di latte con microparticolato al 4% e con rapporto proteina/grasso pari a 0.8. All'aumentare del rapporto proteina/grasso si osserva in generale un rallentamento del processo di coagulazione (sia per la tesi al 3% di microparticolato, sia per la tesi al 4% di microparticolato), fino a raggiungere i 15.20 min per il rapporto pari a 1.0, in corrispondenza della tesi al 4% di microparticolato.

Per i rapporti proteina/grasso 0.9 e 1 non risultano esserci differenze tra le tesi al 3 e 4% di microparticolato.

In Figura 3 b vengono mostrate le medie stimate della resa della cagliata corrette per l'interazione MP*Rapporto. La resa maggiore (21.99%) si osserva con il 4% di microparticolato, per il rapporto intermedio proteina/grasso. In generale, livelli maggiori di resa sono stati ottenuti con il microparticolato al 4%, anche nei prodotti magri. La resa minore è stata ottenuta nei prodotti magri con il 3% di microparticolato aggiunto.

Per quanto riguarda la composizione della cagliata, è il grasso a risentire in misura maggiore dell'interazione MP*Rapporto: la percentuale di grasso cala all'aumentare del rapporto proteina/grasso, raggiungendo il valore più basso (17.50%) in corrispondenza del rapporto pari a 1.0 e del 3% di microparticolato. Lo stesso trend è osservato con il 4% di microparticolato. Al contrario la percentuale di proteine e materia secca presenti nella

cagliata non risultano influenzate né dalla percentuale di microparticolato né dal valore del rapporto proteina/grasso (dati non mostrati).

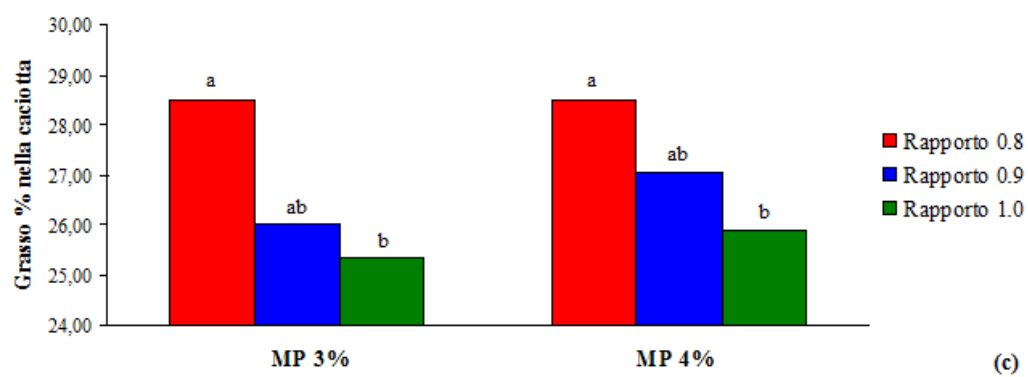
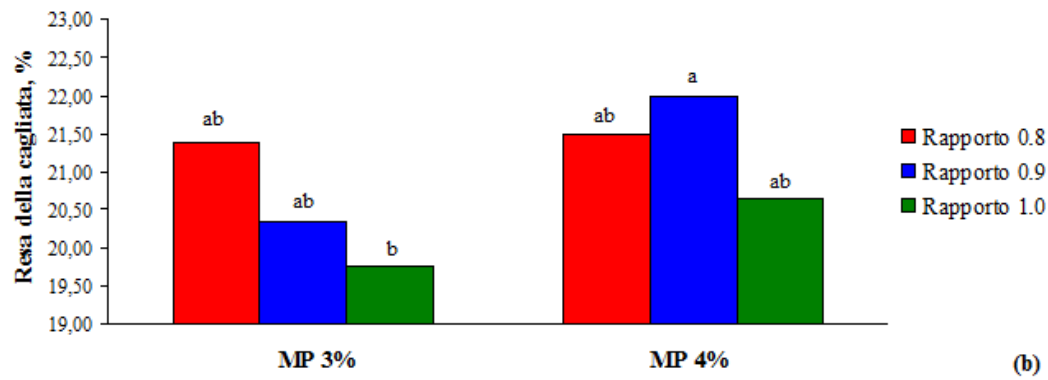
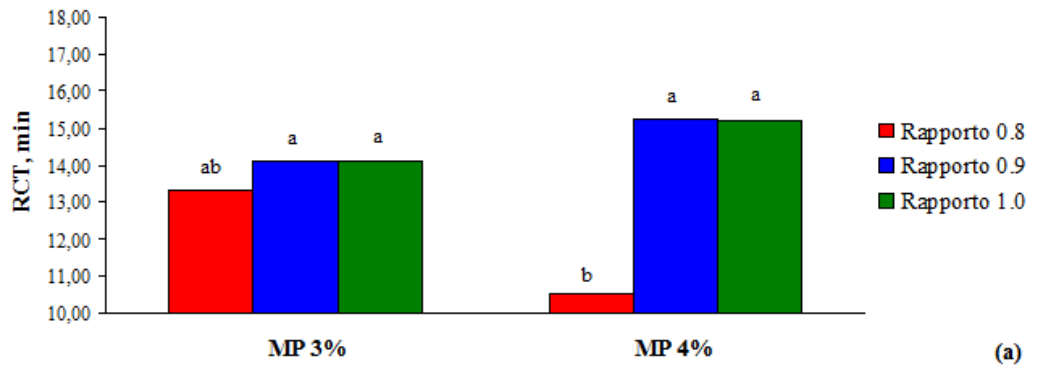
In Figura 3 c sono rappresentate le medie corrette della composizione in grasso della caciotta per l'effetto dell'interazione MP*Rapporto. Si osserva che la percentuale di grasso varia in modo inversamente proporzionale al valore del rapporto proteina/grasso; in corrispondenza del rapporto pari a 0.8 si osservano le percentuali di grasso maggiori (28.50% per microparticolato al 3% e 28.47% per microparticolato al 4%). Confrontando le percentuali di microparticolato a parità di rapporto non risultano esserci differenze statisticamente significative.

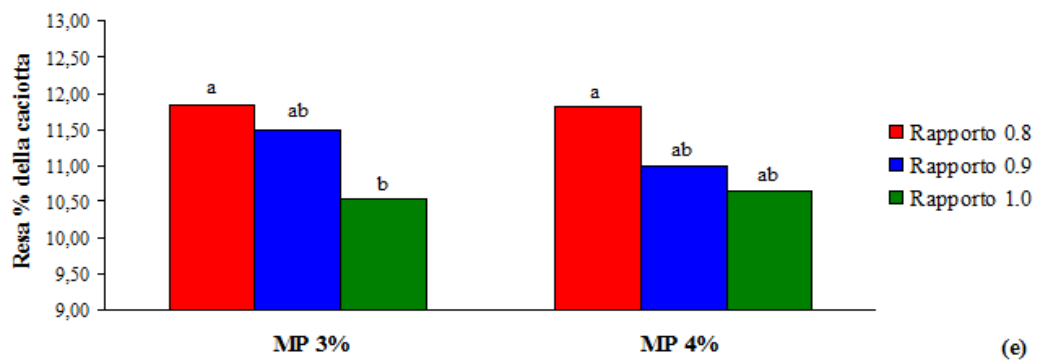
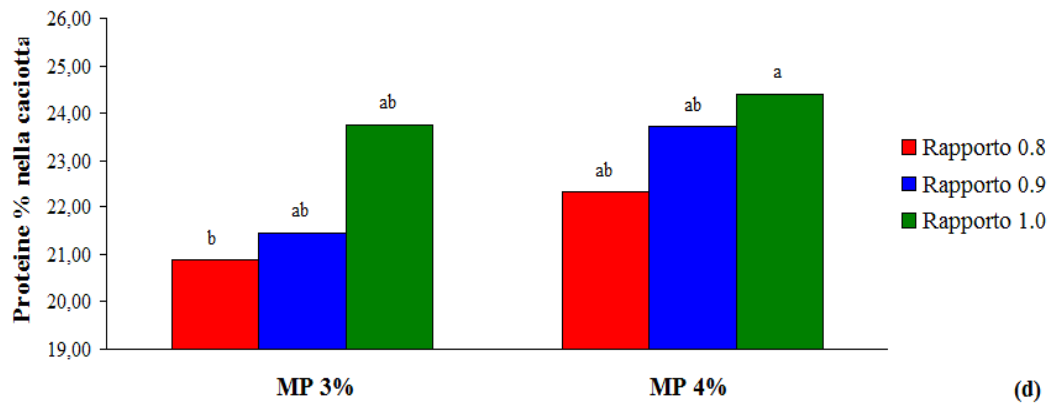
Osservando la Figura 3 d, che valuta la variazione della percentuale di proteine nella caciotta in funzione dell'effetto MP*Rapporto, risulta evidente che all'aumentare del rapporto proteina/grasso aumenta la percentuale di proteine della caciotta; ciò è vero in particolare per le caciotte prodotte con il 4% di microparticolato, in cui questo trend risulta più marcato. In particolare nei prodotti magri con rapporto proteina/grasso pari a 1.0 i livelli proteici maggiori sono stati ottenuti per le caciotte con il 4% di microparticolato (24.40%). Al contrario per quantità intermedie di grasso (rapporto 0.9) non risultano esserci differenze tra le tesi con l'aggiunta del 3 o 4% di microparticolato. Ad alti livelli di grasso e microparticolato al 3% vengono osservati i valori più bassi di proteina nella caciotta.

Per quel che riguarda il peso secco della caciotta non sono state osservate differenze significative nelle medie corrette per l'interazione MP*Rapporto (dati non mostrati).

Nella Figura 3 e vengono riportate le medie corrette della resa della caciotta per l'interazione MP*Rapporto. Come già osservato per la resa della cagliata, anche la resa della caciotta aumenta al calare del rapporto proteina/grasso. I valori massimi sono ottenuti per il rapporto pari a 0.8 con alti livelli di grasso, rispettivamente di 11.84% e 11.81 per le tesi al 3 e 4% di microparticolato. Il valore minore invece è stato ottenuto per i prodotti magri, con rapporto proteine/grasso di 1.0, nella tesi con il 3% di microparticolato (11.54%). Valori intermedi sono stati ottenuti per il rapporto 0.9, e per il rapporto 1.0 con l'utilizzo del microparticolato al 4% che quindi mostra una resa superiore rispetto al formaggio magro prodotto con il 3% di microparticolato.

Figura 3. Medie corrette del tempo di coagulazione (RCT) (a), della resa della cagliata e della caciotta (b, e) e della composizione in grasso e in proteine della caciotta (c, d) per l'effetto MP*Rapporto.





3.2 Effetto della caseificazione sulla composizione del siero

Per valutare l'efficienza con cui il microparticolato è trattenuto all'interno della cagliata è stata valutata la composizione chimica del siero ottenuto dalle caseificazioni con aggiunta di microparticolato.

Nella Tabella 10 vengono presentati media, deviazione standard (DS), minimo e massimo della composizione e delle frazioni proteiche del siero ottenuto dalle prove di caseificazione.

Tabella 10. Statistiche descrittive della composizione media del siero.

Caratteri	Media	DS	Minimo	Massimo
Composizione, % p/p				
Grasso	0.99	0.16	0.69	1.36
Solidi	8.10	0.19	7.72	8.45
Proteine	1.01	0.03	0.96	1.05
Frazioni proteiche, mg/ml				
α -lattoalbumina	0.75	0.04	0.65	0.80
β -lattoglobulina A	2.91	0.19	2.56	3.34
β -lattoglobulina B	1.41	0.08	1.24	1.51
Albumina di siero bovino	0.15	0.02	0.12	0.19
Lattoferrina	0.02	0.003	0.01	0.02
Caseino macropeptide	0.58	0.07	0.42	0.70
Proteoso-peptone	0.25	0.03	0.18	0.30

In accordo con quanto visto nel caso del latte, anche per il siero si osserva una elevata variabilità della frazione grassa, con media percentuale pari a 0.99 ± 0.16 , ed un range di circa 0.7% tra minimo e massimo. Anche in questo caso ne discende una elevata variabilità dei solidi con media percentuale di 8.10 ± 0.19 , minimo pari a 7.72% e massimo pari a 8.45%. La percentuale di proteina, pari all'1.01% risulta essere molto più stabile con DS di 0.03. Il siero ottenuto dalle caseificazioni effettuate in questo studio risulta essere più ricco in grasso e proteine rispetto a quanto riportato da altri autori (Ikonen et al., 1999). La frazione proteica che mostra variabilità maggiore è la β -lattoglobulina A, con media di 2.91 mg/ml e DS di 0.19. Al contrario la lattoferrina, l'albumina di siero bovino e il proteoso-peptone risultano essere le frazioni più stabili con DS di 0.003, 0.02 e 0.03 mg/ml rispettivamente. In accordo con quanto riportato per la percentuale di proteine presenti nel siero, anche la concentrazione delle singole frazioni siero proteiche risulta più elevata rispetto a quella riscontrata in altri studi (Ikonen et al., 1999). Le differenze riscontrate con i dati riportati in queste pubblicazioni potrebbero

essere dovute alla diversa metodica di caseificazione adottata, che non prevede l'uso di microparticolato.

Per l'Anova anche in questo caso sono stati considerati l'effetto della data di caseificazione come effetto annidato nella percentuale di microparticolato (Data(MP)), l'effetto del microparticolato (MP), il rapporto proteina/grasso (Rapporto) e infine l'interazione tra microparticolato e rapporto proteina/grasso (MP*Rapporto). La bontà del modello viene valutata dai parametri R^2 e root means square error (RSME).

Nella Tabella 11 viene riportata l'analisi della varianza condotta per i caratteri di composizione percentuale del siero e per la concentrazione delle frazioni proteiche.

Tabella 11. Analisi della varianza per la composizione del siero.

Caratteri	Data(MP)	MP	Rapporto	MP*Rapporto	RMSE	R^2
Composizione, % p/p						
Grasso	0.79	7.71*	3.48	0.09	0.14	0.67
Solidi	0.54	15.94*	1.40	0.04	0.17	0.63
Proteine	0.83	28.19**	1.20	1.58	0.02	0.80
Frazioni proteiche mg/ml						
A-lattoalbumina	0.24	0.79	0.51	0.10	0.05	0.23
B-lattoglobulina A	0.60	1.03	0.78	0.88	0.20	0.44
B-lattoglobulina B	0.96	0.05	0.63	0.13	0.09	0.40
Albumina di siero bovino	2.99	7.22	2.45	0.06	0.01	0.83
Lattoferrina	2.13	5.03	7.17*	5.84*	0.01	0.85
Caseino macropeptide	3.30	0.03	1.54	0.57	0.06	0.69
Proteoso-peptone	5.22*	0.08	1.83	1.69	0.02	0.78

L'effetto della data non sembra influenzare i caratteri presi in considerazione, fatta eccezione per una lieve significatività nel caso del proteoso-peptone.

L'effetto del microparticolato è risultato significativo a livello della composizione percentuale del siero, in particolar modo sulla percentuale delle proteine oltre che sulla percentuale di solidi e grasso; al contrario non sembra esserci alcuna significatività per quanto riguarda la concentrazione delle frazioni siero proteiche. Infine il rapporto proteina/grasso e l'interazione tra rapporto e microparticolato (MP*Rapporto) hanno un effetto statisticamente significativo solo per la concentrazione di lattoferrina.

I risultati delle medie corrette per i diversi rapporti proteina/grasso della composizione del siero sono riportati nella Tabella 12. La composizione del siero è stata analizzata per grasso, proteine, lattosio e solidi totali, mentre le frazioni siero-proteiche che sono state

prese in considerazione sono la α -lattoalbumina, la β -lattoglobulina A e B, l'albumina di siero bovino, la lattoferrina, il caseino macropeptide e il proteoso peptone.

Le medie corrette per l'effetto dei tre rapporti proteina/grasso pari a 0.8, 0.9 e 1.0, ottenuti rispettivamente con livelli di grasso alti medi e bassi, non influiscono in modo significativo sulla composizione del siero; si osserva tuttavia un trend decrescente della percentuale di grasso nel siero per le tesi con il rapporto proteina/grasso più alto.

Per le frazioni proteiche le differenze tra tesi sono state osservate solo nel caso della lattoferrina: per i rapporti proteina/grasso di 0.9 e 1.0 si osservano i valori più elevati della siero proteina, mentre tutte le altre frazioni proteiche risultano stabili.

Tabella 12. Medie corrette della composizione del siero e delle frazioni proteiche del siero per i diversi rapporti proteina/grasso.

Caratteri	0.8	0.9	1.0
Composizione, % p/p			
Grasso	1.04 ^a	1.05 ^a	0.86 ^a
Proteine	1.00 ^a	1.00 ^a	1.01 ^a
Lattosio	5.07 ^a	5.05 ^a	5.09 ^a
Solidi totali	8.15 ^a	8.13 ^a	8.00 ^a
Frazioni proteiche del siero, mg/ml			
α -lattoalbumina	0.76 ^a	0.74 ^a	0.75 ^a
β -lattoglobulina A	2.92 ^a	2.83 ^a	2.97 ^a
β -lattoglobulina B	1.44 ^a	1.40 ^a	1.39 ^a
Albumina di siero bovino	0.15 ^a	0.14 ^a	0.16 ^a
Lattoferrina	0.02 ^{ab}	0.018 ^b	0.021 ^a
Caseino macropeptide	0.55 ^a	0.57 ^a	0.61 ^a
Proteoso-peptone	0.25 ^a	0.25 ^a	0.26 ^a

Nella Tabella 13 sono mostrate le medie corrette della composizione percentuale del siero e delle frazioni siero proteiche per le percentuali di microparticolato (MP) testate, ovvero 3 e 4%.

La composizione del siero risulta influenzata dall'effetto del microparticolato; in particolare si osserva un aumento della percentuale di grasso e proteina nel siero in concomitanza della percentuale più elevata di microparticolato. Questi dati sono in linea con quanto riportato da altri lavori scientifici nei quali il microparticolato viene usato come sostitutivo del grasso (Mc Mahon et al., 1996). Al contrario l'aumento del microparticolato dal 3 al 4% non influenza i livelli del lattosio e solidi totali.

Tabella 13. Medie corrette della composizione del siero e delle frazioni proteiche del siero per le percentuali di MP.

Caratteri	MP 3%	MP 4%
Composizione, % p/p		
Grasso	0.90 ^a	1.06 ^b
Proteine	0.98 ^a	1.03 ^b
Lattosio	5.06 ^a	5.08 ^a
Solidi totali	7.98 ^a	8.21 ^b
Frazioni proteiche del siero, mg/ml		
α -lattoalbumina	0.744 ^a	0.754 ^a
β -lattoglobulina A	2.87 ^a	2.94 ^a
β -lattoglobulina B	1.41 ^a	1.40 ^a
Albumina di siero bovino	0.142 ^a	0.164 ^b
Lattoferrina	0.018 ^a	0.020 ^b
Caseino macropeptide	0.577 ^a	0.585 ^a
Proteoso-peptone	0.250 ^a	0.257 ^a

L'aumento della concentrazione delle proteine nel siero, in corrispondenza alla percentuale più elevata di MP, è confermata dall'analisi delle frazioni siero proteiche. In particolare le frazioni la cui concentrazione aumenta maggiormente all'aumentare della percentuale di MP risultano essere l'albumina di siero bovino e la lattoferrina.

Dai risultati dell'analisi della varianza la composizione del siero per l'effetto dell'interazione tra microparticolato e rapporto (MP*Rapporto) non risulta significativa tale risultato è confermato per le medie stimate tra tesi e quindi non vengono mostrate le medie corrette.

3.3 Effetto della caseificazione sulla concentrazione di tioli a basso peso molecolare

L'effetto della caseificazione con microparticolato è stata testata per valutare eventuali cambiamenti delle concentrazioni dei tioli a basso peso molecolare nel latte, nel siero e nella caciotta. Nella Tabella 14 vengono presentati media, deviazione standard, minimo e massimo della concentrazione dei tioli: cisteina (cys), cisteinilglicina (cys gly), γ -glutamilsteina (ggc) e glutatione (gsh), presenti nel latte, nel siero e nella caciotta.

Tabella 14. Statistiche descrittive dei tioli del latte, del siero e della caciotta.

Tioli, μM	Media	DS	Minimo	Massimo
Latte				
Cys	33.24	3.86	27.93	43.41
Cys Gly	1.35	0.23	1.08	1.93
Ggc	0.54	0.22	0.23	0.84
Gsh	0.81	0.28	0.43	1.58
Siero				
Cys	26.73	3.53	19.22	32.15
Cys Gly	1.15	0.16	0.90	1.60
Ggc	0.43	0.24	0.14	0.80
Gsh	0.54	0.22	0.16	1.05
Caciotta				
Cys	6.51	4.17	0.33	15.43
Cys Gly	0.19	0.15	0.00	0.52
Ggc	0.11	0.08	0.00	0.25
Gsh	0.26	0.20	0.03	0.65

La cisteina risulta essere il tiolo più abbondante nel latte così come nel siero e nel formaggio (rispettivamente $33.24 \mu\text{M} \pm 3.86$, $26.73 \mu\text{M} \pm 3.53$, $6.51 \mu\text{M} \pm 4.17$). L'abbondanza di cisteina nel latte e nel siero è un dato riportato da diverse fonti bibliografiche (Parodi, 1998; Bounous, 2000). Nelle medesime matrici la γ -glutamilsteina ($0.54 \mu\text{M} \pm 0.22$, $0.43 \mu\text{M} \pm 0.24$, $0.11 \mu\text{M} \pm 0.08$) e il glutatione ($0.81 \mu\text{M} \pm 0.28$, $0.54 \mu\text{M} \pm 0.22$, $0.26 \mu\text{M} \pm 0.20$) risultano avere le concentrazioni più basse. La cisteinilglicina infine risulta più concentrata nel latte, ma durante il processo di caseificazione viene persa nel siero, quindi ha livelli piuttosto bassi nella caciotta ($1.35 \mu\text{M} \pm 0.23$, $1.15 \mu\text{M} \pm 0.16$, $0.19 \mu\text{M} \pm 0.15$).

Nella successiva tabella (Tabella 15) vengono riportati i risultati dell'analisi della varianza condotta per i quattro tioli presenti nel latte, nel siero e nella caciotta.

Tabella 15. Analisi della varianza per i tioli del latte, del siero e della caciotta.

Tioli, μM	Data (MP)	MP	Rapporto	MP*Rapporto	RMSE	R ²
Latte						
Cys	1.23	1.28	1.65	3.15	3.24	0.67
Cys Gly	7.14**	0.00	0.55	1.75	0.14	0.81
Ggc	15.9***	0.48*	1.28	8.82	0.09	0.90
Gsh	1.44	1.32	1.02	0.58	0.27	0.58
Siero						
Cys	0.76	0.12	0.22	0.11	4.23	0.32
Cys Gly	1.06	0.02	1.51	0.42	0.16	0.50
Ggc	47.90***	2.29*	0.94	1.34	0.16	0.75
Gsh	0.25	1.53	1.01	1.37	4.57	0.43
Caciotta						
Cys	0.25	1.53	1.01	1.37	4.57	0.43
Cys Gly	10.39**	0.00	1.78	1.50	0.08	0.86
Ggc	1.19	0.18	0.17	0.22	0.09	0.42
Gsh	1.10	0.06	0.60	0.07	0.22	0.42

L'effetto della data risulta altamente significativo per i tioli, in particolare per la γ -glutamilsteina del latte e del siero, ma anche per la cisteinilglicina del latte e della caciotta. Tale variabilità giornaliera potrebbe essere dovuta a diverse concentrazioni di tioli a basso peso molecolare nel latte di partenza (indipendentemente dal livello di proteine e grasso); la stessa variabilità si osserva di conseguenza anche nelle caciotte e nel siero ottenuti dopo caseificazione.

L'effetto del microparticolato risulta significativo solo per la γ -glutamilsteina, mentre, gli effetti del rapporto e dell'interazione MP*Rapporto non risultano influenzare in modo significativo nessuno dei caratteri presi in considerazione.

Nella Tabella 16 sono riportate le medie corrette per i diversi rapporti di proteina/grasso delle concentrazioni dei quattro tioli: cisteina (cys), cisteinilglicina (cys gly), γ -glutamilsteina (ggc) e glutazione (gsh) all'interno delle tre diverse matrici (latte, siero e caciotta).

Tabella 16. Medie corrette dei tioli del latte, del siero e della caciotta per i diversi rapporti proteina/grasso.

Tioli, μM	0.8	0.9	1.0
Latte			
Cys	33.55 ^a	34.77 ^a	31.41 ^a
Cys Gly	1.32 ^a	1.32 ^a	1.40 ^a
Ggc	0.58 ^a	0.55 ^a	0.49 ^a
Gsh	0.83 ^a	0.68 ^a	0.90 ^a
Siero			
Cys	27.66 ^a	26.15 ^a	26.38 ^a
Cys Gly	1.14 ^a	1.08 ^a	1.24 ^a
Ggc	0.48 ^a	0.42 ^a	0.39 ^a
Gsh	0.51 ^a	0.50 ^a	0.62 ^a
Caciotta			
Cys	5.89 ^a	8.62 ^a	5.03 ^a
Cys Gly	0.18 ^a	0.25 ^a	0.16 ^a
Ggc	0.10 ^a	0.13 ^a	0.10 ^a
Gsh	0.32 ^a	0.18 ^a	0.29 ^a

Dal punto di vista statistico si osserva che le concentrazioni delle molecole in questione non sono influenzate dai diversi rapporti proteina/grasso. Tuttavia l'aumento di questo rapporto sembra essere associato a una diminuzione della concentrazione di cisteina presente nel siero. Tale trend è in parte confermato anche per la cisteina nel latte e nel formaggio.

Nella Tabella 17 sono mostrate le medie corrette della concentrazione dei tioli nel latte, nel siero e nella caciotta, per le percentuali di microparticolato testate (3 e 4%).

Tabella 17. Medie corrette dei tioli del latte, del siero e della caciotta per le diverse percentuali di MP.

Tioli, μM	MP 3%	MP 4%
Latte		
Cys	32.28 ^a	34.20 ^a
Cys Gly	1.35 ^a	1.35 ^a
Ggc	0.42 ^a	0.61 ^b
Gsh	0.72 ^a	0.90 ^a
Siero		
Cys	26.43 ^a	27.03 ^a
Cys Gly	1.15 ^a	1.16 ^a
Ggc	0.38 ^a	0.49 ^b
Gsh	0.44 ^a	0.64 ^b
Caciotta		
Cys	5.85 ^a	7.17 ^a
Cys Gly	0.20 ^a	0.19 ^a
Ggc	0.10 ^a	0.12 ^a
Gsh	0.28 ^a	0.25 ^a

La concentrazione dei tioli nel latte non è influenzata dalle due tesi di MP, fatta eccezione per la γ -glutamilsteina la cui concentrazione passa da 0.42 μ M con microparticolato al 3%, al 0.61 μ M con microparticolato al 4%.

Le concentrazioni dei tioli presenti nel siero si dimostrano in alcuni casi influenzate dall'aumento della percentuale di microparticolato utilizzata (come nel caso della γ -glutamilsteina e del glutatione), mentre in altri casi si dimostrano insensibili, non riportando differenze significative (come per la cisteina e la cisteinilglicina).

Nella caciotta la concentrazione dei tioli pare non essere collegata in nessun caso alla percentuale di microparticolato utilizzata.

Ciò che invece si osserva a livello di tutte le matrici analizzate è un trend in aumento della concentrazione di cisteina passando dalla percentuale di microparticolato più bassa a quella più alta.

Per quel che riguarda l'effetto combinato della percentuale di microparticolato e il valore del rapporto proteina/grasso non sono state osservate differenze significative nella concentrazione dei tioli. Per cui l'interazione MP*Rapporto non influenza la concentrazione dei tioli presenti all'interno delle matrici analizzate (dati delle medie corrette non mostrati).

4. CONCLUSIONI

Tecniche di caseificazione non tradizionali prevedono l'uso di aggregati siero proteici noti con il nome di microparticolato. L'uso del microparticolato per migliorare le caratteristiche strutturali dei prodotti è sempre più diffuso, soprattutto negli alimenti a basso contenuto di grasso. Oltre a conferire migliori qualità tecnologiche, il microparticolato fornisce anche una serie di aminoacidi e peptidi importanti per la salute. In questa tesi è stato valutato l'effetto della caseificazione di diverse tipologie di latte contenente microparticolato sulla resa e sulla composizione dei prodotti.

I diversi rapporti proteina/grasso testati influenzano il tempo di coagulazione del latte, la resa della cagliata e della caciotta, che risultano migliori all'aumentare della quantità di grasso nel latte di partenza.

Le diverse percentuali di microparticolato (3 e 4%) aggiunte al latte di partenza hanno influenza sulla resa della cagliata, che aumenta sensibilmente in corrispondenza della percentuale di microparticolato maggiore, contrariamente alla resa della caciotta che rimane pressoché invariata. L'utilizzo della percentuale di microparticolato più elevata porta ad un aumento significativo della percentuale di proteine presenti nel formaggio.

L'aggiunta di diverse percentuali di microparticolato e l'utilizzo di latte con diversi rapporti proteina/grasso non ha portato a variazioni significative nella concentrazione di molecole benefiche ad azione antiossidante come la cisteina, la γ -glutamilmcisteina, la cisteinilglicina e il glutatione. Si è osservato inoltre che la caseificazione porta alla perdita di tali molecole, che in gran parte vengono ritrovate nel siero. Ne deriva che le proprietà benefiche di un latte ricco in tioli si preservano meglio se il prodotto è destinato al consumo come latte alimentare piuttosto che alla trasformazione casearia.

Altri studi devono essere eseguiti per confermare che i tioli vengono persi nel siero in seguito a caseificazione; in particolare dovranno essere sviluppati ulteriori metodi per la quantificazione dei tioli che potrebbero essere legati alle siero proteine a causa delle reazioni di glutationilazione che occorrono nel processo di microparticolazione.

5. BIBLIOGRAFIA

- Auldist M., Johnston K.A., White N.J. and Fitzsimons W.P. 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.
- Bittante G., Penasa M., and Cecchinato A. 2012. Invited review: Genetics and modeling of milk coagulation properties. *J. Dairy Sci.* 95:6843–6870.
- Bounous G. 2000. Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. *Anticancer Research.* 20:4785-4792.
- Burke D.G., Chilibeck P.D., Davidson K.S., Candow D.G., Farthing J. and Smith-Palmer T. 2001. The effect of whey protein supplementation with and without creatine monohydrate combined with resistance training on lean tissue mass and muscle strength. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* 11:349-364.
- 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 and quality traits in Italian Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 91:371–376.
- Cecchinato A., Penasa M., De Marchi M., Gallo L., Bittante G., and Carnier P. 2011. Genetic parameters of coagulation properties, milk yield, quality, and acidity estimated using coagulating and noncoagulating milk information in Brown Swiss and Holstein-Friesian cows. *J. Dairy Sci.* 94:4205–4213.
- Cecchinato A., Penasa M., Cipolat C., De Marchi M. and Bittante G. 2012. Short communication: factors affecting coagulation properties of Mediterranean buffalo milk. *J. Dairy Sci.* 95 :1709–1713.
- Clément M., Tremblay J., Lange M., Thibodeau J. and Behumeur P. 2007. Purification and identification of bovine cheese whey fatty acids exhibiting in vitro antifungal activity. *J. Dairy Sci.* 91: 2535-2544.
- Corradini C. 1995. *Chimica e tecnologia del latte*. Milano: Tecniche Nuove.
- De Marchi M., Bittante G., Dal Zotto R., Dalvit C. and Cassandro M. 2008. Effect of Holstein Friesian and Brown Swiss breeds on the quality of milk and cheese. *J. Dairy Sci.* 91:4092-4102.
- 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.

- De Wit J.N. 2001. Lecturer's handbook on whey and whey products. Brussels, Belgium: European Whey Products Association.
- Donnelly W.J. and Mehra R.K. 1993. Fractionation of whey protein components through a large pore size, hydrophilic, cellulosic membrane. *J. Dairy Res.* 60: 89-97.
- Drake M.A., Bolyston T.D. and Swanson B.G. 1996. Fat mimetics in low-fat Cheddar cheese. *J. Food Sci.* 61:1267–1270.
- Droge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82:47-95.
- Fagan C.C., Castillo M., O'Donnell C.P., O'Callaghan D.J., Payne F.A. 2008. On-line prediction of cheese making indices using backscatter of near infrared light. *Int. Dairy J.* 18:120-128.
- Fagan C.C., Castillo M., Payne F.A., O'Donnell C.P., Leedy M., and O'Callaghan D.J. 2007. Novel online sensor technology for continuous monitoring of milk coagulation and whey separation in cheesemaking. *J. Agric. Food Chem.* 55:8836-8844.
- Fang Y.Z., Yang S. and Wu G. 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18: 872–879.
- Fenelon M. and Guinee T. 1999. The Effect of Milk Fat on Cheddar Cheese Yield and Its Prediction, Using Modifications of the Van Slyke Cheese Yield Formula. *J. Dairy Sci.* 82:2287–2299
- Gilles J. and Lawrence R. 1985. The yield of cheese. *Journal of Dairy Science and Technology.* 20:205-214.
- Gonzalez Siso M.I. 1996. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Techn.* 57:1-11.
- Griffith O.W. 1999. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic. Biol. Med.* 27: 922–935.
- Guinee T., Auty M. and Fenelon M. 2000. The effect of fat content on the rheology, microstructure and heat-induced functional characteristics of Cheddar cheese. *International Dairy Journal* 10:277-288.
- Hakkak R., Korourian S., Shelnutt S.R., Lensing S., Ronis M.J.J. and Badger T.M. 2000. Diets containing whey proteins or soy protein isolate protect against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in female rats. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 9:113-117.

- Hallen E. 2008. Coagulation properties of milk. Department of Food Science, Faculty of Natural Resource and Agricultural Science, Swedish University, Uppsala.
- Hinrichs J. 2001. Incorporation of whey proteins in cheese. *International Dairy Journal* 11:495–503.
- Ikonen T., Ruottinen O. 1999. 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.
- Ikonen T. 2000. Possibilities of genetic improvement of milk coagulation properties of dairy cows. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Forestry, University of Helsinki, Finland.
- Ikonen T., Morri S., Tyriseva A., Ruottinen O., and Ojala M. 2004. Genetic and Phenotypic Correlations Between Milk Coagulation Properties, Milk Production Traits, Somatic Cell Count, Casein Content, and pH of Milk. *J. Dairy Sci.* 87:458–467.
- Innocente N., Comparin D. and Corradini C. 2001. Proteose-peptone whey fraction as emulsifier in ice-cream preparation. *International Dairy Journal* 12:69–74.
- Jayaprakasha H.M. and Brueckner H. 1999. Whey protein concentrate: A potential Functional Ingredient for Food Industry. *J. Food Sci. Technol.* 36(3)189-204.
- Jelen, P. 2003. Whey processing: utilization and products. *Encyclopedia of dairy sciences*. Edited by H. Roginski, J.W. Fuquay, and P. F. Fox. 2739-2745. New York: Accademy Press.
- Jooyandeh H. 2009. Effect of fermented whey protein concentrate on texture of Iranian white cheese. *J. Texture Studies* 40:497-510.
- Kavas G., Oysun G., Kinik O. and Uysal H. 2004. Effect of same fat replacer on chemical, physical and sensory attributes of low-fat white pickled cheese. *Food Chemistry*. 88(3):381-388.
- Ko Y.T. and Chipley J.R. 1983. Microbial Production of Lysine and Threonine from whey permeate. *Applied and environmental microbiology*. 45(2): 610-615.
- Koca N. and Metin M. 2004. Textural, melting and sensory properties of low-fat fresh kashar cheeses produced by using fat replacers. *Int. Dairy J.* 14:365-373.
- Kosikowski F.V. 1979. Whey utilization and whey products. *J. Dairy Sci.* 62:1149-1160.
- Lanciotti R., Vannini L., Patrignani F., Iucci L., Vallicelli M., Ndagijimana M and Guerzoni M. 2006. Effect of high pressure homogenisation of milk on cheese

- yield and microbiology, lipolysis and proteolysis during ripening of Caciotta cheese. *Journal of Dairy Research* 73:216–226.
- Laursen I., Briand P. and Lykkesfeldt A.E. 1990. Serum albumin as a modulator on growth of the human breast cancer cell line MCF-7. *Anticancer Res.* 10:343-351.
- Laugesen M. and Elliott R. 2003. Ischaemic heart disease, type 1 diabetes, and cow milk A1 β -casein. *The New Zealand Medical Journal.* Vol. 116 No 1168.
- Lobato-Calleros C., Robles-Martinez J.C., Caballero-Perez J.F. and Aguirre-Mandujano E. 2001. Fat replacers in low-fat Mexican Manchego cheese. *J. Texture Studies.* 32:1-14.
- Mangino M. E. 1984. Physicochemical aspects of whey protein functionality. *J. Dairy Sci.* 67:2711–2722.
- Markus C.R., Oliver B. and de Haan E.H. 2002. Whey protein rich in alpha-lactalbumin increases the ratio of plasma tryptophan to the sum of the other large neutral amino acids and improves cognitive performance in stress-vulnerable subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 75:1051-1056.
- Marshall R. 1998. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *J. Dairy Sci.* 81:597-608.
- Marshall R. 2004. Therapeutic applications of whey protein. *Alternative Medicinen Review.* 9 (2):136-156.
- Marwaha S.S. and Kemmedy J.F. 1988. Review: Whey-pollution problem and potential utilization. *Int. J. Food Sci. Technol.* 23:323-336.
- Masi A., Ghisi R. and Ferretti M. (2002). Measuring low-molecular-weight thiols by detecting the fluorescence of their SBD derivatives: application to studies of diurnal and UV-B induced changes in *Zea mays* L. *Journal of Plant Physiology.* 159:499-507.
- Mateo M.J., O'Collaghan D.J., Everard C.D., Fagan C.C., Castillo M., Payne F.A. and O'Donnell C.P. 2009. Influence of curd cutting programme and stirring speed on the prediction of syneresis indices in cheese-making using NIR light backscatter. *LWT-Food Sci. and Tech.* 42:950–955.
- Mc Mahon D., Alleyne C., Fife R., and Obergt C. 1996. Use of fat replacers in low fat mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.* 79:1911-1921.
- Micke P., Beeh K.M. and Buhl R. 2002. Effects of longterm supplementation with whey proteins on plasma glutathione levels of HIV-infected patients. *Eur. J. Nutr.* 41:12-18.

- Mollè D., Jean K. and Guyomarc'h F. 2006. Chymosin sensitivity of heat-induced serum protein aggregated isolated from skim milk. *Int. Dairy J.* 16:1435-1441.
- Morr C.V. 1989. Whey proteins: Manufacture. *Developments Dairy Chemistry-4: Functional Milk Proteins*, edited by P.F. Fox:245-284, New York: Elsevier Applied Science.
- Nicolai T. 2007. Structure of self-assembled proteins. In E. Dickinson, & M. E. Leser (Eds.), *Food colloids, self-assembly and material science*, 35-56. Cambridge: RSC Publishing.
- Nicolai T. and Durand D. 2007. Protein aggregation and gel formation studied with scattering methods and computer simulations. *Current Opinion in Colloid & Interface Science.* 12:23-28.
- Ostensen S., Foldager J. and Hermansen J.E. 1997. Effects of stage of lactation, milk protein genotype and body condition at calving on protein composition and renneting properties of bovine milk. *J. Dairy Res.* 64:207-219.
- Paquet D., Nejjar Y. and Linden G. 1988. Study of hydrophobic protein fraction isolated from milk proteose-peptone. *J. Dairy Sci.* 71:1464-1471.
- Parodi P. 1998. A role for milk proteins in cancer prevention. *Australian journal of dairy technology.* 53:37-47.
- Payne F.A., Hincks C.L., Madangopal S. and Shearer S.A. 1993. Fiber optic sensor for predicting the cutting time of coagulating milk for cheese production. *Trans. ASAE* 36 (3):841-847.
- Prazeres A.R., Carvalho F. and Rivas J. 2012. Cheese whey management: A review. *J. Environmental Management.* 110:48-68.
- Pretto D., Kaart T., Vallas M., Joudou I., Henno M., Ancilotto L., Cassandro M. and Parna E. 2011. Relationships between milk coagulation property traits analyzed with different methodologies. *J. Dairy Sci.* 94:4336-4346.
- Punidades P., Feirtag J. and Tung M.A. 1999. Incorporating whey protein into mozzarella cheese. *Int. J. Dairy Tech.* 52:51-55.
- Robbins S.L., Cotran R.S. 2008. *Le basi patologiche delle malattie.* Milano: Elsevier Masson.
- Romeih E.A., Michaelidou A., Biliaderis C.G. and Zerfiridis G.K. 2002. Low-fat white-brined cheese made from bovine milk and two commercial fat mimetics: chemical, physical and sensory attributes. *Int. Dairy J.* 12:525-540.

- Rudan M., Barbano D., and Kindstedt P. 1998. Effect of Fat Replacer (Salatrima) on Chemical Composition, Proteolysis, Functionality, Appearance, and Yield of Reduced Fat Mozzarella Cheese. *J Dairy Sci* 81:2077–2088.
- Salvadori del Prato O. 1998. Trattato di tecnologia casearia. Bologna: Edagricole – Edizioni Agricole della Calderini s.r.l.
- Secchieri P.L. 2008. Aspetti del valore nutrizionale e nutraceutico degli alimenti di origine animale. *Ital. J. Agron.* 3 (1):73-101.
- Sienkiewicz T. and Riedel C.L. 1990. Whey and whey utilization. Th. Mann, Germany.
- Siliprandi N. and Tettamanti G. 2008. Biochimica medica. Pdova: Piccin.
- Smithers G.W. 2008. Whey and whey proteins- from ‘gutter-to-gold’. *Int. Dairy J.* 18:695-704.
- Thomson N., Kay J. and Bryant M. 2001. Effect of stage of lactation on the efficiency of Jersey and Friesian cows at converting pasture to milk production. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production.* 61:213–216.
- Tyrisevä A.-M., Vahlsten T., Ruottinen O., and Ojal M. 2004. Non-coagulation of milk in Finnish Ayrshire and Holstein-Friesian cows and effect of herds on milk coagulation ability. *J. Dairy Sci.* 87:3958-3966.
- Van den Berg G., Escher J.T.M., de Koning P.J. and Bovenhuis H. 1992. Genetic polymorphism of k-casein and β -lactoglobulin in relation to milk composition and processing properties. *Neth. Milk Dairy J.* 46:145-168.
- Webb B. and Johnson A. 1965. *Foundamentals of dairy chemistry.* Westport, CT: AVI Publishing.
- Wu G., Fang Y.Z., Yang S., Lupton J.R. and Turner N.D. 2003. Glutathione metabolism and its implications for health. *The journal of nutrition.*
- Yoo Y.C., Watanabe S., Watanabe R., Hata K., Shimzaki K. and Azuma I. 1998. Bovine lactoferrin and lactoferrin inhibit tumor metastasis in mice. *Adv. Exp. Med. Biol.* 443:285-291.
- Yves V. 1979. Le lactoserum. Matiere premiere noble pour les industries alimentaires humaines et animales. *Revue Laitiere Franaise,* 372:27-39.
- Zalazar C.A., Zalazar C.S., Bernal S., Bertola N., Bevilacqua A. and Zaritzky N. 2002. Effect of moisture level and fat replacer on physicochemical rheological and sensory properties of low fat soft cheeses. *Int. Dairy J.* 12:45-50.