



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI
RISORSE NATURALI E AMBIENTE

Corso di laurea magistrale in Scienze e Tecnologie Animali

STUDIO DEGLI EFFETTI RELATIVI AL SISTEMA DI
ALLEVAMENTO, RAZZA E CARATTERISTICHE INDIVIDUALI
DEGLI ANIMALI SULLA COMPOSIZIONE PROTEICA DEL
LATTE IN BOVINE ALLEVATE IN ALLEVAMENTI MISTI

Relatore:

Prof. Alessio Cecchinato

Correlatore:

Dott.ssa Tania Bobbo

Laureanda:

Chiara Pulin

Matricola n. 1071685

ANNO ACCADEMICO 2014/2015

Alcune strade portano più ad un destino
che ad una destinazione.

Jules Verne

INDICE

Riassunto	1
Abstract	3
1. Introduzione	5
1.1 Il mercato lattiero-caseario	5
1.2 Il latte	7
1.2.1 La proteina del latte	8
1.3 Fonti di variazione delle proteine del latte	12
1.3.1 Fattori ambientali	12
1.3.2 Fattori individuali	15
1.4 Determinazione analitica della frazione proteica	20
1.4.1 Elettroforesi	20
1.4.2 Spettroscopia nel medio infrarosso	22
1.4.3 Cromatografia	22
1.5 Metodi di rivelazione dei peptidi	26
2 Obiettivi	29
3 Materiali e metodi.....	31
3.1 Raccolta dati	31
3.2 Analisi dei campioni	32
3.2.1 Analisi della composizione chimica del latte	32
3.2.2 Analisi del profilo proteico tramite RP-HPLC	32
3.3 Analisi statistica	34
4 Risultati e discussione.....	37
4.1 Statistiche descrittive	37
4.2 Fonti di variazione della composizione proteica.....	38
5 Conclusioni.....	45
Appendice di figure e tabelle	47
Bibliografia.....	53
Ringraziamenti	

Riassunto

Il profilo proteico riveste un ruolo chiave nella valutazione qualitativa del latte, poiché la frazione solubile ha un elevato valore biologico e le caseine ne condizionano le proprietà tecnologiche. Studiare i fattori che vi influiscono è fondamentale per comprendere come modularlo. L'obiettivo di questo lavoro è di colmare le attuali lacune bibliografiche sull'argomento, adottando un particolare disegno sperimentale, nel quale il campione di riferimento è composto da sei razze (tre specializzate nella produzione di latte e tre a duplice attitudine) e gli allevamenti da cui provengono i capi sono di tipologia mista. Attraverso questo studio viene valutata l'incidenza che esercitano fattori individuali (razza, stadio di lattazione e ordine di parto) ed ambientali (sistema di allevamento) sulla produzione di latte e sulla sua composizione proteica. Il dataset di 1527 campioni è stato costituito prelevando il latte da 41 allevamenti dislocati nelle province di Trento e Bolzano, che sono stati divisi in due classi in base al livello produttivo. L'analisi condotta tramite RP-HPLC permette di quantificare le proteine (caseine, sieroproteine e rispettive frazioni) e attraverso l'analisi della varianza viene valutato l'effetto di tutte le fonti di variazione sui caratteri oggetto di studio. La razza ha un'incidenza altamente significativa su tutti i caratteri considerati ($P < 0,001$), così come l'ordine di parto, che però influenza debolmente la β -lattoglobulina e la sieroproteina totale ($P < 0,05$). Lo stadio di lattazione non mostra effetto significativo sull'indice caseinico e sull' α -lattoalbumina; mentre il livello produttivo incide significativamente su tutti i caratteri ad eccezione della β - e dell' α_2 -caseina. La razza Jersey risulta produrre la minore quantità di latte (16,4 kg/d), con la maggiore concentrazione proteica, significativamente superiore a quella media tra Bruna Frisona; mentre quest'ultima registra la produzione più elevata (25,9 kg/d) ma il profilo proteico più povero e significativamente inferiore a quello della Bruna. Dai contrasti tra le razze emerge anche che la produzione giornaliera di latte e l'indice caseinico delle bovine specializzate, non si discostano significativamente da quelli delle razze a duplice attitudine. La Pezzata Rossa non mostra differenze significative di proteina e caseina totali rispetto i valori derivati dall'associazione dei dati di Grigia Alpina e Rendena, ma ciascuna frazione proteica è significativamente diversa da quelle delle due razze (ad eccezione della β -CN). Con l'avanzare dello stadio di lattazione, la produzione giornaliera tende a calare mentre le componenti proteiche a concentrarsi. Viceversa con l'ordine di parto: la produzione quantitativa aumenta a scapito della ricchezza proteica del latte. Il più alto livello produttivo mostra di stimolare maggiormente la produzione giornaliera di latte e la sintesi proteica, seppure non incida sulla β - e sull' α_2 -caseina. Infine, l'allevamento e la data di campionamento influenzano prevalentemente la produzione di latte, la β -caseina e l' α -lattoalbumina (l'incidenza è espressa attraverso il valore HTD ed è rispettivamente pari a 29,4%, 20,0% e 19,7%).

Abstract

Protein profile affects nutritional and technological milk properties, making the knowledge of the factors that influence it useful to control it. The aim of this thesis is to fill the current bibliographic gap, adopting an innovative experimental scheme: reference sample involves six breeds (three specialized and three dual-purpose) and the herds are multi-breeds. So, it is assessed the incidence exerted by individual factors (breed, days in milk and parity) and environmental factors (farming system) on milk yield and on milk protein composition. The dataset is composed by 1527 samples that belong to 41 herds, located in Trento and Bolzano provinces, which are divided in two classes based on their energy production. The outputs of the RP-HPLC analysis allow to quantify the principal proteins (casein, whey proteins and each fractions) and the analysis of variance is performed to estimate the effect of each source of variation on the characters variability. The breed has the highest effect on all traits considered ($P < 0,001$), as well as the parity, even if it weakly influences β -lactoglobulin and total whey protein ($P < 0,05$). Stage of lactation shows no significant effect on the casein index and on α -lactalbumin; while the energy production level significantly affects all the characters except β - and α_{s2} -casein. Jersey results the less productive breed (16,4 kg/d), with the highest protein content, which is significantly higher than the average data between Brown Swiss and Friesian. Friesian produces the highest milk quantity (25,9 kg/d) with the worst protein concentration, which is significantly lower than those of the Brown Swiss. Orthogonal contrasts for the breed effect show that the milk daily production and the casein index of the specialized cows are not significantly different from those of the dual-purpose breeds. Total protein and casein values of Simmental cows are not significantly different from those derived from the association of Grey Alpine and Rendena data, even if the composition of each protein fraction is significantly different from those of the two breeds (with the exception of β -casein). The results demonstrate that, while the stage of lactation goes on, daily milk production tends to decline and the protein content increases. Conversely, with the parity, milk production rises at the expense of the protein concentration. Furthermore, the highest level of production stimulate the daily milk production and the protein synthesis, although it not affects β - and α_{s2} -casein. Finally, the *herd test day* effect seems to allow mainly to control milk production and β -casein and α -lactalbumin concentrations (the incidence is expressed with the HTD value: respectively 29,4%, 20,0% and 19,7%).

1. Introduzione

1.1 Il mercato lattiero-caseario

Il mercato mondiale

A partire dalla seconda metà del 2013, la produzione mondiale di latte e derivati è cresciuta nei principali paesi esportatori (Nuova Zelanda, USA, UE), favorita dal miglioramento delle condizioni climatiche e dai prezzi alla stalla più stimolanti (Ismea, 2014). Il mercato mondiale dei prodotti lattiero caseari è mantenuto vivace dalla domanda asiatica: dopo la battuta d'arresto del III trimestre, grazie all'import cinese che ha registrato un +28% nei primi nove mesi del 2013, i prezzi del latte in polvere e del burro hanno ripreso a crescere in chiusura d'anno. In questa fase di crescita della domanda, la Cina ha importato oltre 540 mila tonnellate di latte in polvere e, per problemi legati alla salubrità del prodotto della Nuova Zelanda, i buyers hanno iniziato a diversificare gli approvvigionamenti, interessandosi all'UE e agli Stati Uniti. Questi ultimi, emergendo soprattutto grazie alla minor competizione degli esportatori tradizionali, hanno assunto il ruolo di primo fornitore mondiale di latte scremato in polvere, con una crescita delle esportazioni del 18%. In Nuova Zelanda è stato realizzato il 6% in più nei soli primi sei mesi della campagna 2013-2014; l'Unione Europea ha confermato la propria leadership nel mercato mondiale dei formaggi, mentre la Russia ha acquisito il ruolo di polo emergente nello sviluppo degli scambi internazionali delle produzioni comunitarie. In Argentina, invece, la produzione è rimasta depressa e in Australia ha stentato a decollare a causa di una stagione siccitosa che ha limitato le disponibilità idriche e foraggiere.

Il mercato europeo

A livello comunitario, tra gennaio e novembre 2013, le consegne di latte hanno registrato un timido +0,4% rispetto al medesimo periodo dell'anno precedente, con andamenti contrastanti fra i Paesi: Germania +1,9%, Francia -0,5%, Regno Unito -0,1%, Paesi Bassi +4,5%, Polonia +0,3%, Italia -1,9%, Irlanda +2,8%, Danimarca +1,9% e Belgio +1,6% (Ismea, 2014). Dalla seconda metà del 2013, il settore lattiero caseario ha subito un'evoluzione positiva, grazie alla spinta data dalla crescita della domanda internazionale sulle produzioni e sui prezzi di mercato. L'incremento delle esportazioni dei prodotti caseari è dovuto prevalentemente allo sviluppo dei flussi verso la Russia (+6,7%), gli Stati Uniti (+6,1%) e i nuovi mercati, come i paesi del Medio Oriente, l'Australia e l'Ucraina. A dicembre, il prezzo medio del latte alla stalla ha raggiunto il livello record di 40,4 €/100 kg (+18% rispetto allo stesso periodo del 2012), i prezzi delle commodity casearie (polveri e burro) hanno superato quelli dell'anno precedente anche del 30%

e i formaggi hanno registrato incrementi dei listini tra l'8% e il 12%. Anche il patrimonio di vacche da latte è significativamente aumentato (nei 15 Stati della "Vecchia Europa"), facendo prevedere che, dalla spinta data a luglio 2013 dai paesi del Nord, l'incremento della produzione continuerà nel 2014 e nel 2015. L'aspettativa è che la forte richiesta del mercato mondiale di latte scremato in polvere ne farà ripartire la produzione, con una crescita stimata del 7% nel 2014 e di oltre l'8% nel 2015 e si prevede un trend positivo anche per il burro (+1,6% nel 2014 e +1,8% nel 2015). La produzione di formaggi sembra essere invece frenata proprio dalla maggiore convenienza a valorizzare la materia prima in polvere e il grasso ma, nonostante ciò, la Direzione Generale Agricoltura della Commissione Europea, ne stima un aumento nel 2014 e nel 2015, rispettivamente dell'1,2% e dell'1,7%, trainato sia dalle esportazioni che dalla domanda domestica.

Il mercato nazionale

In Italia il tasso di autoapprovvigionamento di latte è del 69,90%. Questo valore è stato calcolato attraverso il rapporto $C/(C+I-E)$, dove le consegne di latte (bovino, bufalino, ovino, caprino; C) sono di 11.306.824, le importazioni in equivalente latte (I) di 8.647.777 e le esportazioni in equivalente latte (E) di 3.778.710 (CLAL, 2014). Per quanto riguarda il mercato del latte vaccino, il settore lattiero caseario italiano, chiude il 2013 con una tendenza complessivamente positiva (+2% rispetto al 2012), in linea con la zootecnia (+1,5%) e con l'intero settore agricolo (+4,8%) (Ismea, 2014). La crescita, iniziata nel IV trimestre dell'anno, è stata trainata in particolare dall'export di formaggi, che ha registrato un aumento dell'8,0% in volume e del 6,4% in valore, soprattutto grazie alla ripresa delle quotazioni delle produzioni DOP (Grana Padano e Parmigiano Reggiano +5,2% e Gorgonzola +4,7% nelle quantità esportate). La crescita delle esportazioni non è comunque stata sufficiente a far superare la produzione dell'annata precedente. Nello specifico, in base ai dati diffusi dai Consorzi di Tutela, il Grana Padano ha registrato un +3,8%, 3,3% in meno dello scorso anno, il Parmigiano Reggiano ha subito un rallentamento produttivo dello 0,8%, mentre l'Asiago ha mostrato un calo del 6,6% rispetto al 2012. La ripresa del mercato nazionale è dovuta anche alla forte spinta al rialzo del burro, alla risalita dei prezzi del latte alla stalla (+5,1% rispetto al 2012) e al contemporaneo calo dei prezzi dei fattori di produzione degli allevamenti (-8,5%), che hanno favorito l'incremento del reddito degli allevatori. L'aumento del consumo interno di formaggio (+0,8% in volume) e di yogurt tradizionale (+1,1%), ha indotto una crescita dell'importazione di formaggi e latticini del 2,7%, trainata dai freschi (+4,3%), che rappresentano quasi il 40% dei formaggi di importazione. Per contro, il calo degli acquisti domestici di latte, sia fresco che a lunga conservazione (entrambi -4,2% nei primi undici mesi del 2013), ha portato le

importazioni e la produzione interna di latte sfuso a chiudere l'anno con segno negativo: la contrazione degli acquisti nazionali ha riguardato tutti i principali fornitori ad eccezione della Germania, verso la quale la flessione è stata minima, mentre la produzione ha subito un calo dell'1,9%. Inoltre, tra aprile e novembre, le consegne ai caseifici si sono attestate a poco più di 7 milioni di tonnellate (con una contrazione dell'1,7% rispetto allo stesso periodo della precedente campagna) in conseguenza dell'atteggiamento prudente tenuto dagli allevatori nel primo semestre, finalizzato soprattutto al contenimento dei costi di gestione.

1.2 Il latte

Il primo secreto della mammella dei mammiferi dopo la nascita del piccolo è il colostro. Il neonato lo deve assumere entro le prime ore di vita per ricavarci le adeguate difese immunitarie, poiché, già dopo 24 ore, la sua composizione si modifica fino a diventare latte, che è il primo vero alimento di ogni mammifero. Questo soddisfa tutte le esigenze nutrizionali del neonato in termini di proteine, lipidi, vitamine, sali minerali e zuccheri. Dal punto di vista commerciale con il termine *latte* si intende il prodotto della mungitura regolare, completa e ininterrotta di animali in buono stato di salute e alimentazione e in corretta lattazione (Corradini, 1995). Quando non è indicata la specie da cui deriva si tratta di latte vaccino. Questo secreto si presenta liquido, uniforme, bianco e torbido. Il suo principale costituente è l'acqua (fase disperdente), che stabilisce con i diversi elementi strutturali rapporti di emulsione, soluzione o sospensione colloidale. La miscela presenta di norma un pH di 6,6-6,7 e un'acidità titolabile di 3,3-3,5°SH. Esaminando al microscopio una singola goccia di latte si distinguono particelle sferiche immerse in un liquido torbido definito plasma. Queste sono globuli di grasso in emulsione e micelle e sub micelle caseiniche in sospensione colloidale. Non si riescono ad individuare, invece, le componenti in soluzione: le proteine del siero, gli zuccheri, i sali minerali, le vitamine e gli enzimi. L'acqua, i minerali e circa il 10% delle proteine vengono trasportati tal quali dal torrente circolatorio alla mammella, dove i restanti costituenti vengono sintetizzati a partire dai loro precursori, assimilati sempre dal sangue. Per esempio, il glucosio viene in parte isomerizzato a galattosio per formare il lattosio (principale zucchero del latte), gli acidi grassi e il glicerolo vengono combinati in trigliceridi e gli aminoacidi associati in proteine. Numerosi fattori individuali (genotipo, stadio di lattazione, ordine di parto...) ed esogeni (tipologia di allevamento, alimentazione, condizioni ambientali...) esercitano un effetto di modulazione più o meno marcato su ciascuno di questi componenti. L'acqua (87-88%) e il lattosio (4,8-5,1%) sono i costituenti più stabili, mentre le sostanze azotate (3,2-3,6%; di cui 2,8-3,3% di proteina) e i grassi (3,6-4,5%) sono quelli più soggetti a variazione.

1.2.1 La proteina del latte

La frazione azotata è costituita per circa il 95% da azoto proteico e per il restante 5% da composti azotati non proteici, solubili e a basso peso molecolare (come l'urea). Le proteine si distinguono in caseine e sieroproteine, ciascuna a sua volta classificata in altre frazioni, che in seguito saranno trattate singolarmente. La concentrazione e la composizione della proteina sono particolarmente importanti perché influenzano la qualità nutrizionale, biologica e tecnologica del latte e la frequenza delle varianti alleliche di ciascuna frazione permette di caratterizzare geneticamente le razze. Inoltre, rientra tra i parametri valutati nel "pagamento qualità" del latte, con il contenuto lipidico, le cellule somatiche e la carica batterica.

Caseine

Rappresentano il 77-78% dell'azoto totale, sono codificate nel cromosoma 6 e influenzano maggiormente le caratteristiche tecnologiche del latte. Fanno parte della famiglia delle fosfoproteine e sono coniugate al fosforo in forma di acido fosforico esterificato, che vi conferisce la capacità di legare minerali come il calcio e il magnesio. La loro conformazione è simile a quella delle proteine denaturate (per la presenza di numerosi residui di prolina e l'assenza di ponti disolfuro) e la mancanza di una struttura terziaria vi dà stabilità termica (non possono essere denaturate al di sotto del punto di ebollizione). Di questa famiglia fanno parte l' α_{S1} -, α_{S2} -, β -, κ -caseina e quelle da esse derivate per proteolisi postsecretoria, come la γ - (dalla β) e la λ -caseina (dalla α_{S1}), che si trovano in percentuale notevolmente inferiore. Le caseine α s e β si organizzano in aggregati molecolari (micelle) piuttosto grandi e insolubili in acqua, che vengono stabilizzati dalla presenza di calcio e fosfati all'interno e della κ -caseina all'esterno. Le micelle precipitano a pH 4,6 (punto isoelettrico delle caseine), a 20°C e in seguito all'aggiunta di caglio. Le caseine α_{S1} -, α_{S2} -, β - e κ - sono di norma presenti in rapporto 4:1:4:1, che variando, influisce sulle dimensioni delle micelle, sulle caratteristiche reologiche del latte e sulla sua reattività al caglio (Malacarne et al., 2001). Infatti, queste incidono prevalentemente sulla fase secondaria di caseificazione (formazione e sineresi del coagulo), con effetti tanto più significativi quanto più è presamica la coagulazione (Mariani e Summer, 1999), ed è stato dimostrato che il contenuto di caseina è correlato positivamente alla resa casearia (Mariani et al., 2002), risultando quindi più basso nel latte che ha difficoltà a coagulare (Jensen et al., 2012b). Questa correlazione è più evidente nei formaggi a lunga stagionatura come il Grana Padano, dove una variazione dello 0,1% dell'indice caseinico (IC= caseina/proteine totali) si traduce in un aumento o perdita di 0,30 Kg di formaggio ogni 100 Kg di latte lavorato (Summer et al., 2002). Anche la base genetica della bovina influisce sul profilo proteico del latte e quindi sulle sue caratteristiche tecnologiche: il locus della κ -caseina è più fortemente

associato ai parametri di coagulazione, mentre quello della β - influenza maggiormente la produzione di latte e il contenuto in proteina, e lo stretto legame tra i due loci indica che gli aplotipi da essi formati sono il set genico più idoneo ad essere utilizzato in un programma di selezione (Comin et al., 2008).

Caseina α_{S1} (α_{S1} -CN): è circa il 35% della caseina totale. È una catena polipeptidica di 199 aminoacidi, che deriva dall'unione di due proteine aventi la stessa sequenza amminoacidica ma diverso numero di gruppi fosforici. La componente maggiore, α_{S1} , ne presenta 8, mentre quella minore, α_{S0} , ne ha uno in aggiunta in posizione 41, che conferisce alla molecola maggiore mobilità elettroforetica (Eigel et al., 1984). È una proteina altamente fosforilata, dotata di due zone idrofobiche separate da una regione polare, e sensibile al calcio a tutte le temperature. Jensen et al. (2012b), hanno dimostrato che la forma fosforilata 8P è presente in quantità significativamente inferiori nel latte che fatica a coagulare o che non coagula. Presenta diversi polimorfismi: A (caratterizzato dalla delezione di 13 aminoacidi), B, C, D, F, G e H di cui le varianti A, D e G sono le più rare mentre la B è la più diffusa.

Caseina α_{S2} (α_{S2} -CN): rappresenta circa il 10% della caseina totale. Ne sono state identificate le varianti A, B, C, e D (Eigel et al., 1984). Quella di riferimento è l' α_{S2} -CN A-11: una singola catena di 207 residui amminoacidici, tra cui due cisteine, con un ponte disolfuro. Data la presenza di 3 cluster di gruppi anionici composti da residui fosfoserilici (responsabili della formazione di ponti fra le submicelle) e glutamili, è la più idrofilica tra le caseine. La natura e il numero di cluster anionici ne determinano anche la capacità di legare il calcio, cui è la più sensibile, al punto che precipita in presenza di basse quantità del suddetto minerale.

β -caseina (β -CN): è il 30-35% della caseina totale. È una fosfoproteina formata da una singola catena polipeptidica di 209 aminoacidi, con 5 gruppi fosfatici legati alla serina. Contiene una quantità molto elevata di prolina uniformemente suddivisa (circa un aminoacido ogni sei) e possiede l'estremità amino-terminale fortemente polare, mentre il resto è apolare. È la caseina meno sensibile al calcio e la più idrofobica. Inoltre, perde sensibilità al calcio a seguito di fosforilazione enzimatica e può impedire la precipitazione della caseina α_{S1} in presenza del minerale, seppure con efficacia minore della κ -caseina. Ne sono state identificate numerose varianti: A e B, le più importanti, E, F, G, H (1 e 2) e di recente è stata scoperta anche la I (Jann et al., 2004; mediante PCR). Per elettroforesi in mezzo alcalino si distingue l'allele A del quale, in mezzo acido, si identificano le tre forme: A₁, A₂ e A₃. La prima ha l'aminoacido istidina in

posizione 67 della catena, mentre la seconda presenta la prolina e influiscono in modo diverso sulla concentrazione delle altre proteine.

κ-caseina (κ-CN): rappresenta circa il 12% della caseina totale. Consta di una componente maggiore priva di carboidrati, e di componenti minori, che sono forme multiglicosilate e/o fosforilate della maggiore. La proteina di riferimento è la componente maggiore della κ-CN A-1P di 169 aminoacidi. La sequenza 20-115 è carica positivamente e si lega ai polisaccaridi, carichi negativamente. L'unicità di questa proteina è data dal fatto che è glicosilata, idrofilica, non calcio sensibile e quindi solubile in presenza di ioni calcio. Essa stabilizza le altre caseine ma, se idrolizzata, perde questa capacità e le fa precipitare. Ciò è alla base del processo di coagulazione che destabilizza le micelle caseiniche: il legame 105-106, tra fenilalanina e metionina, viene attaccato dall'azione idrolitica della chimosina durante la caseificazione e i prodotti che ne derivano sono la para-κ-CN (residui 1-105; frazione N-terminale) e il glicomacropetide (residui 106-169; porzione C-terminale). Il primo taglio è idrofobo e tende a precipitare, l'altro invece è altamente idrofilo, quindi rimane solubile nel siero, poiché privo di aminoacidi aromatici e dotato di gruppi glucidici legati ai residui di serina e treonina mediante legami O-glicosidici. Presenta polimorfismo e ne sono conosciute diverse varianti: A e B, le più comuni e C, E, F, G, H, I; le ultime due scoperte da Prinzenberg et al. (1999).

Υ-caseina (Υ-CN): è circa il 5% della caseina totale. Deriva dalla proteolisi postsecretoria della β-caseina operata dalla plasmina. Con la rottura dei legami peptidici in posizione 28-29, 104-105 o 106-107 si ottengono tre residui (Υ₁, Υ₂ o Υ₃) e polipeptidi (proteoso peptoni), che corrispondono ai frammenti 1-28, 1-105 o 1-107 e 29-105. Corradini (1995) attribuisce all'aumento della sua concentrazione i processi di proteolisi spinta che si instaurano a fine lattazione o in caso di mastite. Secondo gli studi condotti da Heck et al. (2009), confermati da quelli di Bonfatti et al. (2010a), la sua quantità tende a decrescere in presenza dell'allele A₁ della β-CN.

Sieroproteine

Rappresentano il 17-18% della frazione azotata totale. Non sono aggregati proteici poiché vengono sintetizzate in mammella in forma di monomeri e polimeri e rimangono solubili nel siero dopo la precipitazione delle caseine, ad eccezione dei proteoso-peptoni. Infatti, non coagulano per via enzimatica, ma solo mediante riscaldamento. Hanno una composizione aminoacidica favorevole da un punto di vista nutrizionale, grazie all'elevato contenuto di solforati (lisina e triptofano) e presentano un peso molecolare inferiore a quello delle caseine.

Comprendono la β -Lattoglobulina e l' α -Lattoalbumina in rapporto di 3:1, sieralbumina, e solo per il 2% immunoglobuline, lattoferrina, lisozima e frazioni proteoso peptoniche.

β -Lattoglobulina (β -LG): rappresenta circa il 65% delle sieroproteine, il 7-12% dell'azoto totale e ha quindi una concentrazione di 2-3 g/l. La forma di riferimento è la β -LG B, che consta di 162 aminoacidi. È dotata di caratteri fisico-chimici che influenzano le proprietà del latte e che hanno un significato biologico. Ad esempio, essendo inibitrice della fosfatasi della milza, potrebbe regolare il metabolismo dei fosfati a livello mammario. Se ne conoscono più varianti alleliche: A, la più espressa e B, C, D, H, I, J, W.

α -Lattoalbumina (α -LA): presente nell'ordine di 1,2-1,5 g/l, rappresenta il 25% delle sieroproteine e il 2-5% dell'azoto totale. Le varianti genetiche più diffuse sono la A e la B, quest'ultima sempre predominante sulla prima e forma di riferimento per questa famiglia, ma esiste anche la C. Questa proteina è importante sia da un punto di vista nutrizionale che per l'attività di regolazione della sintesi di lattosio e della secrezione latte che svolge (Stinnakre et al., 1994). Il legame con la secrezione di lattosio risulta evidente per il decremento che entrambi mostrano a fine lattazione (Caffin et al., 1985; Farrell et al., 2004) ed è spiegato fisiologicamente dal fatto che l' α -LA interagisce con l'enzima β -1,4-galattosiltransferasi nell'apparato di Golgi delle cellule dell'epitelio mammario, per formare il complesso enzimatico lattosio-sintasi e promuovere la sintesi del glucide.

Sieroalbumine (BSA) e immunoglobuline (Ig): vengono assorbite direttamente dal sangue. Le prime rappresentano l'8% circa delle sieroproteine totali mentre le Ig sono presenti in minore quantità (circa 0,6 g/l) e sono distinguibili in IgG1, IgG2, IgA e IgM. Queste sono coinvolte nel sistema immunitario, hanno proprietà anti-microbiche e neutralizzano tossine e virus.

Lattoferrina (LF): è stata scoperta da Sorensen e Sorensen nel 1939. La sua concentrazione oscilla tra 1.15-485,63 μ g/ml. Viene sintetizzata direttamente nella ghiandola mammaria ed è una proteina globulare multifunzionale, appartenente alla famiglia delle transferrine. Ha funzione antimicrobica, battericida, fungicida, prebiotica (nel tratto intestinale) e antitumorale. La sua attività si mantiene anche in ambienti acidi e in presenza di enzimi proteolitici, inclusi quelli secreti dai microorganismi, ma nel latte fresco è inattiva. Ogni molecola può legare a sé due ioni ferrici e, in base al grado di saturazione, se ne distinguono tre forme: apolattoferrina (priva di ferro), lattoferrina monoferrica (legata ad un solo ione ferrico) e ololattoferrina (che lega due ioni ferrici). Le sue proprietà antimicrobiche-batteriostatiche sono dovute proprio alla

sua capacità di legare il ferro, sottraendolo al metabolismo delle specie batteriche che dipendono da esso per la moltiplicazione e l'adesione alla mucosa intestinale (come *Escherichia coli*). L'attività battericida è invece ferro-indipendente poiché è in grado di attaccare e lisare la membrana batterica (carica negativamente) sfruttando l'affinità dei corpi estranei verso i propri domini cationici, in combinazione con l'azione del lisozima che scinde i legami β -1-4 glicosidici del peptidoglicano, causando la morte del batterio per citolisi.

1.3 Fonti di variazione delle proteine del latte

La quantità e la qualità del latte prodotto sono soggette all'influenza di numerosi fattori individuali ed ambientali ad effetto sinergico. La molteplicità delle fonti di variazione rende necessaria una profonda conoscenza della fisiologia, della genetica e della capacità di adattamento degli animali alle diverse tipologie di allevamento, per poterne massimizzare le produzioni, sia in termini quantitativi che qualitativi. L'insieme delle caratteristiche dell'allevamento, della modalità di gestione, del tipo di animali presenti e dei fattori climatici, determinano l'entità delle variazioni, rendendole più o meno evidenti. I principali fattori ambientali gestibili dall'allevatore, sono la tipologia di allevamento e l'alimentazione, mentre quelli individuali sono di natura genetica e fisiologica (come lo stadio di lattazione, l'ordine di parto o lo stato di salute della bovina).

1.3.1 Fattori ambientali

Il metabolismo della bovina è influenzato dalle condizioni ambientali e, specialmente nelle razze più produttive, da quelle microclimatiche, come la temperatura, il fotoperiodo, l'umidità e la ventilazione. Diversi studi hanno confrontato le caratteristiche delle produzioni ottenute in diverse condizioni di allevamento, ma difficilmente ne hanno considerato il livello produttivo. Per quanto riguarda il sistema di stabulazione, Varisco et al. (2004) hanno dimostrato che quella libera in stalle all'aperto induce un aumento del 7% della produzione di latte e un miglioramento del profilo proteico rispetto a quella libera in stalle chiuse. Questo perché, di norma, la produzione di latte e la sua concentrazione proteica diminuiscono progressivamente quando la temperatura ambientale supera i venti gradi e l'effetto risulta più marcato in condizioni di umidità elevata. Quindi, con il primo sistema, migliorano le condizioni degli animali, aumenta l'ingestione di sostanza secca e vi è un minore effetto negativo dell'umidità. Mentre, il fotoperiodo sembra influire positivamente sulla produzione primaverile di latte delle vacche che partoriscono in autunno, ma è stato rilevato un rapporto inversamente proporzionale tra le ore di luce e il titolo proteico e caseinico del latte (Bonato et al., 1987 e Casati et al., 1998).

Questa modulazione può essere dovuta all'effetto del fotoperiodo sull'ingestione di sostanza secca, sulla concentrazione ematica di prolattina e sulla proliferazione delle cellule epiteliali della ghiandola mammaria. Il consumo alimentare, con lo stato sanitario della mammella, rappresentano i fattori che più incidono sul contenuto di caseina e sull'indice caseinico. Infatti, la minore ingestione di sostanza secca e fibra, causata da condizioni ambientali sfavorevoli (alte temperature e fotoperiodo limitato), genera squilibri nelle fermentazioni ruminanti, in particolare nelle bovine ad elevata produzione, con conseguente riduzione dell'energia disponibile per la sintesi di caseina in mammella. Mentre le mastiti, cliniche o subcliniche, causano un aumento delle sieroproteine di origine infiammatoria a discapito della componente caseinica e si presentano per l'incremento della flora batterica ambientale indotto dalle alte temperature. È quindi necessario poter controllare i fattori ambientali. Per esempio, dallo studio di Mariani et al. (1998a), emerge che le MCP (*Milk Coagulation Properties* - proprietà di coagulazione del latte) del latte prodotto dai piccoli allevamenti a stabulazione fissa ($16,4 \pm 7,8$ capi), risentono maggiormente dell'effetto *stagione* rispetto a quelle degli allevamenti di medie dimensioni a stabulazione libera o fissa ($76,5 \pm 26,2$ capi), mostrando un peggioramento della reattività al caglio nei mesi estivi. Ciò può essere correlato all'aumento delle cellule somatiche che è più spinto nelle piccole mandrie. Questo accade perché nelle aziende di grandi dimensioni, a parità di condizioni climatiche, si hanno migliori condizioni microambientali, maggior attenzione agli equilibri nutrizionali e bovine in grado di fornire migliori performances produttive (Varisco et al., 2004). Quindi, intervenire su fattori gestionali ed ambientali, concede un discreto margine di controllo sulla proteina del latte e tra essi, l'alimentazione sembra avere l'effetto più importante. Questo, perché la proteina del latte viene sintetizzata per il 90-95% in mammella, a partire da quella fornita con la dieta e questo processo richiede un notevole dispendio di energia di cui l'alimento è la fonte principale. Perciò, per controllare la sintesi proteica a livello ruminale prima e mammario poi, è necessario somministrare razioni alimentari bilanciate in funzione dei fabbisogni della bovina (che variano sensibilmente in relazione al suo stato fisiologico e alle condizioni ambientali) con particolare riguardo al rapporto proteine/carboidrati e al contenuto lipidico. L'alimento apporta sostanze azotate sia in forma "non fermentescibile" (che bypassano il rumine) che "fermentescibile", sfruttate dai batteri ruminanti come substrato di sintesi della proteina microbica. È necessario apportare le forme di azoto in rapporto adeguato ed in particolare razionalizzare l'utilizzo di proteine by-pass e aminoacidi. Quelli limitanti, utilizzati dalla mammella per produrre la caseina, sono la metionina, l'istidina, la lisina, la fenilalanina e il triptofano. Per quanto riguarda l'equilibrio tra l'energia e la proteina fornite con la dieta, è noto che una carenza di fonti proteiche o un eccesso di proteina non degradabile inducono un calo della concentrazione proteica del latte; mentre

incrementare il tenore proteico di razioni energeticamente carenti, genera un effetto positivo sulla proteina del latte, perché si riduce drasticamente la quantità di secreto aumentandone la concentrazione di sostanza secca. Bisogna comunque mantenere l'apporto di proteina alimentare al di sotto del 17%, per limitare il rischio di effetti negativi sulla salute. Invece, aumentare la quota azotata della razione in diete equilibrate e adeguate a soddisfare i fabbisogni della vacca, comporta un incremento dell'azoto non proteico del latte (Coulon et al., 1998). Infatti, Rémond et al. (1985), hanno calcolato che, con un supplemento oltre i fabbisogni di 10 g di proteina grezza per kg di sostanza secca, si ottiene un aumento di urea di 4 mg/100 ml di latte, mentre non si evidenziano cambiamenti significativi nel contenuto proteico. Diversi lavori mirano a definire la relazione tra la composizione della dieta e il profilo proteico del latte, come quello di Beauchemin et al. (1997), che hanno rilevato che somministrare amidi a bassa degradabilità ruminale (come il mais) consente di aumentare la produzione di latte e di concentrarne il contenuto proteico. Amenu et al. (2006) hanno valutato l'effetto di un diverso apporto energetico e proteico della dieta ed è emerso che la razione ad apporto nutritivo superiore ha causato un aumento di proteina e caseina totali e anche di ciascuna frazione caseinica. Questa razione era a base di insilato di mais e di orzo e fieno di medica, mentre quella "più povera" era a base di erba di pascoli tropicali e avena. Questi risultati trovano supporto in numerosi altri studi: Christian et al. (1999a-b) hanno evidenziato che il foraggio di scarsa qualità riduce la concentrazione di caseina e che integrare la razione con concentrato di grano e lupino (che aumenta l'energia della dieta del 26% e l'ingestione di EM del 54%) o con maggiore disponibilità di pascolo, stimola un aumento della caseina totale e della proporzione di α_2 - e β -CN. Mackle et al. (1999a) hanno dimostrato che nelle vacche alimentate al pascolo, con integrazione di granella di mais e insilato d'erba, aumenta la concentrazione di β -CN rispetto all'utilizzo della sola granella di mais. Inoltre, Mackle et al. (1999b) hanno riportato che l'aumento della disponibilità energetica stimola anche la sintesi delle principali sieroproteine. Invece, Coulon et al. (2001), studiando gli effetti di tre diete a tenore energetico crescente (dall'85% al 125% dei fabbisogni), hanno evidenziato variazioni significative della concentrazione di proteina e caseina totali, senza alcun cambiamento delle proporzioni tra le frazioni caseiniche, ad eccezione dell'aumento della κ -CN. Hanno quindi dedotto la correlazione positiva tra il contenuto di κ -CN e la concentrazione proteica del latte, attribuibile ad effetti genetici. Infine, Cowley (2013) produce uno studio nel quale evidenzia le relazioni tra le condizioni ambientali, fisiologiche e alimentari delle bovine (soltanto Frisone) e la concentrazione delle proteine nel latte. Le razioni a diverso livello energetico (ottenute con la variazione della concentrazione di amido, fibra non strutturale e proteina grezza) venivano somministrate per un periodo di tempo prestabilito. È risultato evidente l'effetto della dieta a

basso livello nutritivo che, nel lungo periodo (da 3 a 9 settimane), ha causato una riduzione di proteina vera, caseina, grasso, lattosio e urea sui quali, ad eccezione di quest'ultima, si mantiene un effetto residuo anche tornando all'utilizzo di razioni dal maggior apporto energetico. In conclusione, ha rilevato che i fattori che più influenzano la concentrazione proteica sono l'ingestione alimentare (nonostante il potenziale degli interventi nutrizionali per modulare la composizione di proteina e caseina sia risultato debole) e quelli associati al giorno di campionamento (specialmente la temperatura); che non hanno determinato variazioni delle frazioni caseiniche. Invece, quelli che più incidono sulla caseina totale, sono i componenti della razione (in particolare la fibra non strutturale) e, con una correlazione negativa, i parametri ambientali. Non vi influisce invece, il sistema di allevamento, come neppure sulle sieroproteine, sulle quali sembrano incidere soltanto l'ingestione di proteina grezza e di fibra non strutturale.

1.3.2 Fattori individuali

Ogni razza è caratterizzata da un profilo genetico distintivo e l'espressione fenotipica delle varianti alleliche ha effetti su numerose caratteristiche del latte, prevalentemente tecnologiche. Da cui l'importanza della genotipizzazione delle bovine che producono latte indirizzato alla trasformazione casearia. Gli studi più recenti, si sono occupati prevalentemente delle razze di maggior interesse zootecnico (Frisona e Jersey), spostando l'attenzione della ricerca da quelle autoctone a limitata diffusione. È stata quindi valutata la frequenza delle varianti genetiche delle frazioni di caseina e sieroproteina, allo scopo di correlarle alle proprietà tecnologiche del latte oltre che di caratterizzare geneticamente le razze.

Per quanto riguarda l' α_1 -CN, dallo studio di Bonfatti et al. condotto su Pezzata Rossa (2011), risulta correlata positivamente con l'RCT (*rennet coagulation time*-tempo di coagulazione) e negativamente con l' a_{30} (consistenza del coagulo a 30 minuti dall'aggiunta del caglio). Tra le sue varianti genetiche, la G, che compare in seguito ad una mutazione genetica, riduce la sintesi della proteina stessa e sembra in grado di influenzare notevolmente alcune delle principali caratteristiche del latte, come la composizione del sistema micellare. Davoli et al. (2000), l'hanno individuata in vacche di razza Pezzata Rossa, Bruna, Podolica, Modicana, Sarda e Reggiana. Il latte delle bovine che portano quest'allele, presenta un indice caseinico inferiore, un minor quantitativo di calcio e fosforo e una più bassa acidità titolabile. Inoltre, contiene circa il 6% in meno di proteina vera e di caseina totale ma, sintetizzando meno α_1 -CN (fino al 55% negli omozigoti), genera un aumento delle altre caseine, specialmente della κ -CN (Mariani et al., 1995; studio condotto su vacche di razza Bruna). Ciò influisce positivamente sulle proprietà tecnologiche del latte, limitando il tempo di coagulazione e portando alla formazione di cagliate più consistenti. Da studi condotti sul latte di primipare, Ng-Kwai-Hang et al. (1984) e Aleandri

et al. (1990; su vacche Frisone), hanno dedotto che il genotipo BB è correlato ad una maggiore produzione di latte a più elevato tenore di grasso e proteina e quindi ad una migliore resa casearia. Ng-Kwai-Hang et al. (1986; su un campione di Frisone) hanno ripetuto l'analisi con soggetti di diverso ordine di parto e il genotipo più idoneo alla caseificazione è risultato essere quello BC. Evidenza che trova supporto nei dati riportati da Swaisgood e Brunner (1973), che indicano che la variante C favorisce la produzione di coaguli più tenaci incrementando la forza di aggregazione delle micelle. È, però, una variante molto rara negli esemplari puri di Frisone e nello studio di Huang et al. (2012), è stata identificata soltanto analizzando il genotipo di incroci (Frisone x Jersey) x Frisone, dove la Jersey è stata introdotta per aumentare la variabilità genetica e facilitare la mappatura del genoma. Infatti, non si esprime nel campione di Frisone analizzato da Jensen et al. (2012b), che hanno classificato il latte in base all'attitudine alla coagulazione e dimostrato che, indipendentemente dal tipo di latte considerato, l'unica variante dell' α_1 -CN presente è la B. Jann et al. (2004) riportano una frequenza di quest'allele del 96% nella Frisone, del 90% nella Pezzata Rossa e del 65% nella Jersey.

La caseina α_2 -CN presenta un'elevata suscettibilità all'idrolisi a carico dalla chimosina e dalla plasmina e, a conferma di queste evidenze, Bonfatti et al. (2011) ne indicano una correlazione positiva con il tempo di coagulazione ($r = 0,37$) e negativa con l' a_{30} ($r = -0,13$).

Sempre Bonfatti et al. (2011), hanno rilevato che la β -CN è correlata negativamente con il contenuto di κ -CN ($r = -0,44$), α_1 -CN ($r = -0,68$) e con l'RCT ($r = -0,26$) e positivamente con l' a_{30} ($r = 0,17$) e la caseina totale ($r = 0,39$). Nello specifico, Heck et al. (2009) e Bonfatti et al. (2010a-b), hanno evidenziato che la variante A_1 stimola la sintesi di α_1 - e κ -CN a scapito di α_2 -, γ - e β -CN stessa, in modo più marcato rispetto all' A_2 . Al contrario, l'allele B è associato all'incremento della concentrazione delle caseine, dell'indice caseinico, della β -CN stessa (come la variante I) e della κ -CN, a scapito dell' α_1 - e dell' α_2 -CN (Hallen et al., 2008; Bonfatti et al., 2010a). Se si confronta poi l'aplotipo A_2A con la variante B, quest'ultima riduce l'RCT per effetto genetico diretto e aumenta l' a_{30} per la correlazione positiva che ha con la β -CN (Bonfatti et al., 2010b). A conferma degli studi di Lodes et al. (1996) e di Costanza et al. (2010), che avevano rilevato come le micelle di β -CN B siano più piccole, più reattive e sensibili all'azione della chimosina e tendano a coagulare e rassodarsi più velocemente rispetto quelle di β -CN A. Aleandri et al. (1990), studiando latte di frisone primipare, hanno asserito che la combinazione genetica A_1B è quella che rende il latte più idoneo alla trasformazione casearia, ma Jensen et al. (2012a), nei campioni di latte a buona coagulazione di Frisone e Jersey, hanno identificato soltanto la variante B. Merlin e Di Stasio (1982) hanno individuato l'allele A_1 dalla β -caseina in Burlina e Chianina, con frequenze comprese fra lo 0,4 e lo 0,7 e Russo e Mariani (1978) la variante B con frequenza dello 0,2-0,4 nella Bruna e dello 0,25 in Reggiana e

Rendena. Jann et al. (2004), mediante PCR, hanno rilevato che l'allele I ha frequenza dello 0,14 nella Pezzata Rossa e dello 0,12 nella Frisona. Infine, Jensen et al. (2012b), confrontando Frisona e Jersey, hanno trovato la variante F della β -CN soltanto nel latte che non coagulava di vacche Frisone (nella Jersey il latte ha sempre coagulato).

Tra i polimorfismi della κ -CN, le varianti A e G deprimono l'attitudine alla coagulazione (Ikonen et al., 1999; Caroli et al., 2000). In particolare, dagli studi di Coulon et al. (1998) e di Hallén et al. (2008) risulta che l'allele A, nello specifico i genotipi A_2A_2 e AA, sia associato a un minor contenuto della κ -caseina stessa. Secondo Ng-Kwai-Hang (1986) e Huang et al. (2012) questa variante allelica limita anche la sintesi dell' α -LA. Bonfatti et al., nel 2010(a), evidenziano che gli aplotipi A_1B e A_1A non generano differenze significative nel contenuto di caseina totale, se non in associazione alla β -caseina A_2 o B. Dagli studi di Bobe et al. (1999), Hallen et al. (2008), Bonfatti et al. (2010a) e Zambrano-Burbano et al. (2012), gli aplotipi portatori della variante B risultano associati all'incremento di κ -CN stessa, di α_{S1} - e γ -CN, di caseina totale, dell'indice caseinico, e della β -LG (soltanto secondo Bobe et al., 1999), rendendo il latte più idoneo alla caseificazione. Secondo Ng-Kwai-Hang et al. (1987) ed Heck et al. (2009), quest'allele comporta anche una riduzione dell' α -LA. Bonfatti et al. (2010b) affermano che l'allele B influenza le MCP per la variazione della composizione della caseina dovuta all'espressione dell'allele stesso, piuttosto che per un ruolo diretto della variante proteica nel processo di coagulazione. Nello specifico, ne hanno individuato una correlazione negativa con l'RCT e positiva con l' a_{30} , confermata dallo studio di Jensen et al. (2012b). Infatti, la variante B, rispetto alla A, conduce a tempi di coagulazione e di rassodamento del coagulo inferiori (dal 10 al 40% secondo lo studio del 2005 di Kubarsepp et al.), favorisce una migliore consistenza del coagulo (dal 2 al 150% dai risultati del suddetto studio), lo sviluppo di minori quantità di acido citrico e una maggiore incorporazione di grasso, proteina, calcio e fosforo nel formaggio (Ng-Kwai-Hang, 1998; Ikonen et al., 1999 e Costanza et al., 2010). A conferma di ciò, gli studi di Grosclaude (1988) e Zambrano-Burbano et al. (2012) hanno rilevato che in alcuni tipi di formaggio la resa casearia aumenta dal 4 all'8% tra i due genotipi. Infine, Mariani et al. (1992) e Costanza et al. (2010), hanno dimostrato che le vacche con genotipo eterozigote AB producono latte con caratteristiche intermedie rispetto agli omozigoti. Russo e Mariani (1978), hanno rilevato che nelle razze podoliche italiane (Calabrese, Maremmana, Marchigiana, Romagnola, Chianina e Modicana) la κ -CN B ha frequenza superiore allo 0,7. Nella genotipizzazione della Pinzgauer sono stati riconosciuti l'allele G, tipico di questa razza, e l'H, scoperto da Prinzemberg et al. nel 1999. Mentre Jensen et al. (2012b) hanno individuato la rara variante E nel latte di Frisone e Jersey. Ancora, Mariani et al. (2002), hanno riportato che la

Frisona ha una frequenza dell'allele A del 75% e della variante B del 25%, mentre la Bruna mostra valori più bilanciati, con il 56% di portatrici dell'allele A e il 44% del B.

La β -Lattoglobulina, mostra una lieve influenza sulle caratteristiche tecnologiche del latte pur rimanendo solubile nel siero. Coulon et al. (1998), Auld et al. (2000), Hallén et al. (2008) e Bonfatti et al. (2010a), concordano sul fatto che il genotipo BB, rispetto l'AA, riduce l'espressione della lattoglobulina stessa e stimola la sintesi delle caseine, incrementando l'indice caseinico e il rapporto caseine:sieroproteine, migliorando le proprietà di coagulazione del latte. Ciò è supportato da Bonfatti et al. (2010b), che hanno individuato una correlazione negativa tra il genotipo BB e l'RCT e da Jesen et al. (2012a) che hanno registrato una maggiore frequenza dell'allele B nel latte dalle migliori proprietà di coagulazione. Nello studio di Tsiaras et al. (2005) la variante B è stata associata all'aumento della resa casearia (confermato da Wedholm et al., 2006 e da Bonfatti et al., 2010a) e del contenuto di grasso. Secondo Mariani et al. (1995) e Hallén et al. (2008), la resa in formaggio migliora proprio perché l'allele B stimola la sintesi di caseina per unità di latte prodotto. Invece, la variante A favorisce l'aumento della β -LG stessa, a spese prevalentemente dell' α_{s1} - e della β -CN (Bobe et al., 1999; Heck et al., 2009 e Bonfatti et al., 2010a). Nello studio di Kubarsepp et al. (2005) emerge che il genotipo AA minimizza il tempo di coagulazione, unico parametro su cui risulta influire, e Jensen et al. (2012a) ascrivono l'effetto al genotipo A_2A_2 . Il latte di eterozigoti AB mostra concentrazioni intermedie rispetto a quello delle omozigoti (Hallén et al., 2008) ed è quello rilevato con più frequenza in Frisona e Jersey da Jensen et al. (2012a). Lo stesso autore (2012b), analizzando il genotipo di queste razze, trova la variante C della β -LG soltanto nella Jersey.

Sulla distribuzione delle frequenze genetiche delle frazioni proteiche nel latte di Frisona e Jersey sono stati condotti numerosi studi, alcuni dei quali lavorando su entrambe le razze. Ad esempio, Jensen et al. (2012b) hanno analizzato tramite cromatografia liquida a fase inversa associata a spettrometria di massa-ionizzazione elettrospray (MS-ESI), campioni di latte di Frisona e Jersey che avevano precedentemente distinto in tre classi di coagulazione: good (buona coagulazione), poor (fatica a coagulare) e none (non coagula). Hanno genotipizzato ciascun cluster, per correlare le varianti proteiche del latte alle sue proprietà di coagulazione. In entrambe le razze, il genotipo prevalente degli animali il cui latte aveva problemi di coagulazione era BB- A_2A_2 -AA, per le caseine α_{s1} - β - κ . Invece, la maggior parte dei campioni a buona coagulazione delle vacche Jersey, erano caratterizzati dal genotipo CC- A_2A_2 -BB delle suddette caseine, mentre nella Frisona quello prevalente era BB- A_1A_2 -AB. Heck et al. (2009) hanno condotto uno studio nel quale hanno confrontato le informazioni genetiche di un campione di Frisone analizzato nel 1989 (dati riportati nel 1991 da Bovenhuis e van Arendonk), con quelle di una popolazione loro contemporanea. È risultato che la frequenza dei rari alleli

α_1 -CN C, β -CN A₃ e β -CN B è diminuita, mentre quella della β -LG A è aumentata a spese della β -LG B, come quella della β -CN A₂ a scapito della variante A₁ e la frequenza della κ -CN B a spese dell'allele A. La variante E della κ -CN è stata riscontrata nel 18% degli animali campionati nel 2009, ma non era stata riportata nello studio precedente, mentre Caroli et al. (2000) ne avevano individuato una frequenza del 10%. Inoltre, è stato definito quanto il genotipo di ciascuna proteina spiega la propria variabilità genetica e quella delle altre: quello della β -LG spiega il 90% della sua stessa variabilità e il 2-10% di quella delle altre; il genotipo della β -CN spiega il 54% della propria variabilità e l'1-13% di quella delle altre proteine e infine quello della κ -CN spiega il 29% della sua stessa variabilità e il 2-11% di quella delle altre.

I fattori individuali fisiologici che possono influire sul profilo proteico del latte, sono lo stadio di lattazione e l'ordine di parto. Nel corso della lattazione, le variazioni del quadro ormonale e dei fabbisogni nutritivi del feto e le modificazioni fisiologiche della ghiandola mammaria, modulano il profilo chimico-fisico del latte (Varisco et al., 2004). Barber et al. (2002) evidenziano che l'effetto dello stadio di lattazione sulla composizione proteica del latte, è più forte di quello della stagione di parto poiché influenza anche il numero delle cellule secernenti che dimensionano la capacità della mammella. La curva di lattazione raggiunge il cosiddetto *picco* fra il primo e il terzo mese dal parto, dopo il quale la produzione degrada fino all'asciutta, mentre i costituenti del latte seguono l'andamento opposto. Independentemente dall'entità e dall'andamento delle variazioni delle frazioni caseiniche durante la lattazione, le oscillazioni influiscono notevolmente sulla dimensione delle micelle e sulla conseguente consistenza del coagulo. Per esempio, una variazione dell'1% di κ -CN sulla caseina totale, si traduce in una modificazione del 20% del diametro medio delle micelle (Barry et al., 1980), influenzando le caratteristiche tecnologiche del latte. Vi sono numerosi studi verti a definire anche l'andamento delle singole frazioni proteiche nel corso della produzione, ma presentano risultati discordanti. Ng-Kwai-Hang et al. (1987) e Varisco et al. (2004), rilevano che la concentrazione di α -, β - e κ -CN cala nel primo periodo di lattazione, per poi risalire gradualmente con l'avanzare di questa. Altri autori riportano la non significatività di quest'effetto sulla κ -CN (Kroeker et al., 1985) e sull' α_1 -CN (Varisco et al., 2004) mentre Ostersen et al. (1997) registrano un calo della κ -CN e dell' α -LA. In accordo, gli ultimi tre lavori citati, riportano l'andamento decrescente dell' α_2 -CN. Ancora, Kroeker et al. e Ostersen et al. concordano sull'aumento della β -CN nel corso della lattazione. La variazione del contenuto di caseina, se non è proporzionale all'andamento della proteina, induce cambiamenti anche dell'indice caseinico. Malacarne et al. (2001) riportano che il latte di fine lattazione presenta una quantità di caseina più elevata rispetto a quello dell'inizio (2,81% vs 2,32%), contiene più cellule somatiche ed ha un indice

caseinico più basso. Questo perché, seppure il latte di fine lattazione presenti una quantità di caseina più elevata rispetto all'inizio, l'aumento della caseina (+21,5%) è meno che proporzionale a quello della proteina grezza (+27,7%) soprattutto per le sieroproteine di origine ematica (Mariani, 1985). In disaccordo, Coulon et al. (1998) rilevano che la fase di lattazione influenza il contenuto proteico ma non l'indice caseinico, sul quale agirebbe invece l'ordine di parto. Varisco et al. (2004) riportano che l'indice caseinico cala con il progredire delle lattazioni per il cambiamento delle performance secretorie della mammella, la diversa permeabilità del tessuto mammario, il suo invecchiamento fisiologico, gli esiti dei processi infiammatori, clinici o subclinici, che hanno interessato la ghiandola nelle precedenti lattazioni e quindi per un maggiore afflusso di proteine plasmatiche alla mammella e un aumento della sintesi di plasmina. Secondo Mariani (1985) e Hansen et al. (2006) il progredire del numero di lattazioni comporta una riduzione del contenuto di caseina e sieroproteina, quindi della proteina totale. Ng-Kwai-Hang et al. (1987), hanno studiato l'andamento delle singole frazioni caseiniche e riportato che l' α s-CN tende ad aumentare tra la prima e la terza lattazione, per diminuire fino al quinto parto e riprendere poi con una lieve crescita, che la β -CN invece cala gradualmente e la κ -CN non ha mostrato variazioni significative.

1.4 Determinazione analitica della frazione proteica

Nel tempo si sono sviluppate tecniche analitiche sempre più precise per la rilevazione quantitativa e qualitativa delle frazioni proteiche del latte e delle loro varianti genetiche. Ad oggi si stanno ancora perfezionando e le più utilizzate sono quelle elettroforetiche, all'infrarosso e cromatografiche.

1.4.1 Elettroforesi

Questa tecnica si basa sul principio della mobilità degli ioni in un campo elettrico e può seguire diversi protocolli di applicazione in base alla natura del mezzo nel quale la materia viene analizzata.

Elettroforesi su gel di poliacrilammide (PAGE): è impiegata soprattutto nello studio di proteine di origine alimentare e di miscele di peptidi idrofobici ad elevato peso molecolare, poiché per solubilizzare richiedono l'utilizzo di detergenti che sono incompatibili con le tecniche cromatografiche. La separazione può avvenire in base alla carica e alla massa delle molecole (urea-PAGE), al solo peso molecolare (SDS *sodio dodecil solfato* -PAGE) o al punto isoelettrico (IEF *isoelectric focusing* -PAGE). Ciascuna metodologia presenta una buona

risoluzione e riproducibilità, basso costo e semplicità d'uso. Inoltre, possono essere tra loro integrate nella separazione bidimensionale degli analiti (2D-EF), per migliorare ulteriormente la risoluzione. Gli svantaggi principali sono i lunghi tempi che queste analisi richiedono e la loro scarsa efficacia nella risoluzione di miscele complesse di oligopeptidi. Ng-Kwai-Hang e Kroeker (1984) hanno applicato l'urea-PAGE per separare e quantificare le principali caseine e sieroproteine del latte bovino, mentre Kim e Jimenez-Flores (1994) hanno associato le suddette tecniche in un'analisi 2D riuscendo a caratterizzare e confrontare il latte di diverse specie (bovino, caprino, suino, di ratti e umano). Ancora, Skelte (2009) ha proposto il metodo *microfluidic 'lab-on-a-chip'* SDS per separare e quantificare le principali frazioni proteiche del latte, analizzando dieci campioni in 30 minuti, ma le frazioni minori delle sieroproteine (BSA, LF and IgG) non sono state risolte in maniera tale da permetterne la quantificazione.

Elettroforesi capillare: viene sempre più spesso affiancata alla tecnica cromatografica nella separazione e quantificazione dei peptidi, per l'elevata efficienza, semplicità e velocità di analisi e la ridotta quantità di campione richiesta. Inoltre, avendo una selettività diversa dall'HPLC (*high pressure liquid chromatography* oppure *high performance liquid chromatography*) nella separazione delle molecole, fornisce informazioni ad essa complementari. Le tecniche più utilizzate per l'analisi della proteina del latte e dei suoi derivati sono l'elettroforesi capillare a zona (CZE, la forma più semplice), la cromatografia micellare elettrocinetica (MEKC) e l'isoelectric focusing capillare (CIEF). Nella CZE la separazione degli analiti avviene in base alla loro mobilità elettroforetica (caratteristica che dipende dalle dimensioni molecolari e dalla carica assunta ad un determinato pH) e perciò risulta una valida alternativa all'analisi su gel. Miralles et al. (2001) hanno rilevato che più basso è il pH, migliore è la risoluzione di β -LG e para- κ -CN ma maggiore è il tempo di analisi; mentre una minore concentrazione di urea migliora sia la risoluzione che i tempi di separazione. La MEKC ha la capacità di separare le molecole prive di carica o con carica netta molto simile, non separabili attraverso la comune elettroforesi capillare. Può essere applicata allo studio della maturazione biochimica del formaggio, con analisi dei peptidi in circa 25 minuti (Strickland et al., 1996). Infine, la CIEF consiste nella separazione degli analiti in base al punto isoelettrico, come la corrispondente tecnica su gel (IEF), ma ha tempi di analisi più rapidi. Con questa tecnica Miralles et al. (2006) hanno ottenuto risultati meno accurati che con la CZE, nella determinazione delle caseine in campioni di formaggio.

1.4.2 Spettroscopia nel medio infrarosso

Si basa sull'assorbimento dell'energia emessa dall'analita in forma di un raggio infrarosso a specifiche lunghezze d'onda: da parte dei trigliceridi per il grasso, dei legami peptidici tra gli aminoacidi e dei gruppi idrossilici nelle molecole di lattosio. Caseine e sieroproteine vengono discriminate dallo strumento grazie al differente assorbimento energetico che genera la loro diversa composizione in termini di fosforo e aminoacidi solforati. Questa tecnologia si è diffusa per le analisi sul latte in quanto permette determinazioni multicomponenti su un numero elevato di campioni in un tempo limitato, è affidabile dal punto di vista tecnico e facilmente automatizzabile. Il processo prevede che la quantità di luce non assorbita dal campione contenuto nella celletta, in funzione alle lunghezze d'onda che lo caratterizzano, raggiunge il detector e viene tradotta nella quantità proporzionale dell'analita da caratterizzare. La determinazione delle caseine avviene in modo indiretto moltiplicando il dato della proteina per un coefficiente fisso (es: 0,76). Soltanto con l'ultima generazione di queste attrezzature (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy* - FTIR - medio infrarosso a trasformata di Fourier) si può parlare dell'analisi del titolo di caseine in ogni singolo campione di latte eseguita quotidianamente in numero elevato.

1.4.3 Cromatografia

Esistono diverse tipologie di analisi cromatografica ma tutte si basano sul principio della separazione degli analiti di una miscela, trasportati dalla fase mobile, in funzione della loro affinità con la fase stazionaria. Ciò che differenzia le varie tecniche sono i tipi di fasi utilizzate: la fase stazionaria è tendenzialmente solida, soltanto nella gascromatografia (GC) e nella cromatografia liquida (LC) può essere liquida, se supportata su solido, mentre la fase mobile è allo stato liquido, fatta eccezione per la (GC) dov'è in forma di gas. La GC può essere utilizzata esclusivamente su molecole volatili, quindi, per l'analisi dei peptidi del latte, si fa riferimento ai sistemi di interazione idrofobica o alla cromatografia liquida.

Cromatografia per interazione idrofobica (HIC): per purificare le proteine sfrutta l'interazione tra la loro superficie idrofobica e la fase stazionaria (matrice inerte con gruppi idrofobici alchilici o fenolici). La fase mobile (tampono polare) può lavorare a concentrazione salina decrescente, a concentrazione crescente di detergente o con variazioni di pH. Questo metodo minimizza la manipolazione dei campioni, poiché non richiede la precipitazione o la separazione preliminare delle proteine. In alcuni casi le condizioni di eluizione possono provocare denaturazione e, non essendo predicibile, può applicarsi bene ad alcune proteine ma non ad altre. È stata utilizzata da Bramanti et al. (2001-2002-2003) per separare e quantificare

le principali frazioni caseiniche di latte in polvere, yogurt senza grassi e latte bovino tal quale e per identificare le frazioni denaturate dopo il processo di caseificazione nel latte di specie diverse (vacca, capra, pecora e miscele). Inoltre, hanno verificato che la colonna meno idrofoba, a base di etere, svolge le analisi più rapidamente (meno di 22 minuti) e fornisce risultati più accurati di quella a base di fenil-gel.

Cromatografia liquida: entro questa tecnica, ricorrendo ad elevate pressioni sulla fase mobile, si sono sviluppati sistemi di analisi molto rapidi che prendono l'acronimo di HPLC. Questi sono caratterizzati dall'utilizzo di colonne dal diametro interno variabile (≤ 5 mm se a scopo analitico, ≥ 10 mm per scopi preparativi o semipreparativi), di lunghezza inferiore a 30 cm ed impaccate con fase stazionaria composta da micro particelle uniformi del diametro estremamente ridotto (5-10 μm) (Figura 1). Questo tipo di impaccamento favorisce l'estensione della superficie della fase stazionaria, migliorando la risoluzione e l'accuratezza dei risultati rispetto alle tecniche cromatografiche a basse pressioni. Il campione viene spinto nella colonna dall'eluente (fase mobile), al quale sono applicate pressioni dell'ordine delle centinaia di atmosfere perché non interrompa il flusso. I peptidi, in base alla propria struttura chimica, possiedono una diversa affinità per le due fasi: maggiore è l'affinità verso la fase stazionaria, maggiore è il tempo che la molecola impiegherà ad uscire dalla colonna (tempo di ritenzione). Quindi, interagendo con la fase stazionaria, vengono separati e, in uscita, identificati e quantificati dai rivelatori ottici. Le informazioni raccolte sono trasmesse ad un computer che le esprime graficamente in un cromatogramma, dove ciascuno analita corrisponde ad un picco (Figura 2). I vantaggi di questa tecnica sono la rapidità di analisi, sia quantitativa che qualitativa, l'idoneità ad essere applicata anche a sostanze presenti in basse quantità, la riproducibilità delle condizioni sperimentali e la semplicità d'uso, che ripagano gli elevati costi d'acquisto del macchinario (Figura 3).

L'HPLC a scambio ionico (IE-HPLC) viene utilizzata principalmente in analisi di tipo qualitativo e nella purificazione dei campioni per la separazione di macromolecole. Si basa sul principio dell'attrazione fra particelle di carica opposta. Nelle proteine la carica varia in relazione al loro punto isoelettrico (pI) e al pH della soluzione usata come fase mobile (di norma un tampone acquoso), che ha affinità con le molecole di carica netta opposta. L'eluizione degli analiti è dovuta alla loro differenza di carica netta e si può ottenere variando il pH o aumentando la forza ionica, generalmente incrementando la concentrazione di NaCl nella fase mobile. Di norma il tempo di ritenzione è direttamente proporzionale alla loro carica e, per l'eluizione, è necessaria la sostituzione di alcune specie ioniche a livello della fase stazionaria. Richiede quantità di campione superiori rispetto all'RP-HPLC, ma può effettuare la separazione a pH basico, senza il rischio di denaturare le proteine. Infatti, queste tecniche, vengono usate spesso

in modo complementare, soprattutto nell'analisi di miscele peptidiche complesse. Hollar et al. (1991) hanno separato le maggiori frazioni caseiniche e rilevato le varianti genetiche A₁, A₂ e B della β -CN mediante la tecnica dello scambio cationico in FPLC (*fast protein liquid chromatography*), confermando l'identità dei picchi mediante PAGE acida, con buoni risultati. L'HPLC a fase inversa (*reverse phase RP-HPLC*) si basa sull'utilizzo di una fase stazionaria apolare e di una fase mobile polare, l'inverso della NP-HPLC (*normal phase*). Questa tecnica permette di separare le proteine in base alla loro polarità, attraverso le interazioni idrofobiche che i peptidi instaurano con la fase stazionaria. L'eluizione degli analiti procede dai meno ai più idrofobici ed è garantita dal flusso costante della fase mobile. Il maggiore vantaggio di questa tecnica rispetto all'elettroforesi, è la possibilità di quantificare i singoli analiti ricercati (Bobe et al., 1998; Bordin et al., 2001). Inoltre, è possibile modulare numerosi parametri (la natura, la polarità e il pH della fase mobile tramite gradiente, la temperatura di analisi e la natura della fase stazionaria) per ottenere una più efficace separazione degli analiti e ridurre i tempi di eluizione nella risoluzione di miscele complesse, come i peptidi estratti da matrici alimentari. La fase mobile si compone di norma di due eluenti miscelati in proporzioni che variano nel corso dell'analisi secondo un gradiente prestabilito. Una soluzione è molto polare e costituita principalmente da acqua, l'altra, che permette l'eluizione di peptidi sempre più apolari, è più idrofobica ed è composta da solventi organici come acetonitrile, metanolo, propanolo o isopropanolo. L'acetonitrile è il più utilizzato per l'analisi dei composti del latte, principalmente per il suo modesto assorbimento nella regione di rivelazione UV di 200-220 nm, la sua bassa viscosità e alta volatilità. Per migliorare la ritenzione e la separazione dei peptidi e aumentare la risoluzione cromatografica, possono essere aggiunti acidi forti alla soluzione eluente, perché si legano ai peptidi in coppie ioniche strette, li mantengono in forma ionica definita e i gruppi silanolicci liberi della silice restano protonati, evitando interazioni tra la fase stazionaria e gli analiti. Il più utilizzato è l'acido trifluoroacetico (TFA) allo 0,1%, perché non assorbe all'UV, è un ottimo solvente per i polipeptidi ed è miscibile con la maggior parte dei solventi organici utilizzati per l'eluizione; ma presenta lo svantaggio di provocare scarsa ionizzazione nel caso di rivelazione tramite spettrometria di massa. La fase stazionaria (colonna) viene selezionata in base alle molecole da rilevare, poiché può avere diversa dimensione di pori e particelle. Infatti, a seconda della lunghezza delle catene idrofobiche della fase stazionaria, è possibile separare proteine di diversa grandezza. I peptidi ad elevato peso molecolare (>4000 Da, come le proteine del latte), vengono di norma analizzati con fasi stazionarie aventi particelle di 300 Å di granulometria, in modo che le molecole possano attraversare liberamente i pori ed entrare in contatto con le catene alchiliche. Per i peptidi di piccole dimensioni è preferibile utilizzare pori di dimensioni convenzionali (60-100 Å). La colonna C4, dotata di una corta catena a 4 atomi

di carbonio, è quella più adatta alla separazione di peptidi grandi e idrofobici, la C8 e la C18 (con catena idrofobica rispettivamente di 8 e 18 atomi di carbonio) sono invece raccomandate per la separazione di proteine piccole, idrofiliche o non molto idrofobiche. Con questo metodo, possono essere svolte sia analisi di tipo qualitativo che quantitativo. Le prime consentono di identificare ciascuna molecola confrontando la posizione dei picchi espressi nel cromatogramma ottenuto con il database di riferimento, in modo da individuare l'analita cui corrisponde ciascuno di essi. Mentre, la valutazione quantitativa del peptide, viene eseguita misurando l'area sottesa al corrispondente picco del cromatogramma; più i picchi sono alti e stretti, più sono minimizzate le deformazioni (*tailing* e *frontling*). Numerosi autori hanno applicato questa tecnica per l'analisi del profilo proteico del latte e ad oggi sono state identificate la κ -CN A e B; α_{S1} -CN; α_{S2} -CN; β -CN A₁, A₂, A₃, B, C, F; α -LA; β -LG A e B (Visser et al., 1991 e 1995; Ng-Kwai-Hang e Dong, 1994). Ana et al. (2002) hanno confrontato questo metodo con l'urea-PAGE ed è risultato che l'HPLC-UV è più efficiente nelle analisi quantitative, ma meno sensibile ad eventuali contaminazioni del latte. Lo studio che ha rappresentato una svolta nelle possibilità di analisi con la RP-HPLC è quello di Bobe et al. del 1998, poiché hanno proposto il metodo che per primo ha permesso di separare e quantificare simultaneamente le sei principali frazioni proteiche del latte bovino e le varianti genetiche di κ -CN, β -CN e β -LG. La preparazione della matrice non prevede la filtrazione e il campione di latte di 500 μ l veniva diluito fino alla concentrazione proteica di 1,25 mg/ml. Hanno proposto l'utilizzo di una colonna C18 di 25 cm di lunghezza, con diametro di 4,6 mm, particolato di 5 μ m e pori di 30 nm che al termine di ogni corsa veniva riequilibrata alle condizioni di partenza in 9 minuti. L'analisi, di circa due ore per campione (di cui 52 minuti di corsa), ha generato una risposta quantitativa lineare, precisa, con una buona risoluzione ed efficienza dei picchi e dati paragonabili a quelli di riferimento. Le aree sottese ai picchi, ottenuti con assorbanza di rivelazione di 220 nm, erano proporzionali ai quantitativi noti delle principali proteine, quindi ne hanno ricavato l'ordine di eluizione: κ -CN, α_{S2} -CN, α_{S1} -CN, β -CN, α -LA, e β -LG. Le varianti genetiche si presentavano come picchi multipli di una stessa proteina e sono state caratterizzate mediante confronto con gli standard degli alleli purificati (β -LG A e B) o con IEF (κ -CN A e B, β -CN A₁-A₂ insieme, A₃ e B). Questo stesso metodo è stato ripreso e perfezionato da Bonfatti et al. (2008), dove hanno compiuto l'analisi in meno di 40 minuti servendosi di una colonna C8 con particolato di 3,5 μ m e pori di 30 nm e rivelazione a 214 nm. La relazione tra la concentrazione nota delle proteine e le aree dei picchi si è mantenuta lineare e la ripetibilità e la riproducibilità sono risultate soddisfacenti. Questa tecnica analitica si pone quindi come alternativa all'analisi del DNA per la genotipizzazione degli animali.

1.5 Metodi di rivelazione dei peptidi

La fase finale di rivelazione dei peptidi in uscita è fondamentale poiché permette di acquisire le informazioni con le quali viene generato il cromatogramma. Le tecniche applicate sono classificate in due categorie: quelle che si basano sulla rivelazione diretta delle molecole di natura peptidica e quelle che richiedono una reazione pre- o post-colonna con un opportuno reagente di derivatizzazione, per rendere gli analiti più facilmente rivelabili all'UV o in fluorescenza.

Metodo UV-VIS: è quello più utilizzato in associazione all'analisi HPLC. La lunghezza d'onda impiegata è di norma compresa tra i 210 ed i 220 nm: un compromesso tra il massimo d'assorbimento del legame peptidico (< 210 nm) e la necessità di ridurre l'interferenza dovuta all'assorbimento del solvente e delle sue impurità, che a lunghezze d'onda così basse è generalmente elevata. Quella di 214 nm è la più utilizzata, poiché consente di rivelare concentrazioni comprese tra il nanomolare ed il picomolare. Residui aromatici di fenilalanina, tirosina e triptofano contribuiscono all'assorbimento della molecola, per cui la risposta al rivelatore può non essere proporzionale al numero di legami peptidici. Inoltre, sfruttando i diversi minimi di assorbimento caratteristici di fenilalanina e tirosina è possibile distinguere, entro certi limiti, i peptidi particolarmente ricchi in questi residui. La loro presenza nella sequenza peptidica permette di condurre l'analisi simultaneamente a più lunghezze d'onda, arrivando anche ai 254 nm, per distinguerli da quelli privi di aminoacidi aromatici.

Fluorescenza (FI): questo sistema di rivelazione dei peptidi sfrutta la naturale fluorescenza dei residui di tirosina e triptofano ad essi associati. Quando questi sono eccitati a 220-280 nm, si ottiene la più alta emissione a 320-360 nm, con una rivelazione decisamente più sensibile rispetto all'assorbimento a 254 nm e si può aumentare la sensibilità di rivelazione mediante un'adeguata reazione di derivatizzazione.

Spettrometria di massa (MS): abbinata all'HPLC consente di identificare gli analiti sia in base al loro tempo di ritenzione, che al loro peso molecolare (desumibile dal corrispondente spettro di massa). Questa tecnica pone una serie di limiti alle condizioni cromatografiche, per la necessità di flussi non troppo elevati e l'impossibilità di utilizzare tamponi come fase mobile. Gli interfacciamenti più usati sono il *fast atom bombardment* (FAB), la ionizzazione elettrospray (ESI) e la *matrix-assisted laser desorption ionization* (MALDI). La FAB è una tecnica di ionizzazione soft: viene utilizzata per l'analisi di miscele peptidiche anche molto

complesse, in quanto risale in modo accurato al peso dei singoli peptidi e aumenta la frammentazione in sorgente potendo risalire alla sequenza degli analiti. Il principale difetto è l'evidente calo di sensibilità che mostra all'aumentare del peso molecolare degli analiti (soprattutto >3000 Da). La ESI porta alla formazione di molecole multicarica, rendendo possibile l'osservazione di molecole ad elevato peso molecolare con uno strumento avente un range di massa/carica relativamente piccolo (in genere fino a 2000 m/z). È indicata per l'analisi di peptidi e proteine, poiché tendono a generare pattern multicarica caratteristici e di semplice riconoscimento. Trova largo impiego nell'analisi di matrici di origine casearia (Sforza et al., 2003), nella risoluzione del profilo proteico del latte (Leoni et al., 1995) e di idrolizzati delle proteine del latte (Gagnaire et al., 1996). La MALDI è una tecnica di ionizzazione soft molto utilizzata in proteomica, ad esempio nella caratterizzazione delle proteine dopo la separazione per elettroforesi bidimensionale e la digestione triptica in gel. Miralles et al. (2003) l'hanno applicata prima e dopo la separazione dei peptidi mediante cromatografia liquida, per identificare le varianti genetiche A₂ e B della β -CN. Mollè et al. (2009), l'hanno confrontata con l'ESI ed è risultato che i peptidi più idrofobici e grandi vengono identificati meglio con la ESI, mentre l'analisi MALDI si presta soprattutto alla rilevazione dei peptidi più basici e piccoli.

2. Obiettivi

Gli studi fino ad oggi condotti sull'influenza che hanno diversi fattori ambientali e individuali sulla variabilità del profilo proteico del latte, mostrano risultati contrastanti. I maggiori limiti di questi lavori e la difficoltà di confrontarne i dati, sono dovuti all'adozione di procedure analitiche diverse, all'utilizzo di campioni monorazza e all'inferenza statistica basata su campioni di numerosità ridotta. Quindi, l'obiettivo di questa tesi è di studiare l'incidenza che hanno fattori individuali, quali razza, stadio di lattazione e ordine di parto, ed ambientali, come il livello produttivo dell'allevamento, sulla produzione di latte e sul suo profilo proteico. Ciò è perseguito adottando un particolare disegno sperimentale nel quale le vacche campionate, appartenenti a sei razze diverse (tre specializzate nella produzione di latte e tre a duplice attitudine), provengono da allevamenti di tipo misto. Questo per garantire, da un punto di vista statistico, dei confronti a parità di condizioni di allevamento. Inoltre, sono prese in considerazione razze autoctone sulle quali si hanno ancora scarse informazioni, poiché considerate poco interessanti da un punto di vista produttivo, nonostante sostengano importanti realtà locali del nostro Paese.

3. Materiali e metodi

3.1 Raccolta dati

Questo lavoro di tesi si colloca all'interno del progetto COWPLUS (acronimo di *L'allevamento bovino in montagna: sostenibilità, funzionalità degli animali e qualità delle produzioni*), nel quale il Dipartimento di Scienze Animali dell'Università degli studi di Padova collabora con la provincia autonoma di Trento. I 1527 campioni di latte raccolti tra Marzo e Dicembre 2013, derivano da 41 aziende dislocate a Trento e Bolzano. Ciascuno degli allevamenti accoglie diverse razze bovine, requisito fondamentale perché il latte di razze diverse possa essere confrontato a parità di fattori ambientali, normalmente molto variabili tra gli allevamenti. In questo studio è stato utilizzato un dataset finale editato di 1508 campioni, ottenuto con l'eliminazione delle razze minori e degli incroci la cui numerosità non era sufficiente a supportare l'analisi statistica dei dati. Le razze considerate sono sei: Bruna (BS); Frisona (HF); Grigia Alpina (GA); Jersey (Jer); Pezzata Rossa (Si) e Rendena (Ren) (Tabella 1). Durante i controlli funzionali mensili, sono stati prelevati i campioni di latte individuale e registrate le produzioni giornaliere. La Federazione Provinciale Allevatori di Trento ha fornito le informazioni individuali, quali la data di nascita, lo stadio di lattazione (DIM- *days in milk*) e l'ordine di parto di ogni capo, e i dati sono stati suddivisi in classi specifiche per l'analisi statistica, come verrà approfondito nel paragrafo 3.3, le cui frequenze sono riportate in Tabella 1. Gli allevamenti sono stati classificati in due categorie di livello produttivo (alto o basso), applicando l'equazione proposta dall'NRC (2001, VII Ed.):

$$NE_L \text{ (Mcal/kg)} = 0,0929 \times \text{Grasso\%} + 0,0547 \times \% \text{Proteina} + 0,0395 \times \text{Lattosio\%}$$

dove NE_L rappresenta l'energia netta per capo necessaria a sostenere la lattazione. Dunque, per applicare la formula si deve disporre del contenuto percentuale di grasso, proteina e lattosio individuali e della produzione giornaliera di latte. Svolgendo l'equazione si ottiene l'energia prodotta da ogni capo in forma di Mcal/kg latte, che viene trasformata in Kj/kg latte e poi moltiplicata per la produzione giornaliera della bovina corrispondente, ottenendo Kj/d. Dai dati individuali, attraverso un'analisi ANOVA, è stato stimato il valore medio di ogni azienda, per ordinarle in base all'energia prodotta e creare due classi equilibrate nel numero di allevamenti (20 nel livello alto e 21 nel livello basso). I capi di tre delle razze considerate erano sbilanciati nei due raggruppamenti al punto da impedire un eventuale confronto, perciò 8 animali sono stati eliminati dal dataset, giungendo alla versione finale di 1508 campioni; così, la Jersey risulta

presente soltanto negli allevamenti ad alto livello produttivo, mentre Grigia Alpina e Rendena in quelli a livello basso. Infatti, nelle categorie di *razza* e *livello produttivo* i capi sono spartiti in modo meno equilibrato rispetto alle classi dei giorni di lattazione e degli ordini di parto (Tabella 1) e, a conferma della maggiore concentrazione dei capi negli allevamenti dal più alto standard produttivo (61%), le razze specializzate rappresentano il 77,9% del campione.

3.2 Analisi dei campioni

3.2.1 Analisi della composizione del latte

I campioni di latte individuale sono stati analizzati per contenuto in grasso, proteine, caseine, lattosio (espressi in %) e urea (MUN, Milk Urea Nitrogen, espressa in mg/100g) usando il MilkoScan FT6000 (Foss, Hillerød, Denmark). Il pH è stato invece misurato utilizzando il Crison Basic 25 electrode (Crison Instruments SA, Barcelona, Spain).

3.2.2 Analisi del profilo proteico tramite RP-HPLC

Standard, reagenti e campioni

Per la preparazione dei campioni sono stati acquistati dalla Sigma: Guanidina idrocloruro (GdnHCl) (lotto G-4505, purezza >99%), Bis-tris Buffer (lotto B-9754, >98%), acido Trifluoroacetico (lotto T-6508, >99%), citrato di sodio (lotto 71498, >99%), DL-ditiotreitolo (DTT, lotto 43817, >99%) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e le principali proteine purificate da latte vaccino quali, κ -CN (lotto C-0406, >80%), α s-CN (lotto C-6780, >70%), β -CN (lotto C-6905, >90%), α -lattoalbumina (lotto L-5385 tipo I, ~85%), β -lattoglobulina-B (lotto L-8005, >90%) e A (lotto L-7880, >90%). L'acqua ultra pura è stata invece ottenuta in laboratorio (sistema Milli-Q System, >18,2 M Ω cm). Il conservante (Bronopol, 2-bromo-2nitropropan-1,3-diolo) è stato aggiunto ai campioni di latte fresco appena prelevati, in rapporto 0,6:100 (v:v) per prevenire la crescita microbica. Da ogni campione sono state ricavate due aliquote da 1 ml, congelate a -20°C durante la raccolta e poi trasferite a -80°C in laboratorio, in attesa dell'analisi con RP-HPLC. Una volta scongelate, sono state preparate seguendo il metodo proposto da Bobe et al. (1998). Quindi, a ciascun campione portato a temperatura ambiente, viene aggiunta un'aliquota di buffer in rapporto 1:1 (v:v), contenente Bis Tris Buffer 0,1 M (pH 6,8), GdnHCl 6 M, sodio citrato 5,37 mM e DTT 19,5 mM (pH 7). Vengono poi agitati per 10 secondi, incubati per 1 ora a temperatura ambiente e centrifugati per 5 minuti a 16.000 giri in una micro centrifuga. Questo permette la separazione del grasso che verrà facilmente rimosso con una spatola. Il campione solubilizzato rimanente viene diluito in rapporto 1:3 (v:v) con una soluzione contenente GdnHCl 4,5 M e solvente A, che consiste

in acetonitrile, acqua e acido trifluoroacetico in rapporto 100:900:1 (v:v:v; pH 2). La concentrazione finale delle proteine è di circa 4 mg/ml, rispetto a quella del campione originale che è di 30-33 mg/ml. Le vials dei campioni in attesa di analisi sono mantenute a 4°C. Non sono richieste procedure di separazione preliminare o di precipitazione delle frazioni caseiniche prima dell'analisi in HPLC.

Strumentazione HPLC

Per l'analisi sono stati utilizzati un cromatografo Agilent serie 1260 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipaggiato con una pompa quaternaria (Agilent serie 1260, G1311B) e un Diode Array Detector (Agilent 1260 Series, DAD VL+, G1315C). Tutto ciò è controllato attraverso il software Agilent Chem Station for Lc System, in grado di regolare il gradiente del solvente, l'acquisizione dei dati e l'elaborazione dei cromatogrammi. La separazione delle proteine avviene attraverso una colonna analitica a fase inversa C8 (Aeris WIDEPORÉ XB- C8, Phenomenex) con impaccamento a pori di grandi dimensioni (3,6 µm, 300 Å, 250x2,1 I.D.). Come precolonna (UHPLC WIDEPORÉ C8, 2,1 mm I.D.) è stato utilizzato Security Guard ULTRA Cartridge System (prodotto n° AJ0-8785, Phenomenex). Il tutto è integrato con un autocampionatore (Agilent 1100 Series, G1313A) per il prelievo del contenuto delle vials.

Condizioni cromatografiche

Il gradiente di eluizione è stato ricavato da una miscela di due solventi: il solvente A, il più idrofobico, composto dal 94,9% di acqua, 5,0% di acetonitrile e 0,1 % di acido trifluoroacetico (TFA) e il solvente B, più polare, con lo 0,1% di TFA in acetonitrile. La separazione delle singole frazioni caseiniche è stata ottenuta seguendo uno specifico programma di eluizione dei suddetti solventi, con un flusso di 0,5 ml/min. il solvente B è stato eluito seguendo un gradiente lineare: dal 20 al 29% in 30 secondi, dal 29 al 33% in 5,5 minuti, dal 33 al 36% in 6 minuti, dal 36 al 45% B in 6 minuti e ritorno lineare alle condizioni di partenza in 1 minuto. La temperatura della colonna è stata mantenuta a 70°C e la rilevazione dei peptidi effettuata alla lunghezza d'onda di 214 nm. L'analisi viene eseguita su un volume di iniezione del campione di 2 µl. Al termine di ogni corsa, prima dell'iniezione del campione successivo, la colonna viene riequilibrata alle condizioni iniziali in 3 minuti. Il tempo impiegato per l'analisi di un campione è di 22 minuti, di cui 18 di corsa per ottenere la separazione delle proteine.

Proteine purificate

Per quanto riguarda le soluzioni standard, le soluzioni madre contenenti le singole frazioni proteiche sono state preparate diluendo in 0,75 ml di soluzione GndHCl, 5 mg di α-CN

purificata, 2,5 mg di κ -CN purificata, 4 mg di β -CN purificata, 1 mg di α -lattoalbumina purificata e 2 mg di β -lattoglobulina purificata, sia della variante A che B. Da ciascuna di esse, è stato ottenuto un set di 5 soluzioni a concentrazione decrescente, attraverso uno specifico schema di diluizione (Tabella 2). Le soluzioni standard così preparate, sono state analizzate per costruire le curve di calibrazione di ciascuna frazione proteica. Poiché l' α _{S1}- e l' α _{S2}-caseina non sono disponibili come singole proteine, i valori corrispondenti sono stati calcolati dall' α -caseina totale, applicando la proporzione nota per il latte vaccino di 4:1 (Bonizzi et al., 2009).

Validazione e calibrazione

Prima della calibrazione, la linearità del modello è stata testata facendo correre lo stesso campione, ai cinque diversi gradi di diluizione, per tre volte. Le aree sottese ai picchi del cromatogramma espresso sono state quindi utilizzate per validare il metodo. La procedura di validazione ha previsto la corsa di 30 campioni individuali (a volume di iniezione di 2 μ l), ripetendo l'analisi due volte nella stessa sequenza. Il metodo dello standard esterno è stato utilizzato per la calibrazione del sistema cromatografico impiegato nella quantificazione delle proteine. Le curve di calibrazione di ciascuna variante genetica delle proteine, sono state calcolate applicando una regressione lineare semplice all'area dei picchi corrispondenti alla quantità nota iniettata, al diminuire del volume di iniezione.

3.3 Analisi statistica

L'analisi della varianza è stata condotta attraverso la procedura MIXED del pacchetto statistico SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC) applicando il seguente modello lineare misto:

$$y_{ijklmn} = \mu + \text{DIM}_i + \text{OP}_j + \text{Razza}_k + \text{Livello produttivo}_l + \text{Allevamento}_m (\text{Livello produttivo})_l + e_{ijklmn}$$

dove y_{ijklmn} è la variabile dipendente (profilo proteico); μ è la media generale; DIM_i è l'effetto fisso della i^{esima} classe di stadio di lattazione ($i = 6$ classi di 60 giorni, partendo da 5 fino a 305 giorni e oltre); OP_j è l'effetto fisso del j^{esimo} ordine di parto ($j = 1$ fino a 4 e oltre); Razza_k è l'effetto fisso della k^{esima} razza ($k = \text{BS, HF, Jer, Si, GA, Ren}$); $\text{Livello produttivo}_l$ è l'effetto fisso del livello produttivo della l^{esima} classe ($l = \text{Alto o Basso}$); Allevamento_m (livello produttivo) _{l} è l'effetto casuale del m^{esimo} allevamento ($m = 1$ to 41) entro la l^{esima} classe di livello produttivo; e_{ijklmn} è l'effetto casuale dell'errore $\sim N(0, \sigma_e^2)$. I contrasti ortogonali sono stati stimati ($P < 0,05$) per l'effetto razza nel seguente modo: razze specializzate (Bruna, Frisona e Jersey) *versus* razze a duplice attitudine (Pezzata Rossa, Grigia Alpina e Rendena); entro razze

specializzate: Bruna e Frisona *versus* Jersey e Bruna *versus* Frisona; entro razze a duplice
attitudine: Pezzata Rossa *versus* Grigia Alpina e Rendena e Grigia Alpina *versus* Rendena.

4. Risultati e discussione

4.1 Statistiche descrittive

Le statistiche descrittive riportate in Tabella 3, sono riferite alla produzione quantitativa di latte, ai suoi caratteri di composizione e al suo profilo proteico. Nell'output MIRS, il valore attribuito alla proteina, comprende anche l'azoto non proteico (NPN) e le frazioni proteiche minori, non quantificati nell'analisi HPLC, che inoltre utilizza campioni scremati. Quindi, in un confronto (a parità di caratteristiche del campione), si dovrebbero ottenere valori superiori con la prima tecnica. Invece, in questo lavoro, il valore assunto dai principali costituenti del latte ottenuti tramite sistema MIRS, è risultato inferiore a quello registrato mediante HPLC. Ciò è spiegato sia dalla diversa unità di misura con cui sono espressi i risultati (peso/peso vs peso/volume) che dalle migliori condizioni di conservazione delle aliquote garantite dal programma di analisi HPLC (Bonfatti et al., 2010a). Nello specifico, l'analisi MIRS, ha rilevato una concentrazione proteica del 3,61%, di caseina del 2,83%, di grasso del 3,95% e di urea di 24,76 mg/100 g, oltre ad un pH pari a 6,51. Mentre, l'analisi con RP-HPLC ha fornito valori di proteina totale pari a 43,12 g/l, di caseina totale di 36,11 g/l e, inoltre, sono state valutate le sieroproteine, che mostrano una concentrazione di 7,01 g/l. Rapportando la caseina alla proteina, possiamo notare come anche l'indice caseinico risulti maggiore con quest'analisi (0,84 vs 0,79). Per confrontare la variabilità dei diversi caratteri è necessario calcolarne il coefficiente di variazione ($CV = DS/media \times 100$): l'urea mostra la variabilità maggiore ($CV = 37,7$) ed essendo correlata con il rapporto tra i carboidrati fermentescibili e la frazione azotata della razione, è un dato utile per valutare la qualità della dieta. Infatti, tanto più questo rapporto è a favore dell'azoto, tanto minore è l'energia che la microflora ruminale ha a disposizione per la sintesi di proteina batterica e quindi, tanto maggiore è l'azoto in eccesso che viene convertito in urea nel fegato. La produzione di latte ha un coefficiente di variazione pari a 35,8 ed è seguita dalle caseine κ e α_2 (entrambe $CV = 26,1$). Invece, i caratteri che mostrano il coefficiente più basso sono l'indice caseinico (CV pari a 1,48 tramite MIRS; 3,43 con HPLC) e il pH ($CV = 1,5$), a conferma delle aspettative. È difficile confrontare questi dati con quelli di altri studi, poiché non sono reperibili in bibliografia lavori che riportano le medesime informazioni ottenute da un campione costituito dalle stesse razze, provenienti inoltre da allevamenti misti. Infatti, ad oggi, sono state condotte analisi prevalentemente su allevamenti monorazza, con tecniche analitiche differenti e sono reperibili ancora poche informazioni sulle razze locali (come la Grigia Alpina), soprattutto a parità di condizioni di allevamento rispetto a quelle specializzate. Quindi, le differenze che si riscontrano con i più recenti studi, sono dovute sia alla composizione del

dataset che alla tecnica analitica utilizzata (elettroforesi, MIRS o HPLC). Ad esempio, Bijl et al. (2013), che hanno condotto l'analisi su un campione di sole Frisone tramite MIRS, hanno misurato medie di composizione del latte leggermente inferiori a quelle qui riportate: la proteina è del 3,53%, la caseina del 2,75% (da cui ricaviamo l'indice caseinico di 0,78) e l'urea è pari a 23 mg/100 g; soltanto il pH e il grasso risultano superiori nello studio citato (rispettivamente 6,72% e 4,39%).

4.2 Fonti di variazione della composizione proteica

I dati ottenuti dall'analisi HPLC sono stati elaborati mediante analisi statistica ANOVA, al fine di valutare quanto lo stadio di lattazione, l'ordine di parto, la razza e il livello produttivo dell'allevamento agiscono sulla produzione di latte e sulla sua composizione proteica. In Tabella 4, oltre ai risultati dell'analisi della varianza (F-value e significatività), sono stati riportati l'RMSE (root mean square error), la radice quadrata della varianza dell'errore, che rappresenta una misura di fitting del modello, e l'HTD (*herd test day*-allevamento data controllo), che indica quanto incidono l'allevamento e la data di campionamento sulla variabilità di ciascun carattere. Da questa elaborazione è risultato che lo stadio di lattazione, pur avendo un effetto altamente significativo su ciascun carattere ($P < 0,001$), non influisce in modo significativo né sull'indice caseinico né sull' α -lattoalbumina. Anche l'ordine di parto incide con il più alto grado di significatività su ogni carattere ($P < 0,001$) eccetto due: la sieroproteina totale e la β -lattoglobulina, sui quali ha un effetto limitato ($P < 0,05$). La razza risulta l'unica ad influire con elevata significatività ($P < 0,001$) su ciascun carattere, ad indicare come l'effetto genetico incida fortemente su ogni variabile e che quindi, a priori, la scelta dell'animale determini le caratteristiche della produzione. Infine, il livello produttivo ha un effetto altamente significativo ($P < 0,001$) su produzione di latte, sieroproteina totale e β -lattoglobulina, mentre influisce con minore significatività su proteina totale, indice caseinico totale, caseine κ e α_1 , α -lattoalbumina ($P < 0,01$) e sulla caseina totale ($P < 0,05$); al contrario sembra non essere una fonte di variazione significativa per le caseine α_2 e β . Da queste considerazioni si evince che soltanto la produzione di latte viene influenzata con il massimo grado di significatività da tutti gli effetti del modello e che il 29,4% della sua variabilità complessiva è da ascrivere all'HTD, a sostegno dell'evidenza che l'alimentazione, congiuntamente alla data di campionamento, inducono notevoli variazioni sulla produttività delle bovine. Gli altri caratteri che risentono maggiormente di quest'effetto sono la β -caseina e l' α -lattoalbumina (rispettivamente HTD pari al 20,0% e al 19,7%). Il fatto che, però, la prima non sia influenzata dal livello produttivo, potrebbe indicare che le fonti della sua variabilità

non sono da ricercare nel management aziendale (che determina la spinta produttiva dell'allevamento), ma piuttosto nella data di campionamento e negli effetti che questa comprende (temperatura, umidità, stress...). Infine, i parametri sui quali l'HTD ha la minore incidenza sono la κ - e l' α_2 -caseina, le sieroproteine totali e la β -lattoglobulina (HTD dal 6,3 al 6,5%). Tra queste, quelle influenzate anche dal livello produttivo, risentono prevalentemente delle scelte gestionali, mentre l' α_2 -caseina probabilmente è più influenzata dagli effetti del giorno di campionamento. Questi risultati sono in contrasto con quelli degli studi di Coulon et al. (2001), secondo i quali il tenore energetico della razione influenza esclusivamente la κ -caseina, e di Cowley (2013), secondo cui le singole frazioni proteiche non subiscono l'influenza dell'alimentazione e dei parametri ambientali.

Nelle tabelle 5 e 6 vengono riportate le medie stimate dei caratteri presi in esame, che rappresentano i valori che i parametri assumerebbero a parità di ciascun altro effetto del modello. Inoltre, per quanto riguarda l'effetto razza, sono stati calcolati dei contrasti, per identificare differenze significative ($P < 0,05$) tra due razze o gruppi di razze. I valori medi della produzione giornaliera di latte e della sua composizione proteica, confermano le aspettative sulla Jersey (Varisco et al., 2004; Auldist et al., 2004), che risulta la razza che produce il latte con la maggiore concentrazione di proteina (51,8 g/l), delle sue principali frazioni (44,0 g/l di caseine e 7,6 g/l di sieroproteine) e il più elevato indice caseinico (0,86; pari a quello della Rendena), nonostante la minore produzione di latte registrata (soltanto 16,4 kg/d di media). Al contrario, la Frisona produce la maggiore quantità di latte (25,9 kg/d), con la minore concentrazione di proteina (39,6 g/l) e caseina totali (33,1 g/l) e il più basso indice caseinico (0,83; pari a quello della Pezzata Rossa). Ciò trova spiegazione nel meccanismo fisiologico di diluizione dei componenti del latte all'aumentare della quantità che ne viene prodotta. Nella più recente bibliografia, vari studi si sono occupati dell'analisi del latte di vacche Pezzate Rosse, attraverso diverse tecniche analitiche: il MIRS è stato utilizzato da De Marchi et al. (2009), mentre l'RP-HPLC da Bonfatti et al. (2010a). Come atteso, ciascun parametro risulta maggiore nel primo studio. I valori ottenuti in questo lavoro tesi, relativamente alla medesima razza, si discostano leggermente da entrambi. La proteina totale risulta maggiore (42,1 g/l rispetto ai 40,1 g/l di De Marchi et al. e i 38,8 g/l di Bonfatti et al.), come la sieroproteina (7,2 g/l vs 5,0 g/l circa degli altri); la caseina assume un valore di 34,9 g/l, vicino ai 35,1 g/l di De Marchi et al. e superiore ai 33,8 g/l di Bonfatti et al., mentre l'indice caseinico (0,83), non riportato da De Marchi et al., risulta inferiore a quello calcolato da Bonfatti et al. (0,87), principalmente per il più elevato contenuto in proteina totale. Lo scarto della proteina totale rispetto agli studi posti a confronto, è dovuto principalmente all'elevata concentrazione di sieroproteine qui rilevata. Ponendo in ordine decrescente i valori medi di

proteina e caseina assunti in ciascuna razza otteniamo la medesima successione: Jersey, Bruna, Grigia Alpina, Pezzata Rossa, Rendena e Frisona; ad indicare che la sintesi di caseina tende ad essere proporzionale a quella della proteina. Anche per il contenuto in sieroproteine e indice caseinico, Jersey e Bruna mantengono i valori più elevati (rispettivamente 7,6-7,2 g/l e 0,86-0,84). In questo lavoro di tesi è stato svolto sia un confronto tra le razze specializzate nella produzione di latte (BS, Fr e Jer) e quelle a duplice attitudine (Si, GA e Ren), che entro ciascuna categoria. Questo sistema analitico mette in luce che tra le due classi non c'è differenza significativa nella quantità di latte prodotta, come neppure nell'indice caseinico. Ciò può trovare spiegazione nel fatto che le razze a duplice attitudine hanno una produzione superiore a quella della Jersey, che essendo compresa tra le razze specializzate bilancia le differenze altrimenti esistenti tra le classi, e che l'indice caseinico assume i medesimi valori in entrambe le categorie. Inoltre, va evidenziato che nel confronto tra la Pezzata Rossa e le razze a limitata diffusione dell'arco alpino, i valori di proteina e caseina totali non risultano significativamente diversi. In tutti gli altri contrasti, per ciascun parametro oggetto di confronto, i valori assunti si discostano tra loro con alto grado di significatività ($P < 0,001$), ad eccezione della produzione giornaliera di latte tra Grigia Alpina e Rendena, dove la differenza è statisticamente inferiore ($P < 0,01$). Quindi, anche la proteina e la concentrazione delle sue maggiori frazioni risultano significativamente diverse tra Bruna e Frisona, con valori sempre superiori nella Bruna; evidenze confermate da Mariani (1975) e Mariani et al. (1998a). Mentre, tra Grigia Alpina e Rendena, soltanto la produzione di latte e l'indice caseinico sono maggiori nella Rendena. Indipendentemente dalla razza e coerentemente alle aspettative, la produzione di latte nel corso della lattazione subisce una contrazione, accompagnata dall'aumento della concentrazione di proteina, caseina e sieroproteina (in misura minore) e dalla stabilità dell'indice caseinico (costante a 0,84; come atteso dai risultati di Tabella 4), ad indicare che l'aumento di proteina è proporzionale a quello di caseina. La massima quantità di latte prodotta rientra nella prima classe (5-65 d) e quindi non è stato registrato l'iniziale incremento di produzione che porta al *picco*, come non è riportato l'iniziale calo di proteina che lo accompagna. Infatti, questi risultati confutano quelli di Varisco et al. (2004), che segnalano una contrazione della proteina fino al quinto mese, prima di crescere, e un effetto importante sull'indice caseinico, che subirebbe un incremento nei primi 30 giorni, per poi mantenersi costante fino all'ottavo mese di lattazione e quindi calare. Invece, Malacarne et al. (2001) confermano l'andamento della proteina e della caseina qui riportati ma rilevano un andamento decrescente dell'indice caseinico. Coulon et al. (1998) supportano i risultati qui riportati affermando che questo parametro non è influenzato dallo stadio di lattazione ma dall'ordine di parto. Infatti, tra la prima e la seconda lattazione, l'indice caseinico cala per poi mantenersi costante. Con l'incedere delle lattazioni la produzione

di latte aumenta fino a stabilizzarsi dalla terza (da 18,9 kg/d a 22,7 kg/d) mentre decrescono la proteina, la caseina e la sieroproteina (dopo un aumento tra la prima e la seconda lattazione). La correlazione negativa tra l'ordine di parto e la caseina e la sieroproteina trova conferma negli studi di Mariani (1985) e Hansen et al. (2006), anche se nel primo, in contrasto, non risulta significativa l'incidenza di quest'effetto sull'indice caseinico. Infine, come discusso in precedenza, il livello produttivo dell'allevamento mostra di influenzare significativamente ciascun carattere e i valori dalle medie stimate sono superiori negli allevamenti del livello più alto, ad eccezione dell'indice caseinico. Questo parametro è maggiore in quelli meno spinti, ad indicare il minore divario fra proteina e caseina: 42,7 g/l di proteina e 36,1 g/l di caseina (IC = 0,85), rispetto i 44,9 g/l di proteina e 37,6 g/l di caseina in quelli ad alta spinta produttiva (IC = 0,84). Queste evidenze trovano supporto nel fatto che i caratteri coinvolti nel calcolo del livello produttivo, quali la concentrazione proteica e la produzione di latte, sono i medesimi che vengono analizzati. Questi, mostrano valori significativamente maggiori nella classe *alto*, poiché, supportati dagli studi di Mariani et al. (1998b) e Cowley (2013), possiamo dedurre che gli allevamenti più spinti sono tendenzialmente più controllati da un punto di vista microambientale e nutrizionale.

A conferma dei risultati discussi in precedenza e delle aspettative dalla bibliografia, valutando l'effetto *razza*, la Jersey risulta quella con la maggiore concentrazione di ciascuna frazione proteica, ad eccezione dell' α -lattoalbumina che è superiore nella Grigia Alpina (1,04 g/l vs 1,05 g/l). Mentre, i più bassi valori di κ -, β - e α_2 -CN e α -LA sono stati registrati nella Frisona (3,5-12,9-3,0 e 0,91 g/l) e le minori concentrazioni di α_1 -CN e β -LG nella la Rendena (rispettivamente 10,9 e 4,7 g/l). La posizione della Frisona nel rank delle razze in base alla concentrazione delle suddette frazioni, trova conferma nell'obiettivo del programma di miglioramento genetico cui è sottoposta: la produzione quantitativa di latte. Infatti, l'unica variante dell' α_1 -CN individuata in questa razza è la B (Jensen et al., 2012b), che stimola la secrezione latte, e la frequenza dell'allele B della κ -caseina è limitata al 25%, favorendo l'espressione dell'A, che deprime la sintesi della proteina stessa (3,5 g/l), oltre che l'attitudine alla coagulazione. La Bruna è invece seconda alla Jersey per la concentrazione di ciascuna frazione proteica, ad eccezione dell' α -lattoalbumina per la quale è quarta con 0,97 g/l. Ciò può essere spiegato, ancora una volta, dal programma di selezione a cui questa razza è sottoposta da tempo, che mira a favorire le varianti genetiche che rendono il latte idoneo alla caseificazione. Per esempio, l'incremento della frequenza dell'allele B della κ -caseina rispetto all'A (fino al 44% secondo Mariani et al., 2002), ha stimolato indirettamente la sintesi della frazione proteica stessa (4,9 g/l), della caseina totale (38,2 g/l), dell'indice caseinico (0,84) e della β -LG (6,2 g/l). Inoltre, la variante B della β -CN ha una frequenza dello 0,2-0,4 (Russo e

Mariani, 1978) e anch'essa induce un aumento della concentrazione della frazione stessa (14,0 g/l), della caseina totale, dell'indice caseinico, della κ -caseina e della β -LG. Queste considerazioni permettono di spiegare anche i risultati discussi in precedenza, evidenziando una correlazione tra le varianti genetiche delle proteine e le corrispondenti frazioni, quindi con la composizione proteica del latte e le sue caratteristiche tecnologiche. Inoltre, i risultati dei contrasti relativi all'effetto della razza sulle frazioni di caseina e sieroproteina (Tabella 6), confermano, da un punto di vista statistico, che tra Bruna e Frisona ogni frazione proteica è significativamente maggiore nella Bruna ($P < 0,001$). Per quanto riguarda la Pezzata Rossa, negli studi precedentemente citati di De Marchi et al. (2009) e Bonfatti et al. (2010a), sono state misurate anche le concentrazioni di ciascuna frazione proteica e nel primo studio i valori sono risultati maggiori. Confrontandoli con i dati qui ottenuti, notiamo che la β -CN (13,2 g/l) e l' α_1 -CN (12,2 g/l) hanno un valore intermedio, mentre l' α_2 -CN (3,3 g/l) e l' α -LA (0,93 g/l) risultano inferiori ad entrambi. Infine, i valori qui riportati di β -LG sono significativamente maggiori: 6,2 g/l rispetto a 3,7 g/l degli altri lavori. Dai contrasti riportati in questo studio, la composizione proteica del latte di questa razza (in termini di proporzione tra le frazioni proteiche) appare discostarsi significativamente da quella delle rimanenti razze a duplice attitudine (eccetto per la β -CN le cui differenze non risultano statisticamente significative), nonostante la proteina e la caseina totali fossero risultate paragonabili. Approfondendo il confronto tra Grigia Alpina e Rendena, risulta che, nonostante non vi sia differenza significativa tra le caseine β e α_2 e l' α -LA, il contenuto di proteina totale e delle sue maggiori frazioni è significativamente diverso, ad indicare quanto sia marcata la differenza tra le concentrazioni di α_1 -CN e β -LG, sempre maggiori nella Grigia Alpina. Le differenze possono essere ricondotte agli effetti delle varianti genetiche sulla sintesi delle frazioni caseiniche (oltre che sul contenuto di caseina stessa), infatti nella Grigia Alpina è stata individuata una maggiore frequenza della κ -CN B e della β -LG A (Maurmayr, 2014). Infine, dal confronto macroscopico fra razze specializzate e a duplice attitudine, risulta evidente che il valore medio assunto dalle frazioni proteiche del latte è significativamente diverso ($P < 0,001$), con l' α -lattoalbumina che presenta la minore variabilità ($P < 0,05$). Analizzando l'andamento delle frazioni proteiche nel corso della lattazione, possiamo notare la crescita tendenzialmente lineare, seppure di diversa entità, di β -CN, β -LG e α_1 -CN (dal secondo periodo). Invece, la κ -CN aumenta fino alla quarta classe (185-245 giorni), per poi calare leggermente e mantenersi costante fino alla fine della lattazione. L' α_2 -CN e l' α -LA assumono l'andamento meno lineare: la prima dopo un calo iniziale, cresce, si stabilizza e infine aumenta nuovamente; la sieroproteina invece cala, si mantiene costante a metà lattazione per poi aumentare e infine diminuire nuovamente. Ad eccezione di quest'ultima e della κ -CN (le cui variazioni sono confermate negli studi di Caffin

et al., 1985; Ostersen et al., 1997 e Farrell et al., 2004), le frazioni seguono l'andamento della famiglia di proteine di riferimento. Secondo Ng-Kwai-Hang et al. (1987), invece, ciascuna di queste frazioni proteiche decresce inizialmente prima di aumentare. Questa differenza può essere in parte spiegata dal fatto che nel presente lavoro non è stato registrato nemmeno il calo iniziale della concentrazione proteica che di norma accompagna il raggiungimento del picco di produzione. L'andamento della β -CN trova conferma in Kroeker et al. (1985) e Ostersen et al. (1997), ma nel primo studio registrano la non significatività sulla κ -CN. Considerando l'ordine di parto, la κ -CN è l'unica che non riflette l'andamento di calo lineare che caratterizza la caseina totale, poiché dalla quarta lattazione cresce in modo spiccato. Bonfatti et al. (2011) ne riportano una correlazione negativa con la β -CN ($r = -0,44$) e l' α_{S1} -CN ($r = -0,19$), che infatti decrescono. Tra le sieroproteine, invece, l' α -LA cala gradualmente mentre la β -LG aumenta tra il primo e il secondo parto per poi stabilizzarsi al valore iniziale. Lo studio di Ng-Kwai-Hang et al. (1987) conferma soltanto l'andamento della β -CN e l'influenza di quest'effetto sulla β - e sull' α -CN. Infine, viene confermata l'incidenza del livello produttivo su questi parametri, mostrando valori sempre maggiori nell'allevamento caratterizzato dalla più forte spinta produttiva, seppure le medie stimate della β -CN (13,6 vs 13,9) e dell' α_{S2} -CN (3,6 vs 3,7) risultino statisticamente uguali dall'analisi ANOVA (Tabella 4); ad indicare quindi, che il livello produttivo, e i fattori che questo comprende, non le alterano.

5. Conclusioni

I risultati ottenuti in questo lavoro di tesi aiutano a determinare l'entità dell'effetto che hanno fattori individuali ed ambientali sulla quantità di latte prodotta e sul suo profilo proteico. Ciò genera nuove linee guida per la ricerca scientifica, che dovrà dare all'allevatore i mezzi per adeguare, per quanto possibile, la composizione proteica del latte ai propri fini produttivi. Grazie al disegno sperimentale qui adottato (campioni di sei razze diverse provenienti da allevamenti misti) è stato possibile estendere i risultati dalle razze specializzate e cosmopolite a quelle a duplice attitudine a limitata diffusione, confrontandole anche a parità di allevamento, colmando la scarsità di studi approfonditi sull'argomento. La razza esercita la massima influenza su ciascuno dei parametri analizzati, evidenziando che la scelta del tipo genetico da allevare è la prima fonte di variabilità della produzione. Nonostante ciò, dai confronti, non emergono differenze significative nella produzione quantitativa di latte tra le razze specializzate e quelle a duplice attitudine. Considerandole singolarmente, la Jersey registra la minore produzione di latte con la maggiore concentrazione di proteina (e di ciascuna frazione) ed è seguita, per composizione, dalla Bruna; mentre la Frisona mostra la massima produzione associata al più povero profilo proteico. Queste evidenze sono in linea con i diversi obiettivi dei programmi di selezione cui sono sottoposte. Confrontando la Pezzata Rossa con le razze autoctone (GA e Ren), il contenuto di proteina e caseina non mostra differenze significative, mentre le proporzioni tra le singole frazioni sono significativamente diverse, ad eccezione della β -caseina. Tra Grigia Alpina e Rendena, nonostante il diverso contenuto di proteina e delle sue maggiori frazioni, il profilo proteico presenta anche differenze non significative (β -CN, α_2 -CN e α -LA). L'effetto dell'ordine di parto è risultato significativo su ciascun carattere, seppure con rilevanza variabile, e con l'incedere delle lattazioni la quantità di latte prodotta cresce, mentre s'impoverisce da un punto di vista qualitativo. Al contrario, nel corso della lattazione la produzione di latte decresce e se ne concentra la componente proteica, senza variazioni significative dell' α -lattoalbumina e dell'indice caseinico, aiutando ad individuare il periodo più adeguato alla trasformazione casearia. È evidente poi, che l'alto livello produttivo incide positivamente sulla produzione di latte e sul suo profilo proteico (in particolare sulle sieroproteine). Quindi, sarebbe interessante ricercare i fattori che determinano le differenze fra le due classi di livello produttivo, anche tra quelli che caratterizzano l'allevamento e il giorno di campionamento (il cui effetto è stato espresso attraverso il valore HTD, %), che hanno mostrato di influenzare la produzione di latte e di modularne specialmente la concentrazione di caseina totale, β - e α_2 -caseina e α -lattoalbumina.

Appendice di figure e tabelle

Figura 1. Esempi di colonne per HPLC



Figura 2. Esempio di cromatogramma di diversi campioni di latte individuali. No 1: k-CN A; no 2: α_2 -CN ; no 3: k-CN B; no 4: α_1 -CN B; no 5: α_1 -CN C; no 6: Lattoferrina; no 7: α -LA; no 8: β -CN B; no 9: β -CN A1; no 10: β -CN A2; no 11: β -CN A3; no 12: β -LG B; no 13: β -LG A (Maurmayr, 2014).

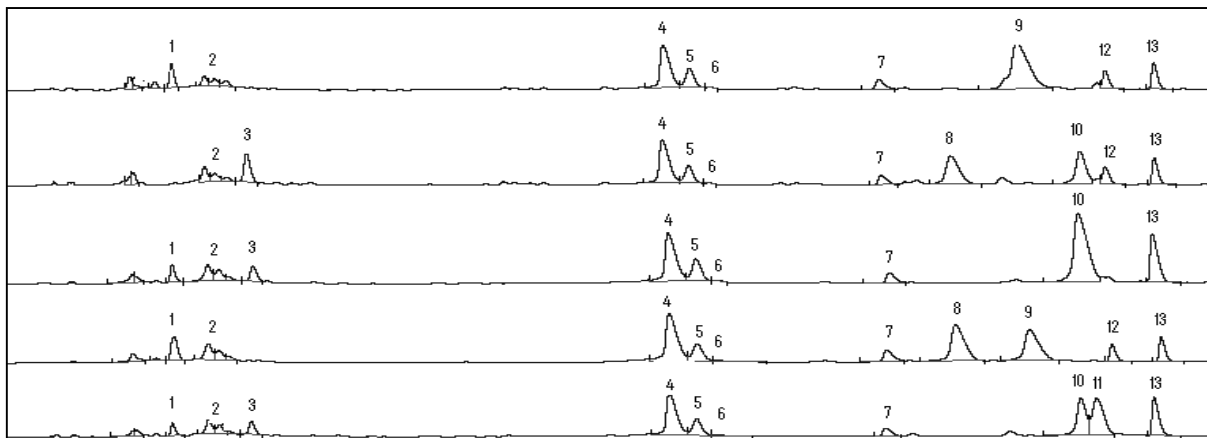


Figura 3. Esempio di macchinario per HPLC (Agilent serie 1260)



Tabella 1. Distribuzione dei capi per razza, classi di DIM, ordine di parto e livello produttivo degli allevamenti

Effetti	Frequenza relativa	Percentuale relativa
Razza		
Bruna	663	44,0
Frisona	471	31,2
Jersey	40	2,7
Pezzata Rossa	158	10,5
Grigia Alpina	73	4,8
Rendena	103	6,8
DIM, d		
5-65	289	19,2
65-125	265	17,6
125-185	244	16,2
185-245	253	16,8
245-305	215	14,3
>305	241	15,9
Ordine di parto		
Primipare	497	32,9
Secondipare	383	25,4
Terzipare	283	18,8
Quartipare e oltre	345	22,9
Livello produttivo		
alto	920	61,0
basso	588	39,0

Tabella 2. Concentrazione degli standard delle frazioni caseiniche

Frazioni proteiche	Concentrazione mg/ mL				
	A	B	C	D	E
κ -CN	1,05	1,40	1,87	2,50	3,33
α -CN	2,10	2,81	3,75	5,00	6,67
β -CN	0,63	0,84	1,12	1,50	2,00
α -LA	0,42	0,56	0,75	1,00	1,33
β -Lg A o B	0,84	1,12	1,50	2,00	2,67

Tabella 3. Statistiche descrittive relative ai caratteri di produzione, composizione e delle singole frazioni proteiche del latte

Carattere	N.	Media	DS	Minimo	Massimo
Produzione di latte, kg/d	1489	24,05	8,61	2,10	50,40
Composizione del latte ¹					
Proteina, %	1212	3,61	0,92	2,41	5,07
Caseina, %	1213	2,83	0,36	1,93	3,97
Indice caseinico ²	1202	0,79	0,01	0,75	0,82
Grasso, %	1202	3,95	0,77	1,20	6,74
Lattosio, %	1203	4,86	0,21	4,13	5,45
Urea, mg/100g	1211	24,76	9,33	5,09	52,76
pH	1497	6,51	0,10	6,21	6,80
Proteina determinata con RP-HPLC, g/l					
Proteina totale	1493	43,12	6,81	25,60	63,50
Caseina totale	1492	36,11	5,96	20,15	54,15
Sieroproteina totali	1486	7,01	1,46	2,96	11,55
Indice caseinico totale ²	1496	0,84	0,03	0,71	0,98
Frazioni proteiche, g/l ³					
κ -caseina	1493	4,29	1,12	1,29	7,51
β -caseina	1491	13,50	2,23	6,75	20,26
α_1 -caseina	1489	12,07	2,02	6,13	18,25
α_2 -caseina	1492	3,58	0,93	1,19	6,39
α -lattoalbumina	1487	0,96	0,17	0,45	1,47
β -lattoglobulina	1485	5,95	1,43	2,07	10,17

¹ Caratteri quantificati mediante MilkoScan FT6000

² Indice caseinico = (caseina/proteina)

³ Tutte le frazioni proteiche sono state quantificate mediante RP-HPLC su latte scremato

Tabella 4. Risultati ANOVA (F-value e significatività) relativi ai dati di produzione e alle frazioni proteiche ottenute mediante HPLC

Carattere	DIM	Ordine di parto	Razza	RMSE ¹	Livello produttivo	HTD, % ²
Latte prodotto, kg/d	123,6***	49,2***	39,8***	4,9	71,9***	29,4
Proteina totale, g/l	57,2***	25,1***	74,9***	4,9	11,9**	10,7
Caseina totale, g/l	50,1***	29,2***	73,4***	4,3	5,56*	13,6
Sieroproteina totale, g/l	32,8***	3,6*	22,0***	1,2	32,7***	6,4
Indice caseinico totale ³	0,6 ^{ns}	8,8***	16,9***	0,03	7,6**	11,6
Frazioni proteiche, g/l						
κ-caseina	8,0***	11,4***	147,4***	0,8	8,7**	6,3
β-caseina	41,4***	34,9***	19,5***	1,7	0,93 ^{ns}	20,0
α ₁ -caseina	36,7***	25,7***	47,7***	1,5	10,2**	14,2
α ₂ -caseina	5,9***	26,0***	64,6***	0,8	3,7 ^{ns}	6,5
α-lattoalbumina	1,9 ^{ns}	19,9***	17,4***	0,14	12,6**	19,7
β-lattoglobulina	34,3***	3,0*	22,7***	1,2	26,2***	6,4

¹RMSE= root mean square error

²HTD,% = Herd/Test day, effetto espresso come proporzione della varianza spiegata dall'allevamento data controllo, calcolato dividendo il corrispondente componente di varianza per la varianza totale a parità di effetti fissi.

³ Indice caseinico = (caseina/proteina)

ns= non significativo; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Tabella 5. Medie stimate per i caratteri di produzione e composizione proteica

	Latte, kg/d	Proteina totale, g/l	Caseina totale, g/l	Sieroproteina totale, g/l	Indice caseinico ¹
Razza					
Bruna (BS)	22,7	45,5	38,2	7,2	0,84
Frisona (HF)	25,9	39,6	33,1	6,6	0,83
Jersey (Jer)	16,4	51,8	44,0	7,6	0,86
Pezzata Rossa (Si)	22,8	42,1	34,9	7,2	0,83
Grigia Alpina (GA)	18,5	44,0	36,8	7,0	0,84
Rendena (Ren)	21,4	39,7	34,0	5,8	0,86
Contrasti, P-value					
<i>BS+HF+Jer vs Si+GA+Ren</i>	0,1619	<0,001	<0,001	0,0003	0,2022
<i>BS+HF vs Jer</i>	<0,001	<0,001	<0,001	0,0026	<0,001
<i>BS vs HF</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>Si vs GA+Ren</i>	<0,001	0,6608	0,3904	<0,001	<0,001
<i>GA vs Ren</i>	0,0028	<0,001	0,0007	<0,001	<0,001
DIM, d					
5-65	25,5	40,7	34,3	6,3	0,84
65-125	24,9	41,4	34,9	6,5	0,84
125-185	22,6	42,9	36,2	6,7	0,84
185-245	20,6	44,7	37,6	7,1	0,84
245-305	18,2	45,6	38,3	7,2	0,84
>305	15,8	47,4	39,8	7,6	0,84
Ordine di parto					
Primipare	18,9	45,1	38,2	6,9	0,85
Secondipare	20,8	44,7	37,6	7,1	0,84
Terzipare	22,7	43,1	36,2	6,9	0,84
Quartipare e oltre	22,7	42,3	35,4	6,8	0,84
Livello produttivo					
alto	25,7	44,9	37,6	7,3	0,84
basso	16,8	42,7	36,1	6,5	0,85

¹ Indice caseinico = (caseina/proteina)

Tabella 6. Medie stimate per le frazioni proteiche¹

	κ -CN	β -CN	α_{S1} - CN	α_{S2} - CN	α -LA	β -LG
Razza						
Bruna (BS)	4,9	14,0	12,5	3,9	0,97	6,2
Frisona (HF)	3,5	12,9	11,3	3,0	0,91	5,6
Jersey (Jer)	5,8	15,4	14,8	4,6	1,04	6,4
Pezzata Rossa (Si)	3,7	13,2	12,2	3,3	0,93	6,2
Grigia Alpina (GA)	4,4	13,8	12,0	3,6	1,05	5,9
Rendena (Ren)	4,0	13,4	10,9	3,4	1,02	4,7
Contrasti, P-value						
<i>BS+HF+Jer vs Si+GA+Ren</i>	<0,001	0,0005	<0,001	<0,001	0,0439	<0,001
<i>BS+HF vs Jer</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,0002	0,0134
<i>BS vs HF</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>Si vs GA+Ren</i>	<0,001	0,1115	0,0003	0,0085	<0,001	<0,001
<i>GA vs Ren</i>	0,0143	0,2696	0,0003	0,1505	0,4604	<0,001
DIM, d						
5-65	4,1	12,7	11,6	3,6	1,00	5,2
65-125	4,3	13,1	11,6	3,5	0,99	5,4
125-185	4,5	13,6	12,0	3,6	0,98	5,7
185-245	4,6	14,1	12,5	3,7	0,98	6,0
245-305	4,4	14,4	12,8	3,7	0,99	6,1
>305	4,4	14,8	13,1	3,8	0,96	6,5
Ordine di parto						
Primipare	4,6	14,4	12,6	3,9	1,02	5,8
Secondipare	4,4	14,0	12,6	3,8	1,01	6,0
Terzipare	4,3	13,6	12,1	3,5	0,97	5,8
Quartipare e oltre	4,9	13,2	11,7	3,5	0,94	5,8
Livello produttivo						
alto	4,5	13,9	12,6	3,7	1,03	6,2
basso	4,2	13,6	11,9	3,6	0,94	5,5

¹Le frazioni proteiche sono espresse in g/l

Bibliografia

Aleandri R., Buttazzoni L. G., Schneider J. C., Caroli A., Davoli R., (1990). *The effect of milk protein polymorphism on milk components and cheese producing ability*. Journal of Dairy Science, 73:241-255.

Amenu B., Cowan T., Deeth H., Moss R., (2006). *Impacts of feeding system and season on milk composition and Cheddar cheese yield in a subtropical environment*. Australian Journal of Experimental Agriculture, 46(3):299-306.

Ana C. A., Veloso A. C. A., Teixeira N., Ferreira I. M. P. L. V. O., (2002). *Separation and quantification of the major casein fractions by reverse-phase high-performance liquid chromatography and urea-polyacrylamide gel electrophoresis Detection of milk adulterations*. Journal of Chromatography A, 967:209-218

Auldism M. J., Thomson N. A., Mackle T. R., Hil J. P., Prosser C. G., (2000). *Effects of pasture allowance on the yield and composition of milk from cows of different β -lactoglobulin phenotypes*. Journal of Dairy Science, 83:2069-2074.

Auldism M. J., Johnston K. A., White N. J., Fitzsimons W. P., Boland M. J., (2004). *A comparison of the composition, coagulation characteristics and cheesemaking capacity of milk from Friesian and Jersey dairy cows*. Journal of Dairy Research, 71(1):51-57.

Barber D. G., Gobius N., Hannah I., Poppi D. P., Cant J. P., (2002). *The effect of calving season and stage of lactation on the milk protein concentration of queensland dairy farms*. Anim. Prod. Aust. 24: 274.

Barry J. G. e Donnelly W. J., (1980). *Casein compositional studies: 1. The composition of casein from Friesian herd milks*. Journal of Dairy Research, 47(1):71-81.

Beauchemin K. A., Rode L. M., Yang W. Z., (1997). *Effects of non structural carbohydrates and source of cereal grain in high concentrate diets of dairy cows*. Journal Dairy Science, 80:1640-1650.

Bijl E., van Valenberg H. J. F., Huppertz T., van Hooijdonk A. C. M., (2013). *Protein, casein, and micellar salts in milk: Current content and historical perspectives*. Journal of Dairy Science, 96(9):5455-5464.

Bobe G., Beitz D. C., Freeman A. E., Lindberg G. L., (1998). *Separation and Quantification of Bovine Milk Proteins by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46:458-463.

Bobe G., Beitz D. C., Freeman A. E., Lindberg G. L., (1999). *Effect of milk protein genotypes on milk protein composition and its genetic parameter estimates*. Journal of Dairy Science, 82:2797-2804.

Bonato P., Disegna L., Spolaor D., (1987). *Effetto di razza ed ambiente sulle caratteristiche chimiche e reologiche dei lattici*. Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia, 38(4):327-343.

Bonfatti V., Cecchinato A., De Marchi M., Gallo L., Carnier P., (2008). *Validation of a new reversed phase high performance liquid chromatography method for separation and identification of bovine milk protein genetic variants*. Journal of Chromatography A, 1195:101-106.

Bonfatti V., Di Martino G., Cecchinato A., Vicario D., Carnier P., (2010a). *Effects of β - κ -casein (CSN2-CSN3) haplotypes and β -lactoglobulin (BLG) genotypes on milk production traits and detailed protein composition of individual milk of Simmental cows*. Journal of Dairy Science, 93(8):3797-3808.

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

Bonfatti V., Cecchinato A., Gallo L., Blasco A., Carnier P., (2011). *Genetic analysis of detailed milk protein composition and coagulation properties in Simmental cattle*. Journal of Dairy Science, 94(10):5183-5193.

Bonizzi I., Buffoni J. N., Feligini M., (2009). *Quantification of bovine casein fractions by direct chromatographic analysis of milk. Approaching the application to a real production context*. Journal of Chromatography A, 1216(1):165-168.

Bordin G., Raposo F. C., de la Calle B., Rodriguez A. R., (2001). *Identification and quantification of major bovine milk proteins by liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 928(1):63-67.

Bramanti E., Ferri F., Raspi G., Lampugnani L., Spinetti M. C., Miller K. E., Synovec R. E., (2001). *New method for separation and determination of denatured caseins by hydrophobic interaction chromatography*. *Talanta* 54(2):343-349.

Bramanti E., Sortino C., Raspi G., (2002). *New chromatographic method for separation and determination of denatured α 1-, α 2-, β - and κ -caseins by hydrophobic interaction chromatography*. *Journal of Chromatography A*, 958(1):157-166.

Bramanti E., Sortino C., Onor M., Beni F., Raspi G., (2003). *Separation and determination of denatured α 1 α 2 -, α -, β - and κ -caseins by hydrophobic interaction chromatography in cows', ewes' and goats' milk, milk mixtures and cheeses*. *Journal of Chromatography A*, 994:59-74.

Caffin J. P., Poutrel B., Rainard P., (1985). *Physiological and pathological factors influencing bovine α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin concentrations in milk*. *Journal of Dairy Science*, 68:1087-1094.

Caroli A., Bolla P., Budelli E., Barberi G., Leone P., (2000). *Effect of κ -casein E allele on clotting aptitude of Italian Fresian milk*. *Zootecnia e Nutrizione Animale*, 26:127-130.

Casati M. R., Cappa V., Calamari L., Calegari F., Folli G., (1998). *Influenza delle stagioni sulla produzione e su talune caratteristiche del latte bovino*. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casaria*, 49(1):7-25.

Christian M. P., Grainger C., Southerland B. J., Mayes J. J., Hannah M. C., (1999a). *Managing diet quality for Cheddar cheese manufacturing milk. 1. The influence of protein and energy supplements*. *Journal of Dairy Research*, 66:341-355.

Christian M. P., Grainger C., Southerland B. J., Mayes J. J., Hannah M. C., (1999b). *Managing diet quality for Cheddar cheese manufacturing milk. 2. Pasture v. grain supplements*. *Journal of Dairy Research*, 66:357-363.

Comin A., Cassandro M., Chessa S., Ojala M., Dal Zotto R., De Marchi M., Carnier P., Gallo L., Pagnacco G., Bittante G., (2008). *Effects of composite β - and κ -casein genotypes on milk coagulation, quality, and yield traits in Italian Holstein cows*. *Journal of Dairy Science*, 91(10):4022-4027.

Corradini C., (1995). *Chimica e tecnologia del latte*. Tecniche Nuove.

Coulon J. B. e Rémond B., (1991). *Variations in milk output and milk protein content in response to the level of energy supply to the dairy cow: A review*. *Livestock Production Science*, 29(1):31-47.

Coulon J. B., Pradel P., Verdier I., (1995). *Effect of forage type on milk yield, chemical composition and clotting properties of milk*. *Lait*, 75:513-521.

Coulon J. B., Hurtaud C., Remond B., Verité R., (1998). *Facteurs de variation de la proportion de caseines dans le proteines du lait de vache*. *INRA Productions Animales*, 11:299-310.

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

Cowley F. C., (2013). *Nutrition and heat stress as sources of variation in bovine milk protein and casein composition*. Supervisor: Dennis Poppi e David Barber, School of Agriculture and Food Sciences, The University of Queensland.

Davoli R., Dall'Olio S., Mariani P., Summer A., Milc J., Costa, L. N., Russo V., (2000). *Effetti della variante CSN1SIG del gene della caseina as1 sul valore riproduttivo per le caratteristiche quanti-qualitative del latte di bovine di razza bruna*. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 51(4):199-209.

Eigel W. N., Butler J. E., Ernstrom C. A., Farrell Jr. H. M., Harwalkar V. R., Janness R., Whitney R. M., (1984). *Nomenclature of proteins of cow's milk: fifth revision*. *Journal of Dairy Science*, 67:1599-1631.

Farrell H. M., Jimenez-Flores R., Bleck G. T., Brown E. M., Butler J. E., Creamer L. K., Hicks C. L., Hollar C. M., Ng-Kwai-Hang K. F., Swaisgood H. E., (2004). *Nomenclature of the proteins of cows' milk*. 6th revision, *Journal of Dairy Science*, 87:1641-1674.

Gagnaire V., Pierre A., Molle D., Leonil J., (1996). *Phosphopeptides interacting with colloidal calcium phosphate isolated by tryptic hydrolysis of bovine casein micelles*. *Journal of Dairy Research*, 63(3):405-422.

Groen A. F., van der Vegt R., van Boekel M. A. J. S., de Rouw O. L. A. M., Vos H., (1994). *Case study on individual animal variation in milk protein composition as estimated by high-pressure liquid chromatography*. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 48:201-212.

Grosclaude F., (1988). *Le polymorphisme génétique des principales lactoprotéines bovines. Relations avec la quantité, la composition et les aptitudes fromagères du lait*. INRA Prod. Anim., 1(1):5-17.

Hallén E., Wedholm A., Andrén A., Lundén A., (2008). *Effect of β -casein, κ -casein and β -lactoglobulin genotypes on concentration of milk protein variants*. Journal of Animal Breeding and genetics, 125(2):119-129.

Hansen J. V., Friggens N. C., Højsgaard S., (2006). *The influence of breed and parity on milk yield, and milk yield acceleration curves*. Livestock Science, 104(1):53-62.

Heck J. M. L., Schennink A., van Valenberg H. J. F., Bovenhuis H., Visker M. H. P. W., van Arendonk J. A. M., van Hooijdonk A. C. M., (2009). *Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk*. Journal of Dairy Science, 92(3):1192-1202.

Hollar C. M., Law A. J. R., Daghleish D. G., Medrano J. F., Brown R. J., (1991). *Separation of casein A₁, A₂, and B using cation-exchange fast protein liquid chromatography*. Journal of Dairy Science, 74(10):3308-3313.

Huang W., Peñagaricano F., Ahmad K. R., Lucey J. A., Weigel K. A., Khatib H., (2012). *Association between milk protein gene variants and protein composition traits in dairy cattle*. Journal of Dairy Science, 95(1):440-449.

Ikonen T., Ahlfors K., Kempe R., Ojala M., Ruottinen O., (1999). *Genetic parameters for the milk coagulation properties and prevalence of noncoagulating milk in Finnish Dairy cows*. Journal of Dairy Science, 82:205-214.

Jann O. C., Ibeagha-Awemu E. M., Ozbeyaz C., Zaragoza P., Williams J. L., Ajmone-Marsan P., Lenstra J. A., Moazami-Goudarzi K., Erhardt G., (2004). *Geographic distribution of haplotype diversity at the bovine casein locus*. Genetics Selection Evolution, 36(2):1-15.

Jensen H. B., Holland J. W., Poulsen N. A., Larsen L. B., (2012a). *Milk protein genetic variants and isoforms identified in bovine milk representing extremes in coagulation properties*. Journal of Dairy Science, 95(6):2891-2903.

Jensen H. B., Poulsen N. A., Andersen K. K., Hammershøj M., Poulsen H. D., & Larsen L. B. (2012b). *Distinct composition of bovine milk from Jersey and Holstein-Friesian cows with*

good, poor, or noncoagulation properties as reflected in protein genetic variants and isoforms. Journal of Dairy Science, 95(12):6905-6917.

Kim H.-H. Y., Jimenez-Flores R., (1994). *Comparison of milk proteins using preparative isoelectric focusing followed by polyacrylamide gel electrophoresis.* Journal of Dairy Science, 77(8):2177-2190.

Kroeker E. M., Ng-Kwai-Hang K. F., Hayes J. F., Moxley J. E., (1985). *Effects of environmental factors and milk protein polymorphism on composition of casein fraction in bovine milk.* Journal of Dairy Science, 68:1752-1757.

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

Lodes A., Krause I., Buchberger J., Aumann J., Klostermeyer H., (1996). *The influence of genetic variants of milk proteins on the compositional and technological properties of milk: rennet coagulation time and firmness of the rennet curd.* Milchwissenschaft, 51:543-548.

Mackle T.R., Bryant A.M., Petch S.F., Hill J.P., Auldist M.J., (1999a). *Nutritional influences on the composition of different protein phenotypes in New Zealand.* Journal of Dairy Science, 82:172-180.

Mackle T. R., Bryant A. M., Petch S. F., Hooper R. J., Auldist M. J., (1999b). *Variation in the composition of milk protein from pasture-fed dairy cows in late lactation and the effect of grain and silage supplementation.* New Zealand Journal of Agricultural Research, 42:147-154.

Malacarne M., Summer A., Formaggioni P., Mariani P., (2001). *Ripartizione percentuale delle caseine di inizio e di fine lattazione in vacche di razza Frisone Italiana.* Scienza e Tecnica Lattiero Casearia, 52(3):185-193.

Mariani P., (1975). *Ripartizione delle proteine del latte nelle razze Frisone, Bruna alpina, Reggiana e Modenese.* Rivista di Zootecnia e Veterinaria, 3:13-35.

Mariani P., (1985). *Osservazioni sull'indice di caseina del latte di vacche frisone.* Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia, 36(3):191-209.

- Mariani P. e Pecorari M., (1991). *Il ruolo delle varianti genetiche della k-caseina nella produzione del formaggio*. *Scienza e Tecnica Lattiero-casearia*, 42(4):255-285.
- Mariani P., Zanzucchi G., Monatti P., Fossa E., Pecorari M., (1992). *Caratteristiche di coagulazione del latte in rapporto al tipo genetico della β -caseina in vacche di razza Bruna*. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 43:7-17.
- Mariani P., Summer A., Anghinetti A., Senese C., Di Gregorio P., Rando A., Serventi P., (1995). *Effetti dell'allele a s1-Cn G sulla ripartizione percentuale delle caseine a s1, a s2, b e k in vacche di razza Bruna*. *L'Industria del Latte*, 31(4):3-13.
- Mariani P., Serventi P., Fossa E., (1997a). *Contenuto di caseina, varianti genetiche ed attitudine tecnologico-casearia del latte delle vacche di razza bruna nella produzione del formaggio grana*. *Allegato a La Razza Bruna Italiana*, 2:8-14.
- Mariani P., Summer A., Zanzucchi G., Fieni S., (1997b). *Relazione tra la consistenza del coagulo –valutata con differenti criteri mediante Formagraph- e il contenuto di caseina nel latte*. *Annali facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Parma, Vol. XVIII*.
- Mariani P., Summer A., Franchetti M., Vecchia P., Fossa E. (1998a). *Ripartizione percentuale delle caseine in latti di massa delle vacche di razza Frisona, Bruna, Reggiana e Modenese*. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 49:181-192.
- Mariani P., Summer A., Formaggioni P., Beltrami A., Sandri S., (1998b). *Andamento mensile delle principali caratteristiche di coagulazione del latte di singoli allevamenti di vacche di razza Frisona con particolare riguardo alla velocità di formazione del coagulo*. *Annali Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Parma*, 18:65-83.
- Mariani P. e Summer A., (1999). *Polimorfismo delle proteine ed attitudine tecnologica del latte*. *L'industria del Latte*, 22(1):35-58.
- Mariani P., Summer A., Formaggioni P., Malacarne M., (2002). *La qualità casearia del latte di differenti razze bovine*. *La Razza Bruna*, 1:7-13.
- Martin P., Szymanowska M., Zwierzchowski L., Leroux C., (2002). *The impact of genetic polymorphisms on the protein composition of ruminant milks*. *Reproduction Nutrition Development*, 42(5):433-459.

Maurmayr A., (2014). *Analysis of milk protein composition in crossbred and purebred dairy cows*. Supervisore: dott. Alessio Cecchinato, dip. Di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente, scuola di dottorato di ricerca in scienze animali e agroalimentari, Università degli Studi di Padova, Legnaro.

Merlin P., Di Stasio L., (1982). *Study on milk proteins loci in some decreasing Italian cattle breeds*. *Annales de Genetique et de Selection Animale*, 14(1):17-28. EDP Sciences.

Miralles B., Rothbauer V., Manso M. A., Amigo L., Krause I., Ramos M., (2001). *Improved method for the simultaneous determination of whey proteins, caseins and para- κ -casein in milk and dairy products by capillary electrophoresis*. *Journal of Chromatography A*, 915:225-230.

Miralles B., Leaver J., Ramos M., Amigo L., (2003). *Mass mapping analysis as a tool for the identification of genetic variants of bovine β -casein*. *Journal of Chromatography A*, 1007(1):47- 53.

Miralles B., Krause I., Ramos M., Amigo L., (2006). *Comparison of capillary electrophoresis and isoelectric focusing for analysis of casein/caseinate addition in processed cheeses*. *International Dairy Journal*, 16:1448-1453.

Mollé D., Jardin J., Piot M., Pasco M., Léonil J., Gagnaire V., (2009). *Comparison of electrospray and matrix-assisted laser desorption ionization on the same hybrid quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometer: Application to bidimensional liquid chromatography of proteins from bovine milk fraction*. *Journal of Chromatography A*, 1216(12):2424-2432.

Ng-Kwai-Hang K. F., Hayes J. F., Moxley J. E., Monardes H. G., (1984). *Association of genetic variants of casein and milk serum proteins with milk, fat, and protein production by Dairy cattle*. *Journal of Dairy Science*, 67:835-840.

Ng-Kwai-Hang K. F. e Kroeker E. M., (1984). *Rapid separation and quantification of major caseins and whey proteins of bovine milk by polyacrylamide gel electrophoresis*. *Journal of Dairy Science*, 67:3052-3056.

Ng-Kwai-Hang K. F., Hayes J. F., Moxley J. E., Monardes H. G., (1986). *Relationships between milk protein polymorphisms and major milk constituents in Holstein-Friesian cows*. *Journal of Dairy Science*, 69:22-26.

Ng-Kwai-Hang K. F., Hayes J. F., Moxley J. E., Monardes H. G., (1987). *Variation in milk protein concentrations associated with genetic polymorphism and environmental factors*. Journal of Dairy Science, 70:563-570.

Ng-Kwai-Hang K. F. (1998). *Genetic polymorphism of milk proteins: relationship with production traits, milk composition and technological properties*. Canadian Journal of Animal Science, 78:131-147.

Ostensen S., Foldager J., Hermansen J., (1997). *Effects of stage of lactation, milk protein genotype and body condition at calving on protein composition and renneting properties of bovine milk*. Journal of Dairy Research, 64(2):207-219.

Prinzenberg E. M., Krause I., Erhardt G., (1999). *SSCP analysis at the bovine CSN3 locus discriminates six alleles corresponding to known protein variants (A, B, C, E, F, G) and three new DNA polymorphisms (H, I, AI)*. Animal Biotechnology, 10(1-2):49-62.

Rémond B., (1985). *Influence de l'alimentation sur la composition du lait de vache. 2. Taux proteique: facteurs generaux*. Bulletin Technique Centre de Recherches Zootechniques et Veterinaires de Theix, INRA 62:53-67.

Russo V. e Mariani P., (1978). *Polimorfismo delle proteine del latte e relazioni tra varianti genetiche e caratteristiche di interesse zootecnico, tecnologico e caseario. Pt. 1 e 2*. Zootecnia e Veterinaria, 6(5):289-304; 6(6):365-379.

Sforza S., Ferroni L., Galaverna G., Dossena A., Marchelli R., (2003). *Extraction, semi-quantification, and fast on-line identification of oligopeptides in Grana Padano cheese by HPLC-MS*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(8):2130-2135.

Skelte G. A., (2009). *The use of 'lab-on-a-chip' microfluidic SDS electrophoresis technology for the separation and quantification of milk proteins*. International Dairy Journal 19:198-204.

Stinnakre M. G., Vilotte J. L., Soulier S., Mercier J. C., (1994). *Creation and phenotypic analysis of α -lactalbumin-deficient mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 91(14):6544-6548.

Strickland M., Broadbent J. R., (1996). *Capillary electrophoresis of Cheddar cheese*. Journal of Chromatography A, 731:305-313.

Summer A., Malacarne M., Formaggioni P., Fieni S., Vecchia P., Mariani P., (2002). *Casein number variability and distribution of the differences between calculated casein (crude protein x 0.77) and Kjeldahl casein in 696 herd milk samples*. *Milchwissenschaft*, 57(5):253-255.

Swaisgood H. E. e Brunner J. R., (1973). *The caseins*. *CRC Critical Reviews in Food Technology*, 3:375-414.

Tsiaras A. M., Bargouli G. G., Banos G., Boscós C. M., (2005). *Effect of Kappa-Casein and Beta-Lactoglobulin Loci on Milk Production Traits and Reproductive Performance of Holstein Cows*. *Journal of Dairy Science*, 88:327-334.

Varisco G., Bolzoni G., Cornoldi M., (2004). *La caseina. La determinazione della caseina nel latte per la qualità delle trasformazioni casearie*. Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "B. Ubertini", regione Lombardia Agricoltura.

Visser S., Slangen C. J., Rollema H. S., (1991). *Phenotyping of bovine milk proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography*. *Journal of Chromatography A*, 548:361-370.

Visser S., Slangen C. J., Lagerwerf F. M., Van Dongenb W. D., Haverkamp J., (1995). *Identification of a new genetic variant of bovine β -casein using reversed-phase high-performance liquid chromatography and mass spectrometric analysis*. *Journal of Chromatography A*, 711(1):141-150.

Wedholm A., Larsen L. B., Lindmark-Månsson H., Karlsson A. H., Andrén A., (2006). *Effect of protein composition on the cheesemaking properties of milk from individual dairy cows*. *Journal of Dairy Science*, 89:3296-3305.

Zambrano-Burbano G. L., Eraso-Cabrera Y. M., Solarte-Portilla C. E., Rosero-Galindo C.Y., (2012). *Relationship between kappa casein genes (CSN3) and industrial yield in Holstein cows in Nariño-Colombia*. In *Milk Protein*, ed. Walter L. Hurley, chapter 10:265-282.

Sitografia

CLAL, www.clal.it

ISMEA, Istituto di Servizi per il Mercato Agricolo Alimentare, www.ismeaservizi.it

Ringraziamenti

Il Grazie più grande va ai miei genitori, per avermi permesso di portare a termine questo percorso, mostrandosene sempre entusiasti e fieri, e per la gioia che mettono nell'aiutarmi a perseguire i miei obiettivi.

Un grazie anche a mia zia Donatella, per le risate, le chiacchiere sul futuro e l'incoraggiamento. Per l'esempio di forza che sono, ringrazio di cuore mia zia Monica, Anna, Massimo e Francesca.

Un ringraziamento speciale a Riccardo, che mi spinge a sognare, a pensare in grande e a superare limiti che forse solo io credo di avere.

Ringrazio tutti gli Amici che da tanti anni mi accompagnano nella vita, supportandomi e sopportandomi in ogni occasione. Non siete tanti, ma siete "buoni".

Vi voglio bene.