



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA

Corso di laurea triennale in sicurezza igienico- sanitaria degli alimenti

TESI DI LAUREA

Influenza dell'alpeggio sulle vitamine liposolubili nei prodotti lattiero- caseari

Relatore: Dr. Severino Segato

Correlatori: Dr.ssa Stefania Balzan

Dr.ssa Cristina Tutta

Laureanda: Arianna Ferracin

ANNO ACCADEMICO 2006-2007

INDICE

1. INTRODUZIONE	pag 1
1.1 LE VITAMINE	
1.1.2 LA STORIA DELLE VITAMINE	
1.1.3 CLASSIFICAZIONE	4
1.2 LE VITAMINE LIPOSOLUBILI	
1.3 LE VITAMINE IDROSOLUBILI	23
1.4 L'ALPEGGIO	
1.4.1 LA REALTÀ DELLE MALGHE	30
1.4.2 LA TIPICITÀ DELLE PRODUZIONI D'ALPEGGIO	
1.4.3 FATTORI CHE INFLUISCONO SULLA COMPONENTE QUANTI- QUALITATIVA DEL LATTE IN ALPEGGIO	32
1.4.4 PARAMETRI PER DEFINIRE LA QUANTITÀ E LA QUALITÀ DEL LATTE, CON PARTYICOLARE RIFERIMENTO ALL'INFLUENZA DELLA FASE DI ALPEGGIO	34
1.5 IL FORMAGGIO	40
1.5.1 L'ASIAGO	
2. OBIETTIVO	45
3. MATERIALI E METODI	47
3.1 PERIODO DI SPERIMENTAZIONE E MALGHE COINVOLTE	48
3.2 CAMPIONAMENTO	
3.2.a PASCOLO	
3.2.b LATTE	49
3.2.c FORMAGGIO	50
3.3 ANALISI STATISTICA	52
3.3.1 DETERMINAZIONE DELLA VITAMINA E NEL FORAGGIO	53
3.3.2 DETERMINAZIONE DELLE VITAMINE A ED E NEL LATTE	
3.3.3 DETERMINAZIONE DELLE VITAMINE A ED E NEL FORMAGGIO	54
3.4 ANALISI STATISTICA	55

4. RISULTATI E DISCUSSIONE	59	
4.1 COMPOSIZIONE CENTESIMALE DEL PASCOLO E CONTENUTO IN VITAMINE LIPOSOLUBILI DEL LATTE.		
4.2. COMPOSIZIONE QUALITATIVA, IGIENICO-SANITARIA E ATTITUDINE CASEARIA DEL LATTE.		64
4.3 COMPOSIZIONE VITAMINICA E CENTESIMALE DEL FORMAGGIO	67	
5. CONCLUSIONI	75	
6. TABELLE	77	
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	83	

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1 LE VITAMINE

Le vitamine sono sostanze organiche di diversa natura chimica necessarie in piccole quantità per lo svolgimento del metabolismo cellulare, e quindi indispensabili per la crescita e il mantenimento delle funzioni vitali.

Questi composti devono essere introdotti dall'esterno perché non sintetizzabili dall'organismo, per cui la loro assunzione avviene con l'alimentazione. Gli alimenti sono buone fonti di vitamine, tuttavia non esiste un alimento che le contenga tutte.

I microrganismi sono capaci di sintetizzare parecchie vitamine idrosolubili e alcune liposolubili.

Le vitamine, necessarie per il normale funzionamento del nostro organismo, non vengono direttamente utilizzate a scopo energetico e la mancanza di una vitamina nella dieta o la presenza di fattori che ne riducono la biodisponibilità è causa di malattie caratterizzate da sindromi carenziali specifiche che generalmente regrediscono o con la somministrazione della vitamina mancante o dell'alimento che la contiene.

Le vitamine si distinguono in base alla loro solubilità in *idrosolubili* “complesso B”(B1, B2, B6, B12, PP, acido pantotenico, acido folico e biotina) e *liposolubili* (vitamina A, D, E, K)

1.1.2 LA STORIA DELLE VITAMINE

All'inizio del secolo corrente, la ricerca scientifica in materia di nutrizione era ancora impegnata

soprattutto nello studio degli idrati del carbonio, dei grassi e delle proteine (rispettivamente glicidi, lipidi e protidi nella nomenclatura moderna). Si riteneva che tali sostanze, in adeguate proporzioni ed addizionate di minerali quali il ferro e il calcio, fossero sufficienti a soddisfare tutti i bisogni dell'organismo. Questa semplicistica concezione della nutrizione continuò ad essere accettata finché non si affermò definitivamente l'idea della presenza, nelle derrate alimentari non sottoposte a manipolazioni sofisticatrici, di sostanze sconosciute, indispensabili per il mantenimento dei processi vitali. E' ammissione generale dei ricercatori che lo sviluppo delle nostre cognizioni sulle vitamine si sia realizzato con tanto ritardo nella storia degli studi sulla dietetica per il fatto che tali sostanze sono presenti negli alimenti in quantità piccolissime. Bisogna tuttavia riconoscere che il punto di partenza di queste cognizioni risale a oltre due secoli addietro, quando comparve (1753) il *Trattato sullo scorbuto* di Lind, al lume delle cui rivelazioni i medici della marina militare britannica riuscirono a far compiere alla flotta un viaggio di 23 settimane senza un solo caso di scorbuto a bordo, grazie alla somministrazione quotidiana di succo di limone. Fu questa, si può dire, la scoperta di una malattia da carenza e della sostanza atta a prevenirla, "una sostanza- come scriveva Lind- che né la medicina, né la chirurgia, né la fisica sono in grado di procurare". Ma bisognò aspettare fino al 1921 per vedere tale sostanza classificata come vitamina C, dopo le ricerche sperimentali di Holst e Frohlich (1907) e le ipotesi di Funk (1912) sulla presenza di questa sostanza sulle piante verdi e nella frutta fresca.

Per la storia vale la pena ricordare le antiche constatazioni fatte da Lunin (1881) e dagli italiani Coppola (1890) e Pasqualis (1896), i quali ammettevano l'esistenza negli alimenti naturali, come ad esempio nel latte, di speciali principi necessari per l'equilibri metabolico, e diversi a seconda della sostanza alimentare; nonché le fondamentali osservazioni di Eijkman fatte nel 1897, il quale, trovandosi in Giappone, notò che il beri- beri, malattia endemica di alcune regioni dell'estremo oriente(Giappone, Malesia, India, ecc.) si manifestava solo negli individui che facevano uso di riso brillato, mentre ne restavano immuni coloro che utilizzavano riso grezzo.

In seguito, sperimentando sui piccioni, egli notò che gli animali nutriti con riso decorticato venivano affetti da una polinevrite che dava luogo ad una paralisi delle gambe e delle ali, seguita da una contrazione dei muscoli del collo e infine dalla morte dell'animale. Gli animali nutriti invece con riso grezzo conservavano ottima salute, e quelli che presentavano sintomi della malattia guarivano completamente quando veniva loro somministrato del riso grezzo. Da ciò ne traeva la conseguenza che tra l'alimentazione con il riso decorticato e il beri- beri esisteva uno stretto rapporto.

Ricordiamo anche lo Stefano, che nel 1910 emise l'ipotesi che la pellagra fosse dovuta da assenza

nella dieta maidica di qualcosa di imponderabile ma pur necessario all'organismo. Anche Rondoni (1914 e 1915), adoperandosi ad approfondire lo studio delle alterazioni istologiche e tentando di differenziarle da quelle dello scorbuto, metteva in luce le lesioni degli organi endocrini descrivendo minutamente quelle del surrene ipertrofico.

Le classiche esperienze si debbono però ad Hopkins il quale nel 1912 sottopose ad un regime dietetico speciale 16 topi dello stesso peso, dividendoli in 2 gruppi. Al primo gruppo somministrò: caseina esaurita con alcool, amido, zucchero, sugna e sali inorganici (Regime 1); agli animali del secondo gruppo aggiunse al suaccennato regime 3cc di latte al giorno, per ogni animale (Regime 2). Egli notò subito che il primo gruppo, tenuto a dieta senza latte subiva immediatamente l'arresto dello sviluppo; gli animali del secondo gruppo invece continuavano a crescere regolarmente e dopo 18 giorni erano quasi raddoppiati di peso. Togliendo il latte a questi e somministrandolo a quelli tenuti a dieta senza latte, essi riprendevano immediatamente a crescere, mentre gli altri deperivano. Hopkins avanzò quindi l'ipotesi che il latte contenesse una o più sostanze necessarie alla vita dell'organismo animale, il quale non è capace di fabbricarle.

A queste sostanze ancora non identificate diede il nome di *fattori accessori all'alimentazione*.

Queste sostanze erano in seguito riconosciute a quelle che Funk aveva un anno prima chiamate *vitamine*.

Una delle caratteristiche principali di questi corpi è la facoltà che l'organismo non è capace a sintetizzarle, ma è necessario che queste siano introdotte nell'organismo nel loro stato definito o sotto forma di uno stato preliminare, che costituisce allora la *pro-vitamina*.

I risultati di questi esperimenti gli permisero di affermare che "nessun animale può vivere con una miscela pura di proteine, grassi e idrati di carbonio, la quale non è sufficiente per il mantenimento dei processi vitali". Donde la conclusione che negli alimenti devono esservi alcune sostanze in più dei componenti già noti, sostanze che l'organismo è incapace di sintetizzare e che perciò bisogna ingerire con la dieta, se non si vuole assistere all'insorgenza di quelle manifestazioni morbose classificate come malattie da carenza vitaminica o avitaminosi. A queste sostanze che vennero poi identificate con quelle che Funk aveva denominato *vitamine*, e sebbene Hopkins diede il nome di "fattori accessori dell'alimentazione", il termine di *vitamina* è quello che più si è affermato fino ad essere generalmente adottato, anche se per alcune delle sostanze che compongono il gruppo delle *vitamine* esso non è appropriato, data la assenza di azoto nella loro molecola (si sa che le amine sono dei composti organici dall'azoto). Le *vitamine* sono dunque dei composti organici, essenziali in piccole quantità per le funzioni vitali, che l'organismo non è in grado di produrre e che pertanto

devono essere assunti con gli alimenti o forniti dalla flora batterica intestinale, che non forniscono energia attraverso il loro metabolismo. Si deve tener presente che gli alimenti contengono anche altri nutrienti, ad esempio gli aminoacidi e taluni acidi grassi polinsaturi contraddistinti dall'aggettivo "essenziali" che, a differenza delle vitamine, devono essere introdotti in quantità notevolmente superiori e che vengono anche utilizzati a fini energetici. Ciò che caratterizza le vitamine, in particolare quelle idrosolubili, rispetto agli altri nutrienti è la funzione che svolgono a livello metabolico come coenzima o come gruppo prostetico di proteine.

Le singole vitamine vennero inizialmente contrassegnate con le lettere dell'alfabeto, ma si scoprì ben presto che le sostanze individuate risultavano essere composte da diversi costituenti appartenenti allo stesso gruppo, e si dovette quindi ricorrere all'uso di cifre aggiunte alle lettere come deponenti, donde la tendenza attuale di fare più spesso uso di altre denominazioni (tiamina per la vitamina B1, tocoferolo per la E, acido ascorbico per la C, ecc.). Comunque, non tutte le vitamine sono richieste per ciascun organismo animale: una sostanza che è vitamina per una data specie può non esserlo per un'altra. Ad esempio, l'acido ascorbico non è un nutriente essenziale per la maggior parte degli animali, in quanto viene prodotto dal metabolismo del glucosio, mentre ha funzione vitaminica per l'uomo, i primati, la cavia, il pipistrello indiano, in quanto questi organismi sono carenti, per difetto genetico, dell'enzima *gulonolattone-ossidasi* che è implicato nella biosintesi dell'acido ascorbico. Similmente, l'acido *p-aminobenzoico* (PABA) è essenziale per l'accrescimento di alcuni microrganismi, dei pulcini e dei ratti, mentre nell'uomo non sono mai stati descritti casi di carenza alimentare.

1.1.3 CLASSIFICAZIONE

Per quanto riguarda la classificazione, le vitamine sono classificate dalla maggior parte degli Autori, in due grandi categorie: *vitamine idrosolubili* (vitamina C e vitamine del gruppo B) e *vitamine liposolubili* (A, D, E, K).

Le vitamine liposolubili possono essere immagazzinate nel corpo.

Una quantità eccessiva di vitamine liposolubili si accumula al fine di provvedere a eventuali successivi fabbisogni; tuttavia, può indurre livelli tossici in aree di deposito quali il fegato e condurre a problemi potenzialmente pericolosi nel lungo termine.

Le vitamine idrosolubili non possono essere immagazzinate nel corpo in quanto solubili nei liquidi cellulari, vengono quotidianamente eliminate con le urine. La quantità necessaria quotidiana deve essere perciò fornita giornalmente da una adeguata alimentazione.

1.2 LE VITAMINE LIPOSOLUBILI

VITAMINA A

Storia

Dobbiamo risalire a una prima importante osservazione fatta nel 1896 dal medico giapponese Inouje, in cui si riferisce che molti bambini, tra il secondo e il terzo anno d'età, da lui visitati venivano affetti da una strana malattia agli occhi. I grandi e lucenti occhi neri dei piccoli giapponesi perdevano a poco a poco la loro caratteristica lucentezza e si opacavano: il tessuto connettivo, in seguito, si sfaldava seccandosi, portando in breve tempo quei bambini alla cecità.

In seguito, un'altra osservazione degna di nota, e dello stesso Inouje, riportava che mentre nell'interno Giappone la malattia assumeva allarmanti proporzioni, nelle regioni litoranee tutti i bambini rimanevano immuni da tale forma morbosa. D'altra parte veniva notato che i bambini guarivano facilmente se ad essi veniva somministrato del fegato di pollo. Così, quelli che vivevano sulla costa erano invece immuni perché mangiavano spesso fegato o carne d'anguilla, oppure anche del burro.

Fu durante la prima guerra mondiale che questa malattia, ancora sconosciuta nel nostro continente, si presentò anche in Europa.

Il burro della Danimarca, durante la prima guerra mondiale, divenne un articolo prezioso e ricercato da indurre i danesi a cedere quasi integralmente la loro produzione ai consumatori dei paesi belligeranti, che lo pagavano ad alto prezzo, e dato che la Danimarca era produttrice di grandi quantitativi di margarina, pensarono che questo succedaneo del burro potesse sostituire facilmente l'alimento stesso. Fu così, che qualche tempo dopo i bambini danesi, abituati a nutrirsi con forti quantità di burro, manifestarono i primi sintomi dei disturbi visivi già lamentati dai piccoli giapponesi. Si era nel 1917.

Contemporaneamente nei vari fronti di guerra questi sintomi fecero pure la loro apparizione, specialmente su quei soldati che non ricevevano i pacchi contenenti quei viveri casalinghi inviati dalle loro famiglie.

I medici chiamati in causa misero in rapporto questo fatto con gli esperimenti di Stepp del 1909, e

riuniti più tardi in volume (Stepp,1941), dove si designava col nome di *fattore di crescita liposolubile* una sostanza che assicurava la regolare crescita degli animali e nello stesso tempo impediva l'apparizione di certi sintomi patologici come la xeroftalmia ed il rachitismo, sostanza che doveva certamente essere contenuta nel burro.

Oltre a ciò, venivano presi in considerazione anche gli esperimenti che Hopkins nel 1912 fece sul latte, in cui designava col nome di *fattore accessorio alla crescita* una certa sostanza ivi contenuta.

Si pensò quindi che somministrando del burro o del latte fresco ai soldati ammalati si sarebbe riuscito in breve tempo a guarirli completamente. Cosa che infatti avvenne.

Nel 1913 E.V. McCollum e M. Davis dimostrarono che nel burro e nel tuorlo d'uovo è contenuto un fattore liposolubile essenziale per la crescita dei ratti. Nel 1916 McCollum indicava tale fattore con la lettera A, mentre con la lettera B raggruppava gli altri fattori essenziali idrosolubili. Nel 1917 Drummond dimostrò che nei bambini la carenza del fattore liposolubile A determinava disturbi sia della crescita che del processo visivo. La relazione esistente tra l'insorgenza di disturbi visivi (cecità crepuscolare) e una nutrizione non adeguata è nota sin dai tempi degli antichi egizi, com'è testimoniato dal papiro d'Eber (1500 a.C. ca.).

Nel 1920 Drummond chiamò i due fattori di McCollum 'vitamina A' e 'vitamina B' e propose di utilizzare le successive lettere dell'alfabeto per ulteriori fattori nutrizionali essenziali. Nello stesso anno si osservò che il β -carotene possiede attività vitaminica A e nel 1929 se ne capì il motivo quando P.van Euler e P. Karrer dimostrarono che nei ratti il b-carotene è convertito in vitamina A (Von Heuler,1928; Von Heuler e Karrer 1931). nei primi anni trenta Karrer identificò la struttura dei carotenoidi e della vitamina A, mettendo in evidenza la stretta relazione esistente tra questi due gruppi di sostanze (Von Heuler e Karrer,1938).

Tra il 1934 e il 1935 G. Wald isolò dalla retina una sostanza coinvolta nel meccanismo della visione e nel 1944 R.A. Morton dimostrò che questa sostanza è la forma aldeidica della vitamina A, che per questo motivo ha ricevuto il nome di "retinaldeide". Nel 1946 J.F. Arens e D.A. van Dorp ottennero per sintesi un'altra forma della vitamina A: l'acido retinico. Nel 1968 D.S. Goodman *et al.* isolarono una proteina in grado di legare e trasportare il retinolo (RBP). Sebbene il ruolo della vitamina A nel promuovere la crescita e la differenziazione cellulare sia noto da tempo, i meccanismi biochimici della vitamina A o Retinolo è costituita da un anello che stanno alla base di questo processo sono rimasti sconosciuti fino al 1987, quando M. Petkovic ha isolato proteine recettoriali nucleari che in seguito al legame con l'acido retinico regolano l'espressione genica.

Nomenclatura e struttura chimica

Con il termine retinoidi vengono indicati gli analoghi del retinolo sia naturale che di sintesi: sono stati identificati circa 1500 diversi retinoidi. Il termine “vitamina A” viene utilizzato per indicare i retinoidi che possiedono l’attività biologica del retinolo. In natura la vitamina A è presente in tre forme: alcool (retinolo), aldeide (retinale), e acido (retinico). La molecola della vitamina A o Retinolo è costituita da un anello β -iononico e da una catena laterale isoprenoide coniugata terminante con un gruppo alcolico primario, la catena laterale ha quattro doppi legami e teoricamente sono possibili dodici stereoisomeri. Il retinolo nella forma tutto *trans* (vitamina A1) è il retinoide che possiede la più elevata attività biologica; la forma 11- *cis* della retineldeide è coinvolta nel processo visivo; le forme tutto *trans* e 9 -*cis* dell’acido retinico sono coinvolte nella regolazione dell’espressione di determinati geni.

I carotenoidi sono pigmenti di origine vegetale: ne sono stati identificati circa 600. Quelli presenti in quantità apprezzabili nell’organismo sono il β -carotene, l’ α -carotene, la luteina, la zeaxantina, la criptoxantina e il licopene. L’ α - e il β - carotene e la criptoxantina possono essere convertiti nell’organismo in vitamina A.

L’esposizione alla luce e il calore determinano isomerizzazione dei retinoidi e dei carotenoidi in soluzione (Cestaro *et al.*, 2006).

Nomi comunemente usati: Vitamina A, Axeroftolo, anti- xeroftalmica, vitamina di crescita.

Formula bruta e peso molecolare: C₂₀ H₂₉-OH=286,44 (Cocchi *et al.*, 2005).

Fonti alimentari

La vitamina A si trova esclusivamente negli alimenti di origine animale, le maggiori quantità si trovano nel fegato, ma anche il latte, le uova i formaggi, il burro e i pesci ne contengono quantitativi apprezzabili.

Nei vegetali sono presenti i carotenoidi, precursori della vitamina A, sono dei pigmenti ampiamente distribuiti in natura: alcuni carotenoidi partecipano al processo fotosintetico e pertanto si trovano nei tessuti vegetali e nei microrganismi fotosintetizzanti. I carotenoidi in oltre, sono responsabili della colorazione giallo-arancione di determinati tessuti vegetali. Particolarmente ricchi sono quindi frutti e gli ortaggi di colore giallo-arancione e gli ortaggi a foglia (Cestaro *et al.*, 2006).

Fonti alimentari più ricche di vitamina A

Alimento	Retinolo- mcg per 100g
-----------------	-------------------------------

Olio di fegato di merluzzo	18000- 30000
Fegato	1500- 18000
Carote	1000- 3500
Albicocche	75- 580
Formaggio	90- 420

Modificato da (Alimenti e salute, 2005).

Metabolismo

Assorbimento. Il Retinolo introdotto come tale e quello derivato dall'idrolisi ad opera degli enzimi pancreatici dei suoi esteri con gli acidi grassi viene assorbito nell'intestino tenue con un meccanismo di trasporto mediato attivo. All'interno delle cellule della mucosa intestinale il Retinolo viene di nuovo esterificato a palmitato e incorporato in chilomicroni. Questi ultimi passano nella linfa e quindi, tramite la vena porta arrivano al fegato che rappresenta l'organo di riserva; infatti oltre il 90% della vitamina A dell'organismo è presente in questo tessuto. All'interno dell'epatocita i chilomicroni sono degradati da enzimi lisosomiali e gli esteri del Retinolo liberati sono a loro volta idrolizzati a livello della membrana; il Retinolo si lega poi a una proteina specifica, la RBPc (proteina citoplasmatica legante il Retinolo) che lo trasporta verso i siti cellulari di deposito, i lipociti, dove viene di nuovo esterificato con l'acido palmitico.

Distribuzione dei tessuti. Quando richiesto il Retinolo viene rilasciato dal fegato e trasportato ad altri tessuti: gli esteri sono idrolizzati da una retinilestere idrolasi e il Retinolo liberato dopo essersi legato ad un'altra proteina specifica, la RBPp (proteina plasmatica legante il Retinolo) passa nel sangue. L'unione del Retinolo alla RBPp è indispensabile per consentire la sua veicolazione in un ambiente acquoso qual è il sangue e nello stesso tempo per proteggerlo dall'ossidazione.

Nel sangue circa il 95% del complesso RBPp-Retinolo si lega a sua volta a un'altra proteina, la transtiretina (TTR) nel rapporto 1:1. Questa seconda proteina ha il duplice ruolo di stabilizzare l'interazione del retinolo con RBPp e di impedire la filtrazione glomerulare del complesso.

Dal sangue poi il complesso Retinolo-RBPp-TTR arriva ai tessuti periferici dove è riconosciuto da uno specifico recettore presente sulla membrana cellulare; il riconoscimento è imputabile alla componente proteica. Il retinolo, captato dalla cellula, si lega di nuovo alla RBPc mentre la RBPp si stacca dalla TTR, passa di nuovo in circolo e viene eliminata attraverso la filtrazione glomerulare.

All'interno della cellula il retinolo può subire diversi destini a seconda del tipo di tessuto:

esterificarsi con acidi grassi per azione della retinil estere transferasi o della acid CoA retinilaciltransferasi, oppure come ad esempio nella retina, ossidarsi reversibilmente a retinale ad opera della retinolo deidrogenasi NAD- dipendente; il retinale a sua volta può ossidarsi irreversibilmente ad acido retinoico per azione della retinale deidrogenasi o della xantina ossidasi. Sia il retinolo che l'acido retinoico possono coniugarsi con l'acido glucuronico per dare i rispettivi glucuronidi.

Livelli ematici. I livelli ematici di vitamina A nel sangue sono regolati da un meccanismo omeostatico che tende a mantenerli il più possibilmente costanti indipendentemente dalla quantità di vitamina assunta; a questo provvedono le riserve epatiche in grado di mantenere per molto tempo normali questi livelli anche quando l'apporto con la dieta è scarso; solo quando le riserve epatiche sono esaurite (a 20 mcg/g) i livelli ematici tendono ad abbassarsi rapidamente mentre si innalzano quando, in seguito ad ingestione di dosi elevate, il contenuto epatico supera i 300 mcg/g.

Vari fattori possono influenzare i livelli ematici di vitamina A: il tipo di dieta, lo stress, certe malattie ed alcuni farmaci.

Tra i fattori dietetici la stessa vitamina A è in grado di influenzarli in quanto rappresenta un importante fattore per il rilascio della RBP dal fegato.

Il meccanismo che sta alla base dell'omeostasi del retinolo ematico è mediato dalla sintesi e dal rilascio delle RBP. In presenza di un'assunzione eccessiva di vitamina A la capacità del fegato di immagazzinare il retinolo e la capacità della RBP di legarlo sono al di sopra dei loro limiti. Di conseguenza vengono mobilizzati dal fegato non il retinolo ma i suoi esteri che, legati alle lipoproteine, sono portati alle membrane delle cellule dei tessuti provocando un loro danneggiamento; gli esteri infatti essendo delle molecole bimodali, agiscono da detergenti.

Anche la quantità e il tipo dei lipidi presenti nella dieta possono condizionare i livelli ematici di vitamina; infatti l'assorbimento della vitamina A richiede la sua incorporazione in micelle costituite da acidi grassi, monogliceridi e sali biliari. Quando la dieta è priva di grassi e/o in presenza di una ostruzione delle vie biliari, non formandosi le micelle, la vitamina non può essere assorbita per cui i suoi livelli ematici risultano inferiori alla norma.

Poiché l'assorbimento, il trasporto, l'utilizzazione della vitamina A sono strettamente legati all'attività di numerose proteine che agiscono da carriers o sono enzimi, è chiaro che la componente proteica della dieta e quindi lo "stato nutrizionale proteico" dell'individuo può condizionare il livelli ematici della vitamina. Questo può spiegare perché la carenza di vitamina A e quella di zinco hanno una sintomatologia simile.

Anche nei casi di stress di qualsiasi origine si osserva una caduta dei livelli ematici di vitamina A; è probabile che la secrezione di corticosteroidi indotta da queste situazioni riduca le riserve di vitamina A favorendone la sua eliminazione dall'organismo.

Le malattie caratterizzate da un alterato assorbimento dei grassi, come la fibrosi cistica, e quelle epatiche e renali provocano una caduta dei livelli ematici di vitamina A. Anche nel diabete si osserva questo fenomeno con contemporaneo aumento delle riserve epatiche; il fatto che il diabete induca una carenza di zinco, e che questo elemento sia un importante fattore per la sintesi delle RBP fa ritenere che la riduzione dei livelli ematici di vitamina A osservati nei soggetti diabetici sia la conseguenza di una diminuita mobilizzazione di essa dal fegato.

Infine anche i farmaci in grado di alterare, attraverso meccanismi competitivi e non competitivi, l'assorbimento, il trasporto, l'immagazzinamento, l'utilizzazione e l'eliminazione della vitamina A possono provocare un abbassamento dei suoi livelli ematici.

Eliminazione. Mentre la quota non assorbita che si aggira tra il 10 e il 20% viene eliminata direttamente come tale con le feci, la maggior parte della vitamina introdotta viene eliminata con le urine sotto forma di derivati ossidati o con le feci come glucuronidi; questi ultimi si formano soprattutto nel fegato dal quale vengono escreti con la bile per essere poi riassorbiti in buona parte dalla mucosa intestinale e ritornare così al fegato (circolo enteroepatico). (Alimenti e salute,2005)

Ruolo biochimico

Due sono i principali processi nei quali il retinolo e i suoi derivati ossidati, il retinale e l'acido retinoico, sono coinvolti: la visione e il differenziamento degli epitelii.

Processo visivo. Sotto forma di retinale la vitamina A è implicata nel processo della visione e in particolare nell'adattamento della visione nell'oscurità e nella percezione delle forme e dei colori.

I fotorecettori presenti nella retina, i bastoncelli per la visione nell'oscurità e i coni per la percezione dei colori, contengono dei pigmenti sensibili alla luce, la rodopsina i primi e la iodopsina i secondi; entrambi i pigmenti sono formati da una componente proteica, l'opsina e la fotopsina rispettivamente, e dall'11-cis retinale dell'opsina viene isomerizzato nella forma *all-trans* che si distacca dalla componente proteica. Queste modificazioni provocano la produzione di un impulso nervoso dovuto alla iperpolarizzazione della membrana neuronale per chiusura dei canali del sodio.

Il trans retinale formatosi viene ridotto a trans retinolo ad opera della retinale reduttasi NADPH-dipendente e quindi isomerizzato a 11cis-retinolo. Quest'ultimo viene in seguito riossidato dalla retinolo deidrogenasi NAD dipendente a 11cis-retinale che al buio si ricombina con l'opsina per

dare di nuovo rodopsina.

Poiché una parte dell'11cis retinale va perduto durante il ciclo, per garantire la formazione di una adeguata quantità di rodopsina è necessario un continuo prelievo da parte della retina di trans retinolo dal circolo sanguigno per essere poi ridotto e quindi isomerizzato a 11cis retinale. Quando i livelli ematici di vitamina A, come nella carenza, sono molto bassi, la captazione di essa da parte della retina risulta insufficiente e quindi anche la formazione di rodopsina. Questo porta ad un diminuito adattamento visivo alla luce ridotta, definito emeralopia, che costituisce il segno più precoce della carenza. Un meccanismo del tutto simile si ha per la visione dei colori a livello dei coni.

Differenziazione cellulare degli epitelii. La vitamina A ha un ruolo fondamentale nella crescita, differenziazione e mantenimento del tessuto epiteliale. Infatti in carenza si ha una cheratizzazione delle cellule squamose (metaplasia squamosa), le membrane passano da un monostrato di cellule epiteliali secernenti muco e ciliate a un pluristrato di cellule non ciliate e non secernenti muco.

Per quanto concerne il meccanismo attraverso il quale la vitamina A agisce a questo livello l'ipotesi più attraente si basa sul suo intervento sulla sintesi delle glicoproteine costituenti le membrane dove hanno funzioni di determinanti antigenici, di recettori di virus e di markers dell'identità cellulare. In questo processo biosintetico la vitamina A agirebbe da cofattore nel trasporto del mannosio alla componente proteica; questo implicherebbe da prima la fosforilazione del retinolo a retinil fosfato, la glicosilazione di questo con formazione del mannosil retinil fosfato e infine il trasferimento del residuo glicosilico da quest'ultimo alla proteina accettrice.

Non è da escludere anche un intervento della vitamina a livello genico simile a quello degli ormoni steroidei; il retinolo captato dalla cellula bersaglio verrebbe ossidato ad acido retinoico che si unirebbe alla RBPC; il complesso formatosi, entrato nel nucleo andrebbe a stimolare la sintesi di un mRNA codificante una proteina specifica.

Oltre a queste due funzioni principali numerosi studi hanno messo in evidenza la capacità della vitamina A di influenzare positivamente sia l'immunità umorale che cellulo-mediata aumentando così le difese dell'organismo contro le malattie infettive (Chew, 1987; Bendich, 1993). È stata pure evidenziata una sua azione protettiva nei confronti di sostanze xenobiotiche, come gli inquinanti e i farmaci stimolando l'attività di alcuni enzimi che richiedono l'intervento del citocromo P450.

Infine la vitamina A proprio per il suo ruolo nel processo del differenziamento cellulare viene considerata un fattore importante per il processo riproduttivo in particolare per la spermatogenesi e lo sviluppo embrionale. L'acido retinoico e non il retinolo sembra pure svolgere un ruolo

coenzimatico-simile nella sintesi del testosterone a livello della tappa pregnenolone →progesterone catalizzata dalla β -idrossisteroide deidrogenasi. (Cocchi *et al.*, 2005)

Carenza

Mentre nei paesi in via di sviluppo la carenza di vitamina A è assai diffusa specie nei bambini fino a 6 anni a causa di un apporto del tutto insufficiente, in quelli industrializzati le manifestazioni carenziali sono rare e si osservano solo in particolari condizioni non tanto per mancato apporto quanto per diminuita utilizzazione della vitamina introdotta. È il caso delle malattie dell'apparato digerente e di anomalie delle vie biliari che ne impediscono l'assorbimento, delle malattie epatiche come la cirrosi, dell'alcolismo cronico e delle malattie genetiche come l' α - β lipoproteinemia che ne compromettono il metabolismo.

I segni clinici della carenza si manifestano principalmente a livello dell'occhio con anomalie funzionali della retina (emeralopia), con secchezza e atrofia della congiuntiva, cellule del Bitot (xeroftalmia) e con opacità della cornea e ulcerazioni (cheratomalacia); a livello delle cellule epiteliali con cheratinizzazione del rivestimento epiteliale del tratto gastrointestinale, respiratorio, urogenitale e della pelle. Oltre a questi segni specifici, in carenza di vitamina A si ha una maggiore incidenza di malattie di tipo infettivo; la maggiore esposizione alle infezioni virali è da ricondursi al fatto che la barriera epiteliale che gioca un ruolo importante nel meccanismo protettivo contro la colonizzazione batterica e le infezioni è profondamente alterata nei soggetti carenti.

La diagnosi di carenza può essere eseguita con test oftalmologici come la valutazione del grado di adattamento all'oscurità e con test ematici: dosaggio dei livelli di retinolo (normale: >300mcg/litro, carente:<25mcg/litro) oppure con test funzionali: prove da carico per valutare le riserve epatiche.(Cocchi *et al.*, 2005)

VITAMINA E

Scoperta

Nel 1922 H.M.Evans e K.S. Bishop, con i loro esperimento sui ratti, dimostrarono che esisteva un nuovo fattore nutrizionale liposolubile, inizialmente chiamato "fattore X", in grado di prevenire la morte fetale(Evans e Bishop, 1922; Evans e Bishop, 1912); l'esperimento consisteva nella

utilizzazione di due gruppi di ratti, il primo alimentato con una dieta a base di caseina pura, lardo, amido di grano, olio di fegato di merluzzo, lievito di birra e cloruro di sodio; il secondo gruppo alimentato con la stessa dieta del primo con aggiunta di alcuni vegetali, tra cui principalmente frumento germogliato e insalata fresca. Gli sperimentatori notarono subito che gli animali del primo gruppo rimanevano sterili: la fecondazione e l'attecchimento ovulare avevano luogo regolarmente, ma il più delle volte il feto moriva durante la gestazione e veniva poi riassorbito insieme alla placenta. Quelli del secondo gruppo invece avevano un numero sempre maggiore di gravide che partorivano poi regolarmente.

A questo punto gli sperimentatori vollero rendersi conto delle esatte caratteristiche dell'avitaminosi E, ed in particolar modo in che consisteva questa avitaminosi, se esisteva veramente una differenza tra l'avitaminosi E dei ratti maschi e quella delle femmine, ed infine quale delle due era più facilmente curabile. Si osservò che nutrendo le femmine con alimenti scarsi di vitamina E, i feti vivi continuavano ad evolversi nell'utero per un certo tempo, per poi regolarmente deperire. I casi in cui sopravvenivano parti prematuri erano invece moltissimi.

Le madri nutrite con alimenti ricchi di vitamina E dopo una nuova fecondazione partorivano tutte regolarmente.

Veniva così dimostrato che la sterilità, se non vi erano infezioni o alterazioni organiche di altro tipo, era transitoria e curabile.

Nei ratti maschi il risultato era invece diverso: si poté dimostrare che un ratto affetto da avitaminosi E, dopo aver perso la facoltà della riproduzione, non era più capace alla rigenerazione nemmeno dopo avergli somministrato della vitamina E anche in dosi elevate, perché tale avitaminosi provoca nel suo corpo l'atrofia degli organi sessuali non più rigenerabili con nessuna vitamina.

Nel 1927, l'esistenza della vitamina E venne generalmente riconosciuta dopo che Evans e Burr presentarono un metodo per la determinazione biologica di questo fattore liposolubile. In seguito Evans e Olcott, nel 1936, per mezzo di estratti fortemente concentrati di vitamina E ottenuti dall'olio di germe di grano, ricavarono un alcol che possiede l'attività biologica della vitamina E e a cui è stato assegnato il nome di α -tocoferolo (dal greco $\tau\omicron\chi\omicron\zeta$: "discendenza" e $\phi\epsilon\rho\epsilon\iota\nu$: "portare").

Negli anni successivi sono stati isolati dagli oli vegetali il β -, il γ -, e il δ -tocoferolo e i tocotrienoli.

In America si era intanto arrivati a sperimentare la dieta vitaminica E sulla donna, e si poté constatare veramente una considerevole diminuzione del numero degli aborti naturali. Juhasz-Shaffer constatò in seguito che un nutrimento ricco in vitamina E produce effetti favorevoli sul nascituro, poiché il suo sviluppo viene ad essere migliore che non negli altri casi.

Nei laboratori svizzeri, tedeschi ed americani intanto si studiava la costituzione chimica di questi tocoferoli e fu nel 1937 che Fernholz e Emerson, separatamente da Karrer e John, chiarirono la costituzione chimica della vitamina E. (Karrer, 1938).

Nell'anno successivo Todd ne realizza la sintesi. Così oggi questa sostanza può essere ottenuta sia da sostanze naturali, sia per via sintetica.

La vitamina E è stata considerata per molti anni un nutriente essenziale per molte specie animali e, a partire dal 1968, anche per l'uomo. Il ritardo nel riconoscere il ruolo essenziale della vitamina E per l'uomo è derivato dal fatto che, nell'adulto sano, l'avitaminosi E dovuta a un apporto deficitario con la dieta è una condizione rarissima. Infatti la vitamina E si trova ampiamente distribuita negli alimenti e nell'organismo sono presenti abbondanti depositi. Nell'adulto un deficit di vitamina E può essere conseguente a un malassorbimento dei lipidi. I nati prematuri sono particolarmente a rischio per la deficienza poiché possiedono scarse riserve della vitamina. (Edgardo Pace *et al.*, 1949)

Nomenclatura e struttura chimica

Con il termine di vitamina E vengono indicati due gruppi di composti, i tocoferoli e i tocotrienoli, aventi in comune la struttura dell'idrossicromano portante una catena laterale isoprenoide, satura nei tocoferoli, insatura nei tocotrienoli. Ognuno dei due gruppi comprende a sua volta quattro componenti indicati rispettivamente α , β , δ , γ , che differiscono per il numero e la posizione dei gruppi metilici fissati sull'anello; l' α - tocoferolo è quello che presenta l'attività biologica più elevata. I tocoferoli possiedono tre centri chirali (C-2' , C-4' , C-8') mentre i tocotrienoli ne possiedono solo uno (C-2). Il tocoferolo naturale ha configurazione 2R, 4'R, 8'R e viene indicato come RRR α - tocoferolo (detto anche d- α -tocoferolo). In natura sono presenti anche esteri dei tocoferoli e dei tocotrienoli (tocoferil-esteri e tocotrienil-esteri).

Il termine vitamina E indica tutti i derivati del tocoferolo e dei tocotrienoli che possiedono l'attività biologica dell' α -tocoferolo. Finora l'attività biologica dei derivati del tocoferolo e dei tocotrienoli è stata valutata considerando prevalentemente la capacità di questi composti di restaurare la fertilità dei ratti, resi sterili dalla carenza nutrizionale di vitamina E, e le loro proprietà antiossidanti *in vitro* o *ex in vivo*. Utilizzando questo sistema di valutazione si è evidenziato che l'RRR α - tocoferolo è la forma biologicamente più attiva e che, se si pone uguale a 100 l'attività biologica dell' RRR α - tocoferolo, il β -tocoferolo avrebbe un'attività di 40, il γ -tocoferolo di 10-30 e l' α -tocotrienoli di 30. I tocoferoli sono sostanze oleose a temperatura ambiente. Sono insolubili in acqua, ma facilmente solubili nei solventi apolari (Cocchi *et al.*, 2005).

Fonti alimentari

La vitamina E è contenuta soprattutto negli alimenti di origine vegetale. Tutte le piante superiori contengono α - tocoferolo, che è localizzato prevalentemente nelle foglie e nelle parti verdi delle piante.

Le fonti principali sono rappresentate dall'olio di germe di grano, di arachidi, di mais, di oliva, e dai frutti oleosi. Data la sua sensibilità al calore, l'olio extra vergine d'oliva crudo, rappresenta uno dei migliori prodotti per l'assunzione di vitamina E.

Fonti alimentari più ricche di vitamina E (mg per 100g)

Olio di germe di grano	150-250
Olio di girasole	50-80
Altri oli vegetali	8-40
Margarina	8-40
Nocciole, mandorle	20-30
Vegetali verdi	0,1-2
Uova	0,7-1,6

Modificato da (Alimenti e salute, 2005)

Metabolismo

Assorbimento. Solo il 40-60% della vitamina E introdotta come α -tocoferolo libero o sottoforma di esteri con acidi-grassi, previa loro idrolisi ad opera di una esterasi pancreatico e in presenza di bile, viene assorbito inglobato in micelle costituite da acidi grassi, monogliceridi e sali biliari a livello della parte mediana dell'intestino tenue con un processo di semplice diffusione.

Distribuzione nei tessuti. Incorporata nei chilomicroni la vitamina passa nella linfa e quindi nel circolo portale dove i chilomicroni sono idrolizzati da una proteina lipasi e l' α -tocoferolo liberato viene captato dal fegato. Da questo organo viene poi escreto, legato alle lipoproteine HDL e LDL e in questa forma portato via dal sangue ai tessuti periferici: in primo luogo quello adiposo che rappresenta il sito di immagazzinamento della vitamina, i surreni, i muscoli e il cuore. L'entrata dell' α -tocoferolo nelle cellule di questi tessuti implica l'intervento di una proteina, la TBP (proteina legante il tocoferolo); all'interno di esse l' α -tocoferolo si localizza nelle membrane; si distinguono

due *pool*, uno “labile” predominante in quei tessuti come il fegato dai quali viene liberato in condizioni di sufficiente apporto esogeno e uno “fisso”, predominante nel tessuto adiposo, dal quale viene rilasciato più lentamente.

Eliminazione. La maggior parte della vitamina E viene eliminata con le feci, via bile, sottoforma di tocoferilchinone coniugato con l'acido glucuronico (Cocchi *et al.*, 2005).

Ruolo biochimico

L' α -tocoferolo come del resto tutti i componenti del gruppo, possiede spiccate proprietà antiossidanti. Tuttavia non si può affermare con assoluta certezza che tutte le funzioni che esso assolve nell'organismo siano attribuibili a questa sua proprietà e quindi la complessa sintomatologia che si instaura nella carenza sia causata esclusivamente dai danni che i radicali liberi dell'O₂ provocano a carico della struttura e quindi della attività di importanti molecole biologiche in particolare dei fosfolipidi presenti nelle membrane cellulari e nelle lipoproteine circolanti. Il fatto però che i sintomi carenziali si manifestano soprattutto a carico di quei tessuti nei quali più è elevata la concentrazione in acidi grassi insaturi polinsaturi quali componenti dei fosfolipidi come il sistema nervoso centrale o dove più alta è la tensione parziale di O₂ e quindi maggiore la possibilità di formazione dei suoi derivati parzialmente ridotti, come i globuli rossi, porta a ritenere probabile che il principale meccanismo attraverso il quale la vitamina E svolge le sue funzioni sia quello di intervenire nella difesa antiradicalica. In altre parole la vitamina E farebbe parte di quel complesso meccanismo protettivo comprendente sia enzimi come la superossido dismutasi, la glutatione perossidasi e la catalasi sia molecole come il glutatione, la vitamina C ed i gruppi sulfidrilici delle proteine.

I radicali liberi sono composti estremamente reattivi con vita molto breve aventi nella loro orbita esterna un numero dispari di elettroni cioè un elettrone spaiato che tendono ad appaiare strappandone uno ad altri composti. Tra i radicali liberi sono da ricordare i derivati parzialmente ridotti dell'O₂ come l'anione superossido (O₂⁻), l'ossidrile radicalico (OH⁻), l'acqua ossigenata (H₂O₂) che si formano durante i processi nei quali è coinvolto l'O₂ e quindi rappresentano dei normali prodotti terminali del metabolismo ossidativo cellulare.

Uno degli effetti più negativi generati dai radicali liberi dell'ossigeno nelle cellule è l'ossidazione degli acidi grassi polinsaturi; per i numerosi doppi legami presenti nella loro lunga catena carboniosa essi rappresentano infatti il “bersaglio” preferito di quei composti.

Il processo può essere suddiviso in tre fasi:

1. *Iniziazione*: il radicale libero iniziatore(I*) interagisce con il doppio legame dell'acido grasso(RH) strappandogli un elettrone: si forma così il radicale libero dell'acido grasso(R°);
2. *Propagazione*: il R° reagendo con l'O₂ si trasforma in un radicale perossilico (ROO°), quest'ultimo a sua volta può interagire con il doppio legame di un altro acido grasso (R'H) trasformandosi in un idroperossido (ROOH) e dando origine a un nuovo radicale libero(R'°)
3. *Terminazione*: quando la concentrazione dei derivati dell'ossidazione degli acidi grassi è molto elevata essi cominciano a reagire tra loro formando composti di degradazione stabili come aldeidi, chetoni e alcoli.

I radicali liberi dell'O₂ possono interagire anche con gruppi amminici e sulfidrilici presenti nelle proteine, con gli acidi nucleici e in particolare con il DNA mitocondriale provocando a loro carico gravi alterazioni strutturali e funzionali.

Un antiossidante (AH) è in grado di interrompere il processo perossidativo in quanto reagendo con un radicale lo neutralizza trasformandosi in un radicale (A°) che è però inattivo.

È con questo meccanismo che la vitamina E interviene nella difesa antiradicalica bloccando la propagazione del processo di ossidazione degli acidi grassi polinsaturi.

Il tocoferolo radicalico (E°) può essere rigenerato a tocoferolo (E) per azione della vitamina C (AH) che si trasforma nel corrispondente radicale (A°) o per azione del glutatiene (GSH) che si ossida (GS- SG).

Il radicale ascorbico e il glutatiene ossidato vengono a loro volta rigenerati nella forma ridotta ad opera di una deidrogenasi NADPH- dipendente.

Tre sono le principali funzioni che la vitamina E svolge nell'organismo: 1) stabilizza le membrane in quanto impedendo la perossidazione degli acidi grassi polinsaturi presenti nei fosfolipidi, che assieme alle proteine sono i costituenti delle membrane plasmatiche e degli organelli subcellulari, garantisce il mantenimento delle loro caratteristiche fisiche quali la permeabilità e la fluidità indispensabili per i processi che in esse hanno luogo; con lo stesso meccanismo la vitamina impedisce la rapida emolisi del globulo rosso a causa dell'aumentata fragilità della sua membrana; 2) controlla l'aggregazione delle piastrine sia inibendo la sintesi di alcune prostaglandine e del trombosano A₂, che hanno azione aggregante sia mantenendo una giusta permeabilità delle loro membrane; 3) modula attività enzimatiche intervenendo direttamente come induttore o repressore della loro sintesi sia indirettamente soprattutto nei riguardi degli enzimi legati alle membrane (Cocchi *et al.*, 2005).

Carenza

La carenza di vitamina E si manifesta con segni di vario tipo: ematologici come l'anemia emolitica specie nei prematuri accompagnata da iperbilirubinemia ; neurologici sia a livello periferico con polineuropatia progressiva dei nervi principali causata da una degenerazione assonica e da deposito di lipopigmenti, sia a livello centrale con degenerazione delle fibre nervose nella sostanza grigia del midollo e dei nuclei centrali, che si manifesta clinicamente con disturbi della motricità oculare e atassia cerebellare; muscolari con miopatia che provoca debolezza muscolare; oftalmologici con retinopatia pigmentata.

La causa della carenza è soprattutto, nei Paesi in via di sviluppo, l'insufficiente apporto dovuto ad una malnutrizione generalizzata, mentre nei Paesi industrializzati è l'alterata utilizzazione di quella introdotta. A rischio di carenza sono i bambini, specie i prematuri, quelli con patologie digestive (ipoplasia delle vie biliari, mucoviscidosi) o affetti da malattie genetiche (β - lipoproteinemia: assenza della componente proteica delle β lipoproteine e quindi di LDL, VLDL, e chilomicroni che sono i vettori plasmatici della vitamina). Segni di carenza si possono osservare anche nei soggetti adulti sottoposti a dialisi e negli alcolizzati cronici affetti da cirrosi e pancreatite.

La diagnosi di carenza può essere effettuata con dosaggi ematici della vitamina (i livelli normali sono 7- 15 mg/litro nell'adulto, 2- 4mg/litro nel bambino) o con esplorazioni funzionali come la misura del grado (%) di emolisi provocata dall'acqua ossigenata sui globuli rossi (<10 % nel normale; >20% nel carente), (Cocchi *et al.*, 2005).

VITAMINA D

Scoperta

L'olio di fegato di merluzzo è usato dall'uomo sin dalla più remota antichità, poiché in esso è contenuto uno speciale principio attivo capace di guarire il rachitismo. Questa circostanza ha stimolato gli scienziati moderni a ricercare e separare questo principio attivo, e far sì che tale prodotto non venisse mai a mancare.

A tale scopo i primi studi risalgono alla prima guerra mondiale; e d'altra parte nell'anno 1919 Huldshinsky e collaboratori (Huldshinsky et Al., 1919) dimostrarono che l'azione dei raggi solari (ultravioletti) hanno una favorevole azione sul rachitismo infantile. Veniva in tal modo posto il problema delle relazioni esistenti tra i raggi solari ed il fegato dei pesci, e come i due fatti

completamente diversi tra loro potessero trovare un anello di congiunzione.

Il ragionamento che qui occorre fare è il seguente: all'epoca della deposizione delle uova miliardi di merluzzi popolano le acque circostanti alle isole Lofoti della Norvegia, e nella stessa epoca migliaia di pescatori convergono in quel punto allo scopo di far buona pesca. Il grasso fegato dei merluzzi (che talvolta raggiunge il peso di 12kg) è il loro bottino preferito: questo è immediatamente raccolto in botti e serve poi ad estrarre mediante semplice pressione, o con mezzi di estrazione perfezionati, il preziosissimo olio. La testa e gli interiori, essiccati e triturati, servono per fare un ottimo concime, mentre la carne è venduta tal quale, oppure seccata per farne baccalà o dello stoccafisso. Comunque la parte più preziosa del merluzzo è indubbiamente il fegato.

Esaminando il nutrimento di questi merluzzi, vediamo che si alimentano di pesci più piccoli, questi a loro volta si nutrono di pesci ancora più piccoli, i quali a loro volta si nutrono di pesci piccolissimi, e così via secondo l'ormai nota tradizione. Gli ultimi elementi di questa lunghissima catena sono costituiti da esseri infinitamente piccoli, il cui nutrimento è costituito da licheni o da microscopici protozoi unicellulari, che vivono in mezzo alla luce viva, nelle limpidissime e rifrangenti acque dei mari del Nord, ricchissime di raggi ultravioletti riflessi dalle nevi perenni e dagli immensi ghiacciai, e quindi ricche di vitamina D.

Da quanto sopra detto, e in particolar modo dato che le radiazioni ultraviolette di una certa lunghezza d'onda (intorno a 3000 Å) agivano favorevolmente verso il rachitismo, Hess, Steenbock ed altri ricercatori vollero constatare se si poteva sostituire all'irradiazione diretta sui malati l'irradiazione dei loro alimenti. Dopo varie prove, alcune delle quali riuscite con esito favorevole, furono indotti ad ammettere che tanto nella pelle come in alcuni alimenti si trovi una sostanza (provitamina) che, sotto l'azione dei raggi ultravioletti, si trasforma in sostanza antirachitica (Hess, 1924; Steenbock, 1924).

Queste prove dimostrarono che alcune sostanze contenenti dei lipidi, normalmente sprovvisti di attività antirachitica, diventano attive allorquando vengono sottoposte all'azione della luce ultravioletta.

Ricerche più precise permisero di dimostrare che solo la parte insaponificabile di questi lipidi era la sola attivata dalle radiazioni ultraviolette. Così che il frazionamento dell'insaponificabile dava, da una parte le sostanze chiamate *sterine* e costituenti la quasi totalità della frazione, e dall'altra una piccola parte di sostanza esente da sterine e costituita da prodotti di natura assai complessa. L'esperienza ha dimostrato che solo la parte contenente sterine acquista proprietà antirachitiche sotto l'azione dei raggi ultravioletti.

Fu così dimostrato che la colesterina tecnica (contenente cioè impurezze), sostanza non avente alcuna azione antirachitica, diventava attiva (circa 100 volte più dell'olio di fegato di merluzzo) dopo essere stata sottoposta all'azione della luce ultravioletta. La colesterina purissima invece non aveva nessun potere antirachitico (Rosenheim e Webster, 1935; Heilbron, Kamm e Morton, 1927).

Dopo questi fatti, molti altri ricercatori sottoposero all'azione dei raggi ultravioletti alcune sterine di origine vegetale (brassicasterina, stigmasterina) ed altre di origine animale (bombisterina, coprosterina) ma con esito negativo.

Fu solo nel 1927 che quasi contemporaneamente Rosenheim e Webster, Windaus ed Hess sottoponendo l'ergosterina alle radiazioni ultraviolette ottennero un prodotto ad azione molto attiva verso il rachitismo che fu poi profondamente studiato tanto dal lato biologico quanto dal lato chimico (Rosenheim e Webster, 1927; Windaus ed Hess, 1927).

Intanto tra il 1929 e il 1931 Reerink e van Wijk riuscirono ad isolare per la prima volta allo stato cristallino un prodotto ottenuto per irradiazione ultravioletta dell'ergosterina, da qui seguirono altri lavori fino a che nel 1936- 1937 si riuscì prima a separare e a individuare la vitamina D quale fattore antirachitico (McCollum *et al.*, Windaus *et al.*, Brockman *et al.*, 1936) e dopo ad ottenere una nuova vitamina D ad alto potere antirachitico per distillazione molecolare dell'olio di fegato di merluzzo (Bills *et al.*, 1937).

Fonti alimentari e fabbisogno

E' riccamente presente nel latte e derivati, nei pesci grassi, nell'olio di fegato di merluzzo, nel tuorlo, nelle frattaglie.

Il fabbisogno giornaliero è variabile nelle diverse fasi dell'accrescimento e nelle donne in gravidanza. Per individui adulti, di ambo i sessi, si attesta intorno ai 10 µg al giorno, tenuto conto che anche la sola produzione endogena potrebbe essere sufficiente (www.sinu.it).

Nomenclatura e struttura chimica

Le due forme principali di vitamina D sono il colecalciferolo (vitamina D₃), che deriva dal colesterolo ed è sintetizzato dagli organismi animali, e l'ergocalciferolo (vitamina D₂), che deriva dall'ergosterolo ed è presente nei vegetali. La struttura chimica di entrambi è quella del ciclopentanoperidrofenantrene, tipica degli steroidi, con una catena laterale in C17 insatura per la D₂, satura per la D₃. Le due forme hanno circa la stessa attività nell'uomo, per cui normalmente si usa il termine vitamina D per indicare ambedue le forme.

Metabolismo

Per svolgere la sua attività biologica la vitamina D deve subire due idrossilazioni (Combs, 1992). Nel sangue la vitamina D è legata ad una proteina che la lega specificatamente (DBP) e la trasporta al fegato, dove avviene la prima idrossilazione a 25-idrossivitamina D (25-OH-D). La formazione di 25-OH-D non è sottoposta a regolazione stretta, per cui, in seguito all'assunzione di dosi elevate di vitamina D, i livelli circolanti di questo metabolita possono aumentare di centinaia di volte. La 25-OH-D viene poi trasportata dalla DBP ai tubuli renali prossimali dove viene convertita a 1,25 diidrossivitamina D (1,25-(OH)₂-D). I livelli circolanti di 1,25-(OH)₂-D non sono influenzati dallo stato vitaminico D, eccetto che in situazioni di severa deplezione. La sua sintesi è infatti strettamente regolata con un meccanismo a *feedback*, e dipende soprattutto dal fabbisogno di calcio e fosforo dell'organismo (Reichel *et al.*, 1989; Kumar, 1986).

Ruolo biochimico

La 1,25-(OH)₂-D è la forma attiva della vitamina D. Le sue funzioni principali sono: la stimolazione dell'assorbimento del calcio e del fosforo a livello intestinale; la regolazione, in sinergia con l'ormone paratiroideo, dei livelli plasmatici di calcio; il mantenimento di una adeguata mineralizzazione dello scheletro (Combs, 1992, Miller *et al.*, 1984). Inoltre può essere direttamente coinvolta in un certo numero di processi non legati all'omeostasi del calcio e del fosforo (es: differenziamento cellulare, funzione neuromuscolare), mediante meccanismi non ancora chiariti.

La vitamina D non è una vitamina in senso stretto, poiché il suo precursore, il 7-deidrocolesterolo, viene sintetizzato dall'organismo e convertito nella pelle a provitamina D per azione della luce solare (Webb & Holick, 1988). Questa sintesi dipende dallo spessore e dalla pigmentazione della pelle, dalla qualità ed intensità delle radiazioni UV (sono efficaci per la sintesi solo le radiazioni comprese tra 290 e 315 nm) e soprattutto dalla superficie esposta e dalla durata dell'esposizione.

Carenza e tossicità

La vitamina D può essere sintetizzata ed accumulata nei mesi estivi così da mantenere un adeguato livello circolante di 1,25-(OH)₂-D anche nei mesi invernali. Se la sintesi endogena risulta insufficiente (specifiche condizioni climatiche, abitudini di vita, età), è necessario un apporto di vitamina D con la dieta o con la supplementazione.

I segni precoci di carenza di vitamina D sono: diminuita concentrazione serica di calcio e fosforo

(come risultato del diminuito assorbimento a livello intestinale), iperparatiroidismo secondario ed aumento dell'attività della fosfatasi alcalina nel siero. A questo stadio si possono avere convulsioni da ipocalcemia. Segni più tardivi sono: inadeguata mineralizzazione dello scheletro (rachitismo o osteomalacia), debolezza muscolare, dolori e deformazioni alle ossa (Combs, 1992).

Segni di intossicazione acuta e cronica (nausea, diarrea, poliuria, perdita di peso, ipercalcemia, ipercalciuria, nefrocalcinosi, ridotta funzione renale o calcificazione dei tessuti molli) sono stati evidenziati dopo somministrazione prolungata di 250-1250 μ g/die di vitamina D (Anning *et al.*, 1948). I segni di intossicazione si manifestano per livelli circolanti di 25-OH-D superiori a 100 ng/ml. Si consiglia in ogni caso di non superare il livello massimo di 50 μ g/die (Commission of the European Community, 1993).

VITAMINA K

Vitamina K e' il termine generale utilizzato per una serie di composti derivati dal 2-metil-1,4-naftochinone, tra cui i fillochinoni o vitamina K1 (che sono la forma prevalente nella dieta) e i menachinoni o vitamina K2. I fillochinoni sono infatti sintetizzati dalle piante verdi, mentre i menachinoni sono sintetizzati dai batteri e da alcuni attinomiceti. Nell'uomo, la vitamina K è il cofattore di una carbossilasi che catalizza la carbossilazione di specifici residui di acido glutammico presenti in alcune proteine per formare residui di acido μ -carbossigluttammico (Suttie, 1984; Shearer, 1990). Tra le proteine che subiscono questa reazione, le principali sono coinvolte nel processo di coagulazione del sangue (protrombina, fattore VII, fattore IX, fattore X ed altre quattro proteine recentemente identificate nel plasma) mentre l'osteocalcina è presente nella matrice ossea.

La vitamina K viene assorbita rapidamente a livello dell'ileo prossimale e passa con i chilomicroni nella circolazione linfatica. Come per le altre vitamine liposolubili, l'assorbimento necessita di normali funzioni pancreatiche e biliari, ed è quindi favorito dalla presenza concomitante dei grassi. Di conseguenza, tutte le condizioni che determinano malassorbimento dei lipidi compromettono anche l'utilizzazione della vitamina presente nella dieta.

La vitamina K viene immagazzinata solo in piccole quantità nell'organismo, poichè ha un *turnover* elevato (emivita di circa 17 ore) (Olson, 1994). L'apporto continuo con la dieta e l'assorbimento ad opera del colon sono quindi indispensabili. La sintesi della vitamina K avviene anche ad opera della flora microbica presente nel colon, ma l'entità dell'assorbimento a questo livello, e quindi il

contributo della forma sintetizzata all'apporto di vitamina all'organismo non è ancora del tutto noto (Allison *et al.*, 1987). Studi effettuati su animali indicano che tale contributo sarebbe sufficiente a prevenire le malattie da carenza.

La deficienza di vitamina K determina una sindrome emorragica conseguenza dell'inadeguata sintesi dei fattori della coagulazione del sangue. I segni clinici vanno da lievi ecchimosi ad emorragie anche fatali; i primi sintomi riguardano l'allungamento dei tempi di coagulazione e l'abbassamento del livello plasmatico di protrombina. Particolarmente a rischio di carenza sono i neonati, poiché hanno scorte ridotte di vitamina (il trasporto placentare della vitamina è limitato) e non hanno ancora sviluppato la microflora intestinale; il latte materno, inoltre, non è una buona fonte di vitamina K (Greer, 1995). Dopo i primi 3-4 mesi di vita il rischio di carenza si riduce, tranne che in condizioni particolari, quali la presenza di patologie che determinano malassorbimento, l'utilizzo di antagonisti della vitamina K come nella terapia anticoagulante, il trattamento prolungato con antibiotici o una nutrizione parenterale inadeguata. Nell'adulto una carenza severa di vitamina K è raramente di origine alimentare, ed anche una terapia antibiotica non sembra in grado di influire sulla quota proveniente dalla sintesi batterica (Allison *et al.*, 1987).

Il fillochinone e i menachinoni non possiedono tossicità anche se assunti in quantità elevate (Miller & Hayes, 1982); il menadione invece può determinare anemia emolitica, iperbilirubinemia e ittero. Questa tuttavia non deve essere considerata una forma di ipervitaminosi K, ma l'effetto secondario di un composto non fisiologico.

La vitamina K si trova abbondantemente negli ortaggi a foglia verde (spinaci, lattuga, broccoli, cavoli), mentre quantità meno rilevanti si trovano nei cereali, nei prodotti carnei e nei prodotti lattiero caseari (Olson, 1994). Il fabbisogno stimato è di circa 1 µg per kg di peso corporeo(www.sinu.it).

1.3 LE VITAMINE IDROSOLUBILI

TIAMINA (VITAMINA B1)

La tiamina è chimicamente costituita da un anello pirimidinico collegato ad un anello tiazolico; la sua forma biologicamente attiva è l'estere pirofosforico (TPP), che occupa un ruolo centrale nel metabolismo energetico cellulare.

L'assorbimento della tiamina avviene principalmente a livello del duodeno, e si riduce gradualmente lungo il resto del tenue. La tiamina viene *assorbita in vivo* tramite due meccanismi: uno attivo, saturabile, probabilmente legato alla presenza di un *carrier*, e uno passivo, non saturabile (Gubler, 1988).

La deficienza di tiamina è associata ad alterazioni nel metabolismo dei carboidrati. Dalla deficienza cronica grave di vitamina B₁ deriva una sindrome caratterizzata da alterazioni a carico del sistema nervoso, del sistema cardiovascolare e dell'apparato gastroenterico, nota come "**beri-beri**". Tale sindrome è ancora diffusa in alcune regioni dell'Estremo Oriente nelle quali il riso brillato rappresenta l'alimento basilare della dieta. Deficienze acute, spesso legate ad alcoolismo, uso di droghe o terapie farmacologiche, provocano invece lesioni del sistema nervoso centrale con una sindrome nota come encefalopatia di Wernicke.

In caso di apporti elevati, una volta saturata l'albumina, l'eccesso di tiamina libera in circolo viene rapidamente escreto nelle urine. Non sono stati rilevati effetti tossici con livelli fino a 500 mg al giorno per un mese (*Commission of the European Communities*, 1993).

La tiamina si trova nelle carni animali, nelle frattaglie, nel lievito di birra e nei vegetali: tra questi, i più ricchi sono i cereali, dove si trova soprattutto nel germe e nella crusca. Una certa quantità di tiamina viene persa durante la cottura degli alimenti (legumi circa 40%, carni circa 30%, uova circa 25% e cereali circa 10%) e durante i processi di raffinazione (www.sinu.it).

RIBOFLAVINA (VITAMINA B2)

La vitamina B₂, sotto forma di coenzimi flavinici (flavinmononucleotide, FMN, e flavindinucleotide, FAD), costituisce il gruppo prostetico di enzimi che intervengono in diverse reazioni di ossido-riduzione.

L'assorbimento avviene probabilmente con un meccanismo di trasporto mediato che richiede la presenza di un *carrier* specifico sulla membrana, a livello della mucosa dell'intestino tenue (Christensen, 1973; Megazy & Schwenk, 1983). Una volta assorbita, la riboflavina si lega a proteine plasmatiche (soprattutto albumina) e giunge al fegato ed ad altri tessuti.

La sintomatologia carenziale di riboflavina consiste essenzialmente in un arresto della crescita e in alterazioni della cute (dermatite seborrica), della mucosa ai margini delle labbra (stomatite angolare) e dell'occhio (vascolarizzazione della cornea, congiuntivite e opacità delle lenti). Questi sintomi sono attribuibili ad un rallentamento dei processi anabolici oltre che ad una alterazione dell'assorbimento dei nutrienti, specie di quelli lipidici. La deficienza in riboflavina può provocare una deficienza secondaria in ferro. Non sono stati rilevati casi di tossicità da riboflavina, poiché la quota non legata ad enzimi viene rapidamente escreta con le urine.

La riboflavina è presente sia nel mondo vegetale che in quello animale, le principali fonti sono: il lievito di birra, il latte, il fegato, il rene e il cuore di diversi animali, le uova e i vegetali a foglie verdi. Nei vegetali, la parte fogliare e le parti ad attiva crescita contengono molta riboflavina, ma quando la crescita cessa il contenuto diminuisce. Il latte, che è una buona fonte di riboflavina, è un alimento soggetto a tipiche variazioni stagionali (in estate tale contenuto aumenta), in rapporto diretto al tipo di foraggio utilizzato nell'alimentazione del bestiame.

La riboflavina è sensibile alla luce e agli alcali, inoltre l'uso eccessivo di acqua e la cottura prolungata dei vegetali può provocare una perdita notevole, essendo la vitamina idrosolubile.

Il fabbisogno giornaliero è valutato in base alla quota calorica assunta, per adulti con una dieta prossima alle 2000 Kcal si attesta sugli 1,2 µg (www.sinu.it).

BIOTINA (VITAMINA B8)

La biotina è una vitamina contenente zolfo e rappresenta il coenzima di diverse carbossilasi. È implicata nel metabolismo proteico e nei processi di sintesi lipidica e glucidica.

L'uomo è incapace di sintetizzare la biotina; deriva, quindi, essenzialmente dall'alimentazione e, in piccola parte, dai microrganismi del tratto gastro-intestinale. La biotina introdotta con la dieta è legata alle proteine per mezzo di un residuo di lisina, (Marquet, 1977) per cui l'enzima biotinidasi presente nel succo pancreatico scinde il legame biotina-lisina, liberando così nel lume intestinale la vitamina. I meccanismi di assorbimento intestinale della biotina sono poco conosciuti nell'uomo. Studi sperimentali hanno dimostrato che la biotina viene assorbita nel digiuno e nell'ileo prossimale contro gradiente di concentrazione in presenza di sodio (Said *et al.*, 1987; Spencer & Brody, 1964;

Berger *et al.*, 1972). La biotina circola nel plasma sia in forma libera che legata alle proteina (α e β -globuline e albumina).

Nell'adulto è assai rara l'insorgenza di una carenza primaria di biotina, che si manifesta principalmente con alterazioni a carico della cute (desquamazioni). Sono state descritte carenze primarie di biotina soltanto in pazienti nutriti esclusivamente per via parenterale.

Carenze secondarie di biotina sono invece da imputarsi a difetti funzionali o ad alterazioni del suo assorbimento, oppure all'ingestione di quantità elevate di uova crude o alla *coque*, in quanto l'albume contiene una proteina (avidina) che possiede un'affinità molto elevata per questa vitamina e la rende quindi indisponibile (Gravel *et al.*, 1980). Non sono stati osservati effetti tossici legati ad assunzione di quantità elevate di biotina, fino a 10 mg/giorno (LSRO, 1978).

La biotina è molto diffusa nel regno animale (carne di bue, vitello, maiale, agnello e pollo) e vegetale (cavolfiore, funghi, carote, pomodori, spinaci, fagioli e piselli secchi, frutta, quali la mela). Inoltre è contenuta sia nel latte umano che in quello vaccino, nei formaggi, nelle uova intere e nei pesci di mare. Non completamente biodisponibile è però la biotina presente negli alimenti di origine vegetale, a causa dei legami molto forti che essa contrae con altri componenti. E' sensibile agli acidi e agli alcali, mentre denota adeguata stabilità al calore.

Il fabbisogno giornaliero è di 15-100 μ g (www.sinu.it).

ACIDO PANTOTENICO (VITAMINA B5)

L'acido pantotenico è il precursore del coenzima A (punto cardine del metabolismo di carboidrati, aminoacidi, acidi grassi e composti steroidei).

Poiché l'eliminazione urinaria diminuisce durante il digiuno e nel diabetico insulino-privo, mentre le concentrazioni plasmatiche della vitamina aumentano in entrambi i casi, si pensa all'esistenza di un controllo ormonale dell'escrezione ed a un aumento del riassorbimento tubulare in assenza di insulina. (Foss, 1981; Kies *et al.*, 1982).

Data la sua elevata diffusione in natura, gli stati di carenza sono rari, nell'uomo sono in rapporto con gravi stati di denutrizione, o con l'assunzione di grandi quantità di alcol e caffeina con la dieta.

Non si conoscono manifestazioni acute o croniche di ipervitaminosi in quanto quantità elevate di acido pantotenico non metabolizzato vengono eliminati con le urine, a seconda delle dosi ingerite, nè sono conosciute malattie metaboliche da carenza.

L'acido pantotenico si trova nei cibi sia in forma libera che legata, ed è largamente distribuito negli alimenti vegetali ed animali, una piccola parte deriva dalla sintesi microbica intestinale.

E' scarsamente resistente agli acidi e alla luce.

Il fabbisogno medio giornaliero si attesta intorno ai 7 mg (www.sinu.it).

VITAMINA C

Le numerose funzioni attribuite alla vitamina C (acido L-ascorbico) sono riconducibili alla sua capacità di ossidarsi in acido deidroascorbico e di ridursi reversibilmente.

L'acido ascorbico è il cofattore di enzimi che catalizzano reazioni di idrossilazione implicate nella formazione del collagene, dell'adrenalina e di composti aromatici nel fegato, inoltre interviene nei processi di difesa cellulare, favorendo l'eliminazione dei radicali liberi dell'ossigeno, favorisce la riduzione dell'acido folico e l'assorbimento intestinale del ferro.

La vitamina C introdotta con la dieta viene assorbita dalla mucosa dell'apparato digerente (stomaco e intestino tenue) mediante un processo di diffusione passiva. L'assorbimento è quasi completo a basse dosi, mentre a dosi più elevate l'assorbimento diminuisce fino a raggiungere valori del 16%. Il livello plasmatico e l'eliminazione urinaria (influenzati dall'introito alimentare) sono in relazione diretta con la saturazione tissutale.

Il fabbisogno giornaliero per l'individuo adulto è di 50-60 mg al giorno.

La carenza grave di vitamina C comporta fragilità ed emorragia capillare diffusa, ma attualmente nei Paesi industrializzati è difficile che si sviluppino casi di scorbutico.

Ad alte dosi di vitamina C si sono riscontrati disturbi come una aumentata escrezione urinaria di ossalati e la formazione di calcoli renali. Sembra comunque che dosi fino a 10g/die possano essere considerate sicure (Flodin, 1988).

La vitamina C è largamente diffusa negli alimenti di origine vegetale; particolarmente ricchi sono gli agrumi, i kiwi, i peperoni, i pomodori e gli ortaggi a foglia verde.

La vitamina C è, tra le vitamine, quella che va incontro a maggiore degradazione, sia per la instabilità al calore e all'ossigeno dell'aria che per la sua idrosolubilità (www.sinu.it).

ACIDO FOLICO (VITAMINA B9)

Con il termine folati si designa un gruppo di sostanze chimicamente e nutrizionalmente riferibili all'acido folico (acido pteroil-glutannico).l'acido folico regola la vita degli eritrociti e svolge un ruolo essenziale nel metabolismo degli aminoacidi, nella sintesi degli acidi nucleici, e in molte reazioni metaboliche alle quali prende parte anche la vitamina B₁₂.

A concentrazioni fisiologiche i folati sono assorbiti tramite un processo attivo mediato da un

carrier, mentre ad alte concentrazioni il processo è passivo. L'assorbimento avviene principalmente nel digiuno, ed è influenzato dal pH (Sezlhub *et al.*, 1984).

I folati si trovano nelle carni (soprattutto frattaglie) e nei vegetali (in particolare fagioli, pomodori, arance), in forma più o meno legata e disponibile. Esistono infatti negli alimenti fattori che ne diminuiscono l'assorbimento. Stati di carenza marginale di acido folico si verificano in Italia così come in altri Paesi.

L'insufficiente apporto di acido folico porta nell'uomo ad una riduzione della sintesi di DNA e RNA, con la conseguente insorgenza di manifestazioni assai gravi a carico di cellule a rapido *turn-over* come quelle del midollo osseo, causando così l'anemia megaloblastica. La carenza di folati nelle donne in stato di gravidanza è frequente, e costituisce un fattore di rischio della comparsa della spina bifida nel nascituro, una gravissima turba a carico del midollo spinale.

Apporti di folati fino a 5 mg/*die* sembrano tollerati senza effetti collaterali. Apporti elevati di folati hanno però l'effetto di mascherare un'eventuale carenza in vitamina B₁₂. Poiché tale carenza può avere effetti neurologici irreversibili, si consiglia di evitare eccessive supplementazioni di folati.

Il fabbisogno giornaliero è di 200 µg (www.sinu.it).

PIRIDOSSINA (VITAMINA B₆)

Con il termine di vitamina B₆ vengono compresi tre composti metabolicamente convertibili tra loro - la piridossina, il piridossale e la piridossamina - ed i rispettivi esteri fosforici (Bender, 1989). Questi ultimi composti sono metabolicamente attivi, in quanto si trovano legati a numerosi enzimi che intervengono in massima parte nel metabolismo degli aminoacidi e di altre sostanze azotate. La vitamina B₆ è anche implicata in alcune reazioni del metabolismo glucidico (glicogenolisi) e lipidico (sintesi degli acidi grassi insaturi).

Gli esteri della vitamina B₆ presenti negli alimenti vengono defosforilati prima di essere assorbiti a livello dell'intestino tenue, mediante un processo che richiede energia.

La carenza di vitamina B₆, piuttosto rara, è causa di problemi nervosi, convulsioni e disfunzioni renali. Anche livelli di assunzione superiori a 50 mg/*die* sono stati associati con una neuropatia sensoriale periferica, e vanno dunque considerati potenzialmente dannosi (Schaumberg *et al.*, 1983).

La vitamina B₆ è largamente diffusa negli alimenti di origine sia animale che vegetale e viene in parte sintetizzata dai microrganismi intestinali. Parte della vitamina B₆ presente negli alimenti vegetali è sotto forma di glicosidi di piridossamina, non idrolizzabili dagli enzimi intestinali e

quindi non biologicamente disponibili.

Il fabbisogno giornaliero è correlabile alla quota proteica assunta con la dieta, si stima la necessità di assumere 1,5 mg per 100g di proteine (www.sinu.it).

VITAMINA B12 (CIANOCOBALAMINA)

Con questo termine si comprende un gruppo di sostanze caratterizzate da un anello corrinico contenente un atomo di cobalto: le cobalamine. Le forme più note sono l'idrossicobalamina (naturale) e la cianocobalamina. Ha un ruolo importante nella crasi ematica e rappresenta un coenzima fondamentale nel metabolismo dell'acido nucleico.

Per essere assorbita a livello dell'ileo la vitamina B₁₂ deve prima legarsi al fattore intrinseco, una glicoproteina secreta dalle cellule parietali dello stomaco. La percentuale di assorbimento varia con la dose ingerita. La vitamina B₁₂ viene molto ben immagazzinata nell'organismo; la sua emivita è stata calcolata in 1-4 anni (*Commission of the European Communities, 1993*).

La vitamina B₁₂ può essere sintetizzata in natura solo da batteri, funghi e alghe. È presente, seppure in piccolissime quantità, in tutti gli alimenti di origine animale, per l'accumulo delle quantità sintetizzate dai batteri. Il fegato ne è particolarmente ricco. Gli alimenti vegetali non contengono vitamina B₁₂.

La carenza di vitamina B₁₂ provoca disturbi a carico del sistema nervoso e della crasi ematica. La causa principale della deficienza di vitamina B₁₂ è certamente la riduzione dell'assorbimento, dovuta spesso alla distruzione delle cellule delle pareti dello stomaco da parte di autoanticorpi con conseguente diminuzione o mancanza di secrezione del fattore intrinseco. L'anemia macrocitica megaloblastica, identica a quella da carenza in folati, è il segno clinico più visibile della deficienza. Le diete strettamente vegetariane sono ad alto rischio di deficienza in vitamina B₁₂.

Livelli di ingestione doppi o tripli di quelli normali non causano effetti dannosi, mentre quantità maggiori di 200 μg possono presentare rischi di tossicità. Il fabbisogno giornaliero è di 2 μg al giorno (www.sinu.it).

VITAMINA PP (VITAMINA B3)

Con il termine vitamina PP (o niacina) vengono indicati sia l'acido nicotinico che la sua amide, la nicotinamide. Sotto forma di coenzimi partecipano a numerose reazioni di ossidoriduzione, sia a livello dei processi catabolici sia di quelli anabolici, quali sintesi di acidi grassi e aminoacidi. La

niacina può essere sintetizzata a partire dal triptofano, un aminoacido essenziale. Il fabbisogno di triptofano e di niacina viene quindi espresso globalmente come "Niacina Equivalenti" (Bender & Bender, 1986).

La niacina, introdotta nella dieta sotto forma dei coenzimi NAD e NADP, viene assorbita dopo idrolisi da parte degli enzimi intestinali, e in parte dopo deamidazione.

La vitamina PP è presente nel lievito, negli alimenti di origine animale (carni), ed è sufficientemente stabile ai processi ai quali essi vengono sottoposti. Nei cereali la niacina è poco biodisponibile.

La vitamina PP è tendenzialmente stabile alla luce e al calore.

Una insufficiente assunzione di niacina e triptofano porta nel tempo all'insorgenza detta "pellagra", caratterizzata da lesioni a carico della cute (dermatite), dell'apparato digerente (diarree) e del sistema nervoso centrale (demenza).

Dosi elevate di acido nicotinico dell'ordine di 500 mg/die provocano danni al fegato, e dosi ancora più elevate (3-6 g/die) provocano vasodilatazione con conseguente ipotensione (Winter & Boyer, 1973). Il fabbisogno giornaliero è di 13-18 mg, tendente ad aumentare nelle diete ipercaloriche (www.sinu.it).

1.4 L'ALPEGGIO

1.4.1 LA REALTÁ DELLE MALGHE

L'attività dell'alpeggio e la vita della malga sono espressioni peculiari delle più antiche tradizioni della nostra agricoltura di montagna, testimonianza dell'attaccamento al territorio e della ricerca della genuinità nel rapporto con la natura attraverso il lavoro dell'uomo (Miori M., 2005).

La zootecnia ha rappresentato, fino ad alcuni decenni fa, una risorsa fondamentale per l'agricoltura di montagna.

Oggi le attività della malga e dell'alpeggio in generale vivono problematiche che rischiano di intaccare la loro sostenibilità, in primo luogo economica, non solo per effetto dell'importante e progressivo affermarsi dei modelli di sviluppo turistici nelle nostre vallate bensì, ed in misura ben maggiore, per i profondi cambiamenti negli stili e ritmi di vita, che hanno percorso il nostro tessuto sociale. Inoltre, la riorganizzazione dei sistemi zootecnici alpini, la concentrazione delle attività nei siti più favorevoli, l'aumento delle dimensioni aziendali, il miglioramento genetico degli animali allevati e il largo uso di alimenti extra-aziendali, nel tempo hanno avuto riflessi negativi sulle attività dell'alpeggio causando una contrazione delle superfici foraggere legate ai prati permanenti e ai pascoli, e la riduzione delle tradizionali attività malghive.

Da alcuni anni l'alpeggio e la zootecnia estensiva comunque stanno suscitando un sensibile interesse a livello comunitario, in ragione del loro contributo alla variabilità del paesaggio, delle implicazioni positive sul benessere animale, al potenziale rappresentato dalla qualità e tipicità dei loro prodotti, all'integrazione con l'attività turistica, di recupero delle "radici" e degli elementi di identità della nostra terra e della nostra gente, della nostra cultura in quanto una zona di montagna come la nostra, malghe e pascoli, oltre a caratterizzare in modo affascinante il territorio e l'ambiente, da secoli rappresentano un prezioso tassello del vissuto e delle faticose esperienze della nostra gente (Miori M., 2005).

1.4.2 LA TIPICITÀ DELLE PRODUZIONI D'ALPEGGIO

La zootecnia di montagna, per tradizione e necessità, basa la propria esistenza e redditività sulla produzione casearia. Il formaggio, prodotto principale degli alpeggi, rappresenta una tradizione gastronomica oltre che un possibile elemento di valorizzazione indiretta del paesaggio e dell'ambiente, come dimostrano diversi studi sull'argomento. Il formaggio prodotto con latte di animali al pascolo, che si alimentano quindi con l'erba caratteristica di ogni ambiente, e realizzato con le tecniche tradizionali delle malghe, rispettose dei microrganismi originari del latte, è quello che garantisce il massimo legame con l'ambiente di provenienza ed è inoltre caratterizzato dal massimo grado di "tipicità". Non a caso il nome di un formaggio richiama il più delle volte una località, una regione o in ogni caso un nome di luogo. Questo legame però può essere più o meno stretto, più o meno riconoscibile, perché può sfumare e confondersi per azione delle numerose variabili che, interagendo fra di loro, determinano la "personalità" del formaggio prodotto.

La ricchezza e la particolarità delle specie vegetali, con cui si alimentano gli animali al pascolo, è il primo elemento che influisce sulle caratteristiche del formaggio di malga, che ha sempre una pasta dal colore giallo più o meno intenso, per il suo contenuto in caroteni derivati dall'erba; i suoi profumi e sapori sono poi determinati dalla composizione botanica dei pascoli e dalla flora microbica locale. Le produzioni artigianali, si sa, sono tutt'altro che standardizzate, mantengono cioè un'identità.

Nei formaggi a latte crudo, infatti, il patrimonio microbico del latte riveste grande importanza sia nelle fasi di lavorazione sia nella maturazione dei formaggi da esso derivati. Le caratteristiche del latte dipendono infatti dalla specie, dalla razza, dal tipo di alimentazione dell'animale. A parità di questi aspetti poi, ogni ambiente arricchisce il latte con una popolazione microbica specifica ed inoltre determina la flora presente sui prati e sui pascoli. Questi due fattori sono fondamentali nella

formazione degli odori e sapori del latte (www.aiab.it).

Le diverse fasi del processo di trasformazione del latte in formaggio sono in grado di operare una selezione ed una moltiplicazione microbica più o meno spinte delle diverse specie microbiche presenti nel latte di partenza: sarà la complessa attività di questi microrganismi, combinata alle tecniche di caseificazione, a influire in modo determinante sulle caratteristiche del formaggio prodotto. Oltre a caratterizzare il formaggio, la componente microbica condiziona la salubrità dei prodotti; la sopravvivenza dei formaggi d'alpeggio è possibile solo se si considerano debitamente tutti gli aspetti legati alla loro produzione, senza trascurare le condizioni igieniche e strutturali dei locali di lavorazione. È evidente che i principi di autocontrollo sulla qualità igienica delle produzioni debbano essere adattati alle condizioni particolari d'alpeggio (Quaderno sozoalp, 2006). La produzione in alpeggio costituisce, infatti, un caso del tutto particolare in considerazione della localizzazione particolarmente disagiata delle strutture, nel loro uso limitato nel corso dell'anno e del loro legame con la tradizione. La normativa in materia di trasformazione casearia ha preso atto di queste esigenze attraverso la concessione di deroghe per i prodotti d'alpeggio.

1.4.3 FATTORI CHE INFLUISCONO SULLA COMPONENTE QUANTI- QUALITATIVA DEL LATTE IN ALPEGGIO

A partire dagli anni '70, l'aspetto qualitativo è stato considerato non più in opposizione ma in supporto alla quantità tenendo conto delle esigenze e delle crescenti aspettative del consumatore. Attualmente, la "qualità", aspetto fondamentale nel settore alimentare e, in particolare, in quello lattiero-caseario, è un concetto complesso, ma che si può scindere in più componenti che nel loro insieme costituiscono il reale "valore" del prodotto. La qualità dovrebbe considerare in modo più approfondito le caratteristiche di composizione o le proprietà particolari di un prodotto che permettano di distinguerlo da altri. La qualità del latte è però molto variabile, in quanto condizionata sia dalla complessa attività metabolica dell'animale sia da fattori nutrizionali e ambientali.

In particolare, variazioni quanti- qualitative e compositive del latte sono dovute a fattori endogeni ed esogeni all'animale, tra i primi troviamo quelli di origine genetica (dovuti alla razza e alla variabilità individuale) e quelli di origine fisiologica (stato di salute e stadio di lattazione), mentre

tra i fattori esogeni troviamo i parametri zootecnici tra cui il sistema di allevamento, la tecnica e i tempi di mungitura, la stabulazione, il clima e l'alimentazione. Tali fattori non agiscono indipendentemente gli uni dagli altri, ma interagiscono tra loro. Ciò significa che la piena estrinsecazione delle potenzialità di un animale dipende in larga misura dall'ambiente, inteso nel senso più generale, e che soggetti molto produttivi in un determinato contesto, possono risultare meno convenienti in situazioni ecologiche diverse (Comba *et al.*, 1995).

Effetto del pascolo

I pascoli di quota sono sempre stati una delle principali risorse ed uno dei tratti caratteristici dell'identità alpina. Nel mese di giugno il bestiame è trasferito in alpeggio da alcune aziende zootecniche di fondovalle. E' noto come la pratica del pascolo estivo in alpeggio abbia una favorevole influenza sullo stato generale di salute degli animali, tuttavia il tipo genetico delle bovine in particolari condizioni climatiche, alimentari e sociali, sembra in alcuni casi condizionare la produttività quanti- qualitativa del latte (Malossini *et al.*, 1992; Franci *et al.*, 1997); inoltre le bovine monticate oggi hanno potenzialità lattifere di gran lunga superiori rispetto a quelle monticate in passato, conseguenza del miglioramento genetico e del fatto che non è più rispettata rigorosamente la consuetudine dei parti stagionali concentrati in autunno-inizio inverno.

Le vacche al pascolo, a parità di peso, fase fisiologica, produzione di latte, manifestano fabbisogni nutritivi in termini di energia superiori rispetto all'animale stabulato. A queste maggiori esigenze concorrono il maggiore movimento e le basse temperature notturne.

Il pascolo offre agli animali una vegetazione molto composita ed è l'unico alimento in grado di arricchire il latte ed i suoi derivati di molecole importanti per la salute e il palato del consumatore. Va però precisato che l'erba non sempre garantisce ottimali condizioni nutritive agli animali: la vegetazione dei pascoli naturali cambia profondamente nel corso delle stagioni. Nei periodi in cui la disponibilità di erba nei pascoli è più limitata si ha anche il più elevato disequilibrio tra i nutrienti dell'erba (Fedele, 2001), i pascoli in quota sono infatti caratterizzati da un breve ciclo vegetativo e quindi da un rapido e progressivo aumento delle frazioni fibrose e dalla diminuzione della digeribilità della sostanza organica e del tenore di proteine. Parallelamente, aumenta il tempo di permanenza dell'alimento a livello ruminale, a causa del suo maggiore ingombro e da ciò deriva la minore ingestione e la conseguente penalizzazione dell'animale nell'obiettivo di una piena copertura dei propri fabbisogni.

Il regime alimentare dell'alpeggio può pertanto determinare uno sbilanciamento tra fabbisogni

dell'animale ed apporti nutritivi, con conseguenze negative sia per l'animale che per la produzione. La cattiva alimentazione si riflette da un lato sulla qualità del latte, in particolar modo sulle sue proprietà reologiche che assumono particolare rilevanza in un contesto quale quello di malga dove, solitamente, tutto il latte è trasformato in formaggio, dall'altro sullo stato sanitario della vacca, con ripercussioni economiche difficilmente quantificabili (Berry *et al.*, 2001a, Berry *et al.*, 2001b).

La precarietà produttiva del sistema pascolivo e le maggiori esigenze nutritive delle vacche in alpeggio possono essere risolte attraverso mirati interventi di integrazione alimentare senza però che questa interagisca con i nutrienti dell'erba (Gusmeroli *et al.*, 1985), poiché durante l'estate l'erba è maggiormente caratterizzata da piante aromatiche (timo, menta, origano...), gli interventi di integrazione dovrebbero semplicemente correggere il disequilibrio nutritivo dell'erba, che fornisce di norma una modesta quantità di energia digeribile, conservandone le fondamentali caratteristiche qualitative che si rispecchiano nei prelibati formaggi d'alpe (Fedele, 2001).

Il riequilibrio ideale della dieta a base di erba di pascolo si realizza attraverso l'integrazione con sali minerali, fieno e concentrati (Corti, 2003). Le prime due integrazioni fanno parte della tradizione pastorale, l'impiego di concentrati, al contrario, costituisce una pratica recente, che si è resa necessaria per mantenere elevate le produttività degli animali e che rappresenta un elemento di discussione.

1.4.4 PARAMETRI PER DEFINIRE LA QUANTITÀ E QUALITÀ DEL LATTE, CON PARTICOLARE RIFERIMENTO ALL'INFLUENZA DELLA FASE DI ALPEGGIO

Andando ad osservare alcuni tra i parametri chimici e biologici più significativi per definire la qualità del latte è possibile evidenziare come, con particolare riferimento alla fase di alpeggio, vari fattori possano influenzarli.

La componente lipidica

Il grasso costituisce il macrocomponente del latte più soggetto a variazioni, sia quantitative che qualitative. Prima di analizzare le relazioni tra questo parametro ed i fattori che agiscono in condizioni di alpeggio occorre ricordare alcuni aspetti di carattere più generale. Il tenore in grasso

del latte non è costante nel corso della lattazione: i valori più bassi si riscontrano a 2-3 mesi dal parto in concomitanza con il picco di lattazione, per poi tendere ad un progressivo e costante aumento con il procedere della lattazione; anche l'età degli animali può influenzare il contenuto lipidico, aumentando fino ad una certa età per poi diminuire. Per quanto riguarda le operazioni di mungitura, è noto inoltre che una mungitura incompleta ed un intervallo irregolare tra le mungiture, influenzano negativamente il tenore lipidico. Non si deve infine dimenticare lo stress al quale sono sottoposti gli animali se le condizioni ambientali non sono ottimali, causando una evidente contrazione della produzione di grasso: il clima, attraverso le componenti umidità, temperatura e altitudine può influenzare infatti il tenore lipidico (Alais, 1988; Piva, 1989b).

In condizioni di monticazione la concentrazione lipidica generalmente aumenta: numerose ricerche confermano infatti che in coincidenza dell'inizio del periodo di pascolamento il contenuto in grasso del latte cresce (Battaglini *et al.*, 2001a, 2003c; Bianchi *et al.*, 2002; Gorlier, 2002). E' l'altitudine, in primo luogo, ad influire su tale andamento: al crescere della quota si incrementa contestualmente la percentuale di grasso.

L'alimentazione rappresenta, comunque, la principale causa di variazione.

Se da un lato, ad inizio alpeggio le diverse razze fanno rilevare aumenti del contenuto in grasso del latte, dall'altro, proprio le stesse razze, allevate nel medesimo ambiente, si differenziano attraverso significative variazioni del livello di incremento e la qualità degli stessi grassi (Bailoni, 2005).

Escludendo la variabilità legata alla razza, allo stadio di lattazione ed ai fattori climatici, le cause di variazione della frazione lipidica nel latte d'alpeggio possono essere ricercate in diversi elementi:

- età dei soggetti;
- riduzione complessiva della quantità di latte prodotta, in conseguenza di una diminuzione dell'ingestione;
- caratteristiche compositive (frazione acidica) dell'erba consumata.

In quest'ultimo caso, considerando la relazione tra l'aspetto bromatologico dell'erba e il contenuto lipidico del latte, diventa possibile condizionare la produzione quanti- qualitativa dei bovini tramite le modalità gestionali (Brun-Bellut *et al.*, 1985; Mordenti e Pacchioli, 1992). Occorre anche ricordare la possibile esistenza di altri elementi in grado di influire sul latte: diversi Autori segnalano l'incidenza delle condizioni ambientali ed in particolare del caldo, sulla capacità produttiva degli animali e sulla frazione lipidica del latte (Succi, 1997; Morhand-Fehr e Doreau, 2001).

Il pascolo alpino estivo agisce positivamente sul profilo acidico: gli acidi grassi insaturi aumentano significativamente ed il rapporto acidi grassi saturi/insaturi di conseguenza diminuisce. Ciò è particolarmente evidente in realtà alpine caratterizzate in prevalenza da un sistema di alimentazione intensivo (insilato e concentrati), in fondovalle, durante la stagione di stabulazione, e da un regime alimentare basato sul pascolo, senza integrazione, in alpeggio, durante la fase centrale della stagione estiva (Battaglini, 2003b; Bianchi *et al.*, 2003). Il profilo acidico del latte è influenzato positivamente dall'elevata quantità di acidi grassi polinsaturi (in prevalenza linoleico e linolenico) presenti nell'erba (Bianchi *et al.*, 2002a).

Gli acidi grassi polinsaturi in particolare, non sono sintetizzati dai tessuti dei ruminanti, per cui la loro concentrazione dipende strettamente dalla quantità assorbita nell'intestino e dalla quantità rilasciata dal rumen (Agabriel, 2001). Gli acidi grassi polinsaturi, nonostante rappresentino normalmente circa il 70-80 % della componente acidica nell'erba del pascolo, sono mediamente contenuti fino al 3% della analoga quota del latte. Alcuni studi segnalano aumenti delle proporzioni degli acidi grassi polinsaturi nel latte di montagna collegati ad una ridotta attività di idrogenazione ruminale a carico degli acidi grassi dell'erba, oltre che ad un maggiore tenore degli stessi polinsaturi nell'alimento (Bugaud *et al.*, 2001a). Le osservazioni effettuate sul latte prodotto nel corso della stagione di alpeggio (Gorlier, 2002) evidenziano l'aumento della quota lipidica monoinsatura, quella degli acidi grassi a lunga catena e la diminuzione della quota di acidi grassi saturi, in accordo con quanto rilevato da altri Autori (Bugaud *et al.* 2001a; Collomb *et al.* 1999, 2003). Sempre secondo Bugaud *et al.* 2001a), la diminuzione della produzione lattea che generalmente si riscontra in alpeggio in seguito ad una più limitata ingestione, può indurre a sua volta una diminuzione dei precursori responsabili della sintesi degli acidi grassi a corta e media catena: per tale motivo il latte di montagna complessivamente si trova ad avere alte proporzioni di acidi grassi a lunga catena insaturi, derivanti anche da una desaturazione a carico di quelli già formati riscontrando valori estivi superiori di un terzo o due terzi, in media e alta montagna, rispetto al dato del latte ottenuto con l'alimentazione primaverile di fondovalle (Collomb *et al.*, 2003). Lo stesso Collomb, in un precedente lavoro (1999), già riportava che tali variazioni potrebbero essere invece determinate da una differente composizione botanica dei pascoli di altitudine.

L'erba pascolata viene quindi ad avere nel complesso effetti simili ad un arricchimento della dieta con acidi grassi polinsaturi della serie C:18, ed i rapporti varierebbero stagionalmente a seconda dello stadio fenologico (Decaen e Ghadaki, 1970).

L'interesse per la conoscenza del profilo acidico del latte deriva da un'attenzione crescente nei

confronti delle caratteristiche compositive e sensoriali dei prodotti d'alpeggio in funzione della loro caratterizzazione territoriale. La presenza degli acidi grassi è infatti ritenuta fondamentale per la determinazione dell'aroma e nella definizione del "flavour" dei prodotti caseari, rappresentando essa stessa una sorgente di costituenti volatili aromatici (Bugaud *et al.*, 2001a, 2001b; Valfrè *et al.*, 1999; Contarini, 1984). Se da un lato quindi, un tasso lipidico più elevato consente una migliore valorizzazione casearia del prodotto finale, dall'altro occorrerà discriminare in particolare tale frazione dal punto di vista qualitativo.

L'influenza del pascolamento sulla composizione della materia grassa è inoltre un tema attuale in ragione delle proprietà nutrizionali e reologiche ricercate nei prodotti caseari: il profilo lipidico raccomandato per le diete volte alla prevenzione delle malattie cardiovascolari indica infatti come ideale per l'alimentazione un basso contenuto in acidi grassi saturi ed un elevato contenuto in acidi grassi monoinsaturi e polinsaturi, con elevati rapporti n3/n6 e C 18:1/ C 18:0 (Bugaud *et al.*, 2000; Grummer, 1991; Gorlier, 2002).

Tra i componenti del grasso del latte i coniugati dell'acido linoleico (CLA) rappresentano una quota di notevole interesse attuale: queste molecole devono il notevole interesse del mondo scientifico soprattutto alla rilevante attività antitumorale ed ad altre importanti proprietà come quella antiaterogena, immunomodulatrice, antidiabetica, di promozione della crescita, miglioratrice della massa muscolare (Ip *et al.*, 1994; Pariza *et al.*, 2001). I CLA sono particolarmente presenti nel latte, soprattutto in quello vaccino e ovino (Griinari e Bauman, 1999; Jahreis *et al.*, 1999): se ne rileva particolare abbondanza nel latte ottenuto dalle bovine al pascolo (Kelly *et al.*, 1998) e ciò grazie a processi di bioidrogenazione degli acidi grassi polinsaturi (linoleico *in primis*, presente in natura in numerosi vegetali prato-pascolivi) operata dai microrganismi ruminanti, soprattutto *Butyrivibrio fibrisolvens*, il quale converte l'acido linoleico contenuto nelle piante verdi e lo trasforma in acido linoleico coniugato: tale trasformazione è particolarmente efficiente negli animali in condizione di dieta che mantenga tutto l'anno un elevato rapporto foraggi/concentrati (Chilliard *et al.*, 2001).

E' anche da ricordare l'effetto favorevole di altri componenti dei grassi, quali vitamine e carotenoidi, particolarmente abbondanti nei formaggi di pascolo d'altitudine che, parallelamente al calo di acidi grassi saturi, mette in evidenza la valenza salutistica dei formaggi d'alpe (Lucas *et al.*, 2003).

La componente proteica

Il tenore proteico del latte è meno soggetto a variazioni rispetto al tenore lipidico, tuttavia alcuni fattori sono in grado di modificarlo.

Dopo il parto, per i primi mesi, si ha la progressiva riduzione delle proteine, come nel caso dei lipidi; in seguito se ne registra un graduale incremento. Per quanto riguarda l'età, e quindi il numero di lattazioni, le caseine diminuiscono con l'invecchiamento della bovina. E' comunque sempre l'alimentazione e, nello specifico, la quantità di energia somministrata alle bovine che maggiormente influenza maggiormente il contenuto proteico del latte (Alais, 1988).

Durante la stagione di pascolo il contenuto in proteine è caratterizzato normalmente da un andamento crescente, attribuibile alla diminuzione della quantità di latte prodotto con l'avanzare dello stadio di lattazione. Inoltre esso è complessivamente molto più costante di quello del grasso, grazie all'azione selettiva a cui il parametro è stato sottoposto dal punto di vista genetico nelle razze più specializzate quali la Bruna (Bianchi *et al.*, 2002a).

E' noto anche che un aumento dei livelli energetici della razione, oltre a favorire una miglior utilizzazione delle proteine fornite dagli alimenti, tenda conseguentemente ad aumentare il tenore proteico del latte (Brun-Bellut *et al.*, 1985; Piva, 1989a).

Un certo incremento della proteina grezza dell'erba in corrispondenza dei ricacci tardo-estivi condiziona in qualche modo una tendenza positiva della quota proteica del latte a fine estate (Gorlier, 2002). Alcuni Autori evidenziano che il calo del tenore proteico ed un peggioramento delle proprietà casearie del latte siano da ascrivere al periodo di monticazione (Zemp *et al.*, 1989; Bovolenta *et al.*, 1998; Berry *et al.*, 2001a,b) e questo evidentemente penalizza le pratiche di una conveniente caseificazione (Ikonen *et al.*, 1999; Verdier-Metz *et al.*, 2001). Tale andamento potrebbe essere spiegato con un particolare incremento delle esigenze energetiche, anche quale effetto della maggior domanda al fine della sintesi ematica legato alla rarefazione dell'ossigeno atmosferico (Kirchgessner *et al.*, 1986). La diminuzione del tenore proteico porterebbe di conseguenza ad una riduzione del tasso caseinico e dunque ad un peggioramento delle proprietà reologiche del latte (Hermansen *et al.*, 1999). Una certa responsabilità del fenomeno potrebbe derivare anche dall'andamento della plasmina (Bugaud *et al.*, 2001a): l'aumento della plasmina e del plasminogeno del latte sarebbe da imputare non tanto a condizioni di ipossia, quanto piuttosto a sfavorevoli condizioni di pascolo e di clima, minor ingestione alimentare ed eventuali mastiti subcliniche. Altri Autori rilevano invece una ridotta attività del sistema plasmina sui pascoli d'alta quota, probabilmente per un minore impegno nella locomozione da parte degli animali controllati (Leiber *et al.*, 2003). Alcune recenti ricerche evidenziano che la plasmina presente naturalmente nel latte favorirebbe una maggior proteolisi e dunque una tessitura meno solida dei formaggi ottenuti (Buchin, 2003).

Il lattosio

La concentrazione di lattosio nel latte è direttamente legata alla produzione lattea conseguita dall'animale: un calo della secrezione del disaccaride, anche per carenze energetiche, ha come conseguenza la diminuzione della quantità di latte prodotto (Succi, 1997).

In condizioni di alpeggio il contenuto in lattosio del latte non manifesta particolari variazioni ad eccezione di una parziale riduzione per effetto dell'avanzare della lattazione e del conseguente calo produttivo e ciò indipendentemente dalle caratteristiche del foraggio pascolivo.

L'utilizzazione di un'erba con migliori caratteristiche nutritive, comporta un aumento della produzione lattea con paralleli aumenti di proteine e lattosio, legati rispettivamente al valore azotato ed energetico ad esempio dei ricacci, ed un calo dei grassi, la cui sintesi viene al contrario ridotta da tale condizione (Gorlier, 2002).

L'urea

La valutazione del contenuto in urea è particolarmente importante in quanto un suo eccesso nel latte va a tradursi in un peggioramento dell'attitudine alla trasformazione casearia e delle caratteristiche organolettiche e di tessitura delle forme (Coulon *et al.*, 1997).

A tale proposito diversi Autori considerano fondamentale valutare la quota proteica degli alimenti per spiegare il tenore in urea, in quanto la quantità di azoto trattenuta dall'animale, presente nel latte e nel sangue, aumenta linearmente con la quantità di azoto ingerita (Demarquilly e Jarrige, 1981; Piva 1989a; Brun-Bellut *et al.*, 1985; Succi, 1997; Coulon, 1997; Ubertalle *et al.*, 1998).

Possono essere molteplici le cause in grado di contribuire alla presenza di urea nel latte: tra questi sono segnalati fattori stagionali legati al contenuto proteico dell'erba, fattori metabolici e fattori sanitari a carico dell'animale, da cui conseguirebbe per esempio una relazione positiva tra il contenuto in cellule somatiche e quello di urea nel caso di mastiti di origine alimentare.

L'aumento della concentrazione di urea soprattutto in primavera è da imputare a regimi alimentari a base di erba di pascolo, ricca in proteine digeribili quando i tessuti sono più giovani, unitamente ad integrazioni alimentari che non tengono adeguatamente conto di tale contributo (Agabriel *et al.*, 2001; Brun- Bellut *et al.*, 1985).

Negli stessi ambienti, nella stagione estiva, vengono osservati cali del tenore ureico del latte quale conseguenza della diminuzione del valore nutritivo ed energetico dell'erba invecchiata in alpeggio;

il successivo aumento a fine alpeggio è collegabile sia all'elevata digeribilità sia al tenore proteico dei ricacci (Brun- Bellut *et al.*, 1985; Giardino, 1996).

Le cellule somatiche

Il numero di cellule somatiche corrisponde al conteggio delle cellule presenti nel latte, comprendendo quelle epiteliali della mammella e soprattutto i globuli bianchi, presenti in grandi quantità in caso di infezioni; può quindi essere considerato un indice dello stato sanitario degli animali e delle condizioni igienico-sanitarie dell'allevamento (Succi, 1997; Coulon, 1997). L'importanza di valutare costantemente tale parametro deriva dal fatto che un'infezione può avere conseguenze sulla qualità microbiologica e sulla composizione chimica del latte, con un impatto tecnologico non indifferente proprio là dove l'obiettivo è la trasformazione casearia.

La presenza di cellule somatiche nel latte è tuttavia da ritenere fisiologica entro certi limiti. E' quindi corretto che il latte contenga un determinato numero di cellule, crescente con il procedere della lattazione, in funzione del rinnovamento dell'epitelio ghiandolare della mammella; il valore può tuttavia crescere irregolarmente a causa di mastopatie cliniche e subcliniche.

Tra i principali fattori che favoriscono l'insorgere di infiammazioni alla mammella si ricordano pratiche errate di mungitura, contaminazioni ambientali ed errori nell'alimentazione animale (ad es. passaggio repentino da foraggio secco a verde).

Numerose ricerche evidenziano complessivamente una netta crescita dell'indice citologico durante l'estate ed in particolare per le bovine condotte in alpeggio; tale aumento è correlato al cambiamento di ambiente ed ai trasferimenti delle mandrie, in grado di favorire stati di stress nell'animale (Agabriel *et al.*, 2001; Coulon *et al.*, 1997; Bugaud *et al.*, 2001a; Pomiès *et al.*, 2000), specie nel caso di razze particolarmente specializzate.

1. 5 IL FORMAGGIO

Il termine “formaggio” deriva dall’antico francese *formage*, il quale a sua volta, deriva dal latino (caseum) *formaticum*, ossia (cacio) “messo in una forma”.

Il formaggio è un prodotto alimentare che si ricava dal latte, da cui si ottiene per coagulazione della caseina. La caseina è la più importante delle molte proteine che il latte contiene; forma circa l’80% delle proteine del latte. È una grossa proteina, che al suo interno contiene varie frazioni (alfa, beta e kappa caseina). Queste frazioni, sotto l’azione di specifici enzimi e dell’acidità del latte, coagulano, formando la cagliata.

Classificazione

Per classificare i formaggi, molti sono i criteri adottabili. Le caratteristiche di un formaggio vengono descritte da una serie di parametri che fanno riferimento alla loro composizione, alla consistenza, alla tecnologia di produzione e al periodo di stagionatura.

I formaggi D.O.P. (Denominazione di Origine Protetta)

In base al regolamento 2081/92 vengono riconosciuti con Denominazione di Origine i formaggi originari di una Regione o luogo, o Paese determinato e le cui qualità e caratteristiche siano dovute essenzialmente o esclusivamente all’ambiente geografico comprensivo dei fattori naturali ed umani e la cui produzione, trasformazione ed elaborazione avvengano nell’area geografica delimitata.

1.5.1 L’ASIAGO

Origini

L’Asiago prende il nome dalla zona in cui si produce, l’Altopiano di Asiago. Le sue origini risalgono all’anno Mille, epoca in cui veniva ricavato dal latte di pecora.

Con la modernizzazione delle tecniche di allevamento, intorno al 1500, le pecore lasciarono il posto ai bovini, e, di conseguenza, il latte ovino venne sostituito con quello vaccino nella produzione dell’Asiago. Nacque così la tecnica casearia ancora oggi in uso nelle malghe altopianesi e nei piccoli e medi caseifici della zona di produzione. Negli anni ’20 fu poi introdotta una nuova tecnica di produzione a più breve stagionatura, così che oggi l’Asiago viene prodotto in due tipologie

differenti, d'allevato (stagionato) e pressato (fresco).

Caratteristiche

L'Asiago DOP è un formaggio a pasta semicotta, prodotto esclusivamente con latte vaccino, ottenuto nel rispetto del disciplinare di produzione (D.M. 24/01/2005, Gazzetta Ufficiale n. 43 del 22/02/05).

La zona della raccolta del latte e della produzione del formaggio Asiago D.O.P., delimitata per legge, tocca quattro province del Nord Est d'Italia: l'intero territorio di Vicenza e Trento ed una parte delle province di Padova e Treviso (nuovo disciplinare di produzione DOP Asiago, art. 2).

Ogni forma è garantita e certificata dal Consorzio Tutela e porta sempre impresso sul bordo della forma questo marchio:



Esistono due tipi fondamentali di Asiago, distinti non solo dal periodo di stagionatura, ma anche da due differenti tecnologie di produzione: l'Asiago Pressato, a volte semplicemente detto "Pressato" e l'Asiago d'Allevato (invecchiato).

Asiago d'Allevato

Tecnologia di produzione

La produzione del formaggio Asiago D.O.P. avviene secondo le norme stabilite dal disciplinare del Consorzio di tutela, (D.M. 24/01/2005, Gazzetta Ufficiale n. 43 del 22/02/05), il quale stabilisce una serie di norme riguardanti la zona di produzione, l'alimentazione del bestiame, le modalità di produzione, l'identificazione e marchiatura.

L'Asiago stagionato è ottenuto da latte vaccino parzialmente scremato proveniente da mungiture effettuate due volte al giorno. Il latte viene esaminato, filtrato e pesato per ottenere la naturale maturazione ed essere scremato. Il latte della mungitura della sera viene lasciato riposare in bacinelle per circa 12 ore in locali a 16°C; una volta separata la panna mediante affioramento, viene miscelato con il latte del mattino. Si raggiunge in questo modo un livello di grasso di circa il 2,6%

ed una acidità di circa 3,8-4°SH/50.

Il latte può essere utilizzato crudo o termizzato a 57-68°C per 15 secondi con parametro analitico della fosfatasi positivo e può eventualmente essere addizionato di lisozima (E1105) nei limiti di legge.

Successivamente viene messo in caldaia a 35 ±2°C e vengono addizionati i fermenti lattici o latte-innesto e il caglio in modo da ottenere la coagulazione. Dopo 15/25 minuti, si procede con la spinatura fuori fuoco con rottura della cagliata fino alla dimensione di chicco di riso.

Segue quindi la semicottura praticata in tempi successivi: prima innalzando lentamente, in circa 5-10' la temperatura sino a circa 40°C, sotto agitazione lenta mantenendo la cagliata in agitazione per circa 5' a quella temperatura; infine segue la cottura rapida (5') fino a 46-48°C sempre in agitazione. Dopo riposo sul fondo della caldaia per circa 10', si dà corso all'estrazione della cagliata, alla formatura e messa in fascera della stessa.

Dopo la porzionatura, la pasta sosta per almeno tre – cinque ore sul tavolo spersore, rivoltando ad intervalli regolari le forme e pressandole. Il prodotto è quindi avviato al condizionamento in frescura dove si completa lo spurgo e avviene l'impressione del marchio di tutela. Questo trattamento si completa nell'arco di alcuni giorni (3-5) durante i quali le forme vengono sottoposte ancora a rivoltamento.

Si procede quindi alla fase di salatura che può essere condotta per immersione in salamoia a 18-20°Bé) o a secco per aspersione superficiale e infine all'asciugatura.

L'ultima fase è la stagionatura che deve essere di almeno 60 giorni per l'Allevato Mezzano e (per l'Asiago allevato che si fregia della menzione «prodotto della montagna» la stagionatura minima è di 90 giorni dall'ultimo giorno del mese di produzione) e deve avvenire all'interno della zona d'origine in magazzini i cui parametri più importanti sono la temperatura di stoccaggio e l'umidità relativa. Per le prime 2-3 settimane la temperatura è pari a 5-8°C, mentre successivamente viene portata a 10-15°C. Il valore di umidità relativa è dell' 80-85% (Salvadori del Prato, 2001).

Formaggio	Asiago Allevato (stagionato)
stagionatura	massimo due anni (4-6 mesi "mezzano")
Forma	Cilindrica a scalzo dritto Facce piane o quasi piane
Dimensione	Diametro 30-36cm; Altezza 9-12cm

Peso	8-12 kg
Crosta	Liscia e regolare

Caratteristiche fisiche dell'Asiago d'Allevato e dell'Asiago Pressato (modificato da www.asiagocheese.it)

Caratteristiche nutrizionali

L'Asiago è un alimento con un alto valore nutrizionale, ricco in proteine, lipidi, sali minerali e vitamine.

Macronutrienti. Le proteine dell'asiago, principalmente caseine, sono proteine di elevato valore nutrizionale in quanto altamente digeribili e costituite da aminoacidi essenziali. Il contenuto medio proteico è del del 28%. I grassi hanno una percentuale sulla sostanza secca del 42-44% (fonte: Istituto Lattiero Caseario e di Biotecnologie Agroalimentari di Thiene) e il contenuto in colesterolo è pari a 86 mg (modesto in rapporto alla percentuale di grassi).

Micronutrienti. I sali minerali maggiormente presenti sono calcio e fosforo, contenuti nel latte e largamente conservati nel formaggio. Altri elementi presenti sono il cloruro di sodio, derivante dal sale aggiunto in lavorazione (circa 2,5g/100g), e altri presenti in tracce tra cui ferro, magnesio e zinco. Le vitamine, presenti in quantità significative nell'Asiago sono A, B, B2, e PP. Per quanto riguarda il contenuto calorico dell'Asiago d'Allevato, le calorie per 100 g di prodotto sono 382 kcal (www.asiagocheese.it).

	ASIAGO ALLEVO
Energia	382 kcal-1586 kJ
Lipidi	31,00 %
Proteine	28,00 %
Carboidrati	Assenti
NaCl	2,40%
Vitamine	A 150 µg- B, B2, PP, tracce
colesterolo	86 mg

Tabella 1.10.2. Caratteristiche nutrizionali dell'Asiago d'Allevato e dell'Asiago Pressato per 100 grammi di prodotto (modificato da www.asiagocheese.it).

CAPITOLO 2

OBIETTIVO

La presente tesi si inserisce in un progetto più ampio di valorizzazione del formaggio stagionato di malga prodotto nella malghe dell'altipiano di Asiago (Asiago d'Allevo) e nel massiccio del Novegno.

La sperimentazione ha voluto analizzare il valore vitaminico del latte e del formaggio prodotti con bovine tenute al pascolo in malga durante la stagione estiva; in particolare è stato considerato il contenuto in vitamine liposolubili A ed E e il loro trasferimento dal foraggio fresco del pascolo al latte e dal latte al formaggio stagionato. Oltre al contenuto vitaminico sono stati analizzati anche altri parametri nutrizionali quali contenuto in proteina, grasso e lipidi. Particolare attenzione è stata dedicata al latte per il quale, oltre alla composizione centesimale si sono valutate le caratteristiche reologiche, tecnologiche e igienico- sanitarie, quali parametri fondamentali nel determinare la qualità delle produzioni casearie. I dati rilevati sono stati sottoposti ad analisi statistica per valutare

gli effetti malga (pascolo e razza) e periodo di produzione del latte (luglio e settembre).

CAPITOLO 3

MATERIALI E METODI

3.1 PERIODO DI SPERIMENTAZIONE E MALGHE COINVOLTE

La sperimentazione si è svolta tra i mesi di luglio e settembre 2006, e in particolare, lo studio ha coinvolto 5 diverse aziende venete della provincia di Vicenza, che durante il periodo estivo hanno spostato la loro attività produttiva in altrettante malghe, di cui 4 ubicate sull'Altopiano di Asiago (CO, LA, PM, ZO) e una sul Monte Novegno (ZU). Per motivi di riservatezza le malghe sono identificate con una sigla. Una breve descrizione delle malghe coinvolte nella sperimentazione viene di seguito riportata.

Malga CO

Malga CO è situata nel Comune di Asiago, ad un'altitudine compresa tra 1106 e 1300 m/slm, e ha un'estensione pascoliva di 27 ha. La malga è dotata di sala di mungitura a spina di pesce con 8 posti (4+4). La produzione di latte media giornaliera è interamente conferita al Caseificio Pennar di Asiago.

Malga LA

Malga LA è situata nel Comune di Lusiana, ad un'altitudine compresa tra 1625 e 2000 m/slm. La SAU totale è costituita da 146 ha. dei quali 95 sono destinati al pascolo; la restante parte è costituita da bosco. La malga è dotata di sala di mungitura a spina di pesce con 8 posti vacca (4+4). La produzione di latte giornaliera è destinata alla lavorazione in malga. La produzione principale è costituita da formaggio Asiago oltre al quale vengono prodotti burro e alcuni formaggi freschi quali casatella e ricotta.

Malga PM

Malga PM è situata nel Comune di Asiago, ad un'altitudine compresa tra 1700 e 1800 m/slm. La SAU totale è pari a 108 ha. dei quali 68 sono adibiti al pascolo, mentre la restante parte è coperta da bosco. La malga è dotata di sala di mungitura a spina di pesce con 8 posti vacca (4+4). La produzione di latte media giornaliera è destinata alla produzione di Asiago d'Alleva

Malga ZO

Malga ZO è situata nel Comune di Roana, ad un'altitudine media di 1350 m/slm. La SAU totale è pari a 60 ha. dei quali 48 sono adibiti al pascolo. La mandria è costituita da 57 bovine, suddivise in 51 di razza Frisona e 6 di razza Pezzata Rossa. La malga è dotata di una sala di mungitura a spina di pesce con 8 posti vacca (4+4). La produzione di latte giornaliera è in parte lavorata in malga per la produzione di Asiago Alleva, e Asiago Pressato, mentre la restante parte del latte viene conferita al caseificio Pennar di Asiago.

Malga ZU

Malga ZU è situata nel Comune di Schio, in località Monte Novegno, ad un'altitudine compresa tra 1500 e 1800 m/slm. La SAU è pari a 110 ha., interamente destinati al pascolo, grazie ad un'accurata opera di disboscamento. La mandria è costituita da 115 vacche di razza Frisona, Bruna Italiana e Pezzata Rossa. La malga dispone di una sala di mungitura a spina di pesce dotata di 6 posti vacca (3+3). La produzione di latte giornaliera è caseificata direttamente in malga; dalla lavorazione si

ottiene circa il 70% di Asiago Allevato e il 30% di Asiago Pressato.

3.2.CAMPIONAMENTO

3.2.a. pascolo

Nel mese di luglio e di settembre sono stati eseguiti per ciascuna malga dei prelievi di pascolo (foraggio verde) in 7 punti strategici e rappresentativi dell'intera superficie della malga, considerando l'intensità pascolativa delle varie zone: molto, poco o mediamente pascolate (poiché si tratta di pascolo turnato); e fisionomia morfologica del pascolo. In tal modo sono state evitate le zone marginali della malga e quelle a ridosso della vegetazione boschiva, nonché quelle non facilmente accessibili dalle bovine.

Prima di ogni rilievo si è effettuata un'analisi di tipo stazionario e agronomico: si è rilevato la profondità del suolo, la litologia, la fisionomia (micro e macromorfologica) vegetazionale e la copertura del suolo.

Le parcelle della superficie sono state raccolte tagliando con delle forbici da giardiniere, a circa 4 cm dal suolo, tutte le specie erbacee comprese in una superficie di un metro quadro, delimitata con l'aiuto di un apposito delimitatore a forma di quadrato dell'area di 1m².

Ciascun campione, subito dopo la raccolta è stato:

- suddiviso in due aliquote uguali, una delle quali è stata mantenuta come tale e definita come *pascolo integrale*, mentre l'altra è stata suddivisa in tre categorie botaniche: *graminacee*, *leguminose e altre specie* (Pasus *et al.*, 2006);
- codificato con un codice, il nome della malga e il peso totale;
- esaminato nella sua composizione floristica (individuazione e pesata delle diverse specie pabulari presenti);
- suddiviso in più sottocampioni omogenei, a loro volta codificati e destinati a differenti analisi tra cui: composizione centesimale mediante tecnica NIRS (Berzaghi *et al.*, 1999; Segato *et al.*, 2004) e successiva conferma con metodiche AOAC (2000);
- stoccato alla temperatura di -20 °C fino al momento dell'analisi.

3.2.b. Latte

Ad esclusione delle malghe LA e PM, presso le altre malghe sono stati eseguiti due campionamenti: uno nel mese di luglio (15) e uno nel mese di settembre 2006 (primi giorni del mese), per un totale di 18 campioni.

Il latte della mungitura della sera, della mattina e il latte della caldaia (miscela latte sera e mattina) è stato raccolto la mattina stessa in bottiglie sterili di plastica da 1,5 litri, poi suddiviso in più sottocampioni omogenei, ciascuno opportunamente codificato e stoccato in congelatore fino al momento dell'analisi.

Determinazione di qualità, lattodinamogramma (LDG) e urea

Una aliquota di latte intero e una di latte scremato, subito dopo il prelievo, sono state consegnate al Laboratorio latte qualità dell'Istituto per la Qualità e le Tecnologie Agroalimentari di Thiene (VI) e utilizzata per la determinazione dei parametri lattodinamografici e di quelli qualitativi, quali contenuto di urea, titoli di grasso, proteina e lattosio, cellule somatiche e carica microbica totale. Ai fini dell'analisi statistica i valori delle cellule somatiche e della carica microbica totale ottenuti dalle analisi sono state normalizzate, secondo le seguenti equazioni:

- cellule somatiche: $\log_2(\text{conta delle cellule}/100)+3$
- carica batterica: $\ln(\text{carica microbica totale})$

Per la determinazione dei principali componenti chimici del latte (grasso, lattosio, proteine e residuo secco magro) è stato utilizzato l'analizzatore infrarosso (IR) Milko-Scan 4000. Il principio di funzionamento di tale apparecchiatura si basa sulla capacità dei componenti del latte di assorbire la luce a delle specifiche lunghezze d'onda appartenenti alla regione infrarossa dello spettro elettromagnetico. Nel grasso, nelle proteine e nel lattosio sono presenti diversi legami chimici dell'idrogeno che assorbono la luce infrarossa ad una lunghezza d'onda specifica per ognuno di essi. Facendo attraversare una quantità nota di latte da un fascio di luce emesso sulla lunghezza d'onda specifica di uno dei parametri considerati e registrando le quantità di luce residua se ne può calcolare la concentrazione presente nel latte; Importante è la calibrazione esatta dello strumento.

Per la determinazione del numero delle cellule è stato utilizzato lo strumento automatico "Combi" che è costituito dal Milko-Scan 4000, che analizza il grasso, le proteine, il lattosio, il residuo secco magro e il punto crioscopico, e il Foss-Matic 400 utilizzato per la determinazione delle cellule. Il principio di funzionamento del Foss-Matic 400 si basa sul mescolare il latte ad una soluzione colorante che ha specifica affinità per il DNA cellulare e lo si illumina con una luce fluorescente

bleu-verde, in presenza della quale il colorante legato al DNA delle cellule emette una luce rossa, rilevata da un fotomoltiplicatore. Infine un microprocessore esegue i calcoli per convertire gli impulsi luminosi in valori esprimibili come numero di cellule.

La determinazione del numero di microrganismi nel latte si basa sul metodo Thompson automatizzato. Lo strumento preleva direttamente dal campione (1ml), mediante un ansa calibrata, 0.001 ml di latte, che viene poi asportato dall'ansa da un getto di soluzione fisiologica. Il getto viene direzionato su una piastra petri a cui, sempre automaticamente viene addizionata una certa quantità di agar. Le piastre poi dopo essere state incubate vengono lette tramite un contatore automatico il cui principio è simile a quello del contacellule.

I profili lattodinamografici vengono valutati tramite una apparecchiatura lattodinamografica, mentre per la determinazione del pH e dell'acidità si utilizza un calibratore automatico: il "Crisom".

3.2.c. formaggio

Il formaggio analizzato è stato prodotto con il latte di luglio e settembre 2005, ottenuto nelle medesime malghe.

Il campionamento ha consistito nel prelievo delle fette di formaggio, poi inviate al laboratorio per l'analisi centesimale (AOAC) e vitaminica.

Composizione centesimale

Ciascun campione è stato privato della crosta e di circa 1 cm di sottocrosta e sottoposto a macinazione con mulino Retsch con un ciclo di macinazione a 4000 giri per 10 secondi.

Umidità

La determinazione del contenuto di umidità è stata effettuata in stufa a 105 °C secondo metodica AOAC (1990). Dopo aver posto in stufa per circa 1 ora a 105 °C le capsule e averle raffreddate in essiccatore, si è proceduto a pesarle e ad aggiungere circa 3,5 grammi di campione. Le capsule sono state riposte in stufa a 105° C per 24 ore, quindi tolte dalla stufa, lasciate raffreddate in essiccatore e pesate. I risultati sono stati espressi come percentuale d'acqua sul tal quale.

Proteina grezza

La determinazione della proteina grezza (N-Kjeldhal x 6,38) è stata eseguita secondo metodica AOAC (1990). Circa 0,8 grammi di campione finemente macinato è stato sottoposto a digestione termica in ambiente acido. L'ammoniaca prodotta è stata distillata mediante apparato Kjeldhal. Il valore di azoto così determinato è stato trasformato in contenuto di proteina grezza utilizzando il fattore di conversione 6.38. I risultati sono stati espressi come percentuale di proteina grezza sul tale quale.

Estratto etereo

La determinazione dei lipidi è stata condotta secondo il metodo ufficiale pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale n. 229 del 02/10/1986 (supplemento ordinario). Sono presenti alcune modifiche rispetto al metodo ufficiale poiché, per velocizzare le operazioni di idrolisi ed estrazione, prima effettuate manualmente, vengono oggi impiegate apposite apparecchiature.

Per l'idrolisi sono stati utilizzati dei provettoni kjeldhal nei quali sono stati aggiunti ai 2,5 g di campione finemente macinato 100 ml di acido cloridrico 3 M e alcune sfere di celite. La miscela è stata portata a lenta ebollizione dall'idrolizzatore SOXTEC SYSTEM HYDROLYZING UNIT modello n. 1047 per consentire l'idrolisi del campione. Sempre nello stesso impianto, una volta raffreddata, la miscela è stata filtrata, lavata fino a reazione neutra e direttamente raccolta nel crogiolo di boro silicato a porosità 2 usato in seguito per l'estrazione. Prima dell'estrazione il campione è stato fatto asciugare in stufa a 60°C per una notte. L'estrazione è stata effettuata mediante l'utilizzo di un estrattore a immersione (FOSS-TECATOR SOXTEC SYSTEM HT EXTRACTION UNIT, modello n. 1043) che fa immergere il campione in una miscela di etere di petrolio e etere dietilico (50:50) per 30 minuti a 90-100°C e successivamente lo risciacqua per un'ora. Il risultato viene espresso in parti per cento del campione.

Ceneri

La determinazione delle ceneri è stata condotta secondo metodica AOAC (1990).

Le capsule, asciugate e raffreddate in essiccatore, sono state pesate e in ogni una di essa sono stati posti circa 5 grammi di campione. Lasciate in muffola a 100° C per qualche ora, la temperatura è stata progressivamente incrementata fino a raggiungere i 230°C; dopo qualche ora in tali condizioni la temperatura è stata nuovamente innalzata fino a raggiungere i 550° C. Al viraggio verso il bianco i campioni sono stati prelevati dalla muffola e riposti in essiccatore per il raffreddamento. Infine, si sono pesate le capsule. I risultati sono stati espressi come percentuale di cenere sul prodotto tale

quale.

3.3. ANALISI VITAMINICA

3.3.1. Determinazione della vitamina E nei foraggi

Per l'analisi vitaminica dei foraggi sono stati selezionati, secondo specifici parametri agronomici, alcuni dei campioni raccolti (16 di quelli raccolti a luglio e 10 a settembre per un totale di 26 campioni).

Preparazione del campione

Ciascun campione, del peso di 300g circa è stato sottoposto alle seguenti operazioni:

1. Sminuzzato con delle forbici in pezzetti di lunghezza inferiore a 1cm in modo da ottenere un campione omogeneo e facilmente congelabile;
2. 100g circa sono stati congelati in azoto liquido e macinati finemente con un mulino Retsch Grindomix 200 alla velocità di 4000 giri per 20 secondi;
3. il campione macinato è stato trasferito in falcon di plastica e stoccato alla temperatura di -20°C fino al momento dell'analisi.

Procedimento di estrazione

In una provetta da centrifuga da 50 ml con tappo in TFE rivestita con alluminio:

Si pesano 0,2 g. di campione e si aggiungono subito 2,5 ml di etanolo assoluto stabilizzato con 0,1% di acido ascorbico.

Si agita con vortex, si aggiunge 1 ml di Idrossido di potassio (KOH) al 50% (p/v) e si agita delicatamente; si insuffla quindi azoto gassoso nella provetta per almeno 3 minuti.

Si lascia in bagnomaria con agitazione a 80 °C e successivamente si raffredda in bagno di ghiaccio.

Si aggiungono 10 ml di una miscela 50:50 di etere etilico: etere di petrolio, stabilizzata con BHT (antiossidante).

Si chiude la provetta e si procede con l'estrazione agitando su vortex per 2 minuti e si lascia riposare per altri 2 minuti aspettando la separazioni delle fasi, quindi si ripete l'estrazione per altre 2 volte

agitando per 1 minuto e lasciando riposare.

Si aggiungono 5 ml di acqua fredda a temperatura di 1-2 °C circa e si agita il campione per capovolgimento, quindi si ripete l'operazione per altre 3 volte.

Centrifugare per 10' a 1000 rpm a temperatura di 15 °C.

Si prelevano 3 ml di surnatante (soluzione organica).

Si porta a secco con evaporatore rotante e si riprendono i residui con 3 ml di Metanolo per analisi in fluorimetria. (λ_{ex} =293 nm per vitamina E)

Si agita bene il campione con vortex, si filtra e si iniettano 25 μ l in HPLC.

3.3.2. Determinazione delle vitamine A ed E nel latte

Procedimento di estrazione

In una provetta da centrifuga da 50 ml con tappo in TFE rivestita con alluminio:

Si mette 1 ml di campione e si aggiungono subito 2,5 ml di etanolo assoluto stabilizzato con 0,1% di acido ascorbico.

Si agita con vortex, si aggiunge 1 ml di Idrossido di potassio (KOH) al 50% (p/v); dopo una delicata agitazione si insuffla dell'azoto gassoso nella provetta per almeno 3 minuti.

Si lascia in bagnomaria in agitazione a 80 °C e, successivamente, si raffredda in bagno di ghiaccio.

Si aggiungono 0,5 ml di una soluzione standard interna contenente una quantità nota di vitamina D.

Si aggiungono 10 ml di una miscela 50:50 di etere etilico: etere di petrolio, stabilizzata con BHT (antiossidante).

Si chiude la provetta e si procede con l'estrazione agitando su vortex per 2 minuti; si lascia quindi riposare per altri 2 minuti aspettando la separazioni delle fasi.

Si ripete l'estrazione per altre 2 volte agitando per 1 minuto e lasciando riposare.

In seguito si aggiungono 7,5 ml di acqua fredda a temperatura di 1- 2 °C circa e si agita il campione per capovolgimento.

Centrifugare per 10' a 1000 rpm a temperatura di 15 °C.

Si prelevano 3 ml di surnatante (soluzione organica).

Si porta a secco con evaporatore rotante e poi si riprendono i campioni con 300 μ l di Metanolo per analisi in UV. (λ_{ex} =324 per vitamina A, λ_{ex} =293 per vitamina E)

Si agita il campione con vortex, si filtra e si iniettano 20 μ l in HPLC.

3.3.3. Estrazione delle vitamine A ed E nel formaggio

Determinazione simultanea del colesterolo e della vitamina E

Colesterolo e della vitamina E sono stati determinati secondo la metodica di Indyk (1990) modificata come segue.

A 500 mg di campioni sono stati aggiunti 10 ml di etanolo assoluto ed agitati per evitare la formazione di grumi.

Sono stati poi aggiunti 2 ml di KOH (50% m/v), quindi dopo chiusura le provette sono state poste a incubare a 70°C per 8 minuti, agitando ripetutamente per consentire l'idrolisi dei lipidi.

Dopo raffreddamento sono stati aggiunti 20 ml di una soluzione di esano – etere diisopropilico (3 + 1), come solvente estraente. Dopo chiusura le provette sono state agitate meccanicamente per 5 minuti.

Successivamente sono stati poi aggiunti 25 ml di acqua a ciascuna provetta, agitate per capovolgimento 10 volte, quindi centrifugate a 1000 giri per 10 minuti.

Dieci millilitri della fase organica superiore sono stati portati a secco con evaporatore rotante e trappola raffreddata in azoto (temperatura <45°C).

Il residuo è stato ripreso in 2 ml di esano e iniettati 20 µl. in HPLC. Fase mobile soluzione isocratica di esano-alcol isopropilico (99,9 + 0,1 v/v), flusso 1 ml/min a temperatura ambiente, dopo filtrazione e degasazione. Lettura in fluorescenza ($\lambda_{ex} = 295$, $\lambda_{em} = 330$ nm).

La determinazione è stata condotta solo sui prodotti provenienti dalle malghe.

Determinazione delle vitamine A

La determinazione è stata eseguita secondo la metodica di Zahar e Smith (1990) modificata come segue.

A 500 mg di campione sono stati aggiunti 5 ml di etanolo assoluto addizionato dell' 0,1% di acido ascorbico.

Dopo aggiunta di 2 ml di KOH al 50% (m/v), le provette sono state tappate, poste in bagno termostato a 80°C per 20 minuti e agitate periodicamente.

Dopo saponificazione i tubi sono stati raffreddati in acqua corrente e successivamente posti in un bagno di ghiaccio.

Sono stati quindi aggiunti 20 ml di esano-etere di petrolio 1:1 addizionati di BHT (0,1%); i tubi sono stati in seguito agitati su vortex per due cicli di un minuto, intervallati da riposo di 2 minuti.

Successivamente sono stati poi aggiunti 15 ml di acqua a ciascuna provetta, agitate per capovolgimento 10 volte, quindi centrifugate a 1000 giri per 10 minuti.

Dieci millilitri della fase organica superiore sono stati portati a secco con evaporatore rotante e trappola raffreddata in azoto (temperatura <45°C).

Il residuo è stato ripreso in 1 ml di etanolo e iniettati 20 µl. in HPLC. Fase mobile soluzione isocratica di esano-alcil isopropilico (99,9 + 0,1 v/v), flusso 1 ml/min a temperatura ambiente, dopo filtrazione e degasazione. Lettura in fluorescenza ($\lambda_{ex} = 295$, $\lambda_{em} = 330$ nm).

3.4. ANALISI STATISTICA

Per l'elaborazione statistica dei dati sono stati utilizzati vari modelli lineari. Un complesso approccio statistico si è reso necessario in quanto il dataset era costituito da latte della sera, latte della mattina e latte scremato (LS) prima della caseificazione. Per evitare che l'effetto periodo e malga fosse inficiato da questa variabile tecnologica (scrematura del latte in malga o caseificio) si è quindi elaborato anche un dataset parziale costituito solo dal latte intero (media del latte della sera e di quella della mattina).

Per valutare l'effetto mungitura sulle caratteristiche igienico- sanitarie e qualitative del latte si è adottato un modello lineare monofattoriale. Per tale modello monofattoriale l'analisi della varianza (ANOVA) è stata condotta utilizzando la PROC GLM di SAS (1999):

$$Y_{ij} = \mu + M_i + e_{ij}$$

dove:

μ = media generale;

S_i = effetto mungitura ($i = 1; 2$)

e_{ij} = errore residuo.

Dopo aver mediato i dati del latte della sera e della mattina, ottenendo cioè un data set di latte intero, si è proceduto a ulteriori analisi statistiche.

Per valutare l'effetto scrematura sulle caratteristiche igienico- sanitarie e qualitative del latte si è adottato un altro modello lineare monofattoriale. Per tale modello monofattoriale l'analisi della varianza (ANOVA) è stata condotta utilizzando la PROC GLM di SAS (1999):

$$Y_{ij} = \mu + S_i + e_{ij}$$

dove:

μ = media generale;

S_i = effetto scrematura ($i = 1; 2$)

e_{ij} = errore residuo.

In riferimento al latte intero, un terzo modello lineare e bifattoriale ha considerato gli effetti fissi periodo e malga sulle caratteristiche igienico- sanitarie e qualitative del latte. L'ANOVA ha quindi considerato periodo e malga e la loro interazione nell'ambito della PROC GLM di SAS (1999).

$$Y_{ijk} = \mu + P_i + M_j + P*M_{ij} + e_{ijk}$$

dove:

μ = media generale

P_i = effetto periodo ($i = 1; 2$)

M_j = effetto malga ($j = 1; 2$ e 3)

PM_{ij} = interazione Periodo per Malga

e_{ijk} = errore residuo

Un quarto modello, simile al terzo, ha considerato anche il latte della caldaia, cioè quello intero dopo scrematura. Tale modello ha valutato l'effetto scrematura in relazione ai fattori fissi dello studio malga e periodo. L'ANOVA mediante PROC GLM è stata così impostata:

$$Y_{ijkl} = \mu + P_i + M_j + S_k + P*M_{ij} + P*S_{ik} + M*S_{jk} + MSP_{ijk} + e_{ijkl}$$

dove:

μ = media generale;

P_i = effetto periodo ($i = 1; 2$);

M_j = effetto malga ($j = 1; 2; 3$);

S_k = effetto scrematura ($k = 1; 2$);

PM_{ij} = interazione Periodo per Malga;

$P*S_{ik}$ = interazione Periodo per Scrematura;

$M*S_{jk}$ = interazione Malga per Scrematura;

MSP_{ijk} = interazione Malga per Scrematura per Periodo;

e_{ijkl} = errore residuo.

Infine, per il formaggio, un quinto modello lineare, simile al terzo, ha considerato nuovamente i fattori fissi periodo e malga, nonché la loro interazione, in riferimento al formaggio dopo sei mesi di stagionatura. Come detto nel paragrafo 3.2.c, il formaggio è stato ottenuto con latte prodotto nel 2005.

CAPITOLO 4

RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1. Composizione centesimale del pascolo e contenuto in vitamine liposolubili del latte

La produzione quanti- qualitativa del latte bovino dipende da una complessa serie di fattori, ma più di tutti la dieta animale è quello che influisce direttamente sulla qualità del latte prodotto e indirettamente sullo stato di salute dell'animale, caratterizzandone la composizione in macro e micro nutrienti. Per questo, un animale alimentato con foraggi freschi produrrà un latte con un maggior valore nutrizionale di quello prodotto con alimenti conservati, più ricco di sostanze utili all'organismo quali carotenoidi (β - carotene), vitamine (A, D, E, K, complesso B), terpeni (neroli, pinene, limonene), di acidi grassi mono e polinsaturi, CLA (coniugati dell'acido linoleico) e sali minerali.

Nello studio si sono analizzati le caratteristiche qualitative e igienico- sanitarie del latte e la loro variabilità in base a fattori fissi quali la malga, la stagione di produzione, la mungitura e la

scrematura. In particolare si è determinata la composizione in vitamine liposolubili A (retinolo) ed E (tocoferolo). Queste due vitamine sono liposolubili e perciò si comportano come i grassi, venendo trasferite dalla dieta al latte e dal latte ai prodotti lattiero- caseari quali burro e formaggi. Entrambe devono essere assunte con l'alimentazione perché l'organismo animale non è in grado di sintetizzarle, come invece accade per altre vitamine quali la K o il complesso B, che sono prodotte dai microrganismi ruminanti, o la D, che può essere assunta solo in minima parte attraverso i foraggi freschi e deve quindi prima essere trasformata per azione dei raggi solari da ergosterolo e colesterolo in vitamina D2 e D3.

La vitamina A è indispensabile per il meccanismo della visione e per la differenziazione cellulare, mentre la vitamina E svolge una fondamentale azione antiossidante prevenendo l'ossidazione degli acidi grassi polinsaturi (PUFA), sequestrando i radicali perossilipidici nei tessuti animali ed in particolare nelle membrane cellulari. I PUFA, per le loro caratteristiche chimico- fisiche hanno un'aumentata necessità di protezione dalle perossidazioni, ed è opportuno perciò che un prodotto con elevate quantità di acidi grassi polinsaturi abbia anche una maggiore quantità di tocoferoli o di altri antiossidanti.

La vitamina A, si trova nei foraggi freschi e nei cereali sottoforma di caroteni, che vengono poi trasformati a livello del fegato e dell'intestino nella rispettiva vitamina; la E passa invece direttamente nel latte dagli alimenti freschi quali l'erba al pascolo o foraggi appena sfalciati. Considerando i fattori che influiscono sul passaggio di queste vitamine dalla materia prima (foraggio) al prodotto finito (formaggio), si devono tenere presenti le loro caratteristiche chimico-fisiche: sia la A che la E sono parzialmente sensibili al calore, alle radiazioni ultraviolette e al pH.

La tabella 3.9 riporta la composizione centesimale, espressa in % sulla composizione in sostanza secca, e contenuto in vitamina E, espresso in $\mu\text{g/g}$ sul tale quale del foraggio.

Per quanto concerne il foraggio, la sola vitamina determinata è stata la E, in quanto la A è presente nei vegetali esclusivamente sottoforma di provitamina. Osservando la tabella si osserva come la quantità di vitamina E abbia un andamento decrescente nella maggior parte delle malghe progredendo da luglio a settembre, questo è probabilmente dovuto a più fattori: il foraggio con l'avanzare del suo ciclo vegetativo va incontro a uno rapido scadimento qualitativo specialmente nei pascoli d'alta quota (Fedele, 2001), ciò implica un progressivo e veloce aumento delle frazioni fibrose e un calo di quella lipidica; infatti l'NDF (fibra neutro detersa) aumenta, mentre il rapporto NDF/ADF (fibra acido detersa) e gli NSC (carboidrati non strutturali o zuccheri) diminuiscono, anche in conseguenza alla diminuzione del rapporto foglie- steli (Orlandi D., 2006) e quindi pure

della quantità di vitamine disponibili, che si trovano in maggiore quantità nell'apparato fogliare della pianta rispetto agli steli.

Anche la specie vegetale sembra influire sulla composizione centesimale (Lynch *et al.*, 2001), difatti i livelli di tocoferolo rinvenuti in tipi di piante diverse in una stessa zona e periodo dimostrano come la sua concentrazione sia tendenzialmente più alta nelle *graminacee* che nelle *leguminose*, tuttavia ci sono delle diversità anche all'interno di una stessa famiglia, come hanno riscontrato Lynch *et al.* (2001) nel loro studio, in cui *Bromus spp* e *Holcus spp* (famiglia delle *Poaceae* o *Graminacee*) risultano avere livelli di α -tocoferolo significativamente più alti di *Dactylis glomerata* L. (famiglia delle *Poaceae*), *Trifolium repens* e *Trifolium pratense* (famiglia delle *Papilionacee* o *Leguminose*) che invece hanno concentrazioni simili.

Dall'erba del pascolo le vitamine sono dunque metabolizzate dall'animale: vengono prima assorbite dall'intestino e poi attraverso il sangue arrivano ai vari organi, tra cui la ghiandola mammaria, che le secerne assieme ai grassi del latte.

Il latte, quale unico nutrimento dell'infante contiene tutte le vitamine e le altre sostanze necessarie allo sviluppo completo dell'organismo; in esso le vitamine liposolubili si trovano principalmente all'interno dei globuli di grasso, adese alla loro membrana e in minima parte anche associate alle proteine del siero (McGillivray, 1957; Puyol *et al.*, 1991).

Se si prende in considerazione la vitamina A, è stato osservato che la sua concentrazione per grammo di grasso è inversamente proporzionale alla dimensione dei globuli di grasso del latte ((Kon, Mawson & Thompson, 1944; Zahar *et al.*, 1995), ciò dimostra che della vitamina A del latte è localizzata anche sulla membrana del globulo. Inoltre, secondo gli studi di Mulder e Walstra (1974) e Walstra e Jenness (1984) la distribuzione approssimativa del β -carotene e della vitamina A nel *core* del globulo di grasso e nella membrana è rispettivamente del 95% e del 5%, non considerando la frazione sierica del latte in quanto la quota di vitamina A presente nel siero di latte è piuttosto irrilevante (Zahar *et al.*, 1995).

Alcuni studi hanno preso in considerazione i meccanismi biochimici coinvolti nel trasferimento delle vitamine liposolubili (principalmente vitamina E, A e carotenoidi) dalla ghiandola mammaria al latte, tuttavia, abbastanza sorprendentemente, questi meccanismi rimangono ancora in parte sconosciuti (Debier *et al.*, 2005). Il processo sembra comunque essere selettivo, coinvolgendo i recettori a livello della ghiandola mammaria; Jensen *et al.* (1999) hanno osservato una relazione non lineare tra la concentrazione di α -tocoferolo nel plasma e la quota secreta nel latte, suggerendo che

questo trasferimento non accade per semplice diffusione passiva, ma che meccanismi differenti possono essere coinvolti nel trasferimento dei componenti liposolubili nel latte.

Inoltre, se si prende in considerazione il colostro, si può notare che l'accumulo di vitamina E in esso non può essere spiegato come un aumento nella secrezione totale dei lipidi, infatti, la quantità dei lipidi del latte (principalmente trigliceridi) è simile, o anche più bassa nel colostro, rispetto al latte in molti mammiferi (Wohlt *et al.*, 1981; Klobasa *et al.*, 1987; Nissen *et al.*, 1994, Jackson *et al.*, 1995; Schweigert, 1990; Schweigert and Gottwald, 1999; Macias and Schweigert, 2001). Ciò significa che la secrezione giornaliera di α -tocoferolo e β -carotene è limitata in quantità, ed è in parte indipendente dalla resa in latte e dal tenore in grasso dello stesso, così che l'aumento della produzione di latte o la resa in grasso del latte non aumenta la produzione di vitamine liposolubili. Secondo quanto suggerisce Schweigert nel suo studio (1990), il trasferimento di colesterolo e vitamina E nel colostro avviene probabilmente attraverso uno specifico sistema di trasporto per le LDL (lipoproteine a bassa densità), all'interno delle cellule secretorie, le quali trasportano più del 20 % dei lipidi a 4 settimane dal parto e solo il 4 % al parto, per poi ritornare a valori del 15 % dopo il parto; la concentrazione di vitamina E nel siero sanguigno potrebbe quindi decrescere prima del parto in risposta ad una maggiore utilizzazione delle lipoproteine plasmatiche da parte della ghiandola mammaria. Ciò è confermato dai valori riportati in tabella 3.2 relativi all'effetto malga, che è soprattutto un effetto razza, e periodo, in cui si riscontra una corrispondenza lineare tra i valori di grasso e la quantità di vitamina A ed E presenti nel latte; ad esempio, passando dal periodo 1 al 2 la quantità di grasso nel latte non mostra variazioni significative, bensì un lieve decremento, mentre le vitamine mostrano entrambe un lieve aumento ($P < 0,05$ e $P < 0,1$ rispettivamente per la A e la E).

A parere di alcuni Autori ciò dipende dalle variazioni climatiche e stagionali, che secondo quanto emerso dallo studio, non influenzano il contenuto vitaminico del pascolo, che diminuisce con l'avanzare della stagione, ma lo stato metabolico delle bovine: le temperature più elevate del mese di luglio provocano un rallentamento del metabolismo delle lattifere con ripercussioni sulla secrezione di vitamine nel latte. Infine è ipotizzabile un effetto concentrazione, in seguito ad un calo della produzione a settembre; ne consegue una diluizione delle vitamine liposolubili e di altri composti importanti per le difese immunitarie delle bovine e per la stabilità ossidativa del latte.

Al giorno d'oggi sono sempre di più i sistemi di allevamento che si indirizzano verso una produzione focalizzata sulla qualità, cercando di rispondere alle esigenze dei consumatori che, alla luce delle sempre più evidenti patologie legate ad una scorretta alimentazione, danno sempre più credito a prodotti con valenze salutistiche, e tra questi rientrano i prodotti lattiero- caseari

d'alpeggio.

L'elaborazione dei dati del latte ha preso in considerazione l'effetto della malga, del periodo di produzione, della mungitura e della scrematura su alcuni parametri quali: il profilo lattodinamografico, le caratteristiche reologiche, l'igiene, la composizione centesimale e vitaminica. In tabella 3.1 e 3.2 sono riportati l'effetto del periodo e della malga e loro interazione sui parametri sopra elencati.

Per quanto riguarda le due vitamine, espresse in $\mu\text{g/ml}$, la vitamina A mostra una variazione abbastanza significativa ($P < 0,05$) tra le varie malghe, il valore massimo si trova nel latte di latte di CO ($1,15 \mu\text{g/ml}$) e il minimo in quello di ZU ($0,96 \mu\text{g/ml}$), che presenta però il valore più alto di vitamina E ($1,85 \mu\text{g/ml}$), seppur poco significativo ($P < 0,1$).

Sapendo che l'effetto malga corrisponde essenzialmente ad un effetto razza, si può ipotizzare che la maggior quantità di vitamine presenti nel latte di CO sia dovuto al fatto che questa malga allevi bovine di razza Bruna, mentre ZU di razza Frisona. La razza infatti, oltre a influire sulla composizione centesimale del latte, assieme ad altri fattori quali l'ereditabilità e la variabilità individuale, influisce in buona parte sulla componente vitaminica del latte, in quanto ogni razza possiede un metabolismo differente per i nutrienti, e tra questi le vitamine; difatti, la maggiore significatività che mostra la vitamina A rispetto alla E, può essere dovuta al fatto che essa è assunta dal foraggio sottoforma di carotenoidi e quindi la sua biodisponibilità dipende oltre che dal grado di distruzione ruminale e dall'efficienza di assorbimento del piccolo intestino, anche dall'efficienza di conversione del β -carotene in retinolo, che viene convertito dagli enzimi allocati sulla mucosa delle cellule intestinali. Questa conversione non è infatti necessaria per la vitamina E, che viene assunta come tale con l'alimento. Inoltre l'assorbimento, il trasporto, l'utilizzazione della vitamina A sono strettamente legati all'attività di numerose proteine che agiscono da carriers o enzimi, e quindi lo "stato nutrizionale proteico" dell'animale può condizionare i livelli ematici della vitamina e conseguentemente la sua concentrazione nel latte, per cui risulta interessante notare come la frazione proteica del latte sia significativamente maggiore in malga CO ($P < 0,01$), che possiede appunto bovine di razza Bruna, dalle quali si ottiene un latte maggiormente ricco in proteine (Summer, 2004).

Se vari studi confermano il fatto che la razza Bruna produce un latte più ricco di proteine, altri invece sostengono che non ci sia un effetto genetico sulla concentrazione di retinolo nel latte (Dubey *et al.*, 1991); secondo altri (Lucas *et al.*, 2006) il retinolo presenta una minore variabilità

rispetto al β - carotene, la cui concentrazione nel grasso del latte è quasi 3 volte maggiore nelle Guernsey che nelle razze Holstein, mentre le bovine di razza Bruna e Jersey hanno valori intermedi. Invece, per quanto riguarda la concentrazione di retinolo, questa risulta 1,6 volte più alta nelle bovine di razza Frisona rispetto alle Guernsey, mentre le Jersey e Bruna hanno valori intermedi.

Sempre per quanto riguarda l'effetto malga, oltre alla razza, anche altri fattori possono influenzare il contenuto in vitamine del latte. Uno è la presenza di mastopatie, segnalate dai valori alti di cellule somatiche nel latte; nello studio il valore più elevato si osserva nelle malghe ZO e ZU, che hanno anche i valori più bassi di vitamina A, difatti secondo quanto affermano Thompson, (1945) Chanda (1952), esiste una correlazione negativa tra la presenza di infezioni mammarie e la quantità di vitamina A presente nel latte, la cui concentrazione è minore nel latte di bovine infette rispetto a quello di bovine sane. Tuttavia la concentrazione di vitamina A nel grasso rimane invariata, in quanto il latte mastitico presenta una minore percentuale lipidica. Lo stesso andamento non è stato però osservato per la concentrazione in carotenoidi, che aumenta sorprendentemente sul sia latte mastitico che sul grasso.

Un altro fattore che sembra esercitare un effetto sulla concentrazione di vitamina A nel latte e nel colostro dipende dall'età della bovina: le primipare secernono una quantità maggiore di vitamina A nel latte che non le pluripare (Block e Farmer, 1987; Franklin *et al.*, 1998; Kumagai *et al.*, 2001), probabilmente perché essendo alla loro prima lattazione, hanno precedentemente immagazzinato una buona quantità di vitamina e sono caratterizzate da un metabolismo più efficiente.

Considerando l'effetto periodo, notiamo come questo non influenza la quantità di vitamina A, che rimane costante con l'avanzare della stagione, mentre per la vitamina E abbiamo un, seppur poco significativo, incremento da luglio a settembre ($P < 0,1$), ciò potrebbe essere dovuto all'interazione di diversi fattori quali: un effetto concentrazione, dovuto a una diminuzione della produzione di latte verso fine stagione, sia per l'avanzare dello stadio di lattazione, che per uno scadimento qualitativo del pascolo. Le bovine al pascolo infatti, tendono a dimagrire sia per l'aumento dell'attività motoria che per la diminuzione del valore nutritivo dell'erba, non compensabile *in toto* dall'integrazione con concentrati.

4.2. Composizione qualitativa, igienico-sanitaria e attitudine casearia del latte.

Il profilo lattodinamografico del latte (LDG) cambia significativamente a seconda della malga, esso è correlato sia alla composizione centesimale del latte, con particolare riferimento a quella caseinica, che ai parametri reologici, in particolare pH ed SH (Soxhlet- Hänkel), che indica la

quantità di NaOH (soda) 0,5 M necessaria per neutralizzare 100 ml di latte.

I valori di LDG in cui l'effetto malga risulta più significativo sono a30 ed r ($P < 0,001$), che misurano rispettivamente la consistenza del coagulo dopo 30 minuti e la velocità di coagulazione del latte dall'aggiunta del caglio; non si nota invece alcuna variazione significativa per k20, che misura in minuti la velocità di formazione della cagliata.

Osservando la tabella 3.1 si nota come Malga ZU presenti i valori più favorevoli alla trasformazione casearia ($r = 8'$, $a30 = 52'$) e ciò è confermato dai valori significativamente più alti ($P < 0,001$) di acidità del latte ($pH = 6,38$; $SH^\circ(50ml) = 3,77$): più il latte ha un'acidità titolabile alta e più i tempi di formazione del coagulo dopo l'aggiunta del caglio diminuiscono e la consistenza della cagliata aumenta, formando una pasta più forte ed elastica, con maggiore attitudine alla trasformazione casearia.

Osservando invece i dati sulla composizione proteica in tabella 3.2 non si osserva alcuna corrispondenza lineare tra la quantità di proteina e l'attitudine del latte alla trasformazione presamica, ciò non significa però che non ci possa essere un'influenza a livello qualitativo della frazione proteica sull'acidità del latte.

Diversamente da quanto ci si potrebbe aspettare, all'aumentare del pH, che varia significativamente a seconda della razza bovina, del periodo, e loro interazione ($P < 0,001$), si ha un calo del rapporto caseina-proteina; il pH è infatti influenzato in buona parte dalla composizione in macroelementi, soprattutto di Ca (calcio) e P (fosforo), che non sono stati determinati, ma che sono componenti essenziali delle micelle caseiniche del latte. La quantità di P e quindi di caseine dovrebbe essere direttamente proporzionale al grado di acidità del latte, tuttavia i valori potrebbero essere influenzati dalla presenza di infezioni alla ghiandola mammaria, frequenti in condizioni di alpeggio, che alterano significativamente la composizione centesimale del latte, variando il rapporto tra i minerali, con un abbassamento della concentrazione di fosforo, un aumento dell'azoto e dei cloruri (Chanda, 1952).

L'effetto malga è risultato significativo per la composizione proteica e il rapporto caseina-proteina, che è maggiore in malga CO, in cui la mandria è costituita soprattutto da bovine di razza Bruna, che producono un latte più ricco in caseina (Summer *et al.*, 2004), che è la vera e propria materia prima del formaggio, da cui dipendono gran parte delle caratteristiche reologiche della cagliata. La migliore resa di caseificazione non è dovuta al maggiore contenuto in proteine totali, ma all'elevata concentrazione di caseina e alla capacità della cagliata di trattenere grasso e proteine, senza lasciarle sfuggire nel siero (Negrini, 2004).

È vero che le cagliate ottenute con il latte della Bruna sono sotto questo aspetto superiori, in quanto riescono a trattenere un maggiore quantitativo di sostanze utili ad esaltare la resa casearia, con la formazione di una pasta più consistente, elastica e quindi con migliore velocità e capacità di sineresi. Probabilmente il latte di malga ZU ha evidenziato la miglior caseificazione in termini di LDG per la maggior carica microbica (7,64, contro il valore di 3,86 di CO), che ha comportato un abbassamento del pH (pH di 6,38, contro 6,66 di CO), ciò però non esclude che il formaggio presenti dei problemi durante la stagionatura.

Il profilo lattodinamografico non varia invece se si considera l'influenza del periodo, solo r (tempo di coagulazione, subisce una variazione poco significativa ($P < 0,1$)).

Tra i parametri reologici, oltre all'acidità si è considerata la crioscopia (punto di congelamento) del latte; il suo valore è normalmente attorno ai $-0,54$ °C e dipende principalmente dalla quantità di lattosio e dai sali in soluzione (sodio, cloro), che tendono ad abbassarlo. I risultati dello studio confermano quanto appena detto in quanto il punto crioscopico risulta inversamente proporzionale alla percentuale di lattosio e di sali disciolti in soluzione, diminuendo significativamente nel latte di malga CO ($P < 0,05$) che alleva bovine di razza Bruna, rispetto alle altre due, che allevano soprattutto Frisone.

L'influenza dell'effetto razza e di altri fattori legati alla malga sulla crioscopia è confermato anche da altri Autori (Buchberger, 1994, 2000; Rohm *et al.*, 1991; Wiedemann *et al.*, 1993), secondo i quali, oltre alla razza, influiscono anche lo stadio e il numero di lattazioni, il regime alimentare, la salute delle mammelle, la regione e la stagione di produzione. Riguardo a quest'ultimo fattore i dati analizzati mostrano una variazione poco significativa ($P < 0,1$) del lattosio, che cala lievemente a settembre, per una correlata diminuzione della resa in latte con l'avanzare del periodo di monticazione.

Al contrario delle nostre aspettative la frazione lipidica non mostra alcuna variazione significativa a seconda della razza e del periodo. Secondo quanto sostengono Battaglini *et al.* (2003), le razze più selezionate come la Bruna manifestano tenori lipidici più elevati di razze autoctone come la Pezzata Rossa d'Oropa, che dal punto di vista nutrizionale presenta però una più favorevole composizione acidica, diminuendo il rapporto tra acidi grassi saturi e insaturi.

Anche il periodo influenza la composizione quanti- qualitativa del grasso, in quanto con l'avanzare della stagione si ha un significativo cambiamento del valore nutrizionale e soprattutto energetico del pascolo (Orlandi, 2006), che subisce un calo. Nello studio è stata considerata solo la variazione quantitativa della frazione lipidica, e i dati raccolti in tabella 3.9 segnalano una diminuzione

dell'estratto etereo nel pascolo di settembre; questo andamento decrescente si ripercuote sulla composizione lipidica del latte, che tuttavia non subisce una riduzione statisticamente significativa perché la diminuzione della quantità di lipidi assunti con la dieta, e quindi la loro quota nel latte, è compensata da un aumento della loro concentrazione nello stesso, in seguito a un calo della produzione (Bailoni *et al.*, 2005).

Per quanto riguarda le caratteristiche igienico- sanitarie, sia la carica microbica, espressa in \ln_e , che le cellule somatiche, espresse come \log_2 , mostrano una variazione significativa (con P rispettivamente $<0,05$ e $<0,1$), presentando il valore maggiore in ZO e ZU, che allevano bovine di razza Frisona, questa è infatti una razza altamente specializzata che produce elevate quantità di latte, ma meno adattabile all'ambiente alpino e quindi più sensibile a contrarre mastopatie. Le mastiti, oltre a peggiorare i parametri igienico-sanitari del latte aumentano il numero di cellule somatiche e la carica microbica totale, ne consegue un' alterazione dei vari macro e micronutrienti.

La tecnologia per la produzione dell'Asiago d'Alleva prevede l'utilizzo del latte parzialmente scremato, per cui il latte appena munto della mattina viene miscelato a quello della mungitura della sera, che lasciato riposare durante la notte acidifica per opera della microflora lattica, che ha il tempo di proliferare.

Il valore di cellule somatiche resta invece inalterato in quanto queste derivano dallo sfaldamento dell'epitelio della ghiandola mammaria e dai leucociti, che nel latte sono del tutto inermi. Osservando le tabelle 3.5 e 3.6, si nota come la scrematura aumenti infatti il valore di cbt (carica batterica totale) ($P<0,05$), tuttavia la stessa operazione di scrematura dovrebbe comportare una debatterizzazione naturale, asportando assieme al grasso affiorato anche buona parte della cbt.

La scrematura migliora in modo evidente la caseificazione, precisando che, rispetto al latte intero, comporta un tempo di attesa dopo la mungitura. Pertanto il latte intero differisce da quello scremato sia per un maggior tenore in lipidi sia per un minore processo di acidificazione ad opera dei lattobacilli, nel minor tempo che intercorre tra mungitura e caseificazione. Infatti il latte intero è stato prelevato dalla cisterna di refrigerazione e subito posto a 4 °C per il trasporto in laboratorio, mentre quello scremato è stato prelevato dalla caldaia dopo alcune ore di riposo a una temperatura superiore ai 4 °C.

L'aumento significativo dell'acidità del latte ($P<0,05$) migliora il profilo lattodinamografico dello stesso: r diminuisce significativamente ($P<0,001$) dal latte intero a quello scremato da valori di 14' a 8', la consistenza della cagliata (a_{30}) aumenta da 39 a 51mm ($P<0,001$) e k_{20} diminuisce, seppure in modo poco significativo ($P<0,1$). Inoltre, la scrematura, privando il latte di una parte di grasso,

rende più stabile la formazione del reticolo caseinico, aumentandone la forza, poiché i lipidi restando imprigionati all'interno del reticolo interferiscono con la caseificazione portando alla formazione di un formaggio a pasta meno consistente.

Per quanto riguarda la composizione centesimale, come ci aspettavamo, gli unici parametri a variare sono la composizione in grasso, espresso come % sulla sostanza secca, e le vitamine A ed E ad esso correlate, che con la scrematura vengono in buona parte eliminate, comportando una diminuzione del valore nutritivo del formaggio.

Infine abbiamo anche considerato l'effetto della scrematura e sua interazione con l'effetto periodo e con l'effetto malga, ma non è stata riscontrata alcuna significatività statistica.

Le tabelle 3.3 e 3.4 prendono in considerazione gli effetti della mungitura sui parametri reologici, igienico- sanitari, di composizione centesimale e vitaminica.

Osservando i dati riportati è interessante notare come i dati siano tutti pressoché costanti e quindi non ci sia alcuna variazione statisticamente significativa tra la mungitura della sera e della mattina.

4.3. Composizione vitaminica e centesimale del formaggio

Il formaggio analizzato è stato prodotto con il latte del 2005, per cui si è cercato di correlare i dati del formaggio e del latte del 2006 con quelli del formaggio prodotto e stagionato per 6 mesi.

Prima di considerare gli effetti malga, periodo e loro interazione sulla composizione vitaminica e centesimale del formaggio, va tenuto presente che il formaggio analizzato è stato prodotto con latte parzialmente scremato, per cui buona parte dei valori riscontrati potrebbero essere stati inficiati dalla quantità di grasso eliminata con la scrematura, sebbene sia abbastanza bassa (circa il 14% della frazione grassa).

Il contenuto vitaminico, espresso in $\mu\text{g/g}$, è stato analizzato sia sul formaggio sia sul grasso tal quale, è così possibile stabilire la relazione tra il contenuto in vitamina del formaggio e il suo contenuto lipidico. Ciò è importante dal punto di vista nutrizionale in quanto i formaggi contengono una quantità non indifferente di grassi saturi e colesterolo, controindicati per il loro effetto favorente l'insorgere di patologie cardiocircolatorie, mentre le vitamine svolgono un'attività antiossidante e di prevenzione dell'ossidazione delle membrane cellulari e delle lipoproteine veicolanti i grassi e il colesterolo. In particolare i formaggi prodotti in alpeggio sono caratterizzati da una più favorevole composizione nutrizionale, in riferimento a una maggiore quantità di vitamine, acidi grassi polinsaturi e CLA (coniugati dell'acido linoleico).

La composizione vitaminica del formaggio dipende principalmente dalla natura del foraggio e

quindi dalla composizione del latte, oltre che dalla tecnologia di produzione e stagionatura.

Per il formaggio, come per il latte si sono considerati l'effetto periodo, malga, e loro interazione, riportati in tabella 3.10.

I formaggi prodotti a settembre, rispetto quelli prodotti a inizio della stagione pascolativa hanno una maggiore concentrazione in vitamine liposolubili, confermato anche dai dati sul latte. Una delle ragioni di tale variabilità, in accordo con alcuni Autori, è probabilmente l'andamento climatico stagionale, che oltre a influire sulla composizione vitaminica e centesimale dell'erba e quindi del latte, influisce anche sulla stagionatura del formaggio, per la quale sono determinanti i parametri di umidità e temperatura. La vitamina E è la sola a mostrare significatività statistica ($P < 0,01$) aumentando da valori di 12,4 a 14,7 ($\mu\text{g/g}$ di formaggio); questo aumento è confermato anche dai dati relativi al contenuto di vitamina nel grasso ($P < 0,001$). Pertanto il formaggio prodotto a settembre ha di più vitamina E di quello prodotto a inizio stagione; ciò è confermato anche dai dati sul latte, che ha un contenuto maggiore di vitamina E a settembre (1,59 *versus* 1,77; $P < 0,1$).

Anche riguardo all'effetto malga, la vitamina E è quella che mostra maggiore variabilità ($P < 0,001$), oscillando da valori massimi di 17,2 $\mu\text{g/g}$ nel formaggio di ZU a 11,2 $\mu\text{g/g}$ in quello di CO, possiamo quindi affermare un effetto razza constatando che la maggiore quantità si trova nel latte di bovine di razza Frisona rispetto a quelle di razza Bruna, almeno relativamente al tocoferolo, perché se si considera invece il retinolo, non si riscontra alcuna significatività statistica, infatti la sua concentrazione varia lievemente tra le malghe. Secondo quanto emerge dagli studi di Lucas *et al.* (2006), la razza sembra influenzare la concentrazione di carotenoidi ma non di retinolo nel formaggio.

Si è poi determinata la sostanza secca, costituita dalla frazione grassa, proteica, ceneri ed estrattivi inazotati. La sostanza secca aumenta in modo significativo ($P < 0,01$) da luglio a settembre in concomitanza con i valori di proteina grezza e di estrattivi inazotati e in corrispondenza al decadimento qualitativo del pascolo, che come già discusso, con l'avanzare della stagione subisce una diminuzione del rapporto foglie/steli e a un aumento della lignificazione e della fibra nei tessuti (Gusmeroli, 2005); inoltre si ha un aumento della spesa energetica dell'animale, che sommata al diminuito apporto di energia attraverso la dieta, comporta una riduzione della resa in latte e una conseguente concentrazione della sostanza secca presente. Per lo stesso motivo nel formaggio di malga CO si nota una maggiore concentrazione di sostanza secca, probabilmente dovuto a fattori legati alla razza Bruna, che produce minori quantità di latte ma con valori di proteina e grasso superiori. La composizione in sostanza secca e in umidità di un formaggio può inoltre variare in

modo rilevante in funzione della realtà produttiva, della tecnologia di produzione e della stagionatura, che nell'ambiente d'alpeggio sono difficilmente standardizzabili, sebbene si segua un preciso disciplinare di produzione.

Il grasso del latte ha una composizione originale che lo distingue dagli altri grassi alimentari, contenendo oltre 150 acidi grassi diversi, tra cui molti a catena carbonica corta che sono di assimilazione più agevole di altri. Il suo valore è notevolmente influenzabile dal regime alimentare e dal management ed molto interessante dal punto di vista nutrizionale considerando l'apporto dei lipidi con il latte e con i formaggi rispetto al totale dei lipidi assunti giornalmente con la dieta. Latte e formaggi prodotti in alpeggio sono caratterizzati da un profilo acidico più favorevole rispetto ad analoghi prodotti ottenuti con sistemi di stabulazione più o meno intensivi con riferimento sia alla presenza di acidi grassi polinsaturi che al contenuto di CLA (coniugati dell'acido linoleico)(Kelly *et al.*, 1998); perciò sebbene lo studio non ha analizzato la composizione in acidi grassi del formaggio, è interessante fare qualche accenno sulla variazione del profilo acidico in condizioni di monticazione, dato che questi composti hanno un elevato numero di effetti sulla qualità del latte e quindi del formaggio, tra cui le caratteristiche fisiche, (ad esempio il punto di fusione, la consistenza del burro e del formaggio) le proprietà nutrizionali (ad es. il potenziale effetto degli acidi grassi sulla salute umana) e organolettiche (ad es. l'effetto di acidi grassi liberi a corta catena e loro cambiamenti ossidativi). Gli acidi grassi quali l'acido butirrico, l'oleico, i polinsaturi (specie della serie n-3), e i coniugati dell'acido linoleico, hanno un potenziale ruolo antiaterogeno, antiobesità o anticarcinogeno; mentre alcuni acidi grassi saturi e trans hanno un ruolo negativo sulla salute umana. I principali AG presenti nel latte di vacche alimentate al pascolo sono l'acido miristico (7–12%), l'acido palmitico (23–28%), l'acido stearico (9–13%) e gli AG monoinsaturi (23– 32%), uno dei principali è l'oleico. In condizioni di pascolamento il grasso del latte è generalmente povero di acido α - linolenico (0.7–2.5%) e linoleico (1–4%) (Kelly *et al.*, 1998; Lawless *et al.*, 1998, 1999), ciò dimostra una estensiva idrogenazione ruminale. Inoltre, passando da una dieta di tipo invernale a una alimentazione a base di pascolo, gli AG (soprattutto linolenico) passano da 0,3 a 0,8% degli AG del latte, mentre gli AG non coniugati (acido linoleico) aumentano ma solo transitoriamente dall' 1,5 a 1,9%.

Gli acidi grassi volatili ed insaturi del latte e soprattutto dei suoi derivati, a numero dispari di atomi di carbonio, sono dotati di una buona attività antinfiammatoria e antibatterica. Ad esempio, l'acido oleico contenuto nel grasso, rende lo stesso molto digeribile, al contrario di molti grassi vegetali

che, contenendo elevate quote di acido stearico, risultano poco digeribili.

Tra i componenti del grasso del latte e dei latticini, meritano particolare attenzione anche la lecitina ed i fosfolipidi. La lecitina, che è un composto fosforato dei grassi, fa parte di un gruppo di sostanze regolatrici: per il suo contenuto in colina facilita l'assorbimento dei lipidi. Le lecitine e i fosfolipidi (nel latte si trovano due fosfolipidi fondamentali, la cefalina e la sfingomieline) appartengono ad un gruppo importante della biochimica: si trovano in tutte le cellule viventi ed in particolare nelle cellule nervose dove giocano un ruolo importante nella costituzione delle membrane formando le cosiddette "guaine mieliniche" che avvolgono l'apparato nervoso.

Altri importanti componenti del grasso del latte sono i CLA, che rappresentano una quota di notevole interesse attuale in quanto posseggono una rilevante attività antitumorale, antiaterogena, immunomodulatrice, antidiabetica, di promozione della crescita e miglioratrice della massa muscolare (Ip *et al.*, 1994; Pariza *et al.*, 2001). I CLA derivano da processi di bioidrogenazione degli acidi grassi polinsaturi (linoleico in primis, presente in natura in numerosi vegetali prato-pascolivi) operata dai microrganismi ruminali, soprattutto *Butyrivibrio fibrisolvens*, il quale converte l'acido linoleico contenuto nelle piante verdi e lo trasforma in acido linoleico coniugato. Molteplici, tuttavia, sono i fattori che ne modificano la concentrazione e, in generale, coincidono con quelli in grado di modificare il tenore di grassi insaturi.

Oltre ai fattori fisiologici, soprattutto attribuibili alla fase di lattazione ed all'età dell'animale, il contenuto in CLA varia largamente a seconda della dieta, con forti variazioni stagionali, giustificate dall'impiego di foraggi pascolivi particolarmente ricchi di PUFA che ne determinano un aumento di 2-3 volte nel latte estivo rispetto a quello invernale (Battaglini *et al.*, 2003e). Recenti ricerche confermano l'arricchimento in CLA nel latte e nei formaggi ottenuti da bovine in pascoli di montagna (Collomb *et al.*, 1999, 2003; Mantovani, 2003), che potrebbero rappresentare utili "markers" per prodotti ottenuti da bovine alimentate in prevalenza con foraggi verdi (Borreani *et al.*, 2003).

I prodotti lavorati in un particolare modo e in una specifica regione geografica, come l'Asiago DOP di malga, hanno di solito un valore commerciale più elevato e potrebbero essere contraffatti ed è quindi utile stabilire un piano di (rin)tracciabilità in modo da poter distinguere la vera origine del prodotto. Per proteggerne il mercato sono stati introdotti strumenti legali nella UE (Regolamento del Consiglio (EEC) 2081/92), per cui, per essere eleggibile all'uso della denominazione di origine protetta (DOP) o dell'indicazione geografica protetta (IGP).

Per risolvere i problemi di autenticità sono stati proposti molti metodi analitici, molti laboratori

hanno proposto tecniche quali la spettrometria di massa del rapporto isotopico, la spettroscopia a infrarossi e l'analisi del DNA. Gli approci attualmente più promettenti sembrano essere la caratterizzazione del prodotto determinando il rapporto di isotopi stabili ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$) e seguenti applicazioni di modelli matematici e tecniche di riconoscimento, e sebbene siano stati ottenuti alcuni risultati promettenti, l'approccio analitico è ancora agli inizi e ha ancora bisogno di essere migliorato per dare una indicazione affidabile che verifichi l'origine di un prodotto.

Nello studio, la componente grassa del formaggio è stata calcolata come estratto etereo % sulla sostanza secca, che determina la quantità totale di sostanze solubili in etere etilico o in esano, ovvero i lipidi ed altri composti, quali pigmenti, olii ed eteri.

L'estratto etereo del formaggio varia in modo poco significativo a seconda della malga. Questo è probabilmente dovuto al fatto che l'Asiago d'Allevio è un formaggio prodotto con latte parzialmente scremato, per cui le differenze sulla percentuale lipidica del prodotto finito dipendono oltre che dal tenore lipidico del latte intero anche dall'entità della scrematura effettuata. Influiscono sul contenuto lipidico anche altri fattori: la diversa modalità di lavorazione e la stagionatura del formaggio, che in condizioni d'alpeggio sono difficilmente standardizzabili; inoltre si potrebbe ipotizzare un effetto dovuto alla diversità di pascolo: malga ZU, che si distingue per valori più elevati, è situata in un contesto differente da quello delle altre malghe.

L'estratto etereo diminuisce in modo altamente significativo ($P < 0,001$) verso il secondo periodo, esso è strettamente correlato alla resa quantitativa e qualitativa in latte, che va incontro a un calo verso fine stagione. Anche questa volta ciò è riconducibile ad un rapido scadimento qualitativo del cotico erboso, che subisce una riduzione della frazione lipidica e un aumento della frazione fibrosa, con ripercussioni sul suo valore energetico e nutrizionale.

La componente proteica dei formaggi è tendenzialmente più costante di quella grassa, in seguito anche ad un'azione di miglioramento genetico. Le proteine del latte hanno una qualità nutrizionale elevata dovuta alla loro composizione costituita da amminoacidi essenziali; inoltre alcune di esse e i loro idrolisati (peptidi generati dalla digestione delle proteine) hanno una dimostrata attività antiossidante. I peptidi antiossidanti derivati dal latte sono composti da 5- 11 aminoacidi, inclusi gli aminoacidi idrofobici, la prolina, l'istidina, la tirosina, o il triptofano. La relazione tra struttura e attività o il meccanismo antiossidante dei peptidi non sono tuttavia pienamente compresi.

L'attività antiossidante degli idrolisati sembra essere inerente alle caratteristiche della sequenza aminoacidica dei peptidi derivati, dipendendo sulla specificità proteasica. I risultati suggeriscono che gli idrolisati delle proteine possono essere usati come antiossidanti naturali per migliorare le proprietà antiossidanti dei cibi funzionali e prevenendo le reazioni di ossidazione nei processi di produzione degli alimenti. Studi più approfonditi hanno bisogno di elucidare il ruolo dei peptidi antiossidanti nella funzione protettiva dell'organismo umano.

Nel formaggio la frazione proteica è stata calcolata come proteina grezza % su sostanza secca, che misura il contenuto in sostanze azotate totali e non l'effettivo contenuto in proteina. La percentuale di proteina grezza del formaggio è pressoché costante sia per quanto riguarda il periodo, la malga e loro interazione, per cui non troviamo una correlazione tra la quantità di proteina del latte e quella presente nel formaggio se si considera che il valore di proteina per il latte, riportato in tabella 3.2 risulta invece statisticamente significativo per l'effetto malga.

I formaggi sono una buona fonte di minerali, che nello studio sono stati calcolati nel loro insieme come ceneri % sulla sostanza secca. Le ceneri tendono ad un lieve calo con l'avanzare del periodo, difatti macroelementi quali calcio e fosforo sono i più abbondanti nel formaggio, questi si trovano soprattutto nelle erbe giovani e con il progredire del ciclo vegetativo subiscono una riduzione che si ripercuote poi nel prodotto finito, rimanendo abbastanza stabili durante i processi di lavorazione. Comunque, nel formaggio prodotto nel secondo periodo il calo delle ceneri è stato molto lieve e non significativo, tuttavia ci saranno state probabilmente delle variazioni qualitative nei rapporti tra i vari elementi, che però non sono stati considerati in quanto gli elementi minerali sono stati valutati nel loro complesso e non singolarmente.

Le ceneri variano invece in modo altamente significativo ($P < 0,001$) a seconda della malga, e mostrano valori nettamente inferiori (5,6%ss.) nel formaggio di malga ZU rispetto al valore più alto di CO e ZO (7%ss.). Questa differenza probabilmente non dipende da differenze genetiche di razza bovina dato che CO e ZO hanno valori simili e razze bovini diverse, ma più probabilmente a una diversità di pascolo, infatti malga ZU è situata in un altro contesto, con un pascolo che ha caratteristiche pedo-climatiche differenti e più povero rispetto a quello delle altre due; inoltre fondamentali possono essere le modalità di lavorazione, tra cui l'entità della salatura, che influisce sulla concentrazione di sodio e cloro, l'acidificazione, il tempo di coagulazione, la sosta della cagliata nel siero, nonché l'intensità dello spurgo, che provocano una più o meno marcata perdita di sali minerali nel siero.

Il completamento a 100 della somma di ceneri, proteina grezza, estratto etereo e fibra grezza, va

sotto il nome di estratti inazotati (EI), questi includono principalmente i carboidrati, che nel latte sono rappresentati dal lattosio, poi trasformato durante la caseificazione dai batteri lattici in acido lattico ed altri composti. La concentrazione in EI varia significativamente ($P < 0,05$) per effetto dell'interazione malga-periodo e soprattutto per l'effetto del periodo: dal primo al secondo periodo subiscono una variazione considerevole ($P < 0,001$), aumentando da 4,7 a 8,9 (%ss.).

Infine abbiamo considerato il colesterolo, uno steroide che si trova nei prodotti di origine animale e spesso imputato quale principale causa di ipercolesterolemia, una condizione associata da numerosi studi epidemiologici all'aumento dell'incidenza di malattie cardio-vascolari. Il colesterolo ha una duplice origine: endogena ed esogena; quello endogeno è prodotto dall'organismo, mentre quello esogeno è introdotto con la dieta e costituisce solo un 20 % del colesterolo corporeo totale. Alcuni studi effettuati su popolazioni di diversi continenti non hanno trovato alcuna correlazione tra consumo di colesterolo e colesterolemia, tuttavia, vi è un numero limitato di soggetti 'iper-reattivi' al colesterolo alimentare, i quali devono limitare l'assunzione di tale sostanza.

I prodotti lattiero caseari sono spesso chiamati in causa quale fonte di colesterolo, tuttavia il formaggio non è certo tra gli alimenti la principale fonte di colesterolo; considerando che un formaggio stagionato come l'Asiago d'Alleva ha una quantità media di colesterolo di 85mg/100g di prodotto, pari al quantitativo di colesterolo contenuto nella carne di pollo e nettamente inferiore a quello del rosso d'uovo che ne contiene fino a 500 mg. Le carni di bovino e suino ne contengono invece quantità inferiori (60- 70 mg), ma se si considera che a parità di sostanza secca, la carne ha una quantità d'acqua intorno al 70%, la differenza non è poi così marcata.

Nello studio, il colesterolo, risulta variare a seconda della malga, seppure in modo poco significativo ($P < 0,1$) da valori minimi di 79,7 in ZO a valori massimi di 87,9 in ZU, e questo andamento risulta correlato positivamente con i valori di grasso. Invece, se consideriamo il periodo, il valore di colesterolo varia in modo inversamente proporzionale con la % di grasso, ossia la sua concentrazione aumenta nei formaggi prodotti a settembre, ma in modo non significativo. L'aumento del colesterolo con il progredire del periodo di pascolamento è probabilmente correlato ad un peggioramento della frazione lipidica, che come già accennato, oltre a diminuire con l'avanzare della stagione, cambia soprattutto nel profilo acidico: aumenta il rapporto acidi grassi saturi- insaturi e diminuiscono steroli e stanoli vegetali, dei composti che hanno una struttura molto simile a quella del colesterolo, componenti essenziali delle membrane cellulari dei vegetali, che inibiscono parzialmente l'assorbimento del colesterolo a livello intestinale.

CAPITOLO 5

CONCLUSIONI

La presente sperimentazione ha avuto l'obiettivo di valutare le caratteristiche igienico-sanitarie e qualitative del latte e dei prodotti caseari ottenuti in alpeggio durante la stagione estiva. In particolare si è considerato il trasferimento delle vitamine liposolubili A ed E dal foraggio al latte e dal latte al formaggio stagionato 6 mesi.

Per le vitamine c'è stata una notevole variabilità sia per l'effetto malga sia per l'effetto periodo e scrematura. La vitamina E in particolare ha evidenziato un aumento a settembre sia nel latte sia nel formaggio, mentre la A è risultata meno variabile. La loro variabilità è legata soprattutto a variazioni climatico stagionali ed è inversamente proporzionale al contenuto lipidico, che subisce una riduzione in seguito ad un impoverimento del cotico. Anche l'effetto malga ha influito significativamente sulla concentrazione vitaminica del latte e del formaggio, in particolare la vitamina E ha evidenziato i valori più alti in bovine di razza Frisona, mentre la A è risultata meno variabile.

La scrematura comporta un'acidificazione naturale ad opera dei lattobacilli, ne consegue un miglioramento dell'attitudine del latte alla caseificazione, almeno per quanto riguarda il profilo lattodinamografico. Inoltre, sebbene il grasso tolto con la scrematura sia poco, essa influenza notevolmente il contenuto lipidico e in vitamine liposolubili, riducendo anche la significatività degli effetti malga e periodo su alcuni parametri del formaggio.

Il contenuto proteico, in seguito ad una spinta selezione genetica, è piuttosto stabile: nel formaggio non varia significativamente, mentre nel latte non c'è effetto periodo ma si osserva un significativo effetto razza.

Il latte prodotto in alpeggio presenta delle caratteristiche igienico-sanitarie tendenzialmente elevate rispetto a quelle del latte prodotto in stalle di pianura. Le cariche batteriche e la conta di cellule somatiche risultano piuttosto elevate nelle diverse malghe e tendono ad aumentare a settembre, anche se non significativamente. I loro valori elevati sono dovuti alle condizioni sfavorevoli dell'alpeggio e al difficile adattamento delle bovine, che in condizioni di monticazione sono sottoposte ad un maggiore stress, ne consegue una maggiore predisposizione all'insorgenza di mastopatie, specie per le razze più specializzate.

I prodotti lattiero-caseari d'alpeggio indagati in questa sperimentazione hanno evidenziato un elevato profilo dietetico-nutrizionale in confronto al latte di pianura, aumenta il contenuto vitaminico, diminuisce quello in colesterolo e migliora il profilo acidico, con un aumento degli acidi grassi insaturi e monoinsaturi a scapito dei saturi.

Esiste tuttavia qualche punto critico a livello di igienico-sanitario, su cui bisognerebbe agire.

In conclusione

CAPITOLO 6

TABELLE

Tabella 3.1. Effetto della malga, del periodo e loro interazione su parametri reologici e caratteristiche igienico sanitarie (dataset latte intero).

	MALGA			PERIODO		SIGNIFICATIVITA'			
	CO	ZO	ZU	15LUGLIO	5 SET	M	P	M*P	DSR
Parametri reologici									
pH	6.66	6.62	6.38	6.61	6.49	***	***	***	0.05
SH° 50ml	3.06	2.81	3.77	3.02	3.41	***	***	***	0.17
Crio	0.54	0.51	0.53	0.53	0.52	*	†	ns	0.02
LDG									
r (min)	16.5	16.7	8.2	14.5	13.1	***	†	***	1.8
K ₂₀ (min)	4.7	5.3	2.5	4.1	4.3	ns	ns	ns	2.2
A ₃₀ (mm)	37.3	29.1	51.8	38.9	39.8	***	ns	**	5.1
Caratteristiche igienico- sanitarie									
Cellule somatiche	3.46	3.85	3.75	3.66	3.71	†	ns	ns	0.30
CBT	3.86	5.10	7.64	5.38	5.69	*	ns	ns	1.77

Significatività: * : P<0,05; ** : P<0,01; ***: P<0,001; DSR: deviazione standard residua

Cellule somatiche : log₂ (n. di cellule/100)+3; CBT: ln (carica microbica totale).

r: tempo di coagulazione; k₂₀: velocità di formazione del coagulo; A₃₀: consistenza della cagliata.

Tabella 3.2. Effetto della malga, del periodo e loro interazione su composizione centesimale e contenuto in vitamine (dataset latte intero).

	MALGA			PERIODO		SIGNIFICATIVITA'			DSR
	CO	ZO	ZU	15LUGLIO	5 SET	M	P	M*P	
Composizione centesimale (%)									
Proteine	3.32	3.00	3.10	3.09	3.19	**	ns	ns	0.17
Caseina	2.68	2.34	2.40	2.48	2.46	*	ns	ns	0.22
Lattosio	4.76	4.51	4.67	4.71	4.58	*	†	ns	0.15
Grasso	3.73	3.46	3.82	3.72	3.61	ns	ns	ns	0.33
Residuo	8.78	8.21	8.46	8.49	8.47	**	ns	ns	0.26
Vitamine									
Vit A (µg/ml)	1.15	1.10	0.96	1.05	1.08	*	ns	ns	0.09
Vit E (µg/ml)	1.65	1.54	1.85	1.59	1.77	†	†	†	0.21

Significatività: * : P<0,05; ** : P<0,01; ***: P<0,001; DSR: deviazione standard residua.

Tabella 3.3. Effetto della mungitura sui parametri reologici e caratteristiche igienico- sanitarie (dataset latte intero).

	MUNGITURA		P	DSR
	sera	mattina		
Parametri reologici				
pH	6.58	6.60	ns	0.15
SH° 50ml	3.17	3.04	ns	0.51
Punto crioscopico (°C)	0.52	0.52	ns	0.06
LDG				
r (min)	14.3	15.5	ns	4.6
K ₂₀ (min)	4.7	4.3	ns	2.5
A ₃₀ (mm)	37.6	36.2	ns	10.8
Caratteristiche igienico- sanitarie				
Cellule (log ₂)/ml	3.70	3.65	ns	0.33
Cbt (ln _e)/ml	5.49	4.74	ns	2.14

Significatività: * : P<0,05; ** : P<0,01; ***: P<0,001; DSR: deviazione standard residua
Cellule somatiche : log₂ (n. di cellule/100)+3; CBT: ln (carica microbica totale).

r: tempo di coagulazione; k₂₀: velocità di formazione del coagulo; A₃₀: consistenza della cagliata.

Tabella 3.4. Effetto della mungitura sulla composizione centesimale e contenuto in vitamine (dataset latte intero).

	MUNGITURA		P	DSR
	sera	mattina		
Composizione centesimale (%)				
Proteine	3.11	3.18	ns	0.22
Caseina	2.45	2.52	ns	0.26
Lattosio	4.59	4.69	ns	0.20
Grasso	3.67	3.60	ns	0.34
Residuo	8.40	8.58	ns	0.36
Vitamine				
Vit A (µg/ml)	1.09	1.08	ns	0.12
Vit E (µg/ml)	1.65	1.64	ns	0.24

Significatività: * : P<0,05; ** : P<0,01; ***: P<0,001; DSR: deviazione standard residua.

Tabella 3.5. Effetto della scrematura sui parametri reologici e caratteristiche igienico- sanitarie (dataset latte intero e scremato).

	SCREMATURA		P	DSR
	intero	scremato		
Parametri reologici				
pH	6.55	6.35	*	0.16
SH/50 ml	3.21	3.96	*	0.71
Punto crioscopico (°C)	0.52	0.53	ns	0.02
LDG				
r (min)	13.8	8.4	***	2.8
k ₂₀ (min)	4.2	2.3	†	2.3
A ₃₀ (mm)	39.4	51.1	***	5.3
Caratteristiche igienico- sanitarie				
Cellule (log ₂)	3.69	3.56	ns	0.29

Cbt (ln _e)	5.53	7.78	*	1.90
------------------------	------	------	---	------

Significatività: * : P<0,05; ** : P<0,01; ***: P<0,001; DSR: deviazione standard residua

Cellule somatiche : log₂ (n. di cellule/100)+3; CBT: ln (carica microbica totale).

r: tempo di coagulazione; k₂₀: velocità di formazione del coagulo; A₃₀: consistenza della cagliata.

Tabella 3.6. Effetto scrematura sulla composizione centesimale e contenuto in vitamine (dataset latte intero e scremato).

	SCREMATURA		P	DSR
	intero	scremato		
Composizione centesimale (%)				
Proteine	3.14	3.18	ns	0.16
Caseina	2.47	2.49	ns	0.22
Lattosio	4.64	4.74	ns	0.15
Grasso	3.67	3.16	**	0.33
Residuo	8.48	8.61	ns	0.26
Vitamine				
Vit A (µg/ml)	1.07	0.89	**	0.11
Vit E (µg/ml)	1.68	1.34	**	0.22

Significatività: * : P<0,05; ** : P<0,01; ***: P<0,001; DSR: deviazione standard residua.

Tabella 3.7. Effetto della scrematura sui parametri reologici e caratteristiche igienico- sanitarie considerando le interazioni tra malga, periodo e scrematura (dataset latte intero e scremato).

	SCREMATURA		P	DSR	SIGNIFICATIVITA'				
	intero	scremato			M	P	M*S	P*S	M*P*S
Parametri reologici									
pH	6.55	6.35	*	0.16	*	ns	ns	ns	†
SH/50 ml	3.21	3.96	*	0.71	ns	ns	ns	ns	†
Punto crioscopico (°C)	0.52	0.53	ns	0.02	ns	ns	ns	ns	ns
LDG									
r (min)	13.8	8.4	***	2.8	***	ns	ns	ns	*
K ₂₀ (min)	4.2	2.3	†	2.3	ns	ns	ns	ns	ns

A ₃₀ (mm)	39.4	51.1	***	5.3	***	ns	ns	ns	*
Caratteristiche igienico- sanitarie									
Cellule (log ₂)	3.69	3.56	ns	0.29	ns	ns	ns	ns	ns
Cbt (ln _e)	5.53	7.78	*	1.90	ns	ns	ns	ns	ns

Significatività: * : P<0,05; ** : P<0,01; ***: P<0,001; DSR: deviazione standard residua

Cellule somatiche : log₂ (n. di cellule/100)+3; CBT: ln (carica microbica totale).

r: tempo di coagulazione; k₂₀: velocità di formazione del coagulo; A₃₀: consistenza della cagliata.

Tabella 3.8. Effetto della scrematura su composizione centesimale e contenuto in vitamine considerando le interazioni tra scrematura, malga e periodo (dataset latte intero e scremato).

	SCREMATURA		P	DSR	SIGNIFICATIVITA'				
	intero	scremato			M	P	M*S	P*S	M*P*S
Composizione centesimale (%)									
Proteine	3.14	3.18	ns	0.16	**	ns	ns	ns	ns
Caseina	2.47	2.49	ns	0.22	*	ns	ns	ns	ns
Lattosio	4.64	4.74	ns	0.15	*	ns	ns	ns	ns
Grasso	3.67	3.16	**	0.33	ns	ns	ns	ns	ns
Residuo	8.48	8.61	ns	0.26	**	ns	ns	ns	ns
Vitamine									
Vit A (µg/ml)	1.07	0.89	**	0.11	*	ns	ns	ns	ns
Vit E (µg/ml)	1.68	1.34	**	0.22	ns	ns	ns	ns	ns

Significatività: * : P<0,05; ** : P<0,01; ***: P<0,001; DSR: deviazione standard residua.

Tabella 3.9. Contenuto in vitamina E nel foraggio (µg/g sul tal quale) e composizione centesimale (% su sostanza secca) del foraggio.

	ZO		CO		LA		PM		ZU	
	lug	sett								
Vitamina E (µg/g)	33,2	26	29,3	17,2	29,1	60,3	21,8	21,2	32,3	22,2
Composizione centesimale (%)										
Sostanza secca, %	34,2	26,5	35,7	29,9	31,1	43,3	28,7	36,1	34,2	31,0

Proteina grezza (%ss)	11,1	14,6	8,9	11,5	10,0	8,1	13,0	12,5	10,1	10,9
Estratto etereo (%ss)	2,7	2,6	2,4	2,2	2,8	2,1	3,3	2,6	2,8	2,2
Ceneri (%)	7,6	9,3	8,4	10,2	7,9	7,0	7,4	8,3	6,6	8,8
NDF	58,8	56,9	60,4	64,3	57,3	68,2	54,1	60,4	55,3	59,7
di cui ADF	31,7	30,5	32,3	33,4	32,4	36,8	29,9	30,9	31,2	31,4
NSC	19,8	16,6	19,9	11,8	21,9	14,6	22,2	16,2	25,2	18,4

NDF: fibra detersa al detergente neutro; ADF: fibra detersa al detergente acido.

NSC: carboidrati non strutturali;

lug.: luglio; sett.: settembre

Tabella 3.10. Effetto della malga, del periodo e loro interazione sulle caratteristiche nutrizionali del formaggio dopo 6 mesi di stagionatura.

	MALGA			PERIODO		SIGNIFICATIVITA'			DSR
	CO	ZO	ZU	15LU	5 SET	M	P	M*P	
Composizione centesimale (% ss)									
Sostanza secca	68.0	67.4	66.2	66.2	68.2	†	**	ns	1.2
Proteina Grezza, % s.s	43.8	44.8	43.5	43.7	44.3	ns	ns	ns	1.6
Estratto etereo, % s.s	41.7	41.5	44.7	44.8	40.4	†	***	†	2.2
Ceneri, % s.s.	7.0	7.0	5.6	6.6	6.4	***	ns	ns	0.4
Estrattivi Inazotati, % s.s.	7.5	6.8	6.2	4.7	8.9	ns	***	*	1.5
Colesterolo (mg/ g formaggio)	82.3	79.7	87.9	82.3	84.3	†	ns	ns	5.5
Vitamine									
Vitamina A (µg/g formaggio)	10.2	11.0	10.0	10.4	10.5	ns	ns	ns	1.5
Vitamina E (µg/g formaggio)	11.2	12.3	17.2	12.4	14.7	***	**	ns	1.3
Vitamina A (µg/g grasso t.q.)	35.9	39.3	34.2	35.0	37.9	ns	ns	ns	4.4
Vitamina E (µg/g grasso t.q.)	39.6	44.2	59.1	41.8	53.6	***	**	ns	5.8

Significatività: * : P<0,05; ** : P<0,01; ***: P<0,001; DSR: deviazione standard residua.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Adorisio S., De Siena E., Ingraio G., Santaroni G.P. 1992. Dietary folic acid in two Italian population groups. *J. Food Sci.*, 4, 33-38.

Agabriel C., Coulon J.B., Journal C., De Ranourt B. 2001. Composition chimique du lait et système de production dans les exploitations du Massif Central. *Prod. Anim.*, 14: 119-128.

Alais C. 1988. *Scienza del latte*. Tecniche Nuove, Milano, Italia.

Allison PM, Mumma-Schendel K, Indberg CG, Harms GS, Banca NU & Suttie JW. 1987. Effects of a vitamin K-deficient diet and antibiotics in normal human volunteers. *J. Lab. Clin. Med.*, 110: 180-88.

Anning ST, Dawson J., Dolby DE & Ingram JT. 1948. The toxic effect of calciferol. *Q. J. Med.*, 17:203-28.

Bailoni L., Battaglini L.M., Gasperi F., Mantovani R., Biasioli F., Mimosi A. 2005. Qualità del latte e del formaggio d'alpe, caratteristiche sensoriali, tracciabilità e attese del consumatore. *Quaderno SoZooAlp n°2*, "L'alimentazione della vacca da latte al pascolo", 59:88.

Baker SJ & Mathan VI. 1981 Evidence regarding the minimal daily requirement of dietary vitamin B₁₂. *Am. J. Clin. Nutr.*, 34: 2423-33.

Bates. 1987. Human riboflavin requirements and metabolic consequences of deficiency in man and animals. *World Rev. Nutr. Diet.*, 50: 215-265.

Bates C. 1994. Riboflavin. *Nutr. Research Review*, 7: 106-07

Battaglini L.M., Fortina R., Mimosi A., Lussiana C., Bianchi M. 2001a. Caratterizzazione della produzione di bovine da latte allevate in due areali alpini del Piemonte. 36° Simposio Internazionale di Zootecnia. Società Italiana per il progresso della Zootecnia. Greppi G.F. e Enne G. ed., vol. II, 15-21.

Battaglini L.M., Mimosi A., Ighina A., Bianchi M., Lussiana C. 2003b. Effects of breeds and different breeding systems on milk production in alpine regions. *Scienza e Tecnica Latiero-Casearia*, 54 (5): 335- 342.

Battaglini L.M., Mimosi M., Malfatto V., Robin Preillan A., Bianchi M. 2003c. Management and productive aspects of a dairy herd in a Valle d'Aosta alpine pasture. *Italian Journal of Animal Science*, vol.2, (suppl. 1), 293-295. Proceedings of the A.S.P.A XV Congress, Parma, 18-20 giugno 2003.

Bender DA. 1989. Vitamin B6 requirements and recommendations. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 43: 289-309.

Bender DA & Bender AE. 1986. Niacin and tryptophan metabolism: the biochemical basis of niacin requirements and recommendations. *Nutr. Abstr. Rev. (Ser. A)*, 56:695-719.

Bendich, A. 1993. Physiological role of antioxidants in the immune system. *J. Dairy Sci.*, 76:2789–2794.

Berger E, Long E & Semenza G. 1972. The sodium activation of biotin absorption in hamster small intestine in vitro. *Biochim. Biophys. Acta*, 255: 873-87.

Berry N.R., Sutter F., Bruckmaier R.M., Blum J.W., Kruezer M. 2001a. Limitations of high Alpine grazing conditions for early-lactation cows: effect of energy and protein supplementation. *Animal Science*, 73,149-162.

Berry N.R., Bueler T., Jewell P.L., Sutter F., Kruezer M. 2001b. The effect of supplementary feeding on composition and renneting properties of milk from cows rotationally grazed at high altitude. *Milchwissenschaft-Milk Science International*, 56 (3), 123-126.

Brun-Bellut J., Laurent F., Vignon B. 1985. Effetti dell'alimentazione sulla composizione del latte. *Il Latte*. X, 4: 314-326.

Bianchi M., Battaglini L.M., Mimosi A., Lussiana C., Prina A., Massimo V. 2002a. Il formaggio Ossolano. Uno studio per la caratterizzazione del territorio, dei sistemi produttivi zootecnici, e dei formaggi. Aspetti zootecnici. In “Il formaggio Ossolano”, Regione Piemonte, Documento finale Interreg II Italia- Svizzera, 197-214.

Bianchi M., Battaglini L.M., Mimosi A. 2002b. Il formaggio Ossolano. Uno studio per la caratterizzazione del territorio, dei sistemi produttivi zootecnici, e dei formaggi. Le filiere produttive del formaggio Ossolano nelle aree di studio (aspetti zootecnici). In “Il formaggio Ossolano”, Regione Piemonte, Documento finale Interreg II Italia-Svizzera, 265-277.

Bianchi M., Mimosi A., Battaglini L.M., Ighina A. 2003a. Prime osservazioni sulla razza-popolazione Barà-Pustertaler allevata in Piemonte. Atti del LVII Convegno Sis.Vet , Ischia (NA), 433-434.

Bills C.E., Massengale O.N., Hicham K.C., Gray E.L. 1938. J. Bio. Chem., 126, 241.

Block, E., Farmer, B. 1987. The status of h-carotene and vitamin A in Que'bec dairy herds: factors affecting their status in cows and their effects on reproductive performance. Can. J. Anim. Sci. 67, 775– 788.

Blomhoff, R., Smeland, E.B. 1994. Role of retinoids in normal hematopoiesis and the immune system. In: Blomhoff, R. (Ed.), Vitamin A in Health and Disease. Marcel Dekker, New York, pp. 451– 485.

Bovolenta S., Cozzi G., Tamburini A., Ventura W., Timini M. 2005. L'alimentazione della vacca da latte in alpeggio: fabbisogni e strategie di integrazione alimentare. Quaderno SoZooAlp n°2, L'alimentazione della vacca da latte al pascolo, 29:44.

Bramley, P.M., Elmadfa, I., Kafatos, A., Kelly, F.J., Manios, Y., Roxborough, H.E., Schuch, W., Sheehy, P.J.A., Wagner, K.-H. 2000. Vitamin E. J. Sci. Food Agric. 80, 913–938.

Brockman H., Z. Physical. Chem., 241, 104 (1936); 245, 96 (1937); Brockman H., Busse A., Z. Physical. Chem., 249, 176 (1937)

Brun-Bellut J., Laurent F., Vignon B. 1985. Effetti dell'alimentazione sulla composizione del latte. *Il Latte*. X, 4: 314-326.

Buchin S., 2003. Synthèse des hypothèses existantes sur l'influence des facteurs de production du lait sur les caractéristiques des fromages français à pâte pressée ou pâte pressée cuite. Proc. 5th International Meeting on Mountain Cheeses, 11-12 sept. 2003, Arèches, F.

Bugaud C., Bornard A., Hauwuy A., Martin B., Salmon J.C., Tessier L., Buchin S., 2000. Relation entre la composition botanique de végétation de montagne et leur composition en composés volatils. *Fourrages*, 162: 141-155.

Bugaud C., Buchin S., Coulon J.B., Hauwuy A., Dupont D., 2001a. Influence of the nature of alpine pastures on plasmin activity, fatty acid and volatile compound composition of milk; *Lait*, 81: 401-414.

Bugaud C., Buchin S., Hauwuy A., Coulon J.B. 2001b. Relationships between flavour and chemical composition of Abondance cheese derived from different types of pastures. *Lait*, 81: 757-773.

Cestaro B. e Cazzola R. 2006. Alimentazione e nutrizione umana. Il pensiero scientifico editore, Capitolo 14.

Cocchi M. & Mordenti A.L. 2005. Alimenti e salute - I nutrienti strategici. CLUEB (Cooperativa Libreria Universitaria Editrice Bologna).

Collomb M., Bütikofer U., Spahni M., Jeangros B., Bosset J.O. 1999. Composition en acides gras et en glycérides de la matière grasse du lait de vache en zones de montagne et de plaine. *Sci. Alim.*, 19: 97-110.

Collomb M., Sieber R., Bütikofer U., Stoll W., Sollberger H., Wechsler D., Gallmann P. 2003.

Impact of oilseeds and grass-feeding at different altitudes on fatty acid composition of milk Lowlands, Mountains and Highlands, and typical winter. Proc. 5th International Meeting on Mountain Cheeses, 11-12 sept. 2003, Arèches, F.

Combs GF Jr., 1992. The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health. Academic Press Inc, San Diego (CA), pp.151-78.

Commission of the European Communities, 1993. Nutrient and energy intakes for the European Community, Reports of the Scientific Committee for Food, Thirty-first series, Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.

Chew B. P. 1993. Role of carotenoids in the immune response. J. Dairy Sci., 76:2804– 2811.

Chilliard Y., Ferlay A., Doreau M., 2001. Contrôle de la qualité nutritionnelle des matières grasses du lait par l'alimentation des vaches laitières: acides gras trans, polyinsaturés, acide linoléique conjugué. Prod. Anim., 14: 323-335.

Christensen S., 1973. The biological fate of riboflavin in mammals. A survey of literature and investigations. Acta Pharm. Toxic., 32: 72.

Consorzio per la tutela del formaggio Asiago Vicenza, Nuovo disciplinare di produzione Dop Asiago (Dm 24/01/05, G.U.n 43 del 22/02/05).

Contarini G., Povolo M., 1984. Importanza della frazione lipidica nella caratterizzazione del latte di capra., Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia, 35: 109-132.

Coulon J.B., Hauwuy A., Martin B., Chamba J.F., 1997. Pratiques d'élevage, production laitière et caractéristiques des fromages dans les Alpes du Nord. INRA. Prod. Anim., 10(3):195-205.

Corti M., 2003. Formaggi in alpeggio: dilemmi tecnici e discorsi sociali. Caseus, 8 (6), 36-43.

Dalton K. & Dalton MJT., 1987. Characteristics of pyridoxine overdose neuropathy syndrome. Acta

Neurol. Scand., 76: 8-11.

Debier C., Pottier J., Goffe Ch., La rondelle Y., 1995. Present knowledge and unexpected behaviours of vitamins A and E in colostrum and milk. *Livestock Production Science* 98 (2005) 135–147.

Decan C., Ghadaki M.B., 1970. Variation de la sécrétion des acides gras des matières grasses du lait de vache à la mise à l'herbe et au cours des six premières semaines d'exploitation du fourrage vert. *Ann. Zootech.*, 19,4: 399-411.

Demarquilly C., Jarrige R., 1981. Panorama des méthodes de prévision de la digestibilité et de la valeur énergétique des fourrages. Prévision de la valeur nutritive des aliments des Ruminants, INRA Pubbl., Beaumont, 41-59.

Edgardo Pace, Milano: Hoepli, 1949. Le vitamine, la chimica, la tecnica farmaceutica, l'azione biologica, i metodi industriali di estrazione e di sintesi. Edizione Enrico Hoepli Milano.

Elia C.A., Balzan S., Segato S., Bonato G., Lignitto L., Novelli E., 2006. Vitamins A and E content in milk from alpine grazing dairy cows. *Proceedings of the 10th ESVCN Congress- 2006*.

Evans H.M. e Bishop K.S., *Science*, 56, 650, (1912); “*Am. J. Physiol.*”, 63, 396, (1922); “*J.A.M.A.*”, 81, 889, (1922).

Fedele V., 2001. Alimentazione, fra pascolo e integrazione. *Caseus*, 6 (3), 36-40.

Flodin NW., 1988. *Pharmacology of Micronutrients*, Wiley, New York. Kallner A, Hartmann D

Hornig D., 1977. Determination of bodypool size and turnover rate of ascorbic acid in man. *Nutr. Metab.*, 21: 31-35.

Food sources of nutrients in the diet of the elderly Italians: II. Micronutrients. *Int. J. Epidemiol.*, 22: 869-77.

Foss ZMS, 1981. Thesis, University of Nebraska, Lincoln, Nebraska.

Franci O., Acciaioli A., Agethle A., Pugliese C., Antongiovanni M., 1997. Influenza di alcune tipologie di allevamento sulle caratteristiche del latte di vacche Brune in Alta Val Venosta. Atti Convegno Nazionale "Parliamo di ...alimentazione animale e ambiente", Fossano (CN), 115-122.

Franklin, S.T., Sorenson, C.E., Hammel, D.C., 1998. Influence of vitamin A supplementation in milk on growth, health, concentrations of vitamins in plasma and the immune parameters of calves. *J. Dairy Sci.* 81, 2623– 2632.

Gorlier A., 2002. Caratteristiche vegetazionali di alcuni alpeggi del Parco Naturale Mont Avic e relazioni con gli aspetti qualitativi del latte prodotto. Tesi di Laurea, Corso di Laurea in Scienze Forestali e Ambientali. A.A. 2001/2002. Università degli Studi di Torino.

Gravel R, Lam K, Mahuran D, Kronis A., 1980. Purification of human liver propionyl CoA carboxylase by carbone tetrachloride extraction and manomeric avidin affinity chromatography. *Arch. Biochem. Biophys.* , 201: 669-73.

Greer FR., 1995. The importance of vitamin K as a nutrient during the first year of life. *Nutr. Res.*, 15: 289-310.

Griinari J.M., Bauman D.E., 1999. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. In *Conjugated Linoleic Acid: Biochemical and Nutrition Clinical, Cancer and Methodological Aspect*. M.P. Yurawecz, M.M. Mossoba, Jk;G. Kramer, G.Nelson, M.W.Pariza. Ed. AOCS Press; Champaing, IL, 180-200.

Grummer R., 1991. Effect of feed on the composition of milk fat. *J. Dairy Sci.*, 74: 3244-3257.

Gubler CJ ., 1988. Thiamin. In: Machlin LJ (ed.), *Handbook of vitamins*, Marcel Dekker, New York, pp. 245-98.

Gusmeroli F., Piccagnoni G., Timini M., Fumasoni S., 1985. I concentrati fanno bene in alpeggio. *Informatore Agrario* 22, 39-44.

Gusmeroli F., 1985. Alpeggio e qualità del latte. *Latte*, 10, 1057-1062.

Hatano M., 1992. Microbiological assay of pantothenic acid in blood and urine. *J. Vitaminol.*, 8: 134-42.

Heilbrom I.M., Kamm E.D., Morton R.A., 1927. "Biochem. J." 21, 78

Hermansen J.E., Ostersen S., Justesen N.C., Aaes O., 1999. Effects of dietary protein supply on caseins, whey proteins, proteolysis and renneting properties in milk from cows grazing clover or N fertilized grass. *Journal of Dairy Research*, 66: 193-205.

Hess A. F., "Am. J. Diseases children", 1924. 28, 517.

Huldschinsky K. *et al.*, "Deut. Med. Wochschr." 1919. 45, 172

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

Ip C., Scimeca J.A., Thomson H.J., 1994. Conjugated linoleic acid: a powerful anticarcinogen from animal fat sources. *Cancer*, 74: 1050-1054.

Jackson, J.R., Hurley, W.L., Easter, R.A., Jensen, A.H., Odle, J., 1995. Effects of induced or delayed parturition and supplemental dietary fat on colostrum and milk composition in sows. *J. Anim. Sci.* 73, 1906– 1913.

Jahreis G., Fritsche J., Mockel P., Schone F., Moller U., Steinhart H., 1999. The potential anticarcinogenic conjugated linoleic acid cis-9, trans-11 C18:2, in milk of different species: cow, goat, ewe, sow, mare, woman. *Nutrition Research*, 10: 1541-1549.

Jensen, S.K., Johannsen, A.K.B., Hermansen, J.E., 1999. Quantitative secretion and maximal secretion capacity of retinol, hcarotene and a-tocopherol into cows' milk.

J. Dairy Res. 66, 511 – 522.

Karrer P. e Fritzsche H., "Helv. Chim. Acta.", 1938. 21, 1234.

Kelly M.L., Kolver E.S., Bauman D.E., Vanamburgh M.E., Muller L.D., 1998. Effect of intake of pasture on concentration of conjugated linoleic acid in milk of lactating cows. J. Dairy Sci.. 81: 1630-1636.

Kies C., Wishart C., Mc Gee M., Foss Z., Yang LC, Quillian J., Fox HM., 1982. Pantothenic acid levels in urine, blood serum, and whole blood of adult humans fed graded levels of pantothenic acid. Fed. Proc. 41: 276.

Kirchgessner M., Kreuzer, M., Roth-Maier D.A., 1986. Milk urea and protein content to 19 diagnose ener- gy and protein malnutrition of dairy cows. Archives of Animal Nutrition 36 20: 192-197 21.

Klobasa, F., Werhahn, E., Butler, J.E., 1987. Composition of sow milk during lactation. J. Anim. Sci. 64, 1458– 1466.

Kumagai H., Chaipan Y., Mitani K., 2001. Effects of periparturientvitamin A supplementation on vitamin A concentrations in colostrum and milk from dairy cows, and plasma retinol concentrations, feed intake and growth of their calves. Anim. Sci. J. 72, 126– 133.

Kumar R., 1986. The metabolism and mechanism of action of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. Kidney Int., 30: 793-803.

Leiber F., Nigg D., Kreuzer M., Wettstein H.R., 2003. Influence of sea level and vegetative stage of the pasture on cheese-making properties of cow milk. Proceedings of the Society of Nutrition Physiology, 12: 87.

Lodi R., Brasca M., Masa B., Tamburini A., Erini S., Turchetti E., 2005. Effetti dell'integrazione

alimentare sulle caratteristiche del formaggio Bitto. Quaderno Sozzoalp n.2. L'alimentazione della vacca da latte al pascolo", 140: 156.

LSRO (Life Sciences Research Office). 1978. Evaluation of the Health Aspects of Biotin as a Food Ingredient. SCOGS 92. Federation of American Societies for Experimental Biology, Bethesda, Md. 12: 87.

Lucas V., Michel N., Ballot E., Rock J.B., Coulon J.B., 2003. Relation entre les conditions de production du lait et les teneurs en composés d'intérêt pour la santé dans les fromages. Proc. 5th International Meeting on Mountain Cheeses, 11 - 12 sept. 2003, Arèches F.

Macias C., Schweigert F.J., 2001. Changes in the concentration of carotenoids, vitamin A, alpha-tocopherol and total lipids in human milk throughout early lactation. Ann. Nutr. Metab. 45, 82– 85.

Malossini F., Bovolenta S., Pradi P.P., Piras C., 1992. Effetto dell'alpeggio sulla produzione di latte di bovine di razza Bruna. Zoot. Nutr. Anim., 18: 259-265.

Marquet A (1977) New aspects of the chemistry of biotin and of some analogs. Pure Appl. Chem., 49: 183-96.

McDowall, F.H., McGillivray, W.A., 1963. Studies on the properties of New Zealand butterfat. VII. Effect of the stage of maturity of ryegrass fed to cows on the characteristics of butterfat and its carotene and Vitamin A contents. J. Dairy Res. 30, 59–66.

McGillivray, W.A., 1957. Factors influencing the vitamin content of milk fat. VII. The possible existence of protein-bound carotenoids and Vitamin A alcohol in mammary secretion. J. Dairy Res. 24, 352–359.

Megazy & Schwenk H (1983) Riboflavin uptake by isolated enterocytes of guinea pigs. Nutr. 113: 1702-07.

Miller BE & Norman AW., 1984. Vitamin D. In: Machlin LJ (ed.) Handbooks of vitamins: nutritional, biochemical and clinical aspects, Marcel Dekker Inc, New York, pp. 45-97.

Miller DR & Hayes KC., 1982. Vitamin excess and toxicity. In: Hathcock JN (ed.) Nutritional toxicology, Academic Press, New York, vol. II, pp. 81-133.

Miori, M.; Sottovia, L., 2005. Prati e Pascoli del Trentino. Provincia Autonoma di Trento Servizio Foreste e Fauna.

Mordenti A., Pacchioli M.T., 1992. L'influenza dei fattori ambientali sulla qualità del latte. *Informatore Agrario*, 22: 35-40.

Morhand-Fehr P., Doreau M., 2001. Ingestion et digestion chez les ruminants soumis à un stress de chaleur. *Prod. Anim.* 14: 15-27.

Morrison AB & Campbell JA, 1960. Vitamin absorption studies 1. Factors influencing the excretion of oral test doses of thiamine and riboflavin by human subjects. *J. Nutr.*, 72: 435-440.

Mulder. H., and P. Walstra. 1974. The milk fat globule. Emulsion science as applied to milk products and comparable foods. Pudoc, Wageningen, and Commonw. Agric. Bur., Farnham Royal, The Netherlands.

National Research Council. 1989. Recommended Dietary Allowances, 10a ed., National Academy Press, Washington, pp. 169-73, 247-261.

Negrini G., 2004. “ Latte di Bruna: risultati di alcune prove di caseificazione. Istituto tecnico agrario, L'Aquila, Italia. Relazione tenuta in occasione della 7^a Conferenza Mondiale Allevatori Razza Bruna.

Nissen, S., Faidley, T.D., Zimmerman, D.R., Izard, R., Fisher, C.T., 1994. Colostral milk fat percentage and pig performance are enhanced by feeding the leucine metabolite beta-hydroxy-beta-methyl butyrate to sows. *J. Anim. Sci.* 72, 2331– 2337.

Novelli E., Elia C.A., Lignitto L., Granata A., Segato S., Tutta C., Ronzani G., Giaccone V., Balzan S., 2006. contenuto di vitamine liposolubili e colesterolo del formaggio Asiago d'Alleva mezzano. XII congresso Nazionale ADI- 2006, 169-170.

Olson JA, 1987. Recommended dietary intakes (RDA) of vitamin K in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*,45: 687-92.

Olson RE, 1994. Vitamin K. In: Shils ME, Olson JA & Shike M (eds.) *Modern nutrition in health and disease*, Lea & Febiger, Philadelphia (PA), vol. II, pp. 342-58.

Olson J.A., 1984. Vitamin A. In: *The Nutrition Foundation (Ed.), Nutrition Review's Present Knowledge in Nutrition*, Washington DC, pp. 177– 191

Orlandi D. Clementel C., 2006. Caratterizzazione produttiva e qualitativa dei pascoli alpini.

Pariza M.W., Park Y., Cook M.E., 2001. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Progress in Lipid Research*. 40: 283-298.

Piva G., Fusconi G., 1989a. Come influire sul contenuto in proteine e sulle proprietà casearie. *Informatore Agrario*, 13: 67-70.

Piva G., Fusconi G., 1989b. Come influire sul contenuto in grasso. *Informatore Agrario*, 4: 59-65.

Pomiès D., Gasqui P., Bony J., Coulon J.B., Barnouin J., 2000. Effect of turning out dairy cows to pasture on milk somatic cell count. *Ann. Zootech.*, 49: 39-44.

Puyol, P., Perez, M.D., Ena, J.M., Calvo, M., 1991. Interaction of b-lactoglobulin and other bovine and human whey proteins with retinol and fatty acids. *Agric. Biol. Chem.* 55, 2515–2520.

Quaderno sozooalp n.3, 2006. Pasut D., Dovier S., Bovolenta S., Venerus S. Le malghe della dorsale Cansiglio- Cavallo “un progetto per la valorizzazione dell'attività alpicolturale”.

Reichel H., Koeffler HP & Norman AW, 1989. The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. *N. Engl. J. Med.*, 320:980-91.

Rose RC, 1988. Transport of ascorbic acid and other water-soluble vitamins. *Bioch. Biophysica Acta*, 947: 335-66.

Rosenheim O., Webster T.A., "Lancet", 1, 1025 (1935); "J. Soc. Chem. Ind.", 45, 932 (1926); "Bioch. J.", 21, 27 (1927).

Rosenheim O., Webster T.A., "Lancet", 1, 306 (1927); "Biochem. J.", 21, 389 (1927); "Bioch. J.", 21, 27 (1927).

Said HM, Redha R & Nylander W, 1987. A carrier-mediated, Na⁺ gradient-dependent transport for biotin in human intestinal brush-border membrane vesicles. *Am. J. Physiol.*, 253: 631-36.

Salvadori del Prato O. 2001. Trattato di tecnologia casearia. Bologna – Edizioni Agricole della Calderini s.r.l.

Schaumberg HJ, Kaplan A, Windebank N, Vick S, Ragmus S, Pleasure D & Brown MJ, 1983. Sensory neuropathy from pyridoxine abuse. *N. Eng. J. Med.*, 309, 445-48.

Schweigert, F.J., 1990. Effect of gestation and lactation on lipoprotein pattern and composition in dairy cows. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 63, 75–83.

Schweigert, F.J., Gottwald, C., 1999. Effect of parturition on levels of vitamins A and E and of h-carotene in plasma and milk mares. *Equine Vet. J.* 31, 319– 323.

Segato S., Berzaghi P., Tenti S., Mirisola M., Serva L., Elia C., Fasolato L., Franco S., Cozzi G., 2004. Applicazione della tecnica NIRs per la predizione del profilo acidico in due tipi di formaggio, 14. Simposio Italiano di Spettroscopia nel Vicino Infrarosso. Lodi, 15-16 Giugno.

Semba, R.D., 1998. The role of vitamin A and related retinoids in immune function. *Nutr. Rev.* 56, S38– S48.

Sezlhub J., Powell GM & Rosemberg H., 1984. Intestinal transport of 5 Metil THF. *Am. J. Phys.*, 246: G515-20.

Shearer MJ, 1990. Vitamin K and vitamin K-dependent proteins. *Br. J. Haematol.*, 75: 156-62.

Spencer R., Brody KR, 1964. Biotin transport by the small intestine of rat, hamster and other species. *Am. J. Physiol.*, 206: 653-57.

Steenbock H., 1924. "Science", 60, 224.

Steenbock H. e Black A., 1924. "J. Biol. Chem.", 61, 405.

Stepp W., Schroder e Kuhnau R., 1941. Die vitamine und ihre Klinische Anwendung. Verlag Euke, Stuttgart.

Succi G., Hoffmann I., 1997. La vacca da latte. Città Studi, Milano, 886.

Sugarman BS & Munro HN (1980) 14C-pantothenate accumulation by isolated adypocytes from adult rats of different ages. *J. Nutr.*, 110: 2297-30.

Summer A. , Pecorari M., Fossa E, Malacarne M. Formaggioni, P, Franceschi P., Mariani P., 2004. Università degli Studi di Parma, Consorzio del Formaggio Parmigiano-Reggiano, Reggio Emilia Centro Lattiero Caseario, Parma, Italia. "Frazioni proteiche, caratteristiche di coagulazione presamica e resa in formaggio Parmigiano-Reggiano del latte delle vacche di razza Bruna italiana" (Relazione tenuta in occasione della 7^a Conferenza Mondiale Allevatori Razza Bruna)

Suttie JW, 1984. Vitamin K. In: Machlin LJ (ed.) *Handbooks of vitamins: nutritional, biochemical and clinical aspects.* Marcel Dekker Inc, New York, pp. 147-98.

Suttie JW, Mummah-Schendel LL, Shah DV, Lyle BJ & Greger H., 1988. Vitamin K deficiency from dietary vitamin K restriction in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 47: 475-80

Traber, M.G., Cohn, W., Muller, D.P.R., 1992. Absorption, transport and delivery to tissues. In: Packer, L., Fuchs, J. (Eds.), *Vitamin E in Health and Disease*. Marcel Dekker, New York, pp. 35–53.

Ubertalle A., Profiti M., Battaglini L.M., Mimosi A., Fortina R., 1998. Milk urea nitrogen of Italian Friesian and Valdostana R.P. dairy cattle. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 49, 5: 249-265.

Valfrè F., Moretti V.M., Marchisio M., Mentasti T., Filippini G., 1999. Studio della frazione volatile in latte e formaggi di capra mediante GC/MS. *Caseus*, 4: 62-67.

Van den Berg H., Finglans PM, Bates C., Fayol V., Jagerstad M., Maiani G., Pietrzik K., Sheehy T., 1994. Flair intercomparison studies on serum and red cells folate. *Int. J. Vit. Nutr. Res.*, 64: 288-93.

Verdier-Metz I., Coulon J.B., Pradel P., 2001. Relationship between milk fat and protein contents and cheese yield. *Animal Research* 50: 365-371.

Von Heuler B., Von Heuler H. ed Hellestrom, 1928. “*Svensk. Kem. Tidskr.*”, 40, 25.

Von Heuler B., Karrer P. Hellestrom H., 1931. “*Helv. chim. Acta*”, 14, 839.

Von Heuler B., Karrer P. e Solmssen U., 1931. “*Helv. chim. Acta*”, 21, 211.

Walstra. P., and R. Jenness. 1984. *Dairy Chemistry and Physics*. John Wiley & Sons. Inc.. New York. NY.

Webb AR & Holick MF, 1988. The role of sunlight in the cutaneous production of vitamin D₃. *Annu. Rev. Nutr.*, 8: 375-99.

Windaus A. e Hess A., 1927. "Nach. Ges. Wiss. Göttingen", 111, 175.

Windaus *et al.*, "Z. Physical. Chem.", 241, 100, 218 (1936), e 245, 168 (1937)

Winter SL & Boyer JL, 1973. Hepatic toxicity from large doses of vitamin B3 (nicotinamide) N. Engl. J. Med., 289: 1180-82.

Wohlt, J.E., Kleyn, D.H., Vandernoot, G.W., Selfridge, D.J., Novotney, C.A., 1981. Effect of stage of lactation age of ewe sibling status and sex of lamb on gross and minor constituents of Dorset ewe milk. J. Dairy Sci. 64, 2175–2184.

Zahar M., Smith D.E., Martin F., 1995. Vitamin A Distribution Among Fat Globule Core, Fat Globule Membrane, and Serum Fraction in Milk. "Journal of Dairy Science" vol. 78 No. 3.

Siti internet

www.aiab.it

www.asiagocheese.it

www.sinu.it dicembre 2006

