

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICO-VETERINARIE

DOTTORATO IN PRODUZIONI ANIMALI, BIOTECNOLOGIE
VETERINARIE, QUALITÀ E SICUREZZA DEGLI ALIMENTI
XXVI Ciclo

FATTORI GENETICI, CARATTERISTICHE STRUTTURALI DELLA MICELLA DI CASEINA E ATTITUDINE ALLA COAGULAZIONE DEL LATTE

*GENETIC FACTORS, CASEIN MICELLE STRUCTURAL
CHARACTERISTICS AND RENNET COAGULATION
PROPERTIES OF MILK*

Coordinatore::

Chiar.ma Prof.ssa Paola Superchi

Tutor:

Chiar.mo Prof. Andrea Summer

Dottoranda: Costanza Marchini

*Il divertimento della ricerca scientifica
è anche... cercare sempre di progredire
pur sapendo che probabilmente ci si avvicinerà
sempre di più a comprendere la realtà,
senza arrivare mai a capirla completamente.
(Margherita Hack)*

Indice

Riassunto	I
Summary	IV
Capitolo I: Introduzione	1
1.1– Ruolo dei fattori genetici nella qualità del latte	2
1.1.1– Polimorfismo delle proteine del latte: effetti sulla coagulazione presamica	3
1.1.2– Polimorfismo delle proteine del latte: effetti sulla componente minerale	5
1.2– Razze autoctone a limitata diffusione: riserva preziosa di geni	5
1.2.1– Effetto razza e genotipi delle caseine	7
1.2.2– Effetto razza e contenuto di calcio e di fosforo	8
1.2.3– Effetto razza e fosfato di calcio colloidale	9
1.3– Caseina, struttura micellare e coagulazione presamica	11
1.3.1– Tipi di κ -caseina, ripartizione delle caseine e dimensioni delle micelle	12
1.3.2– Tipi di κ -caseina e caratteristiche di coagulazione presamica del latte	13
1.3.3– Effetti quantitativi della κ -caseina B sulla resa in formaggio	15
1.3.4– Determinazione della κ -caseina B nel latte di massa: messa a punto del “testkappa”	16
1.3.5– Tipi di β -caseina e caratteristiche di coagulazione presamica del latte	17
1.3.6– Tipi di α_{s1} -caseina, composizione del latte e ripartizione delle caseine	18
1.4– Principali requisiti tecnologico-caseari del latte	21
1.4.1– Attitudine alla coagulazione presamica	21
1.4.2– Acidità titolabile, pH e tempo di coagulazione	22
1.4.3– Contenuto di caseina e consistenza del coagulo	23
1.4.4– Rapporto grasso:caseina	24
1.4.5– Calcio, fosforo ed equilibri salini	25
1.4.6– Fosfato di calcio colloidale	26
1.4.7– Carica batterica	27
1.4.8– Spore di clostridi butirrici	28
1.4.9– Cellule somatiche	30
1.5– Tecnologia di produzione del Parmigiano-Reggiano	32

Capitolo II: Parte Sperimentale	35
2.1– Ricerche	35
2.2– Metodiche Analitiche	36
2.3– Scopo del primo filone di ricerca: studio dell'effetto razza sul contenuto minerale e sugli equilibri salini del latte e le proprietà di caseificazione	54
2.3.1– Disegno sperimentale	54
2.3.2– Risultati e Discussione	55
2.4– Scopo del secondo filone di ricerca: influenza del contenuto di κ -caseina B sulla resa in formaggio Parmigiano-Reggiano	61
2.4.1– Disegno sperimentale	61
2.4.2– Risultati e Discussione	64
Capitolo III: Conclusioni	90
Bibliografia	92

Riassunto

La caseina allo stato nativo si trova sotto forma di micelle fortemente idratate, alla cui formazione partecipa il fosfato colloidale. Quest'ultimo esercita un'azione fondamentale ai fini della costruzione della stabilità delle submicelle. Gli equilibri minerali infatti si riflettono sulla composizione del formaggio, con possibili ripercussioni sulla tessitura della pasta. Recenti studi hanno dimostrato che il miglioramento genetico dell'attitudine casearia è possibile adottando specifici obiettivi di selezione per ottimizzare l'efficienza di resa e di produttività. Tale spinta ha portato all'aumento proporzionale del contenuto di caseina e ad un drastico abbassamento dei parametri di acidità titolabile con riflessi negativi sui parametri reologici del latte. Gli effetti più marcati della strategia di selezione sono stati osservati per le varianti della κ -caseina (κ -Cn). Il genotipo κ -Cn è in grado di esercitare un'influenza significativa sulla quantità con cui questa proteina entra nella composizione della caseina totale; infatti, la κ -caseina di tipo B contiene una maggiore quantità di κ -caseina, rispetto a quella di tipo A. Inoltre, il latte κ -Cn B presenta tempi di coagulazione inferiori, originando masse caseose più consistenti e con migliore capacità di sineresi, di ritenzione proteica e di incorporazione del grasso. Si tratta di caratteristiche che permettono di incrementare significativamente le rese di produzione. Sempre nel latte κ -Cn B sono stati riscontrati contenuti più elevati di calcio e fosforo totale e fosforo colloidale.

Per le motivazioni sopra esposte sono stati sviluppati due differenti filoni di ricerca: il primo con lo scopo di approfondire lo studio dell'effetto razza sul contenuto minerale e sugli equilibri salini e le proprietà di caseificazione di latte destinato a formaggio Grana Padano ed a Provolone Valpadana. Il secondo con lo scopo di valutare l'influenza del contenuto in κ -caseina B sulla resa di Parmigiano-Reggiano.

Il protocollo della prima ricerca ha previsto la raccolta complessiva di 80 campioni di latte individuale da una stalla in cui erano allevate vacche di razza Bianca Val Padana (BVP) e di vacche di razza Frisona Italiana (FI). Di questi, 40 campioni derivanti da 20 vacche BVP e 40 campioni da 20 vacche FI prelevati, per ciascun soggetto, in due momenti diversi dello stadio di lattazione (a 50 ± 7 e a 150 ± 7 giorni di distanza dal parto). Su ogni campione di latte sono stati determinati: lattosio, grasso, proteina grezza e caseina, pH, acidità titolabile; parametri di coagulazione presamica (r , k_{20} , a_{30}); cellule somatiche; conta microbica totale; sostanza secca e ceneri; contenuto totale, solubile e colloidale per il fosforo, per il calcio e per il magnesio).

Il latte di vacche Bianca Val Padana è risultato più ricco in sostanza secca (grasso e proteina),

in caseina e ha evidenziato valori più elevati di acidità titolabile. Inoltre, questo latte ha riportato maggiori quantitativi dei minerali totali e delle frazioni colloidali di calcio e di fosforo. Nonostante tali potenzialità, non sono state riscontrate differenze tra le due razze per i parametri lattodinamografici (r , k_{20} , a_{30}). Ciò potrebbe essere dovuto al basso valore del rapporto tra minerali e caseina, un deficit che porterebbe alla formazione di un coagulo di tipo farinoso.

Nella seconda ricerca, sono stati selezionate 4 stalle che producevano latte caratterizzato da un differente contenuto κ -caseina B: A_1 , A_2 , A_3 e A_4 , in ordine decrescente per contenuto di κ -caseina B. Le quattro stalle erano conferenti di uno stesso caseificio e la produzione giornaliera di ciascuna di esse era sufficiente per permettere una lavorazione in formaggio Parmigiano-Reggiano. Sono stati effettuati sopralluoghi in caseificio, con cadenza mensile, un intero anno solare (12 sopralluoghi). In ciascun sopralluogo, si è proceduto a raccogliere, per ciascuna delle 4 lavorazioni, un campione di latte di massa, uno di latte in caldaia e uno di siero cotto. Inoltre, sempre ciascuna lavorazione, si è misurato al peso delle 2 forme prodotte a 24 ore e dopo 1 e 6 mesi di stagionatura.

A seconda della tipologia del campione sono stati determinati lattosio, grasso, proteina e caseina, pH e acidità titolabile, punto crioscopico, cellule somatiche, urea, contenuto di κ -caseina B, analisi lattodinamografica (r , k_{20} , a_{30}), conta batterica totale, spore di clostridi, frazioni azotate, sostanza secca e ceneri, frazioni minerali e calcolo della resa.

I risultati hanno evidenziato che tra le quattro aziende quella A_1 emerge per le pregevoli caratteristiche del latte in termini chimico-fisici (in particolare, maggiori contenuti di κ -caseina B, un più elevato grado di mineralizzazione della micella e valori ottimali di acidità titolabile), reologici (ottimali parametri lattodinamografici), e tecnologici (maggiore resa casearia, pari a +10%, per i tre livelli di maturazione: a 24 ore, ad 1 mese dall'estrazione dalla salamoia ed a 6 mesi di stagionatura). Sugli stessi dati, si è proceduto ad una differente elaborazione statistica, considerando solo due classi per il contenuto di κ -caseina B: H- κ B (campioni ad alto contenuto di κ -caseina B, corrispondente alla stalla A_1) e L- κ B (campioni a basso contenuto di κ -caseina B, corrispondente al latte delle stalle A_2 , A_3 e A_4). Il latte in caldaia della classe H- κ B si è contraddistinto per maggiori quantitativi di proteina e di caseina (+20,0%, e +12,2%). Inoltre, per quanto riguarda le frazioni minerali, questo latte ha mostrato un più elevato valore di ceneri e maggiori contenuti di calcio, fosforo, e magnesio totale (+5,2%, +18,7%, +7,8%), nonché un più basso contenuto di cloruri (-5,7%).

Ai più elevati valori di sostanza secca, proteina grezza del siero cotto del latte H- κ B hanno fatto riscontro valori più bassi di perdite di caseificazione stessi per ciascuno di questi parametri. Inoltre, il siero cotto H- κ B è stato caratterizzato per una minore presenza di particelle di cagliata perse sotto forma di polveri (curd-fines). Infatti anche in questo caso il latte H- κ B ha dimostrato avere un'efficienza di resa superiore al latte L- κ B a tutti i livelli di maturazione.

Le elaborazioni dei dati ricavati dalla sperimentazione hanno permesso di mettere a punto una proposta di modifica del pagamento latte a qualità del latte che utilizzi, fra i parametri di calcolo, anche la percentuale di κ -caseina B. L'utilizzo delle formule predittive sulla resa di trasformazione, hanno evidenziato un effetto additivo della κ -caseina B sulla resa. Tali differenze, quindi, hanno confermato che, tenendo in considerazione unicamente il parametro caseina, non sia possibile dare una giusta interpretazione delle reali potenzialità di caseificazione del latte e di conseguenza una idonea classificazione e retribuzione in termini di pagamento latte a qualità sarebbe opportuno considerare anche il contenuto di κ -caseina B.

Summary

The casein micelle play a key role during the whole cheese-making process. Its structure affect the development of rennet coagulation and the rheology of the resulting curd, with repercussion on cheese yield and quality. Most studies evidenced the key role played by caseins on milk rennet coagulation aptitude, in terms of their contents, relative proportions, genetic types, and extent of post-translational modifications. In this regard, it is well know the positive influence of κ -casein B on rennet coagulation aptitude of milk. Besides caseins, calcium (Ca) and phosphorus (P) are essential constituents of the micelles. Micellar P can be present as part of colloidal calcium phosphate (CCP) (inorganic-P) or covalently bound to caseins as phosphate groups (casein-P). A fraction of the phosphate groups of calcium-sensitive caseins contribute to micellar casein structure by a Ca^{2+} -mediated secondary interactions with CCP. Although the increasing number of studies, the role of micellar Ca and P on casein micelle structure has not been extensively studied.

Two different lines of research were created: one with the aim to study the effect of cattle breed on mineral content and salt equilibria on the properties of milk destined to Grana Padano and Provolone Valpadana cheeses. The second line with the aim to evaluate the influence of κ -casein B content on Parmigiano-Reggiano cheese yield.

In the first research 80 individual milk samples were collected from a single mixed herd of Bianca Val Padana (BVP) and Italian Friesian (FI) cows; 40 samples from BVP cows and 40 samples from FI cows were taken at two different times of stage of lactation (50 ± 7 , 150 ± 7 ; days). On each sample the following parameters were determined: lactose, fat, crude protein and casein, pH, titratable acidity, rennet coagulation parameters (r , k_{20} , a_{30}), somatic cells, total microbial counts, dry matter and ash and total, soluble and colloidal mineral content (phosphorus, calcium and magnesium).

The milk of Bianca Val Padana breed was richer in dry matter (fat and protein), in casein content and showed higher average titratable acidity. Moreover, this milk reported higher quantities of total minerals and of colloidal calcium and phosphorus. Despite this potential, not significant differences of the rheological parameters (r , k_{20} , a_{30}) were registered, compared to the milk of Italian Friesian. This fact could be explained by the low ratio value between mineral and casein, a deficit that would potentially lead to the formation of a floury curd.

In the second research, four cattle herds (A_1 , A_2 , A_3 , A_4) producing milk with different κ -casein B content were selected. All herds conferred their milk to the same cheese factory.

The daily milk production of each herd was enough to be used for a single Parmigiano-Reggiano cheese-making. The cheese factory was surveyed monthly during one year (12 surveys). During each survey, samples of morning milk, vat milk and cooked whey were collected for each one of the four cheese-making characterised by a different κ -casein B content (A_1 , A_2 , A_3 , A_4). Furthermore, the weights of conferred milk, vat milk, and of the resulting wheels (at 24 hours and after 1 and 6 months of ripening) were measured. Depending on sample type, the following parameters were determined: lactose, fat, protein and casein, pH and titratable acidity, freezing point, somatic cells, urea, κ -casein B content, lactodynamographic parameters (r , k_{20} , a_{30}), total bacterial count, clostridia spores, nitrogen fractions, dry matter and ash, mineral fractions and yield.

The results showed that A_1 herd milk had the best physico-chemical composition (more κ -casein B content and higher mineralization degree of micelles), rheological parameters (optimal values of titratable acidity and r , k_{20} , a_{30}), and technological properties (higher cheese yield percentages for the three levels of ripening: 24 hours, 1 month after brine extraction and 6 months).

According to the results of statistical elaboration, the content of κ -casein B in A_1 herd milk was higher than in A_2 , A_3 , A_4 herd milks, which were not different among them for the same parameter. For this reason, a second elaboration was carried out on the same data, considering only two κ -casein B classes: H- κ B (high κ -casein B content samples, A_1 herd milk) and L- κ B (low κ -casein B content samples, A_2 , A_3 , A_4 herd milks). The H- κ B vat milk was characterized by higher protein and casein percentages (+20.0 % and +12.2 %). Moreover, this milk showed a higher value of ash, higher calcium, phosphorus and magnesium total contents (+5.2 %, +18.7 %, +7.8 %, respectively), and a low chloride content (-5.7 %). H- κ B whey showed highest values of dry matter and crude protein and was characterized by a lower presence of curd-fines. In fact, even in this case, the H- κ B milk, comparing the cheeses with the same ripening, showed a greater yield efficiency than L- κ B milk.

The processing data obtained from the experiments have allowed to develop a proposal of payment milk quality using κ -casein B content as a calculating parameter. The predictive formulas of cheese yield, showed an underestimation for milk with high κ -casein B content. These differences showed that, considering only the casein parameter, is not possible to give a correct interpretation of the real milk dairy potentiality and an appropriate classification and remuneration of milk.

Introduzione

Capitolo I: Introduzione

La qualità del latte può essere valutata in rapporto alla sua attitudine a dare in normali condizioni di caseificazione un buon formaggio, sia dal punto di vista chimico che sensoriale, ed un rendimento caseario più che soddisfacente (Mariani e Pecorari, 1987). Questa svolge un ruolo importante nei processi di caseificazione che prevedono l'utilizzo di latte crudo, come il Grana Padano ed il Parmigiano-Reggiano.

Tutte le variabili fisico-chimiche, chimiche, biochimiche e strutturali della matrice latte concorrono in misura più o meno importante alla definizione della sua attitudine alla coagulazione intesa come: tempo e velocità di formazione del coagulo, consistenza, permeabilità, contrattilità della cagliata e, di conseguenza, capacità e velocità di sineresi della massa caseosa formata (Carlson *et al.*, 1987; Pecorari e Mariani, 1990). Le proprietà di caseificazione sono influenzate da una ampia varietà di parametri chimici, chimico-fisici e citologici, quali il contenuto in proteina e in caseina, quello in sali minerali, i valori di pH e di acidità titolabile ed il contenuto in cellule somatiche. Sotto questo profilo i contenuti di caseina, calcio, fosforo e di riflesso l'acidità svolgono un ruolo fondamentale (Mariani *et al.*, 2001). Questi parametri, a loro volta, sono influenzati da fattori legati all'animale: patrimonio genetico, caratteristiche fisiologiche, quali i giorni di distanza dal parto, numero di lattazioni, alle modalità con cui viene allevato (qualità, quantità e modalità di somministrazione degli alimenti; tipo di stabulazioni, numero di mungiture, condizioni climatiche, etc.) e alla presenza di eventuali processi infiammatori a carico della ghiandola mammaria (mastiti).

Il contenuto di caseina concorre alla determinazione delle proprietà reologiche del latte con particolare riferimento alla consistenza del coagulo (Losi e Mariani, 1984). Le caseine si caratterizzano come un esteso particolato colloidale di circa 50-600 nm di diametro, chiamato "micelle di caseina" (Fox *et al.*, 2008). Secondo il modello proposto da Schmidt (1980) le quattro caseine α_{s1} -caseina (α_{s1} -Cn), α_{s2} -caseina (α_{s2} -Cn), β -caseina (β -Cn) e κ -caseina (κ -Cn) interagiscono tra loro, attraverso legami di natura secondaria, per dare origine alla submicella. Le submicelle, a loro volta, si aggregano per dare origine alla micella di caseina vera e propria. L'azione aggregante tra le submicelle viene esercitata da un sale inorganico, di natura amorfa, definito fosfato di calcio colloidale (CCP). In particolare, grazie al contributo di ioni calcio, il CCP è in grado di formare interazioni di natura elettrostatica con i residui fosforilati delle caseine α_{s1} , α_{s2} e β presenti nelle submicelle (ponti inter-submicellari) (Schmidt, 1980).

Recentemente l'organizzazione strutturale delle micelle di caseina viene spiegata da uno schema di polimerizzazione detto modello a duplice legame (Horne 1998) che prevede: l'esistenza di interazioni idrofobiche tra gruppi di differenti molecole dove queste giocano il ruolo di "giunzione" e la presenza di legami d'estensione attraverso il CCP che neutralizza le cariche negative dei cluster fosfoserilici delle caseine α_{s1} -Cn, α_{s2} -Cn e β -Cn. Dal momento che la κ -Cn risulta mancante dei cluster fosfoserilici e potendo legare con residui idrofobici si distribuisce sulla superficie esterna della micella dove funge da stabilizzatore sterico (Lucey *et al.*, 2003).

La struttura delle micelle di caseina e, perciò, le sue caratteristiche funzionali, sono influenzate anche dal tipo di variante genetica delle frazioni α_{s1} -Cn, α_{s2} -Cn, β -Cn e κ -Cn (polimorfismo delle caseine). Il polimorfismo genetico delle caseine, in effetti, esercita una influenza molto importante sui fenomeni biochimici e chimico-fisici che avvengono nel corso del processo di caseificazione del latte (Corradini e Pettinau, 1972; Russo, 1975; Mariani, 1983; Mariani e Summer, 1999).

1.1– Ruolo dei fattori genetici nella qualità del latte

I fattori genetici rivestono un ruolo importante nel determinare la qualità del latte e le sue proprietà di coagulazione (Ng-Kwai-Hang *et al.*, 2002). Un'ampia variabilità nelle proprietà di trasformazione del latte è stata osservata tra le razze bovine (Macheboeuf *et al.*, 1993; Auldist *et al.*, 2002; Mistry *et al.*, 2002; Malacarne *et al.*, 2006; De Marchi *et al.*, 2007) e tra individui di una stessa razza (Bittante *et al.*, 2002; Auldist *et al.*, 2004).

La genetica e la selezione hanno un forte impatto sulla produzione e sulla qualità del latte: ma negli ultimi anni il miglioramento genetico, principalmente mirato all'aumento della quantità di latte, ha causato un generale peggioramento delle proprietà casearie (Mariani *et al.*, 1992; Sandri *comunicazione personale*, 2001). Tuttavia recenti studi hanno dimostrato che il miglioramento genetico dell'attitudine casearia è possibile adottando specifici obiettivi di selezione per migliorare l'efficienza della produzione casearia. In questi studi, la varianza genetica additiva delle proprietà di coagulazione è stata stimata pari a circa il 30-40% (Ikonen *et al.*, 1997; Bittante *et al.*, 2002) della variabilità totale. Recentemente, Cassandro *et al.* (2008), hanno osservato nella Frisone Italiana una forte correlazione genetica positiva tra il parametro a_{30} ed il contenuto in proteina, in caseina, il pH e l'acidità titolabile; mentre una correlazione negativa tra la consistenza del coagulo ed il contenuto in cellule somatiche.

Tuttavia il miglioramento genetico delle proprietà di coagulazione può essere ottenuto non soltanto inserendo questi caratteri nella stima routinaria della qualità del latte e nei programmi di selezione, ma anche aumentando nella popolazione bovina la frequenza di alleli associati a migliori proprietà di coagulazione (Boettcher *et al.*, 2004).

1.1.1– Polimorfismo delle proteine del latte: effetti sulla coagulazione presamica

Il polimorfismo delle caseine svolge un ruolo del tutto particolare nel complesso quadro della qualità del latte, in conseguenza, sia delle variazioni qualitative legate alla natura stessa della singola mutazione genetica, sia di quelle quantitative legate alla diversa capacità di espressione degli alleli che controllano la sintesi delle singole caseine (Grosclaude, 1988).

E' ben noto che la concentrazione della principale sieroproteina, la β -lattoglobulina (β -Lg), è più elevata nel latte di vacche con genotipo AA, che in quelle AB o BB, e che ciò induce inoltre un più basso indice di caseina (Mariani *et al.*, 1979; van den Berg *et al.*, 1992; Lunden *et al.*, 1997).

E' soprattutto il polimorfismo delle caseine che influenza la composizione del latte, sia in termini di qualità, a seguito delle varianti presenti, che di quantità, per i differenti livelli di espressione degli alleli delle principali caseine (Ikonen *et al.*, 1997).

Gli effetti più marcati sono stati osservati per le varianti della κ -Cn, che sono associate con i contenuti di caseina totale e di κ -Cn (Mariani *et al.*, 1976; Schaar *et al.*, 1985; Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1986; Law *et al.*, 1994; Bobe *et al.*, 1999), alle dimensioni delle micelle (Walsh *et al.*, 1998) e alle proprietà di coagulazione del latte. Il genotipo κ -Cn BB presenta un tempo di coagulazione inferiore, una consistenza del coagulo più elevata e una migliore sineresi del coagulo (Davoli *et al.*, 1990; Amigo *et al.*, 2001; Comin *et al.*, 2008); manifesta inoltre una migliore attitudine alla formazione del coagulo, il cui reticolo tende ad essere più compatto e più elastico rispetto a quello di tipo κ -Cn A (Mariani e Pecorari, 1991; Lodes *et al.*, 1996). Le rese in formaggio risultano significativamente maggiori nel latte κ -Cn BB in numerose produzioni casearie come il Parmigiano-Reggiano, il Cheddar ed il Camembert. Ciò è dovuto ad una maggiore ritenzione delle proteine nella cagliata e ad una migliore incorporazione del grasso e conseguenti minori perdite di grasso e proteina nel siero (Morini *et al.*, 1979; Marziali e Ng-Kwai-Hang, 1986; Rahali e Ménard, 1991).

L'allele E della κ -Cn, uno dei più diffusi insieme agli alleli A e B, è stato messo in relazione con sfavorevoli caratteristiche di coagulazione (Oloffs *et al.*, 1992; Jakob, 1993; Ikonen *et al.*, 1999; Caroli *et al.*, 2000). Anche nel caso della β -Cn, la variante B risulta maggiormente favorevole alla coagulazione presamica: il latte β -Cn BB reagisce più prontamente con il caglio e manifesta migliori caratteristiche reologiche, per quanto riguarda sia la velocità di formazione del coagulo che la sua consistenza (Mariani *et al.*, 1986; Mariani *et al.*, 1992). Il latte caratterizzato dalle varianti B di β -Lg, κ - e β -Cn, quindi, presenta più elevati contenuti totali di frazioni azotate e migliori proprietà di coagulazione rispetto al latte caratterizzato dalle varianti A delle stesse frazioni proteiche (Schaar *et al.*, 1985; van den Berg *et al.*, 1992; Coulon *et al.*, 1998; Walsh *et al.*, 1998; Ikonen *et al.*, 1999). Il gene *CSN1S1*, che codifica per la α_{s1} -Cn, presenta due alleli più comuni, B e C, i cui effetti sulla produzione di latte e sul contenuto di proteina risultano contraddittori. L'allele raro G, a causa della ridotta espressione genica, ha mostrato una forte influenza sulla composizione della frazione proteica e il genotipo GG è associato ad una drastica riduzione della caseina α_{s1} (55%) (Mariani *et al.*, 1995; Rando *et al.*, 1998).

L'analisi della segregazione allelica ai 3 loci caseinici (α_{s1} -Cn, β -Cn e κ -Cn) ha mostrato come questi siano strettamente associati tra loro, in disequilibrio da linkage (LD). Ulteriori osservazioni hanno dimostrato che anche il locus codificante per la α_{s2} -Cn è in LD rispetto agli altri 3 loci caseinici. Studi condotti a livello di DNA hanno permesso di stabilire l'associazione fisica dei loci caseinici: i geni delle quattro caseine (α_{s1} -Cn; α_{s2} -Cn; β -Cn e κ -Cn), infatti, sono situati sul cromosoma 6 in un segmento di 185-250 kb nel seguente ordine *CSN1S1* (α_{s1} -Cn), *CSN2* (β -Cn), *CSN1S2* (α_{s2} -Cn) e *CSN3* (κ -Cn) (Ferretti *et al.*, 1990; Threadgill e Womack, 1990). Gli aplotipi caseinici sono combinazioni di varianti di caseine che vengono ereditate insieme. Comparando gli effetti indotti dagli aplotipi caseinici con l'effetto delle singole varianti caseiniche è possibile stimare in maniera accurata eventuali associazioni tra varianti genetiche e composizione proteica del latte (Heck *et al.*, 2009). Tale regione cromosomica viene definita complessivamente come super locus caseinico (Caroli *et al.*, 2009). A causa dello stretto legame fra i loci caseinici alcuni autori hanno recentemente investigato, in studi di associazione, l'effetto del genotipo composto o dell'intero cluster, piuttosto che l'effetto di un singolo gene sui caratteri produttivi del latte (Caroli *et al.*, 2004; Molina *et al.*, 2006; Keating *et al.*, 2007), così come sulle proprietà di caseificazione (Hallen *et al.*, 2007; Comin *et al.*, 2008).

1.1.2– Polimorfismo delle proteine del latte: effetti sulla componente minerale

Dagli elementi sopra esposti emerge che l'influenza del polimorfismo delle proteine del latte su composizione delle frazioni azotate, dimensioni delle micelle, proprietà di coagulazione e resa in formaggio è stata estesamente studiata, mettendo in evidenza gli effetti che ogni variante genetica può esercitare sul processo di caseificazione. Per contro, la letteratura riguardante gli effetti delle varianti delle caseine e delle sieroproteine sulla componente minerale e sugli equilibri salini è molto scarsa e spesso riguarda il latte di capra (Remeuf, 1993; Pierre *et al.*, 1995; Tziboula e Horne, 1999).

Nella bovina, si tratta per lo più di studi focalizzati a diversi aspetti, che tra le altre componenti considerano anche le sostanze minerali: Mariani *et al.* (1983) riscontrano che il latte di tipo κ -Cn B presenta contenuti più elevati di calcio e fosforo totale e di calcio e fosforo colloidale e contenuti più bassi di acido citrico; van den Berg *et al.* (1992) osservano che la κ -Cn B è correlata a più elevate concentrazioni di calcio ionico; Delacroix-Buchet e Marie (1994) riscontrano che il latte β -Cn A evidenzia maggiori quantità di calcio totale e di calcio colloidale e minor contenuti di calcio solubile rispetto a latte β -Cn C; Mariani *et al.* (1996), in uno studio relativo alla α_{s1} -Cn G, riscontrano che il latte contenente questa variante è più povero di calcio e fosforo totale rispetto al latte α_{s1} -Cn B. Dall'Olio *et al.* (2001) rilevano che il latte con α -La (+15) A/A presenta rispetto a latte B/B un maggiore contenuto di calcio e di fosforo sia totale, sia colloidale. In particolare, è stato messo in evidenza che il latte caratterizzato dalla presenza della variante B di κ -Cn, di β -Cn e di β -Lg si contraddistingue per una composizione azotata e per caratteristiche di coagulazione migliori rispetto alla variante A delle stesse proteine (Mariani *et al.*, 1999; Caroli *et al.*, 2009). Inoltre il latte di vacche di razza Bruna Italiana derivante da combinazioni fenotipiche (α_{s1} _beta_kappa) BB_BB_AB ha mostrato maggiori contenuti sia di fosforo che di potassio (Malacarne *et al.*, 2010).

1.2– Razze autoctone a limitata diffusione: riserva preziosa di geni

Il disciplinare di produzione della maggior parte dei formaggi DOP non pone vincoli di razza per la produzione del latte. Per questo motivo nei comprensori di produzione possono essere allevate razze bovine diverse da quelle originarie con cui le differenti produzioni casearie venivano prodotte nei secoli passati; questo è stato il destino anche delle razze emiliane Reggiana e Modenese (o Bianca Val Padana) e delle razze siciliane Modicana e Cinisara.

Queste razze autoctone hanno subito nei decenni scorsi una forte contrazione numerica. Nel 1985 è stato istituito il Registro Anagrafico delle popolazioni bovine autoctone e gruppi etnici a limitata diffusione, allo scopo di salvaguardare le razze bovine minacciate di estinzione che risultano allevate in Italia e per la salvaguardia di questi patrimoni genetici.

All'epoca erano state ammesse, tra le altre, anche Cinisara, Modenese, Modicana e Reggiana. Le razze Modenese, Modicana e Cinisara sono tuttora iscritte al Registro Anagrafico come disposto recentemente dal Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali con D.M. n.770 del 13 gennaio 2009.

In una ricerca in cui Mariani *et al.* (2001) comparavano l'attitudine alla caseificazione del latte delle 4 razze bovine presenti nel comprensorio del Parmigiano-Reggiano, ovvero Frisona Italiana, Bruna Italiana, Reggiana e Modenese, è stato visto che il latte di queste razze manifestava marcate differenze negli equilibri salini e nel grado di mineralizzazione della micella di caseina.

A questi aspetti riguardanti le componenti minerali faceva riscontro un diverso comportamento reologico, da mettere in relazione non soltanto con la ripartizione delle caseine, ma anche con la differente ripartizione del calcio, del fosforo, del magnesio e dell'acido citrico tra la fase solubile e quella colloidale del latte.

Le razze locali a bassa consistenza e non selezionate costituiscono una riserva di alleli rari e combinazioni geniche originali, se confrontate con le razze cosmopolite altamente selezionate; Jann *et al.* (2004), studiando 30 razze bovine, taurine e zebuine, hanno evidenziato una distribuzione degli aplotipi caseinici fortemente associata alla distribuzione geografica delle razze e principalmente determinata dagli alleli ai loci *CSN1S1* (codificante per α_{s1} -Cn) e *CSN3* (codificante per κ -Cn). I dati presenti in letteratura suggeriscono che nel patrimonio genetico di queste razze sussistano perciò caratteristiche di pregio che rappresentano una ricchezza che può contribuire a determinare un valore aggiunto per le produzioni casearie. Le evidenze sperimentali suggeriscono che queste pregevoli caratteristiche non riguardino soltanto la particolare distribuzione caseinica, ma che esse possano essere determinanti per una peculiare distribuzione della componente minerale tra la fase solubile e quella colloidale.

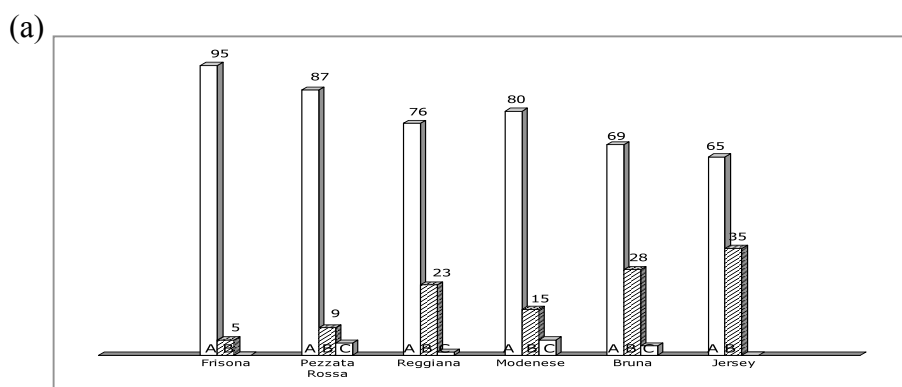
La conoscenza dell'influenza favorevole o sfavorevole delle combinazioni geniche è essenziale per mettere a punto una strategia di recupero e selezione di queste razze, alla luce di un più articolato e consistente programma di valorizzazione del loro latte.

Un contestuale confronto circa i loro effetti con le combinazioni genetiche della razza Bruna Italiana, ad oggi la razza più diffusa tra quelle autoctone, può servire da "controllo" per evidenziare quali siano effettivamente le peculiarità e le caratteristiche di questo valore aggiunto.

1.2.1– Effetto razza e genotipi delle caseine

Le differenze tra i raggruppamenti etnici, per quanto riguarda la presenza di alcune varianti genetiche delle caseine e la frequenza dei tipi più diffusi, sono veramente notevoli. Il fenomeno interessa, anche se in misura diversa, tutti i loci che controllano la sintesi delle caseine (Aschaffenburg, 1968; Grosclaude, 1974; Hossein, 1974; Thompson e Farrell, 1974). Per quanto riguarda la κ -Cn, la struttura genetica delle popolazioni Bruna, Reggiana e Modenese appare abbastanza simile, caratterizzata da una maggiore frequenza della variante B rispetto alla A; questa si discosta nettamente da quella della razza Frisona in cui la variante B risulta essere meno frequente rispetto alla variante A (Russo e Mariani, 1978; Summer *et al.*, 2009) (Figura 1.1). La Pezzata Rossa manifesta principalmente la variante A e percentuali mediocri di B e C, mentre la razza Jersey si contraddistingue per avere una netta prevalenza della variante B (Bettini e Masina, 1972).

La struttura delle razze Reggiana e Modenese è simile a quella della Bruna, che, al contrario della Frisona, si caratterizza per una più contenuta frequenza della variante A, a favore di B e in piccola parte anche di C (Corradini e Battistotti, 1973).



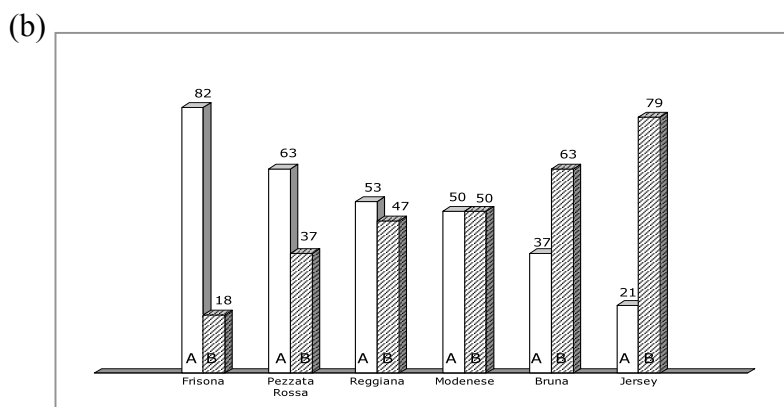


Figura 1.1: Frequenza % delle varianti genetiche delle caseine β (a) e κ (b) nelle razze Frisona, Pezzata Rossa, Reggiana, Modenese, Bruna e Jersey (Mariani *et al.*, 1978; Summer *et al.*, 2009).

Analisi elettroforetiche amido-urea a pH acido riguardanti la β -Cn A hanno evidenziato che mentre nella Frisona prevale la variante A¹, nelle razze Bruna, Reggiana e Modenese risulta più frequente la A² (Di Stato, 1983).

1.2.2– Effetto razza e contenuto di calcio e di fosforo

Le variazioni quanti-qualitative della caseina si ripercuotono sulle caratteristiche reologiche della cagliata, con effetti tanto più importanti quanto più la coagulazione è di tipo presamico. Gli equilibri minerali, peculiari delle micelle, si riflettono sulla composizione del formaggio, con possibili ricadute sulla tessitura della pasta e sulle caratteristiche reologiche del prodotto finito.

Dal momento che i 2/3 del calcio e la metà del fosforo sono parte integrante del complesso micellare, il loro contenuto varia in accordo con quello della caseina. Il latte delle diverse razze, infatti, differiscono tra loro, in misura importante, anche nei riguardi dei principali sali minerali (Mariani e Russo, 1976).

Il latte di Jersey è molto ricco, sia di calcio che di fosforo (Tabella 1.1), come emerge da alcune indagini statunitensi e canadesi (Reinart e Nesbitt, 1956), ma anche da altre (Robertson e Dixon, 1967). Il latte di vacche Jersey contiene il 20% in più di calcio e di fosforo nei confronti del latte di Frisona; il latte delle razze Brown Swiss e Guernsey presentano valori intermedi di calcio, mentre quelli di fosforo restano mediamente piuttosto elevati.

	Calcio	Fosforo
Holstein Friesian	115	93
Ayrshire	116	97
Brown Swiss	127	111
Guernsey	134	110
Jersey	140	115
Frisona	116	88
Reggiana	129	97
Modenese: Ca/P inferiore rispetto a Frisona, Bruna e Reggiana		

Tabella 1.1: Contenuti di calcio e fosforo nel latte di razze statunitensi e canadesi e italiane (Mariani e Russo, 1976)

Tra le razze italiane le differenze sono dell'ordine del 10% o poco di più. Il latte della Reggiana contiene più calcio e più fosforo rispetto a quello della Frisona. Anche la Bruna e la Modenese, pressochè comparabili alla Reggiana, differiscono significativamente dalla Frisona (Mariani e Russo, 1976). La Modenese si contraddistingue, inoltre, per un rapporto Ca/P inferiore a quello delle altre tre razze, soprattutto in conseguenza del suo più elevato tenore in fosforo. Il latte della Pezzata Rossa, che in base ad alcune osservazioni risulta più provvisto di calcio rispetto a quello della Frisona, non sembra contenere quantità di fosforo paragonabili a quelle delle razze Bruna, Reggiana e Modenese (Comberg, 1967).

1.2.3– Effetto razza e fosfato di calcio colloidale

La caseina allo stato nativo si trova sotto forma di micelle fortemente idratate, alla cui formazione partecipa il fosfato colloidale (Schmidt, 1982). Il fosfato di calcio colloidale, intimamente associato alle fosfoproteine, è essenziale ai fini della costruzione e della stabilità del sistema macellare (McGann e Pyne, 1960): esso determina l'aggregazione delle submicelle condizionando, entro certi limiti, anche le dimensioni degli aggregati micellari (Decelles, 1967). Lo stato chimico-fisico dell'intero sistema micellare svolge un ruolo determinante nei riguardi delle proprietà reologiche della cagliata (Resmini, 1971). Il fosfato di calcio colloidale esercita un'azione importante in tutte le fasi del processo di coagulazione (Green *et al.*, 1978), con particolare riferimento allo sviluppo della fase secondaria, di natura prettamente fisico-chimica (Mariani e Pecorari, 1987).

La quantità di calcio e di fosforo sottoforma colloidale, quali costituenti della micella, variano in un rapporto abbastanza stretto con il contenuto di caseina, in modo tale che ciascun latte

tende, anche sotto questo profilo, a manifestare caratteristiche proprie (Mariani e Calajacomo, 1971). Il latte delle razze Bruna, Reggiana e Modenese contengono maggiori quantità di calcio colloidale e di fosforo colloidale nei confronti di quello della Frisona; lo stesso vale, entro certi limiti, anche per la Pezzata Rossa, almeno nei riguardi del calcio colloidale. Il latte della Modenese si distingue dagli altri perché contiene meno calcio colloidale per unità di fosforo colloidale, mentre per Bruna, Reggiana e Frisona il rapporto è pressoché identico (Mariani, 1985).

Nel confronto tra le razze variano anche le quote inorganiche dei due costituenti, in particolare il latte della Reggiana contiene maggiori quantità di fosfato di calcio colloidale nei confronti di quello della Frisona (Resmini *et al.*, 1971). Parimenti, da altre osservazioni si ricava che il latte delle razze Bruna, Reggiana e Modenese risultano, in ordine decrescente, tutti più provvisti di fosfato colloidale rispetto a quello di Frisona; il latte di Pezzata Rossa, invece, non sembra scostarsi molto da quello della Frisona (Figura 1.2).

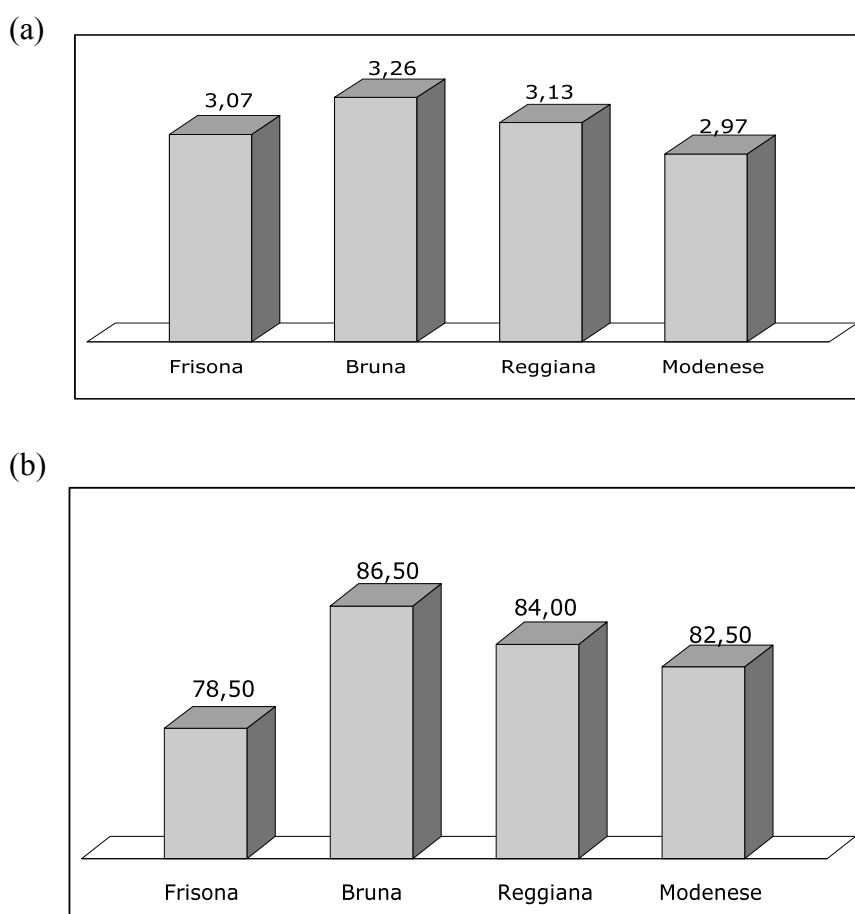


Figura 1.2: Fosfato inorganico colloidale nel latte delle razze Frisona, Bruna, Reggiana e Modenese con significatività statistica delle differenze: (a) * $P < 0,05$; (b) ** $P < 0,01$ (Mariani, 1985).

Tali differenze, se rapportate al contenuto di caseina, per la stretta relazione esistente tra questa e le quote di minerali (Mariani, 1973), si riducono sensibilmente, ma restano ugualmente importanti, sotto il profilo qualitativo. Il latte della Bruna e della Reggiana, infatti, risultano proporzionalmente più ricchi di fosfato colloidale. Il latte della Modenese, invece, dimostra di possedere meno fosfato per unità di caseina, anche a paragone della stessa Frisona, dando origine ad un coagulo la cui resistenza al taglio, simile a quella del latte di Frisona, risulta nettamente inferiore rispetto a quella delle razze Reggiana e Bruna. In realtà, il latte delle vacche di razza Modenese, benché sia il più ricco di caseina, tende a formare un coagulo dotato di minore forza e di scarsa elasticità (coagulo "farinoso"), in netto contrasto con quelli di Reggiana e di Bruna (coaguli prettamente "gelatinosi"). Infatti, il comportamento della Modenese appare del tutto caratteristico per il minor grado di mineralizzazione della micella caseinica. La minor proporzione di fosfato inorganico che contraddistingue il latte delle vacche di razza Modenese si spiega con il suo elevato tasso di caseina; mentre il fenomeno analogo, che sembra interessare anche la Pezzata Rossa, appare piuttosto legato al suo relativo minor contenuto di fosforo colloidale.

Il sistema micellare del latte delle vacche di razza Reggiana, ad esempio, proporzionalmente più ricco di fosfato colloidale inorganico rispetto a quello di Frisona, dà origine ad un formaggio che, a parità di caseina e di fosforo caseinico, risulta maggiormente provvisto di fosforo colloidale inorganico (Mariani e Colajacomo, 1971), probabilmente non senza effetti sulle proprietà fisico-chimiche e strutturali della pasta del Parmigiano-Reggiano.

1.3– Caseina, struttura micellare e coagulazione presamica

La caseina, insieme al grasso, rappresenta uno dei cardini della produzione del formaggio e determina il rendimento industriale della trasformazione casearia. La caseina rappresenta la materia prima, il vero e proprio fulcro dell'intero processo di caseificazione. Essa allo stato nativo è costituita dalle frazioni α_{s1} -Cn, α_{s2} -Cn, β -Cn e κ -Cn strutturate in submicelle, con differenti proporzioni: $\alpha_{s1} = 38\%$, $\alpha_{s2} = 10\%$, $\beta = 36\%$ e $\kappa = 13\%$ (Corradini, 1995). Queste, a loro volta, con il concorso determinante del fosfato di calcio colloidale si aggregano in unità più grandi di varia dimensione, chiamate micelle. La κ -caseina, distribuita per lo più nella parte superficiale della micella, rappresenta l'elemento che conferisce stabilità all'intera struttura.

Essa è anche substrato specifico dell'azione della chimosina presente nel caglio: la chimosina idrolizza il legame peptidico 105-106 della κ -Cn liberandone la porzione carbossi-terminale fortemente idrofila, il caseinomacropeptide (CMP). In tal modo, le micelle si destabilizzano e prendono avvio i processi di ristrutturazione e di disidratazione dell'intero sistema. Si tratta di fenomeni tra loro strettamente interconnessi, che rappresentano il motivo conduttore dell'intero processo di caseificazione. La loro evoluzione dipende da numerosi fattori intrinseci ed estrinseci: pH e acidità titolabile del latte, contenuto di caseina, proporzioni delle singole caseine, varianti genetiche, dimensione delle micelle, concentrazione di ioni calcio e di fosfato di calcio colloidale, acidificazione in caldaia, quantità di caglio, temperatura di coagulazione, tempo di rassodamento, tempi e modalità di frantumazione della cagliata, modalità di spinatura, curve termiche, temperatura di cottura, tempi di lavorazione, etc. (Mariani e Pecorari, 1991).

1.3.1– Tipi di κ -caseina, ripartizione delle caseine e dimensioni delle micelle

La quantità di κ -Cn che entra nella costituzione della caseina nativa tende a variare in rapporto al tipo genetico della proteina stessa (Heck *et al.*, 2009). La caseina del latte di tipo κ -Cn B contiene una maggior proporzione di κ -Cn rispetto a quello di tipo κ -Cn A. I valori riportati in letteratura (Figura 1.3) concordano nell'attribuire al tipo κ -Cn B proporzioni più elevate di κ -Cn, sia nei confronti di κ -Cn AB che, soprattutto, di κ -Cn A (Mariani e Pecorari, 1991). La differente ripartizione percentuale delle caseine in rapporto al tipo genetico della κ -Cn trova conferma in ulteriori ricerche come quella di Walsh *et al.* (1998) e di Law *et al.* (1994). Il coagulo di tipo κ -Cn B analizzato al microscopio elettronico (SEM) risulta come un gel in cui le molecole di paracaseina si trovano uniformemente distribuite, costituendo un network. Il quadro di tipo κ -Cn A è contraddistinto dalla contemporanea presenza di un maggior numero di micelle “grandi” (2,4% di κ -Cn A vs 0,8% di κ -Cn B) e di una rilevante proporzione di submicelle (45,4% κ -Cn A vs 30,0% κ -Cn B). Per contro la caseina di tipo B risulta più ricca di micelle di piccola e media dimensione specialmente di quelle piccole o piccolissime (29,5% κ -Cn A vs 43,3% κ -Cn B). Alla caseina di tipo κ -Cn B corrisponde una maggiore superficie micellare complessiva (Mariani *et al.*, 1996).

Il latte κ -Cn A e κ -Cn B differiscono tra loro anche per altre caratteristiche, quali il contenuto di caseina e l'indice di caseina, i cui valori sono entrambi più elevati nel latte κ -Cn B. Differenze importanti si osservano anche per il contenuto di acido sialico della caseina (più

elevato per il tipo κ -Cn B) e per il contenuto di acido citrico. Il latte κ -Cn B, infatti, contiene quantità inferiori di acido citrico rispetto a quello di tipo κ -Cn A (Morini *et al.*, 1979).

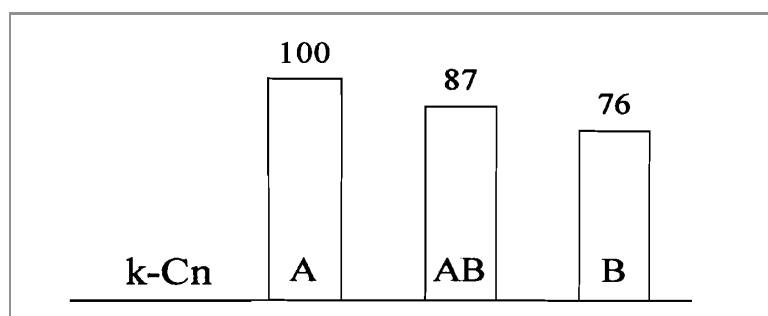


Figura 1.3: Tipi di κ -Cn e tempo di coagulazione del latte (κ -Cn A = 100) (Mariani e Pecorari, 1991).

1.3.2– Tipi di κ -caseina e caratteristiche di coagulazione presamica del latte

La κ -caseina rappresenta il substrato dell'azione della chimosina, la cui attività idrolitica innesca il processo di destabilizzazione del sistema micellare, che attraverso reazioni fisico-chimiche porta alla formazione del coagulo e alla sineresi. Le sue varianti più comuni, A e B, manifestano un diverso comportamento, sia nella fase di costruzione, sia in quella di destabilizzazione della micella; in quest'ultimo caso, sia con riferimento all'azione enzimatica, sia nel corso del processo di aggregazione delle micelle di paracaseina. Sono state formulate diverse ipotesi circa i possibili meccanismi che determinano tale fenomeno in grado di condizionare il comportamento tecnologico del latte prodotto da vacche di tipo κ -Cn A e di quello di tipo κ -Cn B. Una di queste riguarda la diversa capacità di espressione dei due alleli che controllano la sintesi della proteina: la differente disponibilità di κ -Cn è in grado di condizionare la dimensione delle micelle, la quale, a sua volta, influisce sulla reattività enzimatica delle stesse (Puhan e Jakob, 1994).

Il latte κ -Cn B reagisce più prontamente con il caglio, coagulando in un tempo sensibilmente inferiore rispetto a quello di tipo κ -Cn A, mentre il latte di tipo κ -Cn AB manifesta un comportamento intermedio.

Il tipo di κ -Cn influenza in misura importante anche la velocità di aggregazione delle micelle di paracaseina. Il latte κ -Cn B (Figura 1.4) si caratterizza per un'elevata velocità di formazione del coagulo (Lodes *et al.*, 1996). In sintesi, il latte contenente κ -Cn B coagula generalmente in tempi più favorevoli e dà origine ad un coagulo che rassoda più velocemente, raggiungendo una consistenza molto prossima a quella ritenuta ottimale per la produzione di

formaggio di tipo grana (Jakob, 1993). Il latte κ -Cn A, invece, tende a collocarsi tra quelli la cui attitudine alla coagulazione risulta meno favorevole.

Tale comportamento trova ampia conferma nelle proprietà gelometriche e tensiometriche che il latte manifesta prima dell'aggiunta del sieroinnesto: il coagulo κ -Cn B risulta più elastico, dotato di un reticolo caseoso maggiormente idoneo per la sineresi; mentre, il latte κ -Cn A, dà comunque origine a coaguli meno consistenti.

La dinamica della gelificazione indica che il coagulo κ -Cn B raggiunge una maggiore compattezza ed una maggiore forza di contrazione, per cui appare in grado di rilasciare meglio e rapidamente il siero.

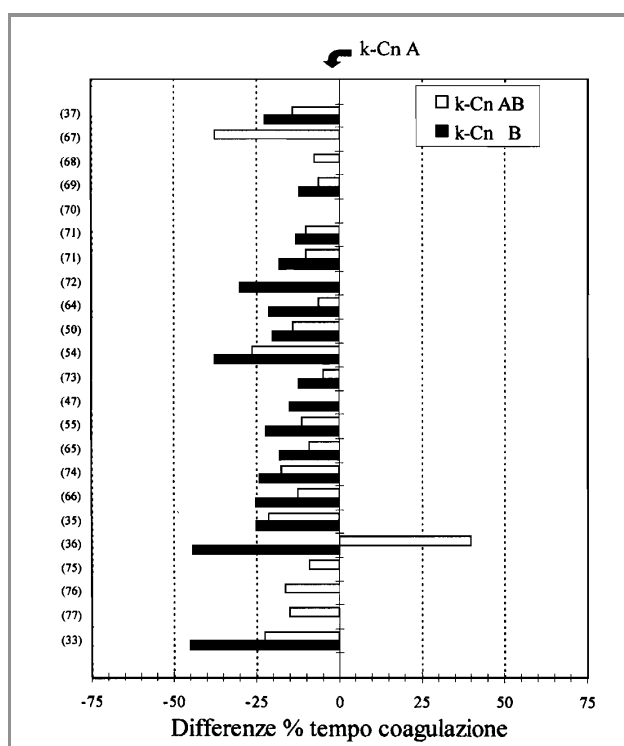


Figura 1.4: Tipi di κ -caseina e tempo di coagulazione del latte, secondo diversi autori: differenze percentuali rispetto a κ -Cn A (Puhan e Jakob, 1994)

Lo studio dei rapporti tra tipi genetici e caratteristiche di coagulazione del latte ha interessato anche altre varianti di κ -caseina. Secondo le indagini il latte κ -Cn AC coagula più lentamente di tutti gli altri tipi. Negli anni è stato osservato il seguente andamento del tempo di coagulazione, nell'ordine dal più veloce al più lento: κ -Cn BE < BB < AB < AE = AA < BC < AC. Anche il latte κ -Cn BC tende a manifestare un tempo di coagulazione piuttosto lungo (Plowman *et al.*, 1997).

Ciò si deve all'influenza negativa della variante κ -Cn C. In effetti la sua struttura risulta modificata in misura tale da rallentare l'idrolisi della molecola ad opera della chimosina (Mariani *et al.*, 1986; Grosclaude *et al.*, 1988; Smith *et al.*, 1997).

L'influenza della variante κ -Cn E è pressoché equivalente a quella della κ -Cn A: il latte di tipo κ -Cn AE coagula molto più lentamente rispetto al tipo κ -Cn B. Diverso appare il comportamento di questi latti per quanto riguarda la consistenza del coagulo. Il latte contenente la variante κ -Cn E risulta caratterizzato da un coagulo molto debole, mentre la variante κ -Cn C fornisce un coagulo forte quando è associata con la B ed un coagulo di consistenza intermedia insieme alla variante A (Mariani *et al.*, 1991).

1.3.3– Effetti quantitativi della κ -caseina B sulla resa in formaggio

Il tipo di κ -caseina, inoltre, influenza non soltanto le proprietà tecnologiche e la facilità di lavorazione del latte, ma anche la sua resa casearia e la qualità del formaggio (Mariani *et al.*, 1976; Marziali e Ng-Kwai-Hang, 1986; Rahali e Ménard, 1991; Hartung e Gernand, 1997; Walsh *et al.*, 1998).

Le rese in formaggio risultano sensibilmente maggiori nel latte κ -Cn BB nei confronti di quelle dei latti κ -Cn AA e AB, in numerose produzioni casearie. Ciò sembra dovuto ad una maggiore ritenzione delle proteine nella cagliata (Schaar *et al.*, 1985; Rahali e Ménard, 1991) e ad una migliore incorporazione del grasso e conseguenti minori perdite di grasso e proteina nel siero (Marziali e Ng-Kwai-Hang, 1986).

FitzGerald *et al.* (1998), affermano che un caseificio, che produce 20.000 tonnellate di formaggio all'anno lavorando latte κ -Cn A, se utilizzasse latte κ -Cn B, potrebbe aumentare la resa produttiva a 21.780 tonnellate di Mozzarella o a 21.180 tonnellate di Cheddar.

Questo aspetto, tuttavia, anche se di fondamentale importanza, non è stato ancora abbastanza approfondito. Queste ricerche sono infatti piuttosto scarse e datate e riguardano produzioni casearie tra loro molto diverse: formaggio Parmigiano-Reggiano (Mariani *et al.*, 1976; Morini *et al.*, 1979), formaggio svedese tipo Household (Schaar *et al.*, 1985), formaggio tipo Camembert (Ménard *et al.*, 1986) e formaggio Cheddar (Marziali e Ng-Kwai-Hang, 1986).

1.3.4– Determinazione della κ -caseina B nel latte di massa: messa a punto del “testkappa”

Recentemente è stato messo a punto un sistema di natura immunoenzimatica per la determinazione dell'allele B della κ -caseina in campioni di latte di massa (Summer *et al.*, 2010).

Il “testkappa” è nato da un progetto frutto della collaborazione fra Università degli Studi di Parma, Schweizer Braunviehzuchtverband SBZV (Svizzera) e Associazione Nazionale Allevatori Razza Bruna Italiana – ANARB.

Da tempo nel comparto lattiero-caseario si era avvertita la necessità, da parte degli allevatori e dei trasformatori, di avere uno strumento analitico in grado di quantificare il contenuto di κ -caseina B nel latte.

Il “testkappa” doveva avere caratteristiche tali da consentirne l'uso nei normali laboratori di analisi del latte, da parte di personale non specializzato. Si è ipotizzato un test di natura immunoenzimatica, che si basa sul riconoscimento specifico della κ -caseina B del latte bovino da parte di un anticorpo monoclonale creato appositamente a questo scopo. L'anticorpo è stato formulato con la tecnologia innovativa HuCAL (Morphosys, 82152 Martinsried/Planned, Germania), che non prevede l'uso di cavie animali. L'anticorpo è in grado di legare, in maniera specifica, una porzione della κ -Cn B nella quale sono compresi i due amminoacidi che distinguono la variante B dalla variante A.

Una volta realizzato l'anticorpo, lo si è utilizzato per la messa a punto di un test rapido di tipo ELISA competitivo indiretto.

Il supporto è una piastra con 96 pozzetti il cui fondo è foderato completamente di κ -caseina B. Nel pozzetto viene aggiunto il latte da analizzare e, successivamente, una quantità ben precisa dell'anticorpo specifico che è in grado di legarsi esclusivamente alla κ -caseina di tipo B. L'anticorpo reagisce con tutta la κ -caseina B presente nel campione di latte, mentre l'anticorpo in eccesso si lega alla κ -caseina B presente sul fondo del pozzetto. Il pozzetto viene poi lavato in modo da lasciare al suo interno solo l'anticorpo che si è legato alla κ -caseina B presente sul fondo del pozzetto: più κ -caseina B c'è nel latte, meno anticorpo rimane legato al fondo del pozzetto. A questo punto, tramite una serie di operazioni, si effettua una colorazione dell'anticorpo rimanente nel pozzetto; l'intensità del colore è inversamente proporzionale al contenuto di κ -caseina B presente nel campione di latte.

Nella prima serie di 16 pozzetti vengono messi degli standard a quantità nota di κ -Cn B. Questi vengono utilizzati per costruire una curva di calibrazione, attraverso la quale è possibile misurare la quantità di κ -caseina B presente nel latte analizzato.

La quantità di latte necessaria per effettuare l'analisi è di pochi microlitri e la durata del test, nel suo complesso, è di circa 4 ore. Secondo quanto indicato nel protocollo sperimentale, i valori di ripetibilità e di sensibilità della metodica permettono l'analisi in singolo dei campioni e, di conseguenza, con ciascuna piastra, è possibile analizzare 80 campioni di latte.

1.3.5– Tipi di β -caseina e caratteristiche di coagulazione presamica del latte

Le osservazioni disponibili per quanto riguarda la β -Cn mettono in evidenza che la β -Cn B ha effetti molto simili e dello stesso segno di quelli che caratterizzano la κ -Cn B. Le micelle contraddistinte dalla presenza di β -Cn B risultano più reattive rispetto a quelle che contengono la β -Cn A e più sensibili all'azione della chimosina, per cui tendono a coagulare in tempi più brevi e a dare origine ad un gel più consistente (Lodes *et al.*, 1996).

Il latte β -Cn B dà origine ad un coagulo che rassoda in un tempo significativamente inferiore rispetto a quello di tipo β -Cn A; la consistenza del coagulo, svincolata dal tempo di coagulazione, non sembra variare significativamente (Delacroix-Buchet e Marie, 1994).

Un'indicazione importante emerge dall'analisi della caseina effettuata al microscopio elettronico. Il latte β -Cn A e β -Cn B si differenziano a livello di dispersione micellare della caseina nativa. La maggior frequenza di micelle di piccolissima dimensione presenti nel latte di β -Cn B potrebbe da sola spiegare il suo diverso comportamento tecnologico, specie per quanto riguarda la miglior reattività con il caglio. La maggior prontezza con cui si forma il coagulo β -Cn B può essere vista in rapporto all'andamento della reazione primaria (più veloce) e della carica negativa netta (minore) della caseina nativa (Figura 1.5). Due condizioni che possono influire significativamente sulla velocità di formazione degli aggregati e sulla costruzione del reticolo caseinico (Mariani *et al.*, 1996).

L'osservazione trova anche riscontro nel fatto che, a parità di tempo di coagulazione, i due coaguli manifestano uguale consistenza. In effetti, la miglior attitudine alla coagulazione del latte β -Cn B, rispetto al latte β -Cn A, appare dovuta essenzialmente alla maggior prontezza con cui la variante B reagisce con il caglio, maggiore reattività determinata probabilmente da una più ampia superficie della caseina nativa (Sala *et al.*, 1995).

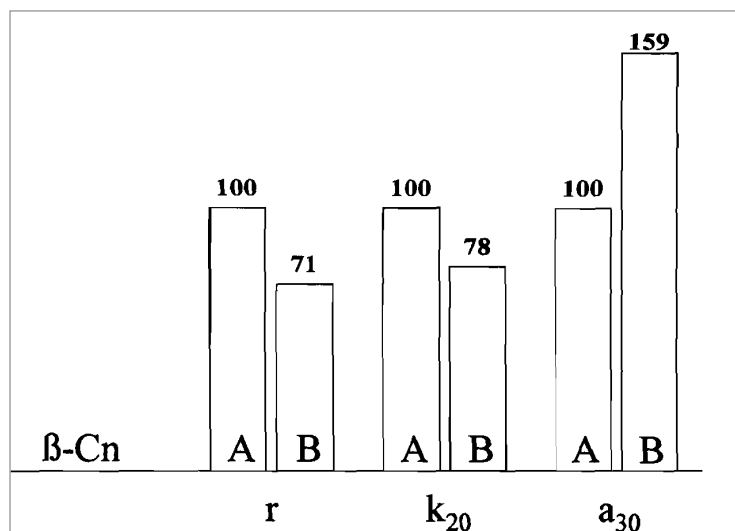


Figura 1.5: Tipi di β -caseina e tempo di coagulazione (r) del latte, tempo di rassodamento (k_{20}) e consistenza del coagulo (a_{30}) (β -Cn A = 100) (Mariani *et al.*, 1992).

Gli stessi autori trovano che le caseine contenenti la β -Cn C si caratterizzano per avere le micelle più grandi in assoluto, a conferma di quanto osservano anche Delacroix-Buchet e Marie (1994), secondo cui le micelle di β -Cn C presentano un diametro notevolmente maggiore (+55%) rispetto a quelle tipo β -Cn A (Mariani *et al.*, 1995).

1.3.6– Tipi di α_{S1} -caseina, composizione del latte e ripartizione delle caseine

Tra i diversi alleli che controllano la sintesi della caseina α_{S1} , l'allele G, pur non modificando la proteina specifica, appare in grado di influenzare in misura importante alcune delle principali caratteristiche del latte, soprattutto con riferimento alla composizione del sistema micellare.

Le variazioni riguardanti la composizione della caseina risultano essenzialmente legate all'effetto quantitativo diretto di questo allele, che si manifesta attraverso una ridottissima capacità di sintesi per la caseina α_{S1} , a paragone degli alleli α_{S1} -Cn B e α_{S1} -Cn C (Tabella 1.2). Ciò comporta sensibili modificazioni a livello di composizione della caseina nativa che interessano anche il grado di glicosilazione (più acido N-acetilneuraminico) e di fosforilazione (meno fosforo esterificato) (Losi e Mariani, 1984).

Il latte delle vacche α_{S1} -Cn G risulta meno provvisto di caseina; ciò nonostante, la struttura genetica di queste vacche è favorita a livello dei tipi di κ -caseina in quanto l'allele α_{S1} -Cn G risulta sempre associato con l'allele κ -Cn B.

		α_{s1} -caseina bassa (L) (n=23) ⁽¹⁾	α_{s1} -caseina normale (N) (n=23) ⁽²⁾	Differenze (L-N)	N = 100
Proteina (N x 6.38)	g/100g	3.09	3.26	-0.17 *	95
Caseina	g/100g	2.41	2.55	-0.14 *	94
NANA caseina/caseina	g/100g	0.42 ⁽³⁾	0.35 ⁽³⁾	0.07 **	120
P caseina/caseina	g/100g	0.81 ⁽³⁾	0.84 ⁽³⁾	-0.03 **	96
pH	unità	6.75	6.73	0.02 NS	—
Acidità titolabile	°SH/50ml	3.07	3.34	-0.27 *	92

⁽¹⁾ Latti individuali di vacche α_{s1} -caseina BG e CG.
⁽²⁾ Latti individuali di vacche α_{s1} -caseina BB, BC e CC.
⁽³⁾ 20 campioni di latte individuale.
 Nana = acido N-acetilneuraminico.
 NS = differenza non significativa; * P ≤ 0.05; ** P ≤ 0.01.

Tabella 1.2: Principali caratteristiche del latte di vacche eterozigoti per l'allele α_{s1} -Cn G e confronto con vacche " α_{s1} -NORMALE" (Mariani *et al.*, 1996).

La nettissima riduzione di α_{s1} -Cn comporta un aumento relativo di β -Cn, ovvero di $\beta + \gamma$ e soprattutto di κ -Cn che fa registrare un incremento del 54% (Tabella 1.3).

La caseina nativa del latte α_{s1} -Cn G tende a caratterizzarsi per avere una maggior proporzione di submicelle (34%) ed una minore proporzione di micelle avente un diametro compreso tra 76 e 125 nm; le submicelle isolate dal latte α_{s1} -Cn G presentano un diametro medio superiore rispetto a quello delle submicelle isolate dal latte α_{s1} -Cn B.

		α_{s1} -Cn G ⁽¹⁾	α_{s1} -Cn "B" ⁽²⁾	Diff. (G- "B")	"B" = 100
k-caseina	%	19.5	12.7	6.8	154
α_{s2} -caseina	%	16.9	12.1	4.8	140
α_{s1} -caseina	%	16.1	35.9	-19.8	45
$\beta + \gamma$ -caseina	%	47.5	39.3	8.2	121
k/ α_{s1}		1.21	0.35	0.86	346

⁽¹⁾ 3 campioni di latte individuale di 2 vacche α_{s1} -Cn GG.
⁽²⁾ 3 campioni di latte individuale di 3 vacche, di cui 2 α_{s1} -Cn BB e 1 α_{s1} -Cn CC.

Tabella 1.3: Tipi di α_{s1} -Cn e ripartizione percentuale delle caseine (Mariani *et al.*, 1995).

Le varianti più comuni della α_{s1} -Cn, B e C, non sembrano in grado di esercitare un'influenza significativa nei riguardi delle principali caratteristiche di coagulazione del latte: la combinazione di tipo α_{s1} -Cn BC tende ad essere migliore per quanto riguarda la consistenza del coagulo (Dewan *et al.*, 1974; Thompson *et al.*, 1969).

Rilevante appare il ruolo della α_{S1} -Cn A, la cui presenza comporta modificazioni a livello di struttura della caseina nativa che interessano l'idratazione, il grado di dispersione micellare e la solubilità nei confronti del calcio ionico (Sherbon *et al.*, 1967; Salder *et al.*, 1968). Le micelle di tipo α_{S1} -Cn A risulterebbero maggiormente idratate e più ricche di κ -Cn rispetto a quelle di tipo α_{S1} -Cn B.

Questa variante rara conferisce al latte un diverso comportamento nel corso dei trattamenti termici e dei processi di trasformazione. Il latte che la contiene presenta un quadro micellare significativamente più eterogeneo del normale, caratterizzato da una moderata proporzione di grandi micelle accanto ad una forte proporzione di micelle di piccolissima dimensione (Mariani *et al.*, 1979). La sua solubilità in presenza di ioni calcio è sensibilmente diversa rispetto a quella delle varianti α_{S1} -Cn B e α_{S1} -Cn C, tanto che il suo comportamento risulterebbe più simile a quello della β -Cn (Creamer, 1974).

Il latte di tipo α_{S1} -Cn A rassoda più lentamente rispetto al latte contenenti α_{S1} -Cn B e α_{S1} -Cn C e, soprattutto, dà origine ad un coagulo soffice, pochissimo consistente, inadatto per la produzione di formaggio. Viceversa, il latte α_{S1} -Cn BC coagula in minor tempo e fornisce un coagulo compatto, migliore di quello ottenibile con il latte α_{S1} -Cn B (Coker *et al.*, 1997).

Le caratteristiche differenziali della α_{S1} -Cn A vengono in gran parte attribuite alla perdita degli amminoacidi 14-26, segmento compreso in una regione a carattere prevalentemente idrofobico posta tra due zone idrofile. E' anche a causa di tale delezione che questa proteina risulta più resistente nei confronti della chimosina e della pepsina. La perdita del legame peptidico 23-24, infatti, legame che costituisce il primo punto di attacco enzimatico della α_{S1} -Cn, da cui si origina la α_{S1} -I, rende la variante α_{S1} -Cn A notevolmente meno sensibile nei confronti della degradazione proteolitica rispetto alla α_{S1} -Cn B e alla α_{S1} -Cn C.

Il latte contenente la caseina con bassa proporzione di α_{S1} -Cn G (Tabella 1.4) coagula in un tempo mediamente inferiore rispetto a quello " α_{S1} -normale" (Mariani *et al.*, 1993).

Il latte delle vacche eterozigoti per l'allele α_{S1} -Cn G manifesta un tempo di coagulazione significativamente inferiore del 22% circa rispetto a quello del latte di confronto. Il coagulo del latte con bassa proporzione di α_{S1} -Cn G si forma più velocemente e raggiunge una maggiore consistenza finale. Inoltre, il coagulo manifesta migliori caratteristiche reologiche, verosimilmente più favorevoli alla sineresi: maggiore resistenza alla compressione e più elevata resistenza al taglio. Questi dati suggeriscono che l'allele α_{S1} -Cn G è in grado di influenzare in misura significativa le principali caratteristiche di coagulazione presamica del latte.

		α_{s1} -caseina bassa (L) (n=5) ⁽¹⁾	α_{s1} -caseina normale (N) (n=5) ⁽²⁾	Differenze (L-N)	N = 100
pH	unità	6.77	6.69	0.08	—
Acidità titolabile	°SH/50ml	3.07	3.57	-0.50	86
Tempo coagulazione (r)	min	13.74	15.36	-1.62	89
Tempo rassodamento (k_{20})	min	6.74	10.32	-3.58	65
Consistenza coagulo (a_{45})	mm	44.00	36.38	7.62	121
Consistenza $a_{1/2r}$ ⁽³⁾	mm	22.68	17.74	4.94	128

⁽¹⁾ Latti individuali di vacche α_{s1} -caseina BG e CG.
⁽²⁾ Latti individuali di vacche α_{s1} -caseina BB, BC e CC.
⁽³⁾ Consistenza del coagulo (a) aggiustata per il tempo di coagulazione (1/2r).

Tabella 1.4: Caratteristiche di coagulazione del latte di vacche eterozigoti per l'allele α_{s1} -Cn G e confronto con vacche " α_{s1} -normale" (Mariani *et al.*, 1993).

1.4– Principali requisiti tecnologico-caseari del latte

La quasi totalità delle produzioni casearie nazionali si basa su una coagulazione di tipo misto (Battistotti e Corradini, 1993). La qualità tecnologico-casearia del latte assume significati diversi a seconda del tipo di trasformazione, in rapporto alla notevole varietà dei formaggi, con particolare riferimento alle condizioni di formazione della cagliata, al grado di acidificazione della massa caseosa sottosiero e ai tempi di stagionatura (Borchers, 1985; Colin e Laurent, 1992; Martin e Coulon, 1995). La qualità del latte svolge un ruolo di fondamentale importanza nella produzione dei formaggi a pasta cotta, dura, a lungo periodo di maturazione.

1.4.1– Attitudine alla coagulazione presamica

Nella coagulazione ad accentuato carattere presamico, il complesso micellare tende a mantenere inalterate le sue proprietà, da cui dipendono buona parte delle caratteristiche reologiche della cagliata, la sua contrattilità in fase di cottura e quella della massa caseosa, nonché il rendimento della trasformazione casearia. La produzione dei formaggi a pasta dura, il cui processo di caseificazione implica reazioni enzimatiche, fisico-chimiche e fisico-meccaniche, consiste essenzialmente nella formazione e nella disidratazione di una cagliata lattico-presamica.

Il latte per questo deve possedere determinati requisiti di ordine tecnologico-caseario, quali un contenuto di caseina mediamente elevato; caseine di tipo genetico potenzialmente favorevole; un buon contenuto di fosfato di calcio colloidale; un giusto grado di acidità titolabile; un moderato contenuto di cellule somatiche ed, appunto, una ottimale attitudine specifica alla coagulazione (Mariani *et al.*, 1997). Ciò al fine di ottenere una massa caseosa strutturalmente omogenea, adeguatamente ed uniformemente disidratata in tutte le sue parti, condizione fondamentale per il normale avvio dei processi fermentativi e per l'equilibrato andamento maturativo del formaggio. Tutte le variabili fisico-chimiche, chimiche, biochimiche e strutturali del latte concorrono, in misura più o meno importante, prese singolarmente o attraverso interazioni più o meno complesse, alla definizione di un latte reattivo e idoneo alla caseificazione. Sotto questo profilo, i contenuti di caseina, calcio e fosforo, e di riflesso l'acidità, svolgono un ruolo fondamentale. Non meno importanti sono le variabili riguardanti i tipi genetici e le proporzioni delle singole caseine, nonché il contenuto e le proporzioni di fosfato di calcio colloidale, aspetti ampiamente approfonditi nei paragrafi precedenti (Annibaldi e Nanni, 1979; Carlson *et al.*, 1987).

Le condizioni favorevoli di reattività del latte con il caglio, si riflettono positivamente sull'andamento dell'intero processo di caseificazione e sullo sviluppo maturativo del formaggio. Tali condizioni consentono un regolare ed equilibrato dosaggio del caglio e del sieroinnesto, una maggiore presa di forza del coagulo, un giusto rapporto tra acidità lattica e grado di presamicità della cagliata, una spinatura più facile ed una frantumazione omogenea. Il latte a coagulazione anomala, lenta, da origine a cagliate deboli, poco elastiche, che mal sopportano le sollecitazioni fisico-meccaniche. Le scadenti caratteristiche reologiche della cagliata e le alterate condizioni tecnologiche di lavorazione possono determinare perdite di resa in formaggio, a causa di un minore recupero di grasso e di caseina, anche sotto forma di particelle di cagliata (curd-fines) che restano nel siero (Lucey e Kelly, 1994).

1.4.2– Acidità titolabile, pH e tempo di coagulazione

L'acidità è la proprietà che esercita la maggiore influenza sulla attitudine del latte alla coagulazione presamica: il ruolo primario spetta al pH (van Hooydonk *et al.*, 1987).

Il pH influenza in maniera pressoché totale l'andamento della fase primaria, in quanto di natura prettamente enzimatica: la chimosina rompe il legame peptidico 105-106 della κ -caseina che, di conseguenza, perde la sua porzione C-terminale fortemente idrofila, ricca di

acido sialico (caseino-macropéptide o CMP) e, quindi, anche la proprietà di proteggere le caseine α_{S1} , α_{S2} e β dall'azione precipitante degli ioni calcio. La concentrazione idrogenionica influenza la reattività tra caseina e caglio, la velocità di aggregazione delle micelle di paracaseina (tempo di rassodamento del coagulo) e la consistenza e capacità di sineresi della cagliata. Il pH normale del latte (6,66-6,72) è molto al di sopra di quello ritenuto ottimale per l'attività dell'enzima (5,5-6,0); la concentrazione degli ioni idrogeno a pH 6,5 è più che doppia rispetto a quella presente a pH 6,7; ciò spiega l'effetto rimarchevole che sue variazioni, di piccola entità, sono in grado di esercitare sulla velocità della reazione primaria. L'acidificazione in generale favorisce anche lo sviluppo della fase secondaria, sia direttamente, in conseguenza della diminuzione di stabilità delle micelle di paracaseina (processo di neutralizzazione delle cariche), sia indirettamente attraverso la liberazione degli ioni calcio dai relativi composti solubili e colloidali. Dato il rapporto molto stretto che esiste tra i valori di pH e quelli dell'acidità titolabile, quest'ultima caratteristica rappresenta un requisito importante nella valutazione della qualità tecnologica del latte. Frequentemente essa è spesso misurata in alternativa al pH, proprio perché in grado di esercitare un'influenza determinante e particolarmente significativa nei riguardi di quasi tutti i principali parametri reologici e tecnologici.

Valori anomali di acidità possono avere conseguenze sulla caseificazione: latte ipoacido, con acidità inferiore a 3,20°SH/50mL, è più lento in fase di coagulazione e di norma produce cagliate con poca consistenza e minore capacità di spurgo. Mentre latte iperacido, con acidità maggiore di 3,80°SH/50mL risulta molto rapido in fase di coagulazione, ma la caseina tende ad essere poco stabile.

1.4.3– Contenuto di caseina e consistenza del coagulo

Il contenuto di caseina concorre in misura importante alla determinazione delle caratteristiche reologiche del latte con particolare riferimento alla consistenza del coagulo ed alle proprietà funzionali del reticolo caseinico. Maggiori concentrazioni di caseina, in effetti, determinano in primo luogo un netto miglioramento della velocità di aggregazione delle micelle di paracaseina (Storry e Ford, 1982; Marziali e Ng-Kwai-Hang, 1986). È noto, comunque, che il latte più ricco di caseina normalmente origina cagliate dotate di maggiore consistenza: nello specifico, dal 2% fino al 2,5% circa di caseina, la forza del coagulo aumenta in misura meno che proporzionale, ma in modo considerevole, raddoppiando i suoi valori.

Il tempo di coagulazione, ad esempio, risulta ben correlato con l'acidità titolabile (Calamari *et al.*, 1995).

A parità di proteina totale, il latte più ricco di caseina e/o più povero di sieroproteina, caratterizzato da un indice di caseina più elevato, risulta vantaggioso ai fini del rendimento industriale e del recupero delle proteine, nonché per le migliori caratteristiche reologiche della cagliata, che sono di preminente interesse tecnico, soprattutto nelle produzioni DOP.

1.4.4– Rapporto grasso:caseina

Il contenuto di caseina svolge un ruolo fondamentale, con il grasso, nella determinazione della resa della trasformazione casearia (Lucey e Kelly, 1994).

I dati relativi alla produzione di formaggio Cheddar ad esempio a partire da latte avente un rapporto grasso:caseina di 1,46, dimostrano ampiamente la stretta relazione che intercorre tra contenuto di caseina e resa industriale del latte (Custer, 1979). Queste osservazioni mettono in evidenza anche le notevoli differenze che caratterizzano il latte di diverse razze bovine. La resa percentuale varia da un minimo di 9,67 kg di formaggio, corrispondente al latte con 2,38% di caseina (Holstein), ad un massimo di 11,33 kg per il latte con 2,86% di caseina (Jersey); lo scarto, di 1,66 kg di formaggio, è a favore della Jersey, una differenza rilevante. Latte con il 2,57% (Ayrshire) e il 2,72% (Guernsey) di caseina si colloca in posizione intermedia.

La quantità di formaggio varia quindi in relazione diretta con la caseina e in misura tanto più stretta quanto più basso è il rapporto grasso:caseina del latte in caldaia, come si verifica, ad esempio, nella produzione di Parmigiano-Reggiano e, in misura ancora maggiore, in quella di Grana Padano, entrambi prodotti con latte parzialmente scremato (Pecorari *et al.*, 1995).

Per quanto riguarda il Parmigiano-Reggiano, le osservazioni disponibili (Pecorari e Mariani, 1990) indicano chiaramente che la resa in formaggio è fortemente associata al contenuto in caseina del latte. I valori medi mensili di resa a 24 h, rilevati nell'arco di 5 anni presso un singolo caseificio, risultano strettamente correlati ($r=0,82$; $P<0,001$) a quelli medi ponderati del contenuto in caseina del latte conferito da 9 diversi produttori. Il latte mediamente più povero di caseina (2,27%) fornisce una resa in formaggio nettamente inferiore (7,38 kg) rispetto al latte che ne è maggiormente provvisto (caseina = 2,48%; resa = 7,94 kg formaggio per 100 kg latte). Infatti, all'aumentare della quantità di caseina aumenta la resa in formaggio; inoltre, all'aumentare della caseina aumenta anche la forza del coagulo presamico e, quindi, la "qualità" della cagliata.

Con riferimento alla composizione del formaggio grana, a 1 g di caseina corrispondono circa 3 g di prodotto stagionato. Latte che si differenzia per 0,10 unità percentuali di caseina (100 g di caseina su 100 kg di latte) è in grado di fornire una resa significativamente diversa dell'ordine di 0,30 kg di formaggio per quintale di latte lavorato (Mariani *et al.*, 1995).

1.4.5– Calcio, fosforo ed equilibri salini

I sali minerali nel latte e nei prodotti lattiero-caseari giocano un ruolo importante per quanto concerne la stabilità proteica, le caratteristiche organolettiche e quelle nutrizionali. Questi elementi divisi in cationi (calcio, magnesio, sodio e potassio) e anioni (fosfato inorganico, citrato e cloro) rappresentano una piccola componente del latte (8-9 g/L) distribuendosi in un equilibrio dinamico tra fase solubile e fase colloidale. In particolare, potassio, sodio e cloro sono diffusibili, porzioni di calcio, di fosfato inorganico e di magnesio sono associate alle micelle di caseina. La composizione in sali minerali del latte è relativamente costante anche se in alcuni casi possono verificarsi variazioni in base al quantitativo proteico, alla fase della lattazione (il parto: il calcio nel colostro è elevato) e allo stabilirsi di processi infiammatori mastitici (sodio e cloro). La concentrazione in minerali ha effetti rilevanti sulla coagulazione e le proprietà tecnologiche del latte. Lo ione Ca^{2+} nella fase solubile è in grado di influenzare il comportamento delle caseine, riducendo la forza di repulsione tra di esse e andando a neutralizzare le cariche negative sulle micelle. Gli ioni calcio nella fase colloidale, invece, sono coinvolti direttamente nella stabilità interna delle micelle di caseina, partecipando alla formazione di ponti tra le submicelle di caseina (Schmidt, 1982). Particolarmente elevata risulta la correlazione tra acidità titolabile e contenuto di fosforo solubile. In condizioni normali (ad esempio, latte con il 2,5-2,6% di caseina e lo 0,045-0,047% di fosforo solubile) il loro contributo rispetto ai valori di acidità risulta pressoché di pari entità. Nel latte anomalo, sia ipoacido o iperacido, l'equilibrio si altera più o meno profondamente a carico di uno o di entrambi i costituenti (Mariani *et al.*, 1983; Mariani *et al.*, 1988). I valori del rapporto Ca/P e del rapporto Ca/P x N caseina risultano alterati ed entrambi significativamente più elevati rispetto a quelli che contraddistinguono il latte ad acidità normale (Mariani *et al.*, 1983). Si modificano, inoltre, i rapporti a livello della fase solubile, che, in aggiunta a calcio e fosforo, coinvolgono anche l'acido citrico, con importanti ripercussioni di interesse tecnologico. Il latte tende a manifestare peculiari caratteristiche, che appaiono tali da configurare diverse tipologie acidimetriche.

La principale caratteristica differenziale del latte ipoacido è quasi sempre rappresentata da una carenza di fosforo solubile, cui si correlano strettamente i valori di pH; alla diminuzione della concentrazione idrogenionica corrisponde un decisivo allungamento del tempo di coagulazione del latte. Anche l'iperacidità è in gran parte legata al fosforo, il cui contenuto, in questo caso, risulta però nettamente più elevato della norma. Il latte genericamente definito ad "elevata" acidità titolabile tende a coagulare in minor tempo ma non mancano indicazioni contrastanti (Tervala *et al.*, 1985). Il latte propriamente iperacido manifesta una lenta reattività presamica. Mentre la scarsa reattività del latte ipoacido è essenzialmente legata alla natura stessa dell'anomalia (elevati valori di pH), quella del latte propriamente iperacido, per acidità naturale, appare di non facile spiegazione. La tendenza di questo latte a coagulare lentamente è probabilmente dovuta al loro basso contenuto di calcio e soprattutto al bassissimo valore del rapporto Ca/P, fattori che concorrono entrambi a determinare una significativa carenza di ioni calcio, con riflessi negativi sulla formazione del coagulo. Particolarmente elevata risulta la correlazione tra contenuto di cloruri e contenuto di fosforo solubile (Mariani *et al.*, 1989). Questa relazione acquista un significato tecnologico del tutto particolare, in quanto lo ione cloro, al pari di altri anioni, esercita un'influenza negativa sul processo di coagulazione presamica del latte: rallenta lo sviluppo della reazione primaria tra chimosina e κ -caseina (White *et al.*, 1958; Patel *et al.*, 1986; Pearce, 1986; Anema, 1997), riduce la velocità di aggregazione delle micelle di paracaseina e, più in generale, interferisce sulla costruzione del reticolo caseinico diminuendo la capacità di sineresi del coagulo (Patel *et al.*, 1986). In effetti, le alterazioni del rapporto Ca/P, sia pure di segno diverso, probabilmente riconducibili in gran parte a disordini metabolici, tendono ad essere sempre più frequenti. È il caso, ad esempio, di latte propriamente carente di calcio, senza altre peculiari anomalie, che manifesta una scarsa attitudine alla coagulazione presamica, contraddistinta da un eccessivo allungamento dei tempi di rassodamento del coagulo.

1.4.6– Fosfato di calcio colloidale

Circa i 2/3 del calcio e la metà del fosforo contenuti nel latte sono parte integrante del complesso micellare, che rappresenta la matrice stessa del formaggio. Una quota importante è costituita dal fosfato di calcio colloidale, intimamente associato alla caseina (McGann *et al.*, 1983; van Dijk, 1990), come componente che svolge un ruolo essenziale nella costruzione delle micelle (Rollema, 1992) e determinante ai fini dell'integrità e delle proprietà dell'intero sistema micellare (Aoki *et al.*, 1986; Singh *et al.*, 1996).

Il fosfato di calcio colloidale, probabilmente attraverso un legame di natura elettrostatica con il fosforo esterificato alle caseine, determina l'aggregazione delle submicelle (Schmidt, 1982), condizionando, entro certi limiti, anche la dimensione degli aggregati micellari (Decelles 1967; Holt e Muir, 1978); in ogni caso, al di sotto di una certa soglia di fosfato colloidale non si ha formazione di micelle. Le quote colloidali di calcio e di fosforo variano in un rapporto abbastanza stretto con i rispettivi livelli di contenuto totale (Resmini *et al.*, 1971). Si osservano variazioni in rapporto a razza, stadio di lattazione, stagione di produzione, allevamento, *etc* (Mariani e Russo, 1976; Mariani, 1989) anche per quanto riguarda in maniera specifica il fosfato di calcio colloidale ed il grado di "mineralizzazione" della micella (Mariani *et al.*, 1996). Questo svolge, sia direttamente che indirettamente, un'azione significativa in tutte le fasi del processo di coagulazione (Mehaia e Cheryan, 1983; Lenoir e Schneid, 1984), con particolare riguardo allo sviluppo della fase secondaria, di natura fisico-chimica, influenzando la velocità di aggregazione delle micelle di paracaseina e le proprietà del reticolo caseinico: più fosfato, significa maggiore aggregazione e formazione di un coagulo più consistente. In effetti, il coagulo, a parità di altre condizioni, in presenza di maggiori quantità di fosfato di calcio colloidale tende a formarsi più velocemente ed in modo proporzionale, a quantità crescenti di fosfato colloidale corrispondono coaguli sempre più compatti, dotati di maggiore forza. Al contrario, in assenza di fosfato colloidale non si forma un vero e proprio gel, ma soltanto un precipitato fioccoso.

1.4.7– Carica batterica

La qualità e la quantità microbica rispecchiano lo stato sanitario delle bovine, l'igiene della mungitura e delle condizioni di raccolta e di conservazione del latte, soprattutto durante il riposo notturno nelle vasche di affioramento (Mariani *et al.*, 2001).

I batteri presenti nel latte sono appartenenti a specie assai diverse le une dalle altre, quasi tutti, però, riconducibili a due categorie di appartenenza: i batteri filo caseari utili alla caseificazione e quelli, invece, anticaseari dannosi per la caseificazione stessa, in quanto in grado di provocare, all'interno della forma prodotta, fermentazioni anomale con gravi danni strutturali della pasta. La riduzione della contaminazione del latte può essere utile anche al fine di salvaguardare la qualità dei derivati caseari, compresi quelli stagionati a lungo e tipici. In effetti, un latte più pulito contiene meno batteri indesiderati (*Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Achromobacter* e *Alcaligenes*) e meno batteri "anticaseari" (clostridi e propionici) (Bottazzi *et al.*, 1995).

Laddove le innovazioni zootecniche sono state meno significative (ad esempio, divieto foraggi insilati) la presenza di germi "anticaseari" nel latte risulta più ridotta, mentre rimane importante il contenuto di batteri lattici. In questi casi, la microflora del latte raccolto dopo ogni mungitura e destinato alla produzione di formaggi con stagionatura superiore ai 60 giorni, può raggiungere valori di 200-400000 UFC/mL. La flora mesofila nativa nel latte è fondamentale per le caratteristiche del formaggio. Essa rappresenta un vero e inscindibile legame con il territorio, capace di conferire al formaggio i requisiti per la DOP, ed è in grado di indirizzare e condizionare i processi chimico-fisici, biologici ed enzimatici che intervengono durante la stagionatura del formaggio.

La temperatura di cottura e di conservazione della cagliata, la riduzione dell'attività dell'acqua e l'aumento di acidità nel corso della lavorazione selezionano i ceppi, indirizzano il processo fermentativo e condizionano lo sviluppo di enterobatteri, propionici e clostridi. Questi gruppi microbici, che generalmente costituiscono una piccola quota della microflora del latte, assumono particolare significato nel determinare la qualità ad esempio del Parmigiano-Reggiano.

Inoltre possono essere presenti, in funzione dello stato sanitario delle bovine, anche germi patogeni, che non rappresentano un ruolo importante, in quanto la tecnologia, già entro poche ore dalla fabbricazione del formaggio, ne riduce la loro attività eliminando qualsiasi rischio igienico sanitario per il consumatore (Mariani *et al.*, 1999).

1.4.8– Spore di clostridi butirrici

Clostridium butyricum, *Cl. tyrobutyricum* e *Cl. sporogenes* sono le specie più spesso coinvolte nei processi di alterazione dei caratteri strutturali ed organolettici dei formaggi per formazione di occhi e distacchi di pasta e comparsa di odori e sapori sgradevoli (Panari e Pecorari, 2004). I clostridi hanno il loro habitat naturale nel terreno; l'entità della loro presenza varia in funzione della tessitura dello stesso (terreni ricchi di scheletro contengono meno spore) e della qualità e quantità delle concimazioni organiche da deiezioni zootecniche (Colombari *et al.*, 2005). I difetti vengono classificati in base al momento della stagionatura del formaggio in cui compaiono e principalmente sono:

gonfiore precoce: si manifesta quasi sempre nei periodi caldi e durante la salatura del formaggio (entro il primo mese di età). Le cause della sua insorgenza possono essere di varia natura anche se le più frequenti sono principalmente tre (Pecorari, 1984);

ridotta acidificazione della pasta: può manifestarsi quando, a seguito di una ridotta o mancata acidificazione della pasta dovuta a una inibita o diminuita attività dei batteri lattici termofili, resta disponibile parte del lattosio presente nel latte. Questo tipo di gonfiore precoce è caratterizzato dallo sviluppo, al centro della forma, di una intensa e violenta fermentazione anticasearia con comparsa di una cavità, più o meno accentuata, accompagnata da pasta alveolata e stirata dai gas di fermentazione. Tale fermentazione anticasearia è sostenuta da spore butirriche appartenenti prevalentemente alla specie *Clostridium butyricum*, che producono con il loro metabolismo, anidride carbonica, idrogeno, acido butirrico e acido acetico;

gravi anomalie chimico-fisiche presenti nel latte: compare particolarmente nel periodo estivo e si evidenzia già durante la salatura. Le forme, in salamoia, si deformano e al taglio presentano uno spacco di grosse dimensioni posizionato in prossimità di un piatto contornato da pasta destrutturata di colore biancastro e accompagnato, spesso, da piccoli occhi. La causa dello sviluppo del difetto è quasi sempre collegata alla caseificazione di latte con alterate caratteristiche chimico-fisiche, produzione di cagliate con ridotta capacità di spurgo e conseguente produzione di una massa caseosa poco e non uniformemente disidratata, per cui facilmente soggetta a possibili sviluppi di fermentazioni anomale;

occhiatura: si manifesta quasi sempre nel periodo estivo ed è provocato dalla presenza di una eccessiva carica microbica anticasearia nel latte. La contaminazione microbica avviene quasi sempre in stalla, ma un eccessivo sviluppo dei microrganismi può essere favorito anche in caseificio da una inadeguata conservazione del latte della sera. Tale fermentazione, a volte, può essere accompagnata da alcuni spacchi e fessure nella pasta;

gonfiore tardivo: è provocato dallo sviluppo, all'interno della pasta del formaggio, di spore anaerobiche appartenenti alla specie *Clostridium tyrobutyricum*. La presenza di questa flora anticasearia nel latte è dovuta principalmente ad una contaminazione ambientale, ad una cattiva qualità degli alimenti e alla mancata applicazione delle corrette procedure di mungitura, come ad esempio le operazioni di preparazione della mammella. Questi microrganismi trasformano il lattato di calcio in acido butirrico, acido acetico, anidride carbonica e idrogeno.

Il gonfiore può manifestarsi dopo alcune settimane fino, anche, a diversi mesi dalla produzione del formaggio, quando si vengono a creare le condizioni ideali di sviluppo. Le forme colpite da tale fermentazione sono caratterizzate dalla presenza di occhi composti, anche di grosse dimensioni, accompagnati da spacchi e fessurazioni (Bacci *et al.*, 2002);

fermentazione putrefattiva: consiste nella formazione di una o più zone di pasta biancastra, rammollita e fortemente proteolizzata, di odore e sapore cattivo, localizzate principalmente nella zona centrale della forma. Tale fermentazione anticasearia è sostenuta dal *Clostridium sporogenes*, specie responsabile della degradazione putrefattiva dei composti azotati con produzione di ammoniaca, acido capronico e acido caprilico, ammine e anidride carbonica. Viene evidenziata, molto spesso, solo al momento del taglio delle forme, in quanto ad esempio la valutazione delle caratteristiche strutturali del Parmigiano-Reggiano, che avviene a circa 12 mesi dalla produzione tramite la “battitura”, non sempre consente di riconoscere questa grave anomalia. Le cavità, infatti, normalmente sono abbastanza piccole, presenti in generale al centro della forma, non sempre sono in grado di modificare sensibilmente il suono ottenuto dalla percussione del martello (Bottazzi, 1983).

1.4.9– Cellule somatiche

Le cellule somatiche del latte sono costituite soltanto in piccola parte da cellule di sfaldamento dell’epitelio mammario, mentre la maggior parte appartiene alla linea bianca, cioè ai globuli bianchi, quali: macrofagi, neutrofilo polimorfonucleati (PMN) e linfociti B e T. In una mammella sana il loro valore non deve superare le 200000 Cellule/mL di latte, anzi le più recenti ricerche affermano che una bovina ben gestita presenta un contenuto di cellule somatiche intorno a 100000. Il contenuto in cellule somatiche del latte, quindi, è sicuramente un parametro di notevole importanza, sia perchè al suo aumento corrisponde un peggioramento della qualità casearia del latte sia perchè è un importante indicatore dello stato sanitario e manageriale dell’allevamento (Summer, 2008).

Le cause che portano all’aumento del contenuto di cellule somatiche sono diverse; tra queste, alcune sono di ordine “fisiologico” come lo stadio di lattazione, l’ordine di parto e l’età dell’animale; altre, invece, sono di natura genetica oppure dovute ad un’errata alimentazione, che può predisporre l’animale ad andare incontro ad una infiammazione della mammella. L’infiammazione può, a sua volta, avere origini diverse, da agenti patogeni o ambientali.

Il latte prodotto da bovine affette da mastiti cliniche e subcliniche e da gravi disordini secretori presenta alterazioni fisico-chimiche, chimiche, microbiologiche ed enzimatiche tali da risultare più o meno inadatto per qualsiasi produzione casearia (Mitchell *et al.*, 1986). All’aumentare del contenuto in cellule somatiche del latte, diminuisce il contenuto in lattosio, mentre aumenta il contenuto in proteina (Franceschi *et al.*, 2003).

La diminuzione di lattosio, che viene in parte riassorbito nel sangue, provoca un'alterazione a livello osmotico del latte, quindi vi è un minore afflusso di acqua alle cellule mammarie, pertanto un minore volume di latte. Il maggior contenuto in proteina potrebbe sembrare un effetto positivo, al contrario esso è dovuto principalmente alla sostanziale diminuzione della quantità di latte prodotto; inoltre, vi è anche l'apporto di sieroproteine, provenienti direttamente dal sangue, non utili per la caseificazione.

Proprio a livello dei rapporti tra le frazioni proteiche si hanno le maggiori alterazioni. Da una parte aumentano le sieroproteine e la componente non proteica del latte, dall'altra diminuiscono le caseine e l'indice di caseina (Malacarne *et al.*, 2003). Le caseine α_{s1} -caseina, α_{s2} -caseina, β -caseina e κ -caseina sono sintetizzate nella ghiandola mammaria e costituiscono la micella. Mentre la γ -caseina deriva dalla degradazione enzimatica della β -caseina a carico della plasmina e di altri enzimi provenienti dalle cellule somatiche, pertanto aumenta quando nel latte vi è una maggiore quantità di cellule somatiche. Un maggiore contenuto di cellule somatiche comporta, quindi, una diminuzione di caseina micellare sia per l'effetto di una minore sintesi, che per l'aumento della proteolisi che comporta un aumento dei proteosi peptoni (Formaggioni *et al.*, 2002; Summer *et al.*, 2003).

Anche il quadro degli elementi minerali presenta profonde alterazioni; infatti i cloruri ed il sodio aumentano insieme alle cellule somatiche per effetto della perdita dell'integrità della barriera emato-mammaria, mentre il potassio diminuisce (Kitchen, 1981). L'aumento, inoltre, è strettamente correlato al peggioramento della capacità di affioramento del latte in vasca, requisito importante nella lavorazione del latte a formaggi tipo grana (Sandri *et al.*, 2008).

Il valore di acidità titolabile, come è logico attendersi, diminuisce all'aumentare del contenuto in cellule somatiche, mentre il valore del pH si alza. Queste alterazioni portano ad un peggioramento della risposta del latte nei confronti del caglio. Infatti, abbiamo un aumento del tempo di coagulazione, del tempo di rassodamento e una diminuzione della consistenza del coagulo. Quest'ultimo risulta particolarmente difettoso: i granuli caseosi risultano di dimensioni molto eterogenee, quelli più piccoli manifestano una eccessiva sensibilità termica, non disidratandosi in misura adeguata, perdono la capacità di coesione.

Essi, per lo più, restano nel siero in forma di polvere e concorrono a determinare una minore efficienza di resa. Inoltre, aumentano le perdite di grasso, nonché quelle di caseina, conseguenti, rispettivamente, ai difetti di struttura del reticolo caseinico e ad una più intensa attività proteolitica aspecifica (Barbano *et al.*, 1991).

1.5– Tecnologia di produzione del Parmigiano-Reggiano

Il formaggio Parmigiano-Reggiano viene prodotto nelle province di Parma, Reggio Emilia, Modena e Bologna alla sinistra del fiume Reno e Mantova alla destra del fiume Po, in poco meno di 400 caseifici. Nel 2011, le imprese italiane hanno prodotto 1100000 tonnellate di formaggio, di cui 490000 tonnellate di formaggi a denominazione di origine protetta (DOP).

Il Parmigiano-Reggiano deve le sue peculiari caratteristiche organolettiche e merceologiche ad una tecnologia artigianale legata all'esperienza dei casari ed al rispetto delle consuetudini e delle tradizioni consolidate nel tempo. Il processo tecnologico di produzione di questo formaggio ricalca lo schema di lavorazione mostrato nella Figura 1.6.

Il latte viene conferito al caseificio due volte al giorno, dopo le rispettive mungiture della sera e della mattina. Il latte destinato alla caseificazione deve essere di buona qualità dal punto di vista chimico-fisico, igienico-sanitario e microbiologico. Il latte della sera viene steso, in vasche di acciaio collocate in ambienti adatti per la sua conservazione, in modo da consentire l'affioramento spontaneo del grasso. Il mattino successivo il latte "magro" viene separato con cura, mediante spillatura, dallo strato superiore di crema affiorata durante la notte e mescolato al latte intero della mungitura della mattina. Le due matrici miscelate vengono poste nelle tradizionali caldaie tronco-coniche in rame dove prenderà il via il processo di lavorazione. In seguito viene aggiunto il siero innesto naturale, cioè una coltura lattica di microrganismi termofili ottenuta per acidificazione spontanea del siero cotto ricavato dalla lavorazione del giorno precedente, avente lo scopo di predisporre il latte alla successiva fase di processo abbassando il pH da 6,6-6,7 a 6,3-6,4, in modo tale da incrementare l'attività della chimosina, proteasi acida che presenta un optimum d'azione a pH compreso tra 5,4 e 5,7. Il sieroinnesto ha una composizione microbica eterogenea con la predominanza di *Lactobacillus helveticus* e la presenza di altri lattobacilli termofili, quali *L. delbrueckii* subsp. *lactis* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Oltre ai batteri omofermentanti possono essere presenti, anche se in numero decisamente inferiore, batteri eterofermentanti, streptococchi termofili, lattobacilli mesofili e lieviti. La quantità di sieroinnesto aggiunta varia in rapporto sia all'acidità del latte sia a quella del siero stesso.

La coagulazione della miscela viene effettuata alla temperatura di 33-34 °C mediante l'aggiunta di caglio di vitello, che per la sua costituzione enzimatica, caratterizzata dalla netta prevalenza della chimosina rispetto alla pepsina, costituisce il coagulante più idoneo. Il caglio viene aggiunto al latte in quantità variabili in relazione al titolo del caglio stesso, ovvero in riferimento a quante parti di latte è in grado di coagulare una parte di caglio in 40 minuti alla temperatura di 35 °C. In generale si utilizza caglio in polvere (titolo 1:125000) in ragione di 2,5 g per 100 kg di latte. Il tempo di presa varia tra i 10 e i 12 minuti.

Dopo “qualche” minuto di rassodamento, si procede alla “rottura” e alla frantumazione della cagliata, a cui fa seguito la “spinatura”. Questa operazione, condotta in modo “rapido” ed uniforme con un apposito attrezzo detto “spino”, ha il compito di frammentare la cagliata fino ad ottenere granuli caseosi delle dimensioni di un chicco di riso. A questa fase segue la cottura graduale a “fuoco lento”, che consiste nel riscaldamento della miscela siero-cagliata, e quindi la cottura finale, durante la quale la cagliata raggiunge la temperatura di 55-56 °C.

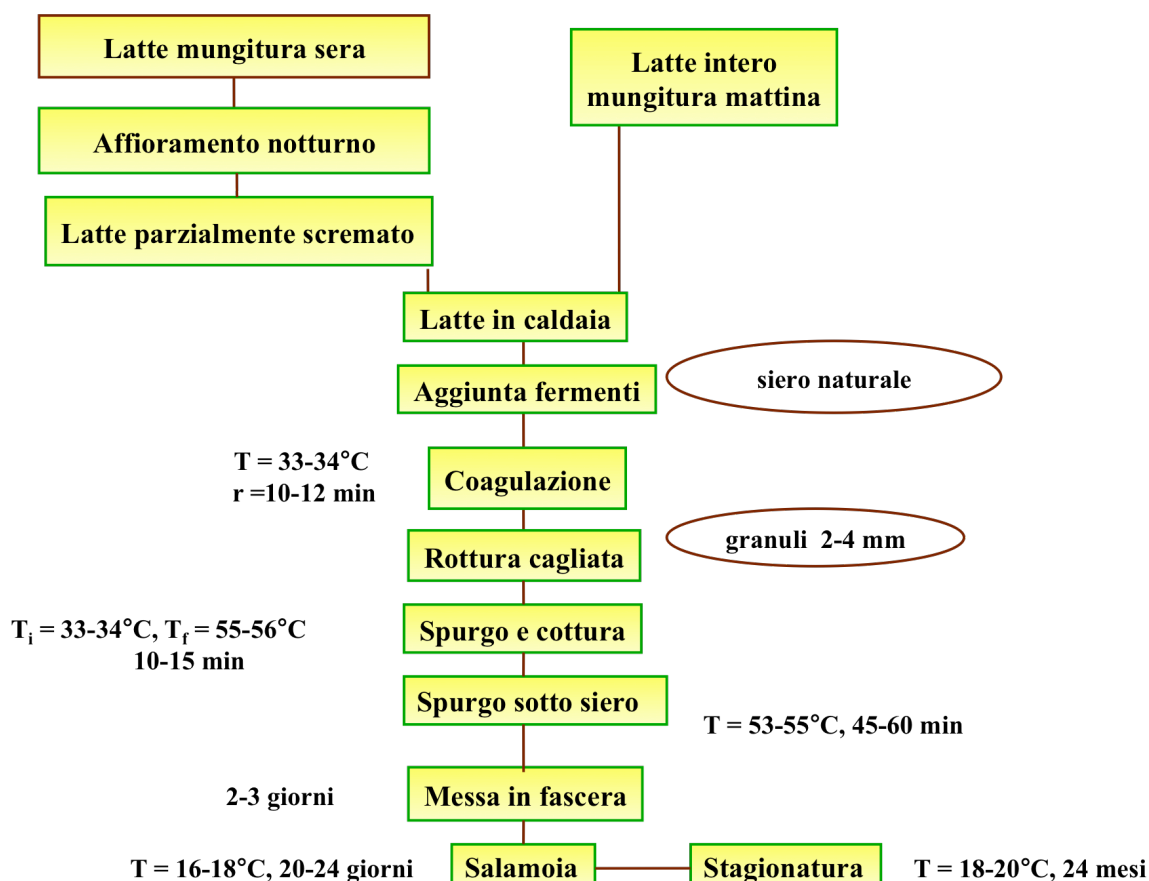


Figura 1.6: Schema della linea di lavorazione del formaggio Parmigiano-Reggiano.

L'obiettivo di quest'ultima fase della lavorazione è di ottenere una massa caseosa compatta e il più possibile omogenea, dotata di buona elasticità e permeabilità e di un giusto ed uniforme grado di disidratazione.

Alla cottura segue la fase di giacenza durante la quale la massa caseosa in via di formazione viene lasciata riposare per circa 60 minuti sotto siero: i granuli caseosi si aggregano e si fondono nel corso della naturale sedimentazione sul fondo della caldaia.

Dalla fase di giacenza si ottiene una massa caseosa ben consolidata, che viene estratta e tagliata in due porzioni per dare origine a due forme "gemelle", che vengono "sospese" (in parte immerse nel siero), con la tela, sulla caldaia per 10-20 minuti al fine di facilitare il drenaggio del siero. Le forme vengono poi estratte dalla caldaia e poste in appositi stampi per la formatura, detti fascere. Con l'estrazione della massa caseosa termina quella che comunemente viene definita "fase di caldaia".

Le forme restano nelle fascere per 2-3 giorni, durante i quali vengono ripetutamente voltate per consentirne il raffreddamento e l'asciugatura. Trascorso questo lasso di tempo il formaggio viene sottoposto a salatura per immersione in apposite vasche contenenti salamoia satura di NaCl, dove permane per circa 20-24 giorni durante i quali assorbe circa il 2-3% di sale, che diffonderà verso il centro della forma in 12 mesi circa. Il formaggio in salamoia subisce un calo di peso del 4% circa. La fase successiva è quella di asciugatura: secondo la pratica tradizionale le forme vengono poste per 1-2 giorni in locali alla temperatura "elevata" di 25-30 °C, al fine di ottenere un'essudazione di grasso, che genera un film lipidico, il quale contribuisce a contenere i successivi cali di peso in fase di maturazione.

Completata l'asciugatura il formaggio passa in appositi locali di stagionatura, dove, nel corso di un periodo minimo di 12 mesi la pasta subisce profonde modificazioni chimico-fisiche, microbiologiche ed enzimatiche (glicolisi, proteolisi, lipolisi), fortemente influenzate dalle condizioni ambientali, in particolare temperatura e umidità, che conferiranno al formaggio le sue tipiche caratteristiche organolettiche e strutturali.

Parte Sperimentale

Capitolo II: Parte Sperimentale

2.1– Ricerche

Nell'arco di un trentennio le strategie di selezione genetica hanno portato ad un miglioramento delle caratteristiche fenotipiche e, nello specifico, ad un incremento quantitativo e qualitativo della produttività del latte. Come mostrano i dati di una ricerca di Sandri (2011) condotta sul latte di massa di allevamenti appartenenti al comprensorio del Parmigiano-Reggiano, si sono verificati due fenomeni distinti: dal 1990 al 2010 un crescente aumento del contenuto di caseina ($2,31 \div 2,54$ g/100g), accompagnato da un decremento dei valori di acidità titolabile, che hanno registrato andamenti altalenanti fino al 2005 ($3,20 \div 3,24$ °SH/50mL), seguiti da un crollo tra il 2006 ed il 2010 ($3,14 \div 3,17$ °SH/50mL). Inoltre, di riflesso, è stato evidenziato un peggioramento dei parametri reologici che ha determinato la diminuzione delle percentuali di latte a coagulazione ottimale (tipo A) e l'incremento di quelle di latte a coagulazione discreta (tipo EA) (Sandri *comunicazione personale*, 2011).

Considerato che l'acidità titolabile dipende per il 6% da acidi organici e citrati, per il 34% da minerali, per il 40% da caseina e per il 20% da fosfati, particolarmente elevata risulta la correlazione tra questa e contenuto minerale ed il problema legato alla coagulazione potrebbe riguardare proprio quest'ultima componente.

Infatti la concentrazione minerale ha effetti rilevanti sulla coagulazione presamica e le proprietà tecnologiche del latte (Resmini *et al.*, 1982; van Hooydonk *et al.*, 1986). Si osservano variazioni delle quote minerali in rapporto a razza, stadio di lattazione, stagione di produzione, allevamento, *etc.*, ed in maniera specifica a carico del fosfato di calcio colloidale ed al grado di “mineralizzazione” della micella (Schmidt, 1980). Essenzialmente, la variazione delle frazioni colloidali di calcio e di fosforo è legata, in un rapporto abbastanza stretto, con i rispettivi livelli di contenuto di caseina totale e del rapporto calcio/fosforo calcolato sui quantitativi totali di azoto caseinico ($\text{Ca/P} \times \text{N caseina}$) (Resmini *et al.*, 1982).

Da un punto di vista tecnologico, l'ottenimento di latte a tenore di caseina così elevato ha comportato, il conseguimento di rese in formaggio maggiori (Morini *et al.*, 1979; Pecorari *et al.*, 1995). Tale aumento dovuto alla scelta di indirizzare la selezione verso un latte a maggiore percentuale di κ -caseina B (Marziali e Ng-Kwai-Hang, 1986a; McLean *et al.*,

1986; Rahali e Ménard, 1991; Horne *et al.*, 1997). Questo perchè il latte κ -caseina B comporta la presenza di micelle più piccole ed uniformi (Fox e Brodkorb, 2008), una maggiore ritenzione delle proteine nella cagliata (Davoli *et al.*, 1990; Walsh *et al.*, 1998), una migliore incorporazione del grasso e conseguenti minori perdite di grasso e proteina nel siero.

Per quanto detto è stato avviato uno studio sulle caratteristiche di coagulazione presamica del latte e le proprietà reologiche della cagliata, aspetti che esercitano una forte influenza sia sulla resa che sulla qualità del formaggio e sono strettamente connessi alle peculiarità della micella di caseina ed agli equilibri salini del latte. A tal fine sono stati sviluppati due differenti filoni di ricerca: il primo indirizzato ad approfondire lo studio dell'effetto razza sul contenuto minerale e sugli equilibri salini e sulle proprietà di caseificazione di latte destinato a formaggio Grana Padano ed a Provolone Valpadana; il secondo allo scopo di valutare l'influenza del contenuto in κ -caseina B sulla resa in formaggio Parmigiano-Reggiano.

2.2– Metodiche Analitiche

Sui campioni di latte, sono stati effettuati, in doppio, i seguenti rilievi analitici:

- a) Lattosio, grasso, proteina, caseina (IR) del latte, grasso (Gerber) del siero cotto
- b) Frazionamento chimico dell'azoto (Kjeldahl) del latte e del siero cotto
- c) Contenuto di κ -caseina B
- d) pH, acidità titolabile
- e) Densità , peso, resa casearia, punto crioscopico del latte
- f) Contenuto di urea
- g) Analisi lattodinamografica: parametri r , k_{20} , a_{30}
- h) Cellule somatiche
- i) Conta batterica totale
- l) Spore clostridi
- m) Sostanza secca, ceneri
- n) Contenuto minerale totale: Fosforo, Calcio, Magnesio, Sodio, Potassio
- o) Contenuto delle frazioni minerali: Fosforo, Calcio, Magnesio
- p) Determinazione dei cloruri
- q) Particelle di cagliata “curd-fines”

a) Determinazione dei contenuti di lattosio, grasso, proteina e caseina del latte (Luginbuhl, 2002).

La determinazione dei contenuti di lattosio, grasso, proteina grezza e caseina del latte è stata effettuata mediante lettura nel medio infrarosso con apparecchio MilkoScan FT 6000 della Foss (Foss Electric, DK-3400 Hillerød Denmark) (Figura 2.1, 2.2). Tale strumento, spettrofotometro ad alte prestazioni, misura l'intensità di assorbimento dell'energia IR in corrispondenza degli specifici gruppi funzionali delle molecole organiche. Tale analisi non richiede alcuna preparazione del campione in quanto la lettura viene condotta sul latte tal quale. Ogni 10 campioni si provvede alla taratura dello strumento con campioni di latte standard.

a₁) Determinazione del contenuto di grasso del siero cotto secondo Gerber (Savini, 1946).

La determinazione del grasso nel siero cotto è stata effettuata seguendo il metodo volumetrico di Gerber:

- in un butirrometro sono stati introdotti 10 mL di acido solforico (H_2SO_4 al 96%), 11 mL di siero cotto, ed 1 mL di alcool amilico $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{OH}$;
- una volta richiuso il butirrometro con l'apposito tappo, questo è stato agitato vigorosamente;
- il butirrometro poi capovolto è stato riposto nella centrifuga di Gerber per 12 minuti a 65 °C.

Durante la centrifugazione la fase lipidica si separa nettamente ed il suo volume è stato letto direttamente attraverso una scala graduata (il cui zero relativo è per convenzione il corrispettivo della linea di separazione tra la fase lipidica e la fase acquosa).



Figura 2.1: Combi: composto da Milkoscan 6000 utilizzato per la determinazione, mediante lettura nel medio infrarosso, dei contenuti di grasso e proteina nel latte e Fossomatic 5000 utilizzato per la determinazione con metodo fluoro-opto-elettronico del contenuto in cellule somatiche nel latte.

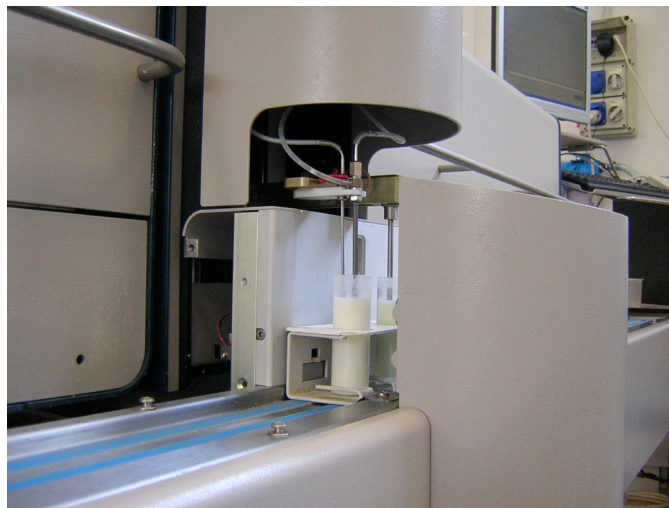


Figura 2.2: Dettagli della sonda del Combi: composto da Milkoscan 6000 e Fossomatic 5000

b) Determinazione dell'azoto totale del latte e del siero cotto (NT), determinazione della proteina grezza del latte (Aschaffenburg e Drewry, 1959)

I valori di azoto totale del latte e del siero cotto ed i valori di proteina grezza sono stati rilevati tramite strumento Kjeldahl secondo la seguente metodica:

- sono stati pesati esattamente circa 5 g di latte o 10 g di siero cotto in un provettone Kjeldahl;
- sono stati poi aggiunti 18 mL di acido solforico fumante (SO_3 al 7%) e 1 mL di acqua ossigenata (H_2O_2 , agente antischiuma) in proporzione 1:2, 0,8 g di solfato di rame (CuSO_4 , agente catalizzante), 7,0 g di solfato di potassio (K_2SO_4 , agente utilizzato per incrementare il punto di ebollizione);

- si è proceduto alla mineralizzazione della sostanza organica, ponendo il provettone Kjeldahl in un fornello regolato per uno specifico gradiente di temperatura di seguito riportato:
 - da $T = 20^{\circ} \text{C}$ a $T = 240^{\circ} \text{C}$ sosta per 1 minuto;
 - da $T = 240^{\circ} \text{C}$ a $T = 340^{\circ} \text{C}$ sosta per 1 minuto;
 - da $T = 340^{\circ} \text{C}$ a $T = 430^{\circ} \text{C}$ sosta per 60 minuti.

La digestione termina quando la soluzione da bruna diventa limpida e trasparente, assumendo la colorazione azzurra data dal solfato di rame;

- dopo aver effettuato un idoneo raffreddamento sono stati addizionati 50 ml di acqua distillata e preparata una beuta da 300 mL contenente 25 mL di acido solforico (H_2SO_4 0,1 N), 75 mL di acqua distillata e 3 gocce di indicatore “Merck 5” e si è proceduto alla distillazione, previa aggiunta nel provettone di circa 100 mL di idrossido di sodio (NaOH al 40% p/v);
- terminata la distillazione, circa 250 mL di liquido distillato, l’acido solforico non neutralizzato contenuto nella beuta è stato titolato con NaOH 0,1N fino al viraggio da violetto chiaro a verde chiaro.

Il valore della proteina grezza (g/100g) è stato ottenuto moltiplicando il valore dell’azoto totale per il fattore di conversione proteico 0,00638.

b₁) Determinazione dell'azoto solubile a pH 4,6 del latte e del siero cotto (NS)

I valori di azoto solubile del latte e del siero cotto sono stati rilevati tramite strumento Kjeldahl secondo la seguente metodica:

- sono stati pesati esattamente circa 40 g di latte o di siero cotto in un matraccio tarato da 100 mL;
- dopo essere stati aggiunti 40 mL di acqua distillata, si è posto il matraccio a riscaldare in un bagno d’acqua termostato a 35°C ;
- al raggiungimento di tale temperatura sono stati addizionati 4 mL di acido acetico (CH_3COOH al 10% p/v), poi la soluzione è stata agitata e lasciata riposare per 10 minuti;
- quindi sono stati aggiunti 4 mL di acetato di sodio (CH_3COONa 0,1 N), la soluzione nuovamente agitata e lasciata riposare per 10 minuti;
- raffreddato il campione a temperatura ambiente, si è portato a volume con acqua

distillata e filtrato su filtri Wathman 40;

- 20 mL di filtrato è stato pipettato in un provettone Kjeldahl e si è proceduto alla digestione in modo analogo all'azoto totale del latte e del siero cotto;
- terminata la mineralizzazione si è lasciato raffreddare il campione e sono stati aggiunti 50 mL di acqua distillata nel provettone Kjeldahl;
- è stata preparata una beuta da 300 mL contenente 80 mL di acqua distillata e 20 mL di H_2SO_4 0,1 N e 3 gocce di indicatore "Merck 5", quindi si è effettuata la distillazione, previa aggiunta nel provettone di 100 mL di NaOH 40% p/v;
- terminata la distillazione, circa 250 mL di liquido distillato, l'acido solforico non neutralizzato contenuto nella beuta è stato titolato con NaOH 0,1N fino al viraggio da violetto chiaro a verde chiaro.

Importante per ottenere un risultato accurato tenere in considerazione del fattore di correzione del precipitato, per l'azoto solubile pari a 0,976. Il valore della frazione proteica solubile (g/100g) del latte e del siero cotto è stato ottenuto moltiplicando il valore dell'azoto solubile per il fattore di conversione proteico 0,00638.

L'azoto della caseina del latte è stato ottenuto per differenza:

$$NT_{\text{latte}} - NS_{\text{latte}}$$

dove NT e NS sono espressi in mg/100g latte.

Il valore della caseina (g/100g) del latte e del siero cotto è stato ottenuto moltiplicando il valore dell'azoto solubile per il fattore di conversione proteico 0,00638.

L'indice di caseina del latte (%) è definito da un semplice rapporto matematico:

$$\text{azoto caseina}_{\text{latte}} \times 100 / NT_{\text{latte}}$$

dove l'azoto della caseina e NT sono espressi in mg/100g latte.

b₂) Determinazione dell'azoto solubile del latte in acido tricloroacetico (NPN)

I valori di azoto solubile del latte in acido tricloroacetico (NPN) sono stati rilevati tramite strumento Kjeldahl secondo la seguente metodica:

- sulla bilancia tecnica sono stati pesati esattamente circa 20 g di latte in un matraccio tarato da 100 mL;
- il matraccio è stato portato a volume con una soluzione di acido tricloroacetico al 15% p/v, agitato e lasciato riposare per 60 minuti;

- il contenuto del matraccio filtrato su filtri Wathman 40;
- 40 mL di filtrato pipettato in un provettone Kjeldahl, addizionato di: 18 mL di H₂SO₄ al 98% v/v, di 0,8 g di CuSO₄, di 7,0 g di K₂SO₄ e di 5 mL di H₂O₂ in proporzione 1:2 v/v;
- si è proceduto alla mineralizzazione della sostanza organica in modo analogo all'azoto totale del latte e del siero cotto;
- è stata preparata una beuta da 300 mL contenente 10 mL di una soluzione di H₂SO₄ 0,1N, 90 mL di acqua distillata e 3 gocce di indicatore "Merck 5";
- raffreddato il campione a temperatura ambiente sono stati addizionati 50 mL di acqua distillata e si è proceduto alla distillazione previa aggiunta nel provettone di circa 100 mL di NaOH 40% p/v;
- terminata la distillazione, circa 150 mL di liquido distillato, l'acido solforico non neutralizzato contenuto nella beuta è stato titolato con NaOH 0,1N fino al viraggio da violetto chiaro a verde chiaro.

In questo caso il fattore di correzione di precipitazione per l'azoto non proteico è stato calcolato pari a 0,0986.

Il valore della frazione di NPN (g/100g) del latte per convenzione è stato ottenuto moltiplicando il valore dell'azoto non proteico (mg/100g) per il fattore di conversione proteico 0,00638.

Dai quantitativi di NPN e di NT sono stati ricavati i valori di proteina vera (g/100g):

$$(NT - NPN) \times 6,38 / 1000$$

dove NT e NPN sono espressi in mg/100g latte.

b₃) Determinazione dell'azoto non coagulabile del latte (NNC)

I valori di azoto non coagulabile del latte (NNC) sono stati rilevati tramite strumento Kjeldahl secondo la seguente metodica:

- sono stati pesati circa 100 g di latte in un becher da 400 mL forma bassa;
- il becher è stato riscaldato in un bagno d'acqua termostato a 35° C;
- al raggiungimento di tale temperatura sono stati addizionati 2 mL di caglio (titolo 1:100000 UI);
- si è attesa la coagulazione del latte e si è lasciato rassodare il coagulo per 10 minuti, poi coagulo è stato tagliato;

- il coagulo è stato lasciato raffreddare a temperatura ambiente, per 30 minuti e filtrato su filtri Wathman 1;
- sono stati pesati esattamente in un provettone Kjeldahl, circa 10 grammi di filtrato addizionati di: 18 mL di H₂SO₄ al 98% v/v, di 0,8 g di CuSO₄, di 7,0 g di K₂SO₄ e di 5 mL di H₂O₂ in proporzione 1:2 v/v;
- si è proceduto alla mineralizzazione della sostanza organica in modo analogo all'azoto totale del latte e del siero cotto;
- è stata preparata una beuta da 300 mL contenente 20 mL di una soluzione di H₂SO₄ 0,1N, 80 mL di acqua distillata e 3 gocce di indicatore "Merck 5";
- raffreddato il campione a temperatura ambiente e addizionati 50 mL di acqua distillata si è proceduto alla distillazione previa aggiunta nel provettone di circa 100 mL di NaOH 40% p/v;
- terminata la distillazione, circa 150 mL di liquido distillato, si procede titolando l'acido solforico non neutralizzato contenuto nella beuta è stato titolato con NaOH 0,1N fino al viraggio da violetto chiaro a verde chiaro.

Il fattore di correzione del precipitato dell'azoto non coagulabile è stato calcolato pari a 0,986. Dalle frazioni azotate sopra descritte sono stati ricavati i tenori di paracaseina (g/100g):

$$(NT - NNC) \times (6,38/1000)$$

dove NT e NNC sono espressi in mg/100g latte.

L'indice di paracaseina (%) è stato calcolato nel modo qui sotto descritto:

$$(NT - NNC) / NT \times 100$$

dove NT e NNC sono espressi in mg/100g latte.

c) Determinazione del contenuto di κ -caseina B nel latte di massa: metodo "testkappa" (Summer *et al.*, 2010)

Il kit per il testkappa consta di soluzioni per la diluizione dei campioni, di soluzioni per i lavaggi, di due standard di κ -caseina B in polvere, di anticorpo primario (monoclonale, specifico per la κ -caseina B), di anticorpo secondario, di reagenti per generare la colorazione e di una piastra (12 x 8) con pozzetti rimovibili e conservabili in frigorifero a 4°C.

Preparazione dei reagenti

- A: Wash Buffer

L'intero contenuto (50 mL) del Wash Buffer Concentrate è stato trasferito in un cilindro graduato da 1000 mL e portato a volume con acqua distillata.

Il cilindro è stato agitato delicatamente per evitare la formazione di schiuma ed il pH finale della soluzione è stato portato a 7,4. Per garantirne la stabilità, la soluzione è stata conservata ad una temperatura compresa tra 2 e 25 °C.

- B: Assay Buffer

L'intero contenuto (5mL) dell'Assay Buffer Concentrate è stato trasferito in un cilindro graduato da 100 mL e portato a volume con acqua distillata. Il cilindro è stato agitato delicatamente per evitare formazione di schiuma. Per garantirne la stabilità, la soluzione è stata conservata ad una temperatura tra 2 e 8 °C.

- C: Standard κ -caseina B

E' stato ricostituito lo standard di κ -caseina B addizionando acqua distillata di una quantità definita dall'etichetta della fiala. La soluzione così ottenuta ha raggiunto una concentrazione pari a 50 $\mu\text{g/mL}$.

- D: Preparazione dell'anticorpo anti-bovine κ -caseina B

E' stata effettuata una diluizione 1:100 con Assay Buffer a seconda delle strips utilizzate:

- fino a 6 strips: 30 μL di anticorpo in 2,97 mL di Assay Buffer;
- fino a 12 strips: 60 μL di anticorpo in 5,94 mL di Assay Buffer.

- E: Preparazione del HRP-Conjugate

E' stata effettuata una diluizione 1:100 di HRP-Conjugate addizionando 90 μL di Assay Buffer alla fialetta di HRP-Conjugate concentrato. La soluzione è stata miscelata adeguatamente e nuovamente diluita in rapporto 1:1000 con Assay Buffer trasferendo 12 μL di RHP-Conjugate diluito a sua volta in rapporto 1:10 in 12 mL di Assay Buffer.

Protocollo di analisi:

I contenuti di κ -caseina sono stati rilevati mediante la seguente metodica:

- sono stati preparati i reagenti A, B e C nelle modalità sopra riportate;
- i campioni sono stati ottenuti da una pre-diluizione del latte (100 μL di latte in 900 μL di acqua bidistillata), da questa soluzione sono stati prelevati 10 μL e addizionati a 990 μL di Assay Buffer;
- determinato il numero di strips da utilizzare, il rimanente è stato riposto nell'apposita

bustina provvista di essiccante, questa è stata conservata ad un range di temperatura di 2÷8 °C;

- lavati i pozzetti delle strips (due volte con 300 mL di Wash Buffer) facendo attenzione a non toccare ne graffiare il fondo dei pozzetti;
- capovolta la piastra su carta assorbente per non più di 15 minuti (per rimuovere l'eccesso di Wash Buffer e al contempo evitare l'essiccamento dei pozzetti), dal pozzetto B1 al pozzetto G1 sono stati addizionati 100 µL di Assay Buffer;
- nel pozzetto A1 sono stati aggiunti 150 µL di soluzione standard di κ-caseina B, successivamente da questo pozzetto sono stati prelevati 50 µL e trasferiti nel pozzetto B1, quindi da questo secondo pozzetto ne sono state prelevati ulteriori 50 µL e trasferiti nel pozzetto C1 ripetendo tale sequenza fino al pozzetto G1 (i 50 µL prelevati da G1 sono stati eliminati);
- è stata poi costruita una curva degli standard da 50 a 0,07 µg/mL (da A1 a G1);
- ai pozzetti dedicati al “bianco” sono stati addizionati 100 µL di Assay Buffer, ai pozzetti dedicati ai campioni di latte sono stati addizionati 50 µL di Assay Buffer, ai pozzetti disegnati sono stati addizionati 50 µL di campione di latte diluito;
- 50 µL di anti-bovine κ-caseina B sono stati addizionati a ciascun pozzetto;
- successivamente la piastra è stata incubata ad una temperatura tra 18 e 25 °C per 120 minuti, tenuta in agitazione ad una frequenza pari a 200 rpm;
- in seguito i pozzetti sono stati svuotati e lavati 5 volte con Wash Buffer, ed a ciascun pozzetto sono stati aggiunti 50 µL di HRP-Conjugate;
- ricoperta la piastra con le strisce adesive, questa è stata incubata ad una temperatura tra 18 e 25 °C per 60 minuti in agitazione ad una frequenza pari a 200 rpm;
- rimosse le strisce, i pozzetti sono stati lavati 5 volte con Wash Buffer e addizionati di 100 µL di TMB substrate solution;
- la piastra è stata nuovamente incubata a temperatura ambiente (18-25 °C) per circa 10 minuti, evitando l'esposizione alla luce diretta.

Lo sviluppo della colorazione è stata controllata e la reazione con TMB substrate solution non è stata “stoppata” prima che i pozzetti positivi potessero sviluppare una colorazione idonea a permettere una lettura spettrofotometrica adeguata. A tal fine, la reazione è stata fermata al momento dello sviluppo del “bianco” di una colorazione blu intensa e monitorata con lo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda pari a 620 nm.

La reazione enzimatica colorimetrica è stata fermata aggiungendo 100 µL di stop solution a ciascun pozzetto in modo rapido e uniforme. La piastra è stata letta immediatamente dopo l'aggiunta della stop solution (o entro 1 ora se conservata al buio ad una temperatura di 2÷8 °C). La lettura è stata effettuata ad una lunghezza d'onda di 450 nm o in via opzionale di 620 nm.

d) pH e acidità titolabile secondo Soxhlet–Henkel (Anonymous, 1963)

Il pH del latte viene determinato mediante potenziometro Orion con elettrodo Crison specifico per alimenti ad alto contenuto proteico.

I valori di acidità titolabile del latte secondo Soxhlet-Henkel sono stati determinati mediante elettrotitolatore automatico "Crison Compact Titrator D" che comporta una titolazione di 50 ml di latte con NaOH 0,25 N con riferimento al punto di viraggio della fenolftaleina (pH = 8,45).

e) Determinazione del peso del latte, determinazione del punto crioscopico e della resa casearia

Il peso del latte, è stato calcolato prendendo in considerazione il volume (L), misurato mediante apposita pompa volumetrica, e la densità (kg/L) del latte magro della sera e del latte intero della mattina misurata mediante lattodensimetro di Quevenne.

$$\text{Peso} = \text{Volume} \times \text{Densità}$$

Il punto crioscopico è stato determinato con crioscopio a termistori Hortvet.

La resa in formaggio indica la quantità di formaggio espressa in kg ottenuta dall'utilizzo di 100 kg di latte. Per il calcolo si è proceduto al peso delle forme di Parmigiano-Reggiano durante le quattro fasi di maturazione: a 24 ore dall'estrazione dalla caldaia, fuori sale (successivamente all'estrazione dalla salamoia), a 6 mesi e a 12 mesi di stagionatura.

f) Determinazione dell'urea (Pecorari *et al.*, 1993)

La determinazione dell'urea sui campioni di latte è stata effettuata per reazione enzimatica catalizzata dall'ureasi con apparecchio Bun Analyzer.

g) Analisi lattodinamografica (Annibaldi *et al.*, 1977)

L'attitudine del latte alla coagulazione è stata determinata effettuando l'analisi lattodinamografica, che consiste nel determinare parametri quali tempo di coagulazione, tempo di rassodamento e consistenza del coagulo che indicano il comportamento del latte addizionato di caglio. L'analisi è stata condotta mediante Lattodinamografo Formagraph della Foss Italia secondo la seguente metodica:

- in ciascuno dei 10 pozzetti costituenti le piastre di caricamento sono stati pipettati 10 mL di latte;
- raggiunta la temperatura di analisi ($T=35\text{ }^{\circ}\text{C}$), è stata addizionata una determinata quantità di caglio (diluizione 1:100, titolo 1:19000) adeguatamente miscelato;
- in seguito, dei piccoli "pennini" di acciaio a forma di cerchio sono stati immersi in ciascun pozzetto, ad evidenziare le piccole forze indotte e create dal latte ad inizio coagulazione;
- da questo segnale, rilevato ed amplificato, sono stati determinati i caratteristici tracciati lattodinamografici a campana in cui l'inizio della coagulazione è rappresentato dall'apertura del tracciato.

Da tali tracciati sono stati ricavati i seguenti parametri (Figura 2.3):

r = tempo di coagulazione (espresso in minuti), corrispondente alla durata della reazione primaria tra caglio e caseina; corrisponde al tempo che intercorre dall'aggiunta del caglio (tempo 0 analisi) all'apertura del tracciato (formazione del coagulo);

k_{20} = tempo di rassodamento del coagulo (espresso in minuti), corrispondente al tempo necessario al coagulo per raggiungere una resistenza meccanica tale da determinare un'ampiezza del tracciato di 20 mm;

a_{30} = consistenza del coagulo misurata a 30 minuti dall'aggiunta del caglio (espressa in mm), corrisponde all'ampiezza raggiunta dal grafico a 30 minuti.

In base ai lattodinamogrammi ottenuti (Figura 2.4) è stata ricavata la tipizzazione dei vari campioni (Tabella 2.1):

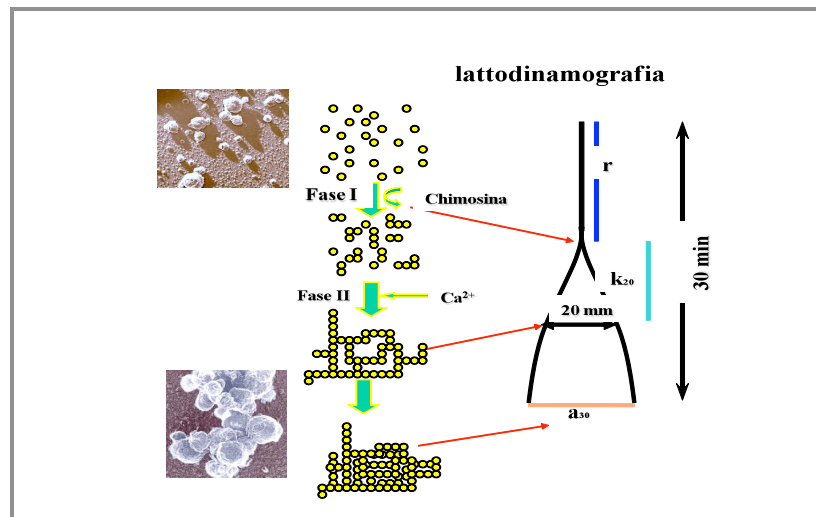


Figura 2.3: Schema del rapporto tra coagulazione presamica e tracciato lattodinamografico.

Tipologia latte	
Tipo A $11 < r < 17,30$ $19 < a_{30} < 40$	attitudine alla coagulazione presamica risulta ottimale;
Tipo B $11 < r < 17,30$ $40 < a_{30} < 100$	la coagulazione risulta inizialmente un po' lenta ma si osserva un rapido rassodamento del coagulo con formazione di una cagliata dotata di buona consistenza
Tipo C $8 < r < 11$ $a_{30} < 30$	coagulazione abbastanza rapida ma il coagulo non raggiunge una consistenza sufficiente
Tipo D $0 < r < 5$ $0 < a_{30} < 54$	latte caratterizzati da un elevato contenuto di caseina oppure lievemente acidi che danno origine ad un coagulo ad elevata consistenza;
Tipo E $17,30 < r < 20$ $0 < a_{30} < 19$	latte con scarsa reattività al caglio, la cui attitudine alla coagulazione presamica risulta nel complesso poco più che sufficiente
Tipo DD $0 < r < 5$ $0 < a_{30} < 100$	latte con pessima attitudine alla coagulazione presamica perché iperacido o troppo maturo;
Tipo FF $29,45 < r < 100$ $a_{30} < 100$	latte che non coagula entro 30 minuti dall'aggiunta del caglio e, pertanto, non idoneo alla caseificazione.

Tabella 2.1: Descrizione dei parametri reologici e dei differenti tipi lattodinamografici

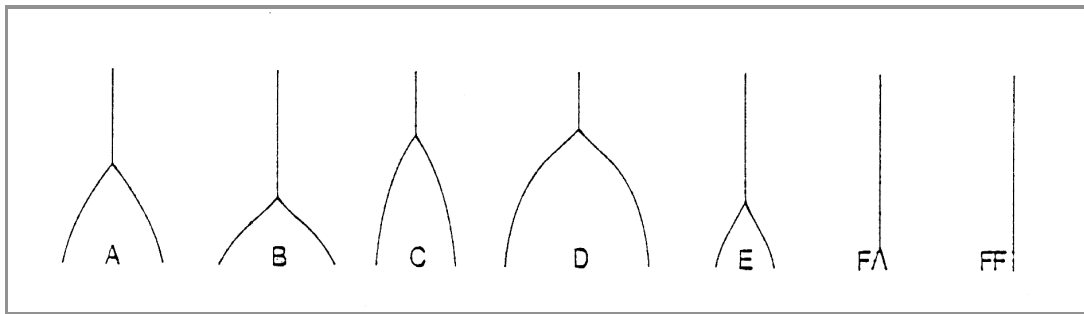


Figura 2.4 : Tipologie dei principali tracciati lattodinamografici dei campioni di latte.

h) Determinazione delle cellule somatiche (Schmidt-Madsen, 1975).

La determinazione delle cellule somatiche sui campioni di latte è stata effettuata con il metodo fluoro – opto – metrico mediante Fossomatic 5000, contatore elettronico integrato al MilkoScan FT, che non necessita di alcuna preparazione del campione (Figura 2.1).

i) Determinazione della carica batterica totale (Grappin *et al.*, 1985).

La determinazione della carica microbica totale sui campioni di latte è stata effettuata con il metodo citometrico a flusso tramite BactoScan 8000. Le cellule messe in sospensione dopo una breve preparazione vengono forzate in un capillare che è illuminato ed è posto di fronte all'obiettivo di un microscopio. Ogni cellula che passa viene rilevata dal contatore elettronico collegato al microscopio.

l) Determinazione delle spore clostridiche (Annibaldi, 1969).

La determinazione delle spore clostridiche sui campioni di latte è stata effettuata con il metodo di Weinzirl modificato da Annibaldi:

- per ogni campione di latte sono state preparate 9 provette contenenti ciascuna 1 mL di terreno;
- 3 provette sono state inoculate con 10 mL di campione di latte ciascuna, 3 provette sono state inoculate con 1mL di campione di latte ciascuna e 3 provette sono state inoculate con 0,1 mL di campione di latte ciascuna;
- in seguito sono stati addizionati 10 mL di latte sterile a ciascuna delle 6 provette contenenti 1 e 0,1 mL di campione di latte;
- su ogni provetta è stato posto un tappo di paraffina-vasellina dello spessore di circa 1,5 cm;

- successivamente le provette sono state pastorizzate a bagnomaria per 15 minuti a 82 °C e raffreddate in una vaschetta di acqua a temperatura ambiente ed incubate in un termostato per 7 giorni a 37 °C.

Sono risultate positive le provette in cui il tappo di paraffina si è sollevato di almeno 1cm. Preso nota del numero di provette positive per ciascun inoculo, è stata ricercata la combinazione di tali numeri nell'apposita tabella statistica del Most Probable Number (MPN/1000mL).

m) Determinazione della sostanza secca e delle ceneri (Savini, 1946).

Determinazione della sostanza secca:

- per ogni campione, è stata condizionata una capsula di porcellana in muffola a 530 °C; dopo averla posta in essiccatore a raffreddare, questa è stata pesata con una bilancia analitica con l'esattezza di 0,0001 g determinando la tara;
- nella capsula sono stati apportati esattamente circa 20 g di latte;
- sono state aggiunte alcune gocce di CH₃COOH al 10% (solo nei campioni di latte per indurre una parziale coagulazione) e la capsula è stata posta in stufa a 70 °C per una notte (pre-concentrazione) al fine di evitare la formazione di una pellicola superficiale costituita da sieroproteine con formazione di vescicole gassose il cui scoppio potrebbe condurre a possibili perdite di campione;
- la capsula è stata portata a 100 °C per 7 ore;
- la capsula è stata trasferita in essiccatore per 30 minuti per il raffreddamento e si è poi proceduto alla pesata da cui, per semplice sottrazione della tara, si è ottenuto il valore della sostanza secca.

Determinazione delle ceneri:

- per ogni campione, è stato condizionato un crogiuolo di porcellana in muffola e si è proceduto in modo analogo alla determinazione della sostanza secca;
- in seguito si è proceduto all'incenerimento della sostanza secca: si è posto il crogiuolo sul Bunsen fino alla scomparsa dello sviluppo dei fumi;
- si è trasferito il crogiuolo in muffola a 530 °C per 6 ore al fine della calcinazione;
- si è posto il crogiuolo in essiccatore per il raffreddamento e si è effettuata la pesata per la determinazione delle ceneri.

n) Determinazione del contenuto minerale di fosforo, calcio, magnesio, sodio e potassio dalle ceneri cloridriche.

Per la determinazione di fosforo (P), calcio (Ca), magnesio (Mg), sodio (Na) e potassio (K) sono state preparate le ceneri cloridriche del latte e del siero cotto.

Le ceneri tal quali sono state riprese con acido cloridrico (HCl 2N) e trasferite, per semplice versamento, in becher da 100 mL;

- il becher è stato disposto in un bagno termostato di sabbia per portare a secco la soluzione;
- è stato atteso il raffreddamento del becher;
- sono stati aggiunti circa 20 mL di HCl 2N, il becher poi è stato coperto con un vetrino d'orologio e posto nuovamente nel bagno di sabbia fino ad ebollizione;
- è stato effettuato un travaso quantitativo dal becher, per mezzo di acqua bidistillata calda, in un matraccio tarato da 100 mL;
- il contenuto è stato poi filtrato con filtro Whatman 40;
- raffreddato a temperatura ambiente, è stato portato a volume con acqua bidistillata fredda.

Per la determinazione delle frazioni solubili del fosforo, calcio e magnesio le ceneri cloridriche sono state ricavate da siero ultrafiltrato di latte.

L'ultrafiltrazione è stata effettuata mediante cella ultrafiltrante AMICON (modello 8200, Beverly, MA, USA) utilizzando una membrana MILLIPORE (Bedford, MA, USA) a cut-off di 30.000 Da.

n₁) Determinazione del fosforo mediante analisi colorimetrica (Allen, 1940).

La determinazione del fosforo è stata effettuata secondo la seguente metodica.

Preparazione campione:

- sono stati prelevati precisamente 5 mL di ceneri cloridriche del latte in un matraccio tarato da 200 mL e portati a volume con acqua distillata;
- sono stati prelevati 10 mL di tale soluzione e sono stati posti in una provetta in cui successivamente sono stati pipettati 10 mL di acqua distillata e 2 mL di acido perclorico (HClO₄ al 65%).

Preparazione del bianco:

- in una provetta sono stati pipettati 20 mL di acqua distillata e 2 mL di HClO₄ al 65%.

Preparazione dello standard:

- in una provetta sono stati pipettati 10 mL di soluzione standard precedentemente preparata, 10 mL di acqua distillata e 2 mL di HClO₄ al 65%;
- in ogni provetta quindi sono stati addizionati 2 mL di soluzione di Amidolo (1g di Amidolo e 20g di Sodio Metabisolfito disciolti in 100 mL di H₂O) e successivamente 1 mL di soluzione di Molibdato (8,3g di Molibdato d'Ammonio disciolti in 100 mL di H₂O);
- le provette poi sono state ricoperte da parafilm e agitate in modo vigoroso al fine di sviluppare una colorazione azzurra di intensità proporzionale al contenuto di fosforo presente nel campione;
- dopo 25 minuti si è proceduto alla lettura mediante Spettrofotometro Helios Gamma UV/Vis (Thermo Spectromic, Rochester, NY 14625 USA) in corrispondenza della lunghezza d'onda $\lambda_p = 750$ nm.

n₂) Determinazione del calcio, del magnesio, del sodio e del potassio mediante Assorbimento Atomico (Anonimous, 1982).

La determinazione del calcio, del magnesio, del sodio e del potassio è stata effettuata mediante la seguente metodica.

Preparazione campione:

- sono stati posti 5 mL di ceneri cloridriche del latte e del siero cotto in un matraccio tarato da 50 mL e portati a volume;
- sono stati poi prelevati 10 mL della soluzione precedente e riportati in un matraccio da 100 mL, solo per calcio e per il magnesio sono stati addizionati 2 mL di soluzione di cloruro di lantanio (LaCl al 5%) e portato il tutto a volume;
- si è proceduto alla lettura dei campioni mediante Assorbimento Atomico 1100 B (Perkin-Elmer, Shelton, Connecticut 06484-4794, USA) impostato alle seguenti lunghezze d'onda $\lambda_{Ca} = 422,7$ nm, $\lambda_{Mg} = 285,2$ nm, $\lambda_{Na} = 589,0$ nm e $\lambda_K = 776,5$ nm.

Costruzione retta di taratura:

- Retta di taratura per il calcio: tre soluzioni standard da 1 ppm, 2 ppm e 4 ppm.
- Retta di taratura per il magnesio: tre soluzioni standard da 0,1 ppm, 0,2 ppm e 0,4 ppm.
- Retta di taratura per il sodio: tre soluzioni standard da 0,5 ppm, 1 ppm e 2 ppm.
- Retta di taratura per il potassio: tre soluzioni standard da 1 ppm, 2 ppm e 4 ppm.

o) Determinazione del contenuto delle frazioni minerali del fosforo, del calcio e del magnesio dalle ceneri cloridriche.

La lettura delle frazioni del fosforo è avvenuta tramite il metodo colorimetrico di Allen: il fosforo totale (x) ed il fosforo solubile (y) sono stati ricavati rispettivamente dalle ceneri cloridriche del latte e dal siero ultrafiltrato. Da questi poi è stato calcolato il fosforo colloidale (x-y) corretto per la quota del fosforo dei fosfolipidi.

Il fosforo acido solubile totale (z) è stato ricavato dal filtrato dell'analisi dell'azoto non proteico (filtrato NPN del latte TCA al 12%) secondo la seguente metodica:

- preparazione del campione: 5 mL di filtrato NPN pipettati in un tubo kjeldahl contenente 5 mL di HClO₄ al 65% e 3 palline di vetro per evitare schizzi;
- digestione: il campione è stato digerito per 60 minuti a 240 °C, aggiungendo 4 mL di H₂O₂ raggiunti i 240 °C;
- travaso: una volta digerito e raffreddato, il campione è stato travasato in un matraccio classe A da 200 mL in modo quantitativo con l'aiuto di acqua calda e portato a volume.

Dalla determinazione del fosforo acido solubile è stato ricavato il fosforo colloidale inorganico (z-y) ed il fosforo della caseina (x-z) corretto per la quota del fosforo dei fosfolipidi.

A partire dalle ceneri del latte e del siero ultrafiltrato (ottenuto per ultrafiltrazione attraverso cella AMICON a cut-off di 30 kDa), opportunamente riprese con HCl 2N, sono stati determinati rispettivamente i contenuti di calcio e magnesio totale ed i contenuti di calcio e magnesio solubile. Da questi, per differenza tra la quota totale e la quota solubile, sono stati poi ricavati i valori di calcio e di magnesio allo stato colloidale.

La lettura dei dati è avvenuta mediante Assorbimento Atomico (vedere punto n₂).

p) Determinazione dei cloruri del latte (Savini, 1946).

La determinazione dei cloruri del latte è stata effettuata secondo il metodo volumetrico classico Charpentier – Volhard:

- pesati esattamente circa 20 g di latte in un matraccio tarato da 100 mL e addizionati 2 mL di reagente Carrez 1 ottenuto da 43,9 g di acetato di zinco (CH₃COO)₂Zn e 5,9 mL di acido acetico glaciale CH₃COOH al 95% portati a volume in un pallone da 200 mL e poi conservato in frigorifero
- alla soluzione sono stati aggiunti ulteriormente 2 mL di reagente Carrez 2 ottenuto da: 10,6 g di ferrocianuro di potassio K₄[Fe(CN)₆]·3H₂O portato a volume con acqua

distillata in un pallone da 100 mL ;

- la soluzione è stata lasciata riposare per 1 ora e poi filtrata su filtri Wathman 40;
- 50 mL di filtrato sono stati pipettati in un becher da 150 mL, addizionati 5 mL di acido nitrico HNO_3 in proporzione 1:2 e 2 mL di indicatore ferro ammonio solfato $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ e 10 mL di argento nitrato AgNO_3 0,1N;
- la soluzione finale è stata titolata con ammonio solfocianuro NH_4SCN 0,1N fino all'ottenimento di una colorazione arancione.

q) Determinazione delle particelle di cagliata (curd fines) nel siero (van den Berg *et al.*, 1973; modificata da Walsh *et al.*, 1995)

- Dopo aver agitato, sono stati pesati esattamente circa 80 g di siero cotto in una provetta centrifugata per 15 minuti a 300 rpm;
- utilizzando la pompa a vuoto, è stato aspirato quasi completamente il surnatante lasciando il sedimento depositato sul fondo della provetta;
- i primi tre punti della metodica sono stati ripetuti in successione tre volte con la medesima provetta;
- le particelle di cagliata depositate nella provetta sono state poi recuperate tramite imbuto Büchner, precedentemente condizionato e pesato, al cui interno è stato posto un filtro Whatman 40;
- su una beuta collegata alla pompa a vuoto si procede ad un travaso quantitativo, aiutandosi con acqua distillata, naturalmente le particelle di cagliata sono state trattenute dal filtro;
- gli imbuti Büchner, con il filtro Whatman 40, sono stati essiccati in stufa per 2 ore e poi pesati per la determinazione delle particelle di cagliata.

Il contenuto di particelle di cagliata in mg/kg del siero cotto di fine lavorazione è stato calcolato con la seguente formula:

$$(\text{mg}_{\text{filtro essiccato}} - \text{mg}_{\text{tara filtro}}) / 1000\text{g}.$$

2.3– Scopo del primo filone di ricerca: studio dell'effetto razza sul contenuto minerale e sugli equilibri salini del latte e sulle proprietà di caseificazione del latte

Obiettivo di questa ricerca è stato quello di approfondire l'influenza dell'effetto razza sulla componente minerale del latte nella specie bovina e sulle principali caratteristiche fisico-chimiche e reologiche del latte.

In particolare l'indagine si è incentrata sugli equilibri salini, cioè la distribuzione dei costituenti minerali fra la fase solubile e la fase colloidale. Si tratta di un aspetto che è stato trattato solo marginalmente e parzialmente. Si ritiene, quindi, necessaria una maggiore conoscenza circa la ripartizione di calcio, fosforo, magnesio fra le fasi solubile e colloidale, e le interazioni tra la componente organica e quella salina della micella. Si ritiene, inoltre, che questo possa fornire importanti informazioni sulla composizione del sistema micellare per il ruolo che i sali, in particolare il fosfato di calcio colloidale, esercitano sulle proprietà della micella e conseguentemente sull'intero processo di caseificazione.

I fattori genetici influenzano l'andamento degli equilibri salini e questi a loro volta si ripercuotono sul grado di mineralizzazione della micella e quindi sulla coagulazione presamica: per investigare su tale fenomeno è stata scelta la razza Bianca Val Padana, perché, come da letteratura, è nota per la produzione di latte con un quadro minerale che la distingue dalle altre razze (Mariani e Pecorari, 1987; Custer, 1979; Mariani e Summer, 1999; Summer *et al.*, 2002).

2.3.1– Disegno sperimentale

Il piano sperimentale è indirizzato allo studio della composizione chimica di base, e alla ripartizione delle principali frazioni proteiche e minerali del latte delle vacche di razza Bianca Val Padana destinato alla produzione di formaggio Grana Padano e Provolone Valpadana.

Il protocollo di ricerca ha previsto la raccolta complessiva di 80 campioni di latte individuale da un singola stalla in cui erano allevate vacche sia di razza Bianca Val Padana (BVP) che di razza Frisona Italiana (FI), situato in pianura, nella provincia di Brescia. Di questi, 40 campioni derivavano da vacche BVP e 40 campioni da vacche FI. I prelievi sono stati effettuati nel corso di sopralluoghi mensili, da gennaio 2012 a gennaio 2013.

Per ogni vacca, sono stati prelevati due campioni in due momenti differenti dello stadio di lattazione, a 50 ± 7 giorni e a 150 ± 7 giorni rispettivamente. I campioni sono stati raccolti nel corso della mungitura della mattina ed entrambe le quote sono state raffreddate alla temperatura di $4\text{ }^\circ\text{C}$ e trasportate presso il laboratorio di analisi.

Su ogni campione sono stati determinati: lattosio, grasso, proteina grezza e caseina, con letture nel medio infrarosso; pH e acidità titolabile; parametri di coagulazione presamica (r , k_{20} , a_{30}); cellule somatiche; conta microbica totale; sostanza secca e ceneri; contenuto minerale totale (fosforo, calcio e magnesio); contenuto delle frazioni minerali del fosforo (fosforo solubile, fosforo acido solubile, fosforo colloidale, fosforo colloidale inorganico); contenuto delle frazioni minerali del calcio (calcio solubile, calcio colloidale); contenuto delle frazioni minerali del magnesio (magnesio solubile, magnesio colloidale). Le analisi sono state effettuate entro 3 ore dalla raccolta dei campioni all'allevamento.

Il data-set è stato poi processato con ANOVA univariata, tramite software SPSS 19.0, impiegando il seguente modello:

$$Y_{ijkl} = \mu + R_i + L_j + M_k + (RLM)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

dove: Y_{ijkl} = variabile dipendente; μ = media generale; R_i = effetto fisso razza (2 livelli: BVP, FI), $i = 1, 2$; L_j = effetto fisso classe di lattazione (2 livelli: 50 ± 7 ; 150 ± 7), $j = 1, 2$; M_k = effetto fisso ordine di parto (3 livelli: primo parto; secondo parto; terzo parto), $k = 1, \dots, 4$ e ε_{ijkl} = errore residuo.

La significatività statistica delle differenze tra i valori medi delle due classi corrispondenti alle due razze bovine è stata saggiata mediante il test di Bonferroni.

2.3.2– Risultati e Discussione

Nelle Tabelle 2.2, 2.3 e 2.4, sono mostrati le medie, gli errori standard e la significatività statistica degli effetti “razza” sui parametri chimici, fisico-chimici, reologici ed igienico-sanitari rilevati dei campioni di latte individuale di vacche di razza Bianca Val Padana e di Frisona Italiana. I valori relativi alla produzione di latte, al contenuto di lattosio e al pH sono da considerare come fisiologicamente normali per il latte di entrambe le razze.

I valori relativi al contenuto di cellule somatiche e di carica batterica totale sono ampiamente al di sotto dei valori limite, pari, rispettivamente, a 400000 Cellule/mL e a 100000 UFC/mL.

Composizione chimica di base e parametri igienico-sanitari

Nella Tabella 2.2 sono mostrati i risultati corrispettivi ai parametri di composizione chimica ed ai parametri igienico-sanitari dei campioni di latte di vacche di razza Bianca Val Padana (BVP) e Frisona Italiana (FI).

Tutti i parametri considerati, tranne il contenuto di lattosio e la conta batterica totale, hanno mostrato differenze statisticamente significative tra latte BVP e latte FI.

Le vacche FI sono caratterizzate, rispetto a quelle BVP, da una maggiore produzione di latte, (15,93 vs 10,01 kg latte/mungitura; $P < 0,001$). Al contrario, il latte delle vacche BVP, rispetto a quello FI, è risultato più ricco in sostanza secca (12,82 vs 12,16 g/100g; $P < 0,05$).

Tra i costituenti della sostanza secca, il grasso e la proteina sono risultati più elevati nel latte BVP (+12,8%, +6,2%; $P < 0,05$ rispettivamente). Il maggior contenuto di proteina del latte BVP è principalmente dovuto al maggior contenuto di caseina (+6,7%; $P < 0,01$), con conseguenti ricadute sui valori dell'indice di caseina, che risulta più elevato nel latte BVP rispetto a quello FI (78,00 vs 77,69 %; $P < 0,05$). Tali andamenti risultano in accordo con una precedente ricerca, condotta su campioni di latte di massa di vacche di razza Modenese e Frisona Italiana destinato alla produzione di Parmigiano-Reggiano, anche se si evidenzia un calo per quanto riguarda i contenuti di proteina e caseina nel latte di BVP rispetto a quelli di Modenese (3,48 e 2,75; g/100g MO $P < 0,01$ rispettivamente) (Summer *et al.*, 2002).

Infine, le cellule somatiche sono risultate più elevate nel latte di vacche BVP rispetto a quelle del latte FI (+46,26%; $P < 0,05$). Entrambi i valori sono da considerarsi bassi e tali da non dover alterare significativamente la composizione e le caratteristiche del latte. Mariani *et al.* (1998) in uno studio condotto su campioni di latte di massa di vacche di razza Frisona, Bruna, Reggiana e Modenese rappresentativi di allevamenti collocati nelle province di Parma, Reggio Emilia e Modena, riportano contenuti di cellule somatiche maggiori per entrambe le razze (137000 Cell/mL MO e 227000 Cell/mL FI; $P < 0,01$).

Caratteristiche chimico-fisiche e reologiche

Nella Tabella 2.3 sono mostrati i risultati corrispettivi alle caratteristiche chimico-fisiche e reologiche dei campioni di latte di vacche di razza Bianca Val Padana (BVP) e Frisona Italiana (FI).

Tra tutti i parametri considerati, solo il valore dell'acidità titolabile ha mostrato differenze statisticamente significative tra BVP ed FI. L'acidità titolabile, infatti, è risultata più elevata nel latte BVP rispetto a quello FI (+4,3%; $P < 0,05$). La più elevata acidità titolabile del latte di vacche BVP, rispetto a quello delle vacche di razza FI, non ha trovato riscontro nei valori del pH, che, pur manifestando valori inferiori nel latte BVP, sono risultati non differenti dal punto di vista statistico. La differenza di acidità titolabile tra il latte delle due razze non ha influenzato i parametri di coagulazione presamica. Questi parametri sono risultati mediamente più favorevoli nel latte BVP rispetto a quello FI, ma, anche in questo caso, le differenze non hanno raggiunto la significatività statistica. I risultati hanno mostrato un comportamento reologico del latte di BVP molto differente rispetto ai dati dello studio di Summer *et al.* (2002) precedentemente descritto, dove il latte di razza Modenese a parità di tempi di coagulazione presenta un coagulo ottenuto con tempi di rassodamento maggiori e di consistenza nettamente inferiore (r : 17,9 min, k_{20} : 10,5 min, a_{30} : 25,4 mm; MO). Anche per quanto riguarda il latte di FI, si evidenzia un miglioramento delle caratteristiche di coagulazione presamica, in particolare per il parametro di consistenza a_{30} . I risultati di uno studio di De Marchi *et al.* (2008) condotto su latte di massa di vacche di razza Frisona e di Bruna mostrano, a parità di tempo di coagulazione, medie di consistenza del coagulo inferiori rispetto a questa ricerca (r : 18,4 min e a_{30} : 18,9 mm; $P < 0,05$).

Contenuto minerale ed equilibri salini

Nella Tabella 2.4 sono mostrati i risultati relativi al contenuto minerale ed agli equilibri salini dei campioni di latte di vacche di razza Bianca Val Padana (BVP) e Frisona Italiana (FI).

Tra i parametri considerati, il contenuto di fosforo e calcio totale, fosforo e calcio colloidale, fosforo solubile e colloidale inorganico, hanno mostrato differenze statisticamente significative tra BVP ed FI.

Sia il contenuto totale di calcio che quello del fosforo sono risultati entrambi più elevati nel latte prodotto dalle vacche BVP, rispetto a quello prodotto dalle vacche FI (+3,6% e +3,7%; $P < 0,01$ rispettivamente). Lo stesso comportamento è stato rilevato per le frazioni colloidali di calcio e fosforo, che sono risultate ancora una volta più elevate nel latte BVP (+1,5% e +2,4%; $P < 0,01$, $P < 0,05$ rispettivamente).

Il maggior contenuto di calcio totale del latte delle bovine BVP è da imputarsi al contributo dato dal calcio colloidale. Per il fosforo, invece, questa relazione è meno diretta, in quanto il latte BVP si è caratterizzato, rispetto a quello FI, anche per un più elevato contenuto di fosforo solubile (+4,8%; $P < 0,05$). Il contenuto di fosforo colloidale del latte BVP è risultato principalmente a carico del fosforo colloidale inorganico, che è risultato superiore nel latte BVP (+6,1%; $P < 0,01$).

La frazione minerale colloidale del latte, è un importante costituente del reticolo caseinico che darà origine al coagulo. I dati ottenuti da questa ricerca hanno evidenziato una distribuzione dei contenuti minerali del latte BVP differente rispetto a risultati di una precedente letteratura (Summer *et al.*, 2002). Il quadro minerale del latte BVP ha mostrato una diminuzione delle quote colloidali e solubili del fosforo ed un incremento di quelle colloidali del calcio. La diminuzione dei valori di fosforo nel latte BVP ha permesso di bilanciare lo squilibrio del rapporto Ca/P (1,22 BVP vs 1,24 FI; NS)

Tabella 2.2: Composizione chimica e parametri igienico-sanitari dei campioni di latte di 20 bovine di razza Bianca Val Padana e di 20 bovine di razza Frisona Italiana.

		(BVP) N ¹ =40		(FI) N ¹ =40		P ³
		Media	ES ²	Media	ES ²	
Latte prodotto	kg/mungitura	10,01	± 0,49	15,93	± 0,49	***
Sostanza secca	g/100g	12,82	± 0,17	12,16	± 0,17	*
Lattosio	g/100g	4,80	± 0,04	4,81	± 0,04	NS
Grasso	g/100g	3,87	± 0,14	3,43	± 0,14	*
Proteina grezza	g/100g	3,27	± 0,05	3,08	± 0,05	*
Caseina	g/100g	2,55	± 0,04	2,39	± 0,04	**
Indice caseina	%	78,00	± 0,22	77,69	± 0,22	*
Cellule somatiche	10 ³ Cell/mL	134	± 23	72	± 23	*
Conta microbica totale	10 ³ UFC/mL	57	± 19	36	± 19	NS

¹ Numero dei campioni

² Errore standard

³ P: NS, P>0,05; * P≤0,05; ** P≤0,01 *** P≤0,001

Tabella 2.3: Proprietà fisico – chimiche e parametri di coagulazione presamica dei campioni di latte di 20 bovine di razza Bianca Val Padana e di 20 bovine di razza Frisona Italiana.

		BVP N ¹ =40		FI N ¹ =40		P ³
		Media	ES ²	Media	ES ²	
pH	—	6,69	± 0,01	6,70	± 0,01	NS
Acidità titolabile	°SH/50mL	3,41	± 0,07	3,27	± 0,07	*
Abbassamento crioscopico	Δ°C	0,520	± 0,002	0,519	± 0,002	NS
Tempo coagulazione (r)	min	17,53	± 0,88	18,24	± 0,88	NS
Tempo rassodamento (k ₂₀)	min	3,42	± 0,28	3,73	± 0,28	NS
Consistenza del coagulo (a ₃₀)	mm	36,06	± 1,96	34,54	± 1,96	NS

¹ Numero dei campioni

² Errore standard

³ P: NS, P>0,05; * P≤0,05

Tabella 2.4: Contenuto minerale ed equilibri salini dei campioni di latte di 20 bovine di razza Bianca Val Padana e di 20 bovine di razza Frisona Italiana.

	BVP N ¹ =40		FI N ¹ =40		P ³
	Media	ES ²	Media	ES ²	
Ceneri	g/100mg	± 0,73	0,72	± 0,01	NS
Calcio totale	mg/100mg	± 117,58	113,48	± 1,46	**
Calcio solubile	mg/100mg	± 31,39	30,51	± 0,98	NS
Indice Calcio solubile	%	± 26,79	26,89	± 0,81	NS
Calcio colloidale	mg/100mg	± 86,19	82,97	± 1,45	**
Fosforo totale	mg/100mg	± 96,53	93,13	± 1,56	**
Fosforo solubile	mg/100mg	± 45,44	43,34	± 0,90	*
Indice Fosforo solubile	%	± 46,99	46,65	± 0,69	NS
Fosforo colloidale	mg/100mg	± 48,83	47,71	± 1,26	*
Fosforo colloidale inorganico	mg/100mg	± 29,52	27,84	± 0,84	**
Fosforo caseina	mg/100mg	± 19,31	19,87	± 0,96	NS
Magnesio totale	mg/100mg	± 10,23	9,74	± 0,29	NS
Magnesio solubile	mg/100mg	± 7,58	7,19	± 0,23	NS
Indice Magnesio solubile	%	± 73,99	73,71	± 0,38	NS
Magnesio colloidale	mg/100mg	± 2,65	2,55	± 0,08	NS
Ca/P	—	± 1,22	1,24	± 0,02	NS

¹ Numero dei campioni

² Errore standard

³ P: NS, P>0,05; * P≤0,05; ** P≤0,01

2.4– Scopo del secondo filone di ricerca: influenza del contenuto di κ -caseina B sulla resa in formaggio Parmigiano-Reggiano

Obiettivo di questa ricerca, della durata di 18 mesi, è stato valutare l'influenza del contenuto di κ -caseina B sulle caratteristiche chimiche, chimico-fisiche, reologiche e sulla resa in formaggio Parmigiano-Reggiano. A tal scopo sono stati selezionati quattro allevamenti di collina conferenti ad un unico caseificio situato in provincia di Parma, appartenenti al comprensorio di produzione del Parmigiano-Reggiano, al fine di ottenere 4 possibili masse di latte che presentassero un differente contenuto di κ -caseina B

La finalità pratica riguarda la proposta di una modifica del sistema pagamento latte qualità, introducendo un nuovo parametro che tenga conto degli effetti del contenuto in κ -caseina B del latte; tale proposta si è resa possibile, in quanto oggi si può disporre del “testkappa” che consente analisi di routine del contenuto di κ -caseina B nel latte di massa (Summer *et al.*, 2010).

2.4.1– Disegno sperimentale

Il piano sperimentale ha previsto la scelta di 4 aziende conferenti latte a differente contenuto di κ -caseina B. I prelievi sono stati effettuati con sopralluoghi a cadenza mensile, in un arco di tempo compreso tra marzo 2012 e febbraio 2013. I campioni raccolti, sono stati rappresentativi di latte di buona qualità, e sufficienti alla costituzione di 4 caldaie per Parmigiano-Reggiano, ciascuna per la produzione di 2 forme gemelle.

Per ogni caseificazione è stata inoltre misurata accuratamente la quantità di latte introdotta nelle vasche di affioramento ed in caldaia mediante l'utilizzo di una pompa volumetrica. Infine, sono state pesate le forme ottenute durante quattro stadi di maturazione: a 24 ore dall'estrazione dalla caldaia, dopo l'estrazione dalla salamoia (fuori sale), a 6 mesi e a 12 mesi di stagionatura (solo per le forme prodotte nei primi 6 mesi di sperimentazione).

La raccolta dei dati sperimentali ha riguardato campioni di differenti matrici, i campioni sono stati sottoposti alla determinazione dei seguenti parametri:

- 48 campioni latte di massa di allevamento (inteso come il latte intero della mungitura della mattina): lattosio, grasso, proteina e caseina con letture nel medio infrarosso, pH e acidità titolabile, punto crioscopico, cellule somatiche, urea, contenuto di κ -caseina B, analisi lattodinamografica (r , k_{20} , a_{30}), conta batterica totale, spore di clostridi, peso latte;
- 48 campioni crema di affioramento: peso crema

- 48 campioni latte in caldaia: lattosio, grasso, proteina e caseina con letture nel medio infrarosso, pH e acidità titolabile, punto crioscopico, contenuto di κ -caseina B, analisi lattodinamografica (r , k_{20} , a_{30}), cellule somatiche, conta batterica totale, spore di clostridi, frazioni azotate (NT, NS pH 4,6, NPN, NNC), sostanza secca e ceneri, P (totale, solubile, acido solubile, colloidale, colloidale inorganico), Ca (totale, solubile, colloidale), Mg (totale, solubile, colloidale), Na (totale), K (totale), cloruri, densità, peso latte;
- 48 campioni siero cotto: grasso mediante Gerber, frazioni azotate (NT, NS a pH 4,6, NPN), sostanza secca e ceneri, P (totale), Ca (totale), Mg (totale) particelle di cagliata (curd fines);
- 96 forme di formaggio a 24 ore, fuori sale, a 6 mesi e a 12 mesi: peso forma, calcolo della resa.

I valori ottenuti sono stati elaborati statisticamente secondo analisi descrittiva al fine di ottenere il valore medio, la deviazione standard, il valore minimo ed il valore massimo.

Il data-set è stato poi processato mediante ANOVA univariata tramite software SPSS 19.0 impiegando il seguente modello:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + S_j + (AS)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

dove Y_{ijk} = variabile dipendente; μ = media generale; A_i = fattore fisso azienda conferente (4 livelli: A_1, A_2, A_3, A_4), $i = 1, \dots, 4$; S_j = fattore fisso stagione (4 livelli: inverno, da gennaio a marzo; primavera, da aprile a giugno; estate, da luglio a settembre; autunno, da ottobre a dicembre), $j = 1, \dots, 4$ e ε_{ijk} = errore residuo.

La significatività statistica delle differenze dei valori medi dei parametri riferiti alle quattro aziende conferenti è stata saggiata mediante il test di Bonferroni.

I risultati del test kappa hanno indotto la classificazione in due sole categorie: una classe ad alto contenuto di κ -caseina B (H- κ B) ed una classe a basso contenuto di κ -caseina B (L- κ B).

La nuova elaborazione è stata ottenuta mediante ANOVA univariata tramite software SPSS 19.0 impiegando il seguente modello:

$$Y_{ijk} = \mu + C_i + S_j + b_1x_{1ijk} + b_2x_{2ijk} + b_3x_{3ijk} + \varepsilon_{ijk}$$

dove: Y_{ijk} = variabile dipendente; μ = media generale; C_i = fattore fisso contenuto κ -caseina B (2 livelli : L- κ B, H- κ B), $i = 1, 2$; S_j = fattore fisso stagione (4 livelli: inverno, da gennaio a marzo; primavera, da aprile a giugno; estate, da luglio a settembre; autunno, da ottobre a dicembre), $j = 1, \dots, 4$; $b_{1,2,3}$ = coefficiente di regressione; $x_{1,2,3ijk}$ = covariate (grasso, caseina, rapporto grasso/caseina) e ε_{ijk} = errore residuo.

Anche in questo caso, la significatività statistica delle differenze dei valori medi dei parametri riferiti alle due classi è stata saggiata mediante il test di Bonferroni.

Infine sono stati simulati gli effetti dell'introduzione della κ -caseina B come nuovo parametro per una proposta di modifica del sistema di pagamento del latte a qualità.

La definizione dell'unità di misura e del peso da assegnare alla percentuale di κ -caseina B è stata una problematica piuttosto complessa da affrontare e di non facile soluzione perché: da una parte è stata riscontrata una sorta di dipendenza tra i fattori in gioco, dall'altra parte non si è voluto correre il rischio di premiare e pagare due volte lo stesso elemento ed inserire delle rigidità di calcolo che, variando la popolazione dei campioni di latte, potessero determinare distorsioni inaspettate (per esempio, assumere che la κ -caseina costituisca sempre il 13% della caseina presente).

Per questi motivi è stata cercata una strada alternativa, forse empirica, ma applicabile alle diverse situazioni: è stato misurato l'effetto additivo della κ -caseina B sulla resa. Utilizzando il subset proveniente dai dati riferito alle caldaie (L- κ B) e (H- κ B) sono state ricavate 3 formule di previsione di resa di trasformazione per forme a 24 ore, fuori sale e a 6 mesi di stagionatura. Il fine è stato quello di verificare se la resa stimata corrispondesse alla resa reale sia nei casi di latte (L- κ B) che di latte (H- κ B). Di seguito è riportata la formula di previsione:

$$\text{Resa stimata} = (\text{coeff.}_1 \times \text{grasso IR}) + (\text{coeff.}_2 \times \text{caseina IR}) + \text{coeff.}_3$$

I coefficienti sono riferiti al grado di maturazione delle forme di Parmigiano-Reggiano in accordo con Formaggioni (2004).

2.4.2– Risultati e Discussione

Di seguito sono riportati i parametri descrittivi (valore medio \pm deviazione standard, valore minimo e valore massimo) di ogni singolo parametro rilevato, riferiti al latte di massa (Tabella 2.5), al latte in caldaia (Tabella 2.6, 2.7) e al siero cotto (Tabella 2.8, 2.9). Nella Tabella 2.10 sono mostrati i valori dell'efficienza del processo di caseificazione.

Il latte di massa conferito in caseificio dai 4 allevamenti prescelti si è caratterizzato per valori dei parametri di composizione di base simili a quelli riportati da Summer *et al.*, (2007). Occorre precisare che molti dei valori minimi dei parametri di composizione di base sono relativi ad un campione che, in base all'analisi del punto crioscopico, è risultato essere annacquato ($-0,467$ °C nel latte di massa e $-0,490$ °C nel corrispondente latte in caldaia). Tale campione non è stato poi elaborato nella successiva analisi statistica.

Dei 48 campioni di latte di massa analizzati, nessuno è risultato essere anomalo, infatti, 10 sono risultati avere una coagulazione di tipo ottimale, 29 una coagulazione di tipo discreta e 9 una coagulazione di tipo lenta. Da specificare che su tre campioni di latte di massa ed un campione di latte in caldaia non è stato possibile determinare il valore k_{20} , in quanto il tracciato non ha raggiunto l'ampiezza di 20 mm entro 30 minuti dall'aggiunta del caglio.

I valori medi di conta microbica totale sono risultati essere mediamente bassi, anche se, in un caso, per quanto riguarda la conta microbica totale, è stato riscontrato un dato elevato, superiore a 100000 UFC/mL. Tra i valori medi riferiti al contenuto di cellule somatiche sono stati riscontrati in due casi valori superiori a 400000 Cell/mL. I valori del latte in caldaia testimoniano l'efficacia del fenomeno di debatterizzazione del latte associata alla risalita superficiale dei globuli di grasso nel corso della fase tecnologica di affioramento.

Il latte in caldaia si è caratterizzato per un contenuto medio di grasso piuttosto elevato, con un valore massimo pari a 3,50 g/100g e ciò potrebbe aver influito sull'elevato valore del rapporto grasso:caseina. Questo andamento, però, non sembra aver avuto ripercussioni né sul contenuto di grasso di siero cotto derivato dalla lavorazione del latte in caldaia, il cui valore massimo supera di poco il mezzo punto percentuale, né sulle perdite relative di grasso nel siero cotto, che sono risultate mediamente basse e caratterizzate da un'ampia variabilità.

Infatti, le perdite di lavorazione sono state di entità esigua ed in linea con quanto riportato da Franceschi *et al.* (2008) in uno studio condotto sul latte destinato alla lavorazione per Parmigiano-Reggiano.

La media corrispettiva al contenuto di cloruri del latte in caldaia, che esercita un'influenza negativa in termine di coagulazione presamica, è risultata bassa ed in linea con ricerche precedenti (Malacarne *et al.*, 2010).

Latte di massa: parametri chimici, chimico-fisici, reologici ed igienico-sanitari

Nella Tabella 2.11 sono riportati i risultati (medie ed errori standard) dei parametri analitici relativi al latte di massa delle quattro aziende conferenti, contraddistinto per un diverso contenuto di κ -caseina B, in ordine decrescente: "A₁", "A₂", "A₃" e "A₄".

I valori medi della κ -caseina B (mg/100 mL) sono risultati significativamente ($P < 0,001$) più alti nel latte A₁ rispetto ai conferenti A₂, A₃ e A₄ (0,34 vs 0,04-0,04-0,03; mg/100mL). Analoga differenza è stata riscontrata anche confrontando le percentuali di κ -caseina B sulla caseina totale, qui indicate con il nome convenzionale di "indice di κ -caseina B".

Per quanto riguarda i parametri chimici di base, il contenuto di grasso del latte A₁ è risultato significativamente ($P < 0,001$) più elevato rispetto a quello delle altre aziende (+10,66%, +8,1%, +9,5% rispettivamente). Anche i contenuti di proteina e di caseina sono risultati significativamente ($P < 0,001$) più elevati nel latte A₁; in questo caso però, sono stati riscontrati valori minori per il latte A₂ rispetto al latte A₃.

Considerando i parametri chimico-fisici e reologici, sono state riscontrate differenze significative tra il latte delle quattro aziende, ad esclusione del pH e del punto crioscopico. In particolare, l'acidità titolabile è risultata ($P < 0,001$) più alta nel latte A₁ (3,41 °SH/50mL) contro i 3,15 °SH/50mL di A₂, i 3,15 °SH/50mL di A₃ ed i 3,06 °SH/50mL di A₄. Il valore ottimale di acidità titolabile raggiunto dal latte A₁ appare legato, principalmente, al maggior contenuto di caseina e di fosforo.

Il tempo di coagulazione del latte A₁ è risultato ($P < 0,01$) minore rispetto al latte A₄, mentre i campioni di latte A₂ ed A₃ sono risultati statisticamente non differenti per questo parametro. Il tempo di rassodamento del coagulo ha fatto registrare ($P < 0,001$) il valore più basso (2,31 min) per il latte A₁ e quello più alto (5,39 min) per il latte A₄, mentre i latti A₂ ed A₃ hanno mostrato valori intermedi.

La consistenza del coagulo è risultata ($P < 0,001$) più elevata nel latte A₁ (36,86 mm); anche per questo parametro sono stati riscontrati valori significativamente maggiori rispetto al latte A₄.

I risultati ottenuti dalle analisi lattodinamografiche, quindi, hanno evidenziato per il latte A₁ un'ottima reattività al caglio e ne delineano un comportamento reologico che lo contraddistinguono rispetto a quelli del latte delle altre aziende. Il latte A₁ ha mostrato inoltre una maggiore ($P < 0,05$) densità rispetto al latte A₂ (+2,0%); il latte A₃ ed A₄ hanno evidenziato valori intermedi, non statisticamente diversi dalle altre categorie.

I parametri igienico-sanitari (carica batterica totale e spore di clostridi) hanno fatto registrare differenze non significative tra le quattro aziende. Il contenuto di cellule somatiche è risultato significativamente ($P < 0,01$) più basso in A₁ e A₃. Il latte conferito dalle quattro aziende ha riportato parametri microbiologici ed igienici di molto inferiori rispetto alla ricerca condotta Franceschi *et al.* (2012) su latte di stalle di collina e di pianura per Parmigiano-Reggiano. Le differenze sono dovute, probabilmente, ad una tendenziale migliore gestione e pulizia delle stalle analizzate nella presente ricerca.

La quantità di latte di massa considerata per ogni singola lavorazione (latte della mungitura della sera posto nelle vasche di affioramento mescolato con latte della mattina posto in caldaia) è risultata essere statisticamente più bassa nella lavorazione del latte A₁ rispetto alle altre tre aziende (-7,1%, -6,9%, -7,4%; $P < 0,001$).

La resa a 24 ore è risultata marcatamente ($P < 0,001$) più elevata per il latte A₁, rispetto a latte A₂, A₃, A₄ (+12,8%, +8,4%, +10,0%; rispettivamente). Tale differenza di resa si è riscontrata anche dopo l'estrazione delle forme dalla salamoia (+13,2%, +9,1%, +10,5%; $P < 0,001$) e a 6 mesi (+10,5%, +7,8%, +9,7%; $P < 0,001$). Diversamente, a 12 mesi la differenza non è risultata significativa; ciò è probabilmente legato al ridotto numero di forme che è stato possibile pesare a 12 mesi.

Latte in caldaia: parametri chimici e frazioni azotate

Nella Tabella 2.12 sono riportati i risultati (medie ed errori standard) dei parametri chimici e delle frazioni azotate del latte in caldaia, suddivisi per le quattro aziende.

Anche per questa matrice, come atteso, i valori medi della κ -caseina B (mg/100mL) sono risultati significativamente ($P < 0,001$) più alti nel latte A₁ rispetto agli altri conferenti e analoga differenza si è riscontrata anche nel confronto tra le percentuali di κ -caseina B sulla caseina totale.

Per quanto riguarda i parametri chimici di base, il contenuto di grasso del latte in caldaia è risultato significativamente non diverso tra le quattro aziende: esso, infatti, è principalmente condizionato dall'affioramento e dalla modalità di spillatura del latte magro. Il contenuto di lattosio, che nel complesso presenta una differenza significativa ($P < 0,001$), è risultato più elevato in A₁ e in A₃. Anche i valori di sostanza secca sono risultati più alti nel latte A₁, per i maggiori contenuti di proteina e di lattosio.

I lattici analizzati nella presente ricerca, per quanto riguarda i componenti di base (grasso e caseina), presentano un livello leggermente più elevato rispetto ai dati riportati da Colombari in uno studio condotto su latte destinato a Parmigiano-Reggiano, proveniente da allevamenti in provincia di Parma e Mantova (Colombari *et al.*, 2006).

Il latte A₁ è risultato inoltre caratterizzato, rispetto ad A₂, A₃ ed A₄, da un maggior contenuto in frazioni azotate: proteina (+15,1%, +11,3%, +13,0%; $P < 0,001$); caseina (+16,8%, +13,2%, +14,5%; $P < 0,001$); sieroproteina (+9,4%, +5,2%, +8,0%; $P < 0,001$); proteina non coagulabile (+11,3%, +9,0%, +9,0%; $P < 0,001$); paracaseina (+17,1%, +12,3%, +15,1%; $P < 0,001$); proteina vera (+17,1%, +12,3%, +14,5%; $P < 0,001$). Anche l'indice di caseina ed il rapporto grasso:caseina sono risultati più elevati nel latte A₁ mentre non è stata rilevata significatività per l'azoto non proteico e per l'indice di paracaseina.

Latte in caldaia: contenuti minerali

Nella Tabella 2.13 sono riportati i risultati (medie ed errori standard) dei contenuti minerali del latte in caldaia, suddivisi nelle quattro aziende.

Il latte A₁ si è caratterizzato per maggiore apporto minerale rispetto al latte A₂, A₃, A₄; nello specifico ha mostrato più elevati contenuti totali di calcio (+4,8%, +5,6%, +5,0%; $P < 0,001$ rispettivamente) e di fosforo (+12,5%, +11,4%, +14,6%; $P < 0,001$) e di magnesio (+4,3%, +11,0%, 8,2%; $P < 0,001$). Questi risultati si ripercuotono sul contenuto di ceneri, anch'esse più elevate nel latte A₁. I cloruri, al contrario, sono risultati significativamente ($P < 0,01$) più bassi nel latte A₁ e A₃ rispetto al latte A₄, dato peraltro in linea con quanto è stato riscontrato per il contenuto di cellule somatiche del latte di massa, vista la correlazione negativa che esiste tra questo parametro e il contenuto dei cloruri.

Valutando le ripartizioni dei minerali (equilibri salini), è stato possibile riscontrare che il calcio colloidale ed il fosforo colloidale sono risultati più elevati ($P < 0,001$) nel latte A₁ rispetto alle altre classi. Questo è dovuto, evidentemente, al maggiore contenuto di caseina, come confermato anche dal valore di fosforo della caseina (fosforo prostetico) e dal fatto

che il fosforo colloidale inorganico ha presentato differenze statisticamente non significative.

Il contenuto di fosforo solubile è risultato più elevato ($P < 0,001$) sempre nel latte A₁, così come i contenuti di calcio solubile ($P < 0,05$). Anche i contenuti di magnesio solubile e di magnesio colloidale sono stati rilevati superiori nel latte A₁, mentre, i valori più bassi, sono risultati, per entrambi i parametri, quelli dei latti A₃ e A₄. I contenuti di sodio e di potassio hanno evidenziato differenze non significative tra le quattro classi.

Latte in caldaia: proprietà chimico-fisiche e caratteristiche igienico-sanitarie

Nella Tabella 2.14 sono riportati i risultati (medie ed errori standard) delle proprietà chimico-fisiche e igienico-sanitarie del latte in caldaia, suddivisi nelle quattro aziende.

Per quanto riguarda i parametri chimico-fisici e tecnologici del latte, sono state riscontrate differenze significative tra le quattro aziende per tutti i parametri, ad esclusione del tempo di coagulazione e del punto crioscopico. In particolare, l'acidità titolabile è risultata significativamente ($P < 0,001$) più alta nel latte A₁ (3,44 °SH/50mL) rispetto ad A₂, A₃ e A₄ (3,15-3,17-3,06; °SH/50mL), dato analogo a quanto riscontrato per i latti di massa corrispondenti. Il tempo di rassodamento del coagulo ha fatto registrare ($P < 0,001$) i valori più bassi per i latti A₁, A₂ e A₃ e più alti per il latte A₄. La consistenza del coagulo è risultata significativamente ($P < 0,001$) più elevata in A₁ (43,03 mm) e A₂ (40,62 mm) e più bassa per il latte A₄, anche se quest'ultimo raggiunge ugualmente valori di a_{30} elevati se confrontati con lo studio di Malacarne *et al.* (2008).

Nel latte A₁ si è riscontrata, inoltre, una maggiore ($P < 0,01$) densità dovuta ai maggiori contenuti di proteina e di lattosio. I parametri igienico-sanitari (carica microbica totale e cellule somatiche) hanno fatto registrare differenze non significative tra le quattro classi; il contenuto di spore di clostridi, invece, è risultato significativamente diverso ($P < 0,05$), evidenziando valori più elevati per il latte A₃.

Siero cotto: parametri chimici, frazioni azotate e contenuti minerali

In Tabella 2.15 sono riportati i risultati (medie ed errori standard) di parametri chimici, frazioni azotate e contenuti minerali dei campioni di siero cotto, suddivisi nelle quattro aziende.

Per quanto riguarda i parametri chimici di base, il contenuto di grasso del siero cotto è risultato significativamente ($P<0,001$) più basso per il latte A₁ (0,28 g/100g) e più alto per il latte A₄ (0,43 g/100g); A₂ ed A₃ hanno mostrato valori intermedi e non diversi tra loro. Il contenuto di proteina del siero cotto è risultato significativamente ($P<0,001$) maggiore nel latte A₁ rispetto al latte altre aziende (+13,65; +8,7%, +9,7%; rispettivamente); stesso andamento ha evidenziato la proteina vera. La caseina residua nel siero ha fatto registrare differenze non significative, mentre la sieroproteina è risultata superiore nel latte A₁ (0,96 g/100g) ed inferiore nel latte A₂ (0,84 g/100g). Le differenze sono risultate non significative per l'azoto non proteico, per la sostanza secca, per le ceneri e per l'indice di caseina. Il contenuto di calcio totale è risultato non differente tra le classi, mentre il fosforo totale ha fatto registrare valori più elevati ($P<0,001$) nel latte A₁. Il magnesio totale ha evidenziato i valori più elevati ($P<0,001$) nei latt A₁ e A₂ e più bassi nel latte A₃. Il siero cotto derivato da tutte e quattro le caldaie ha riportato contenuti minerali maggiori rispetto ai risultati della ricerca di Formaggioni *et al.* (2005).

Rese riferite al latte in caldaia

Nella Tabella 2.16 sono riportati i risultati (medie ed errori standard) delle rese riferite al latte in caldaia, suddivisi nelle quattro aziende.

La resa a 24 ore è risultata marcatamente ($P<0,001$) più elevata per il latte A₁, rispetto alle altre classi (+13,4%, +9,1%, +10,8%; rispettivamente). Tale differenza di resa si è riscontrata anche per le forme “fuori sale“, ovvero appena estratte dalla salamoia. Per le forme a 12 mesi di stagionatura (8,19 vs 7,33-7,54-7,36; kg/100kg $P<0,05$), il minore livello di significatività è probabilmente da imputare al fatto che la resa a 12 mesi è stata misurata, come previsto dal piano sperimentale, solo relativamente alle prime 6 prove.

Perdite in caldaia

Nella Tabella 2.17 sono riportati i risultati (medie ed errori standard) delle perdite in caldaia, suddivisi nelle quattro classi.

Questi risultati hanno permesso di valutare, indirettamente, l'effetto della κ -caseina B sulle caratteristiche funzionali e strutturali del coagulo e sulla capacità della massa caseosa di trattenere sostanze utili nel corso del processo di caseificazione, ovvero, nello specifico, grasso, proteina e minerali.

È stato possibile riscontrare, infatti, che le perdite in grasso (fenomeno di slattamento) sono risultate significativamente più basse ($P < 0,001$) nel latte A₁ (-38%) rispetto al latte A₄, mentre per i latti A₂ ed A₃ sono stati riscontrati valori intermedi e non diversi tra loro. Anche le perdite in proteina sono risultate più basse ($P < 0,01$) nel latte A₁ (-4,4%) rispetto al latte A₄.

Conseguentemente, le perdite in sostanza secca e le polveri nel siero (curd-fines) sono risultate inferiori ($P < 0,001$; $P < 0,01$, rispettivamente) nel latte A₁.

Per quanto riguarda le perdite di minerali, si può riscontrare che il latte latte A₂ si scosta in modo significativo dagli altri latti, in senso peggiorativo, sia per quanto concerne la perdita di fosforo e sia per quanto concerne la perdita di ceneri. Le perdite di calcio e di magnesio hanno fatto registrare differenze non significative.

Tabella 2.5: Statistiche descrittive dei 48 campioni di latte di massa: parametri chimici, fisico-chimici, igienico-sanitari.

		N	Media	DS ¹	Minimo	Massimo
Lattosio IR	g/100g	48	4,89	0,30	4,30	6,76
Grasso IR	g/100g	48	3,49	0,23	3,06	4,14
Proteina IR	g/100g	48	3,37	0,22	2,83	3,90
Caseina IR	g/100g	48	2,64	0,19	2,07	3,07
Indice caseina	%	48	78,29	1,19	73,14	80,00
κ -caseina B	mg/100mL	48	0,11	0,13	0,02	0,39
Indice κ -caseina B	%	48	4,02	4,58	1,00	13,95
Urea	mg/100mL	48	27,26	2,37	21,10	33,80
Punto crioscopico	$\Delta^{\circ}\text{C}$	48	0,524	0,009	0,467	0,532
Densità	kg/L	48	1,0299	0,0014	1,0246	1,0329
pH	-	48	6,70	0,29	6,67	6,80
Acidità titolabile	$^{\circ}\text{SH}/50\text{mL}$	48	3,18	0,18	2,70	3,55
Tempo coagulazione (r)	min	48	19,51	2,20	15,75	25,00
Tempo rassodamento (k_{20})	min	48	3,71	1,45	1,75	7,00
Consistenza del coagulo (a_{30})	mm	48	29,51	6,39	17,02	45,96
Conta batterica totale	$10^3\text{UFC}/\text{mL}$	48	44	4	8	222
Cellule somatiche	$10^3\text{Cell}/\text{mL}$	48	217	97	97	575
Spore clostridi	Spore/L	48	86	26	36	200
Peso latte di massa (conferito)	kg	48	1114,33	42,89	954,93	1166,30

¹ Deviazione standard

Tabella 2.6: Statistiche descrittive dei 48 campioni di latte in caldaia: parametri chimici e frazioni azotate.

		N	Media	DS ¹	Minimo	Massimo
Sostanza secca	g/100g	48	12,09	± 0,50	10,95	13,34
Lattosio IR	g/100g	48	4,90	± 0,11	4,57	5,11
Grasso IR	g/100g	48	2,95	± 0,20	2,50	3,50
Proteina IR	g/100g	48	3,42	± 0,23	3,00	4,03
Caseina IR	g/100g	48	2,65	± 0,19	2,26	3,13
Proteina grezza (Nx6,38)	g/100g	48	3,39	± 0,24	2,82	3,95
Sieroproteina (Nx6,38)	g/100g	48	0,77	± 0,04	0,67	0,86
Caseina (Nx6,38)	g/100g	48	2,63	± 0,20	2,15	3,09
Indice di caseina	%	48	77,41	± 0,71	75,31	78,74
κ-caseina B	mg/100mL	48	0,125	± 0,145	0,020	0,450
Indice di κ-caseina B	%	48	4,45	± 4,93	0,79	15,94
Proteina non coagulabile (Nx6,38)	g/100g	48	0,92	± 0,06	0,80	1,07
Paracaseina (Nx6,38)	g/100g	48	2,47	± 0,19	2,02	2,94
Indice paracaseina	g/100g	48	72,73	± 1,03	70,87	75,19
Azoto non proteico (Nx6,38)	g/100g	48	0,18	± 0,03	0,10	0,22
Proteina vera (Nx6,38)	g/100g	48	3,21	± 0,24	2,66	3,80
Rapporto grasso:caseina	–	48	1,12	± 0,07	1,00	1,29
Peso del latte in caldaia	kg	48	1086,21	± 45,17	922,07	1141,38

¹ Deviazione standard

Tabella 2.7: Statistiche descrittive dei 48 campioni di latte in caldaia: contenuti minerali ed equilibri salini.

		N	Media	DS ¹	Minimo	Massimo
Ceneri	g/100g	48	0,73	± 0,02	0,67	0,80
Calcio totale	mg/100g	48	115,43	± 3,39	109,65	122,38
Calcio solubile	mg/100g	48	35,36	± 2,07	31,64	40,54
Calcio colloidale	mg/100g	48	80,07	± 2,94	75,06	85,74
Fosforo totale	mg/100g	48	92,74	± 6,28	84,25	109,27
Fosforo solubile	mg/100g	48	38,87	± 4,84	23,45	48,82
Fosforo acido solubile totale	mg/100g	48	70,12	± 5,47	61,27	83,64
Fosforo colloidale	mg/100g	48	52,07	± 4,11	44,11	62,99
Fosforo colloidale inorganico	mg/100g	48	31,26	± 4,07	21,94	43,39
Fosforo caseina (prostetico)	mg/100g	48	20,81	± 2,21	16,06	26,88
Magnesio totale	mg/100g	48	10,49	± 0,56	9,43	11,99
Magnesio solubile	mg/100g	48	7,91	± 0,42	7,10	9,08
Magnesio colloidale	mg/100g	48	2,58	± 0,17	2,31	2,93
Sodio	mg/100g	48	42,77	± 4,44	36,27	55,32
Potassio	mg/100g	48	145,18	± 5,59	131,37	154,97
Cloruri	mg/100g	48	95,42	± 3,11	88,85	105,52

¹ Deviazione standard

Tabella 2.8: Statistiche descrittive dei 48 campioni di latte in caldaia: parametri chimico-fisici, tecnologici e igienico-sanitari.

		N	Media	DS ¹	Minimo	Massimo
Punto crioscopico	Δ°C	48	0,523	± 0,005	0,490	0,530
Densità	kg/L	48	1,0312	± 0,0012	1,0289	1,0341
pH	–	48	6,74	± 0,03	6,67	6,80
Acidità titolabile	°SH/50mL	48	3,20	± 0,18	2,90	3,60
Tempo coagulazione (r)	min	48	19,60	± 1,61	16,25	24
Tempo rassodamento (k ₂₀)	min	48	2,90	± 1,39	1,75	7,50
Consistenza del coagulo (a ₃₀)	mm	48	35,85	± 8,61	18,44	51,86
Conta batterica totale	10 ³ UFC/mL	48	71	± 82	11	425
Cellule somatiche	10 ³ Cell/mL	48	156	± 187	55	1360
Spore clostridi	Spore/L	48	63	± 27	20	140

¹Deviazione standard

Tabella 2.9: Statistiche descrittive dei 48 campioni di siero cotto di fine lavorazione: parametri chimici e frazioni azotate.

		N	Media	DS ¹	Minimo	Massimo
Sostanza secca	g/100g	48	7,45	± 0,22	6,80	7,94
Grasso	g/100g	48	0,36	± 0,07	0,21	0,54
Proteina grezza (Nx6,38)	g/100g	48	0,93	± 0,06	0,80	1,08
Sieroproteina (Nx6,38)	g/100g	48	0,89	± 0,06	0,77	1,01
Caseina (Nx6,38)	g/100g	48	0,04	± 0,02	0,01	0,08
Indice di caseina	%	48	4,11	± 2,36	0,91	9,13
Azoto non proteico (Nx6,38)	g/100g	48	0,24	± 0,03	0,18	0,31
Proteina vera (Nx6,38)	g/100g	48	0,69	± 0,06	0,52	0,81
Ceneri	g/100g	48	0,54	± 0,01	0,52	0,57
Fosforo	mg/100g	48	46,76	± 3,47	40,68	54,32
Calcio	mg/100g	48	41,35	± 2,42	34,95	48,69
Magnesio	mg/100g	48	8,14	± 0,42	7,33	9,20
Polveri (curd fines)	mg/kg	48	112,43	± 47,58	10,27	231,83

¹Deviazione standard

Tabella 2.10: Statistiche descrittive dell'efficienza del processo di caseificazione di 48 lavorazioni: resa casearia e perdita di sostanze nel siero cotto.

		N	Media	DS ¹	Minimo	Massimo
Peso crema di affioramento	kg/100kg	48	5,09 ±	1,02	3,02	8,14
Resa a 24 ore del latte in caldaia	kg/100kg	48	8,62 ±	0,59	7,64	10,26
Resa fuori sale del latte in caldaia	kg/100kg	44	8,24 ±	0,57	7,35	9,90
Resa a 6 mesi del latte in caldaia	kg/100kg	48	7,71 ±	0,41	6,99	8,51
Resa a 12 mesi del latte in caldaia	kg/100kg	6	7,60 ±	0,41	7,10	8,20
Perdita sostanza secca	%	48	61,64 ±	1,75	57,16	65,36
Perdita grasso	%	48	12,18 ±	2,59	6,93	17,76
Perdita proteina	%	48	27,41 ±	1,07	25,16	31,14
Perdita caseina	%	48	1,46 ±	0,85	0,32	3,30
Perdita ceneri	%	48	74,54 ±	2,37	68,88	79,23
Perdita fosforo	%	48	50,42 ±	1,61	45,34	53,73
Perdita calcio	%	48	35,84 ±	2,11	31,11	43,42
Perdita magnesio	%	48	77,64 ±	0,85	76,13	79,71

¹ Deviazione standard

Tabella 2.11: Medie stimate ± Errore Standard dei campioni di latte di massa suddivisi per azienda: parametri chimici, chimico-fisici, reologici e igienico-sanitari.

	A ₁		A ₂		A ₃		A ₄		P
	Media	ES	Media	ES	Media	ES	Media	ES	
Lattosio IR	4,92	± 0,09	4,81	± 0,09	4,91	± 0,08	4,98	± 0,08	NS
Grasso IR	3,74	± 0,05	3,38	± 0,05	3,46	± 0,05	3,41	± 0,05	***
Proteina IR	3,68	± 0,03	3,21	± 0,03	3,35	± 0,03	3,28	± 0,03	***
Caseina IR	2,90	± 0,02	2,51	± 0,02	2,64	± 0,02	2,56	± 0,02	***
Indice caseina	78,65	± 0,26	78,07	± 0,27	78,80	± 0,26	78,06	± 0,26	NS
κ-caseina B	0,34	± 0,01	0,04	± 0,01	0,04	± 0,01	0,03	± 0,01	***
Indice κ-caseina B	11,74	± 0,26	1,39	± 0,27	1,65	± 0,26	1,34	± 0,26	***
Urea	27,53	± 0,71	26,87	± 0,74	27,41	± 0,71	27,03	± 0,71	NS
Punto crioscopico	0,526	± 0,001	0,525	± 0,001	0,524	± 0,001	0,525	± 0,001	NS
Densità	1,0308	± 0,0003	1,0294	± 0,0003	1,0300	± 0,0003	1,0298	± 0,0003	*
pH	6,72	± 0,09	6,74	± 0,09	6,75	± 0,09	6,59	± 0,09	NS
Acidità titolabile	3,41	± 0,03	3,15	± 0,03	3,15	± 0,03	3,06	± 0,03	***
Tempo coagulazione (r)	18,29	± 0,58	18,64	± 0,60	20,17	± 0,58	20,90	± 0,58	**
Tempo rassodamento (k ₂₀)	2,31	± 0,29	3,93	± 0,30	3,52	± 0,29	5,39	± 0,34	***
Consistenza del coagulo (a ₃₀)	36,86	± 1,26	28,52	± 1,32	29,37	± 1,26	23,69	± 1,26	***
Conta batterica totale	51	± 11	23	± 12	60	± 11	30	± 11	NS
Cellule somatiche	170	± 24	254	± 26	160	± 24	282	± 24	**
Spore clostridi	80	± 7	79	± 8	100	± 7	83	± 7	NS
Peso latte di massa (conferito)	1057,58	± 8,20	1132,74	± 8,56	1130,56	± 8,20	1135,68	± 8,20	***
Resa a 24 ore sul latte di massa	9,05	± 0,11	8,02	± 0,11	8,35	± 0,11	8,23	± 0,11	***
Resa fuori sale sul latte di massa	8,70	± 0,11	7,68	± 0,11	8,00	± 0,11	7,87	± 0,11	***
Resa a 6 mesi sul latte di massa	8,05	± 0,08	7,28	± 0,09	7,47	± 0,08	7,34	± 0,08	***
Resa a 12 mesi sul latte di massa	7,95	± 0,15	7,13	± 0,15	7,36	± 0,15	7,21	± 0,15	NS

NS, P>0,05; *, P<0,05; **, P<0,01; ***, P<0,001; a, b, c differiscono per P<0,05

Tabella 2.12: Medie stimate \pm Errore Standard dei campioni di latte in caldaia suddivisi per azienda: parametri chimici e frazioni azotate.

	A ₁		A ₂		A ₃		A ₄		P
	Media	ES	Media	ES	Media	ES	Media	ES	
Sostanza secca	12,62	b \pm 0,11	11,81	a \pm 0,11	12,13	a \pm 0,11	11,88	a \pm 0,11	***
Lattosio IR	4,98	b \pm 0,02	4,85	a \pm 0,02	4,95	b \pm 0,02	4,84	a \pm 0,02	***
Grasso IR	3,05	\pm 0,06	2,87	\pm 0,06	2,98	\pm 0,06	2,89	\pm 0,06	NS
Proteina grezza (Nx6,38)	3,73	b \pm 0,03	3,24	a \pm 0,03	3,35	a \pm 0,03	3,30	a \pm 0,03	***
Sieroproteina (Nx6,38)	0,81	b \pm 0,01	0,74	a \pm 0,01	0,77	a \pm 0,01	0,75	a \pm 0,01	***
Caseina (Nx6,38)	2,92	b \pm 0,03	2,50	a \pm 0,03	2,58	a \pm 0,03	2,55	a \pm 0,03	***
Indice di caseina	78,22	b \pm 0,15	77,13	a \pm 0,16	77,11	a \pm 0,15	77,26	a \pm 0,15	***
κ -caseina B	0,370	b \pm 0,007	0,043	a \pm 0,008	0,052	a \pm 0,007	0,035	a \pm 0,007	***
Indice κ -caseina B	12,72	b \pm 0,30	1,74	a \pm 0,31	2,00	a \pm 0,30	1,38	a \pm 0,30	***
Proteina non coagulabile (Nx6,38)	0,99	b \pm 0,01	0,89	a \pm 0,01	0,91	a \pm 0,01	0,91	a \pm 0,01	***
Paracaseina (Nx6,38)	2,74	b \pm 0,03	2,34	a \pm 0,03	2,44	a \pm 0,03	2,38	a \pm 0,03	***
Indice paracaseina	73,34	\pm 0,28	72,45	\pm 0,30	72,88	\pm 0,28	72,31	\pm 0,28	NS
Azoto non proteico (Nx6,38)	0,17	\pm 0,01	0,19	\pm 0,01	0,18	\pm 0,01	0,18	\pm 0,01	NS
Proteina vera (Nx6,38)	3,56	b \pm 0,03	3,04	a \pm 0,03	3,17	a \pm 0,03	3,11	a \pm 0,03	***
Rapporto grasso:caseina	1,05	b \pm 0,02	1,15	a \pm 0,02	1,16	a \pm 0,02	1,13	a \pm 0,02	***

NS, P>0,05; ***, P<0,001; a, b differiscono per P<0,05

Tabella 2.13: Medie stimate \pm Errore Standard dei campioni di latte in caldaia suddivisi per azienda: contenuti minerali ed equilibri salini.

	A ₁		A ₂		A ₃		A ₄		P
	Media	ES	Media	ES	Media	ES	Media	ES	
Ceneri	0,75	b \pm 0,01	0,71	a \pm 0,01	0,73	a \pm 0,01	0,72	a \pm 0,01	***
Calcio totale	119,78	b \pm 0,65	114,33	a \pm 0,68	113,37	a \pm 0,65	113,98	a \pm 0,65	***
Calcio solubile	36,72	\pm 0,55	35,62	\pm 0,57	34,74	\pm 0,55	34,69	\pm 0,55	*
Calcio colloidale	83,05	b \pm 0,65	78,71	a \pm 0,68	78,63	a \pm 0,65	79,29	a \pm 0,65	***
Fosforo totale	101,43	b \pm 1,03	89,44	a \pm 1,08	91,91	a \pm 1,03	88,47	a \pm 1,03	***
Fosforo solubile	44,02	b \pm 1,13	37,67	a \pm 1,18	37,79	a \pm 1,13	36,20	a \pm 1,13	***
Fosforo acido solubile totale	76,93	b \pm 1,07	67,38	a \pm 1,12	69,75	a \pm 1,07	66,37	a \pm 1,07	**
Fosforo colloidale	55,54	b \pm 1,05	50,02	a \pm 1,09	52,29	ab \pm 1,05	50,51	a \pm 1,05	**
Fosforo colloidale inorganico	32,91	\pm 1,16	29,71	\pm 1,24	31,96	\pm 1,16	30,18	\pm 1,16	NS
Fosforo caseina	22,63	b \pm 0,56	20,31	a \pm 0,58	20,33	a \pm 0,56	20,33	a \pm 0,56	**
Magnesio totale	11,09	c \pm 0,11	10,63	b \pm 0,12	9,99	a \pm 0,11	10,27	ab \pm 0,11	***
Magnesio solubile	8,31	c \pm 0,09	8,01	bc \pm 0,10	7,57	a \pm 0,09	7,75	ab \pm 0,09	***
Magnesio colloidale	2,78	c \pm 0,03	2,62	b \pm 0,03	2,42	a \pm 0,03	2,52	ab \pm 0,03	***
Sodio	43,26	\pm 1,25	43,15	\pm 1,31	40,89	\pm 1,25	44,32	\pm 1,25	NS
Potassio	144,65	\pm 1,58	144,67	\pm 1,65	146,88	\pm 1,58	145,48	\pm 1,58	NS
Cloruri	93,73	a \pm 0,78	96,65	ab \pm 0,81	93,71	a \pm 0,78	97,43	b \pm 0,78	**

NS, P>0,05; *, P<0,05; **, P<0,01; ***, P<0,001; a, b, c differiscono per P<0,05

Tabella 2.14: Medie stimate ± Errore Standard dei campioni di latte in caldaia suddivisi per azienda: parametri chimico-fisici, reologici e igienico-sanitari.

	A ₁		A ₂		A ₃		A ₄		P
	Media	ES	Media	ES	Media	ES	Media	ES	
Punto crioscopico	0,524	± 0,001	0,523	± 0,001	0,523	± 0,001	0,523	± 0,001	NS
Densità	1,0323	b ± 0,0003	1,0309	a ± 0,0003	1,0310	a ± 0,0003	1,0310	a ± 0,0003	**
pH	6,72	a ± 0,01	6,74	ab ± 0,01	6,74	ab ± 0,01	6,76	b ± 0,01	*
Acidità titolabile	3,44	b ± 0,03	3,15	a ± 0,03	3,17	a ± 0,03	3,06	a ± 0,03	****
Tempo coagulazione (r)	19,33	± 0,45	18,86	± 0,47	19,67	± 0,45	20,48	± 0,45	NS
Tempo rassodamento (k ₂₀)	2,00	a ± 0,30	2,30	a ± 0,31	2,98	a ± 0,30	4,69	b ± 0,34	****
Consistenza coagulo (a ₃₀)	43,03	c ± 1,66	40,62	bc ± 1,74	34,49	b ± 1,66	26,19	a ± 1,66	****
Conta batterica totale	61	± 21	45	± 22	113	± 23	45	± 23	NS
Cellule somatiche	106	± 53	266	± 55	100	± 53	157	± 53	NS
Spore clostridi	57	± 7	56	± 8	83	± 7	57	± 7	*

NS, P>0,05; *, P<0,05; **, P<0,01; ***, P<0,001; a, b, c differiscono per P<0,05

Tabella 2.15: Medie stimate ± Errore Standard dei campioni di siero cotto di fine lavorazione ottenuto da caseificazioni con latte in caldaia suddivisi per azienda: parametri chimici e frazioni azotate.

	A ₁		A ₂		A ₃		A ₄		P
	Media	ES	Media	ES	Media	ES	Media	ES	
Sostanza secca	7,57	± 0,06	7,39	± 0,06	7,43	± 0,06	7,46	± 0,06	NS
Grasso	0,28	a ± 0,01	0,35	b ± 0,02	0,37	b ± 0,01	0,43	c ± 0,01	***
Proteina grezza	1,00	b ± 0,01	0,88	a ± 0,01	0,92	a ± 0,01	0,92	a ± 0,01	***
(Nx6,38)									
Sieroproteina	0,96	c ± 0,01	0,84	a ± 0,01	0,89	b ± 0,01	0,88	ab ± 0,01	***
(Nx6,38)									
Caseina	0,04	± 0,01	0,04	± 0,01	0,03	± 0,01	0,04	± 0,01	NS
(Nx6,38)									
Indice di caseina	3,66	± 0,70	4,83	± 0,73	3,77	± 0,70	4,10	± 0,70	NS
%									
Azoto non proteico	0,24	± 0,01	0,24	± 0,01	0,24	± 0,01	0,24	± 0,01	NS
(Nx6,38)									
Proteina vera	0,76	b ± 0,01	0,64	a ± 0,01	0,68	a ± 0,01	0,68	a ± 0,01	***
(Nx6,38)									
Ceneri	0,54	± 0,01	0,55	± 0,01	0,54	± 0,01	0,54	± 0,01	NS
Calcio	42,17	± 0,68	42,14	± 0,71	40,18	± 0,68	41,11	± 0,68	NS
Fosforo	51,41	b ± 0,61	45,96	a ± 0,63	45,85	a ± 0,61	43,92	a ± 0,61	***
Magnesio	8,58	c ± 0,08	8,29	bc ± 0,09	7,74	a ± 0,08	7,98	ab ± 0,08	***

NS, P>0,05; ***, P<0,001; a, b, c differiscono per P<0,05

Tabella 2.16: Medie stimate ± Errore Standard della resa casearia e delle perdite di sostanze nel siero per caseificazioni suddivise per azienda.

	A ₁		A ₂		A ₃		A ₄		P
	Media	ES	Media	ES	Media	ES	Media	ES	
Peso latte in caldaia	1026,09	b ± 8,55	1103,57	a ± 8,93	1104,64	a ± 8,55	1109,51	a ± 8,55	***
Peso crema di affioramento	6,11	b ± 0,24	5,17	ab ± 0,25	4,57	a ± 0,24	4,58	a ± 0,24	**
Resa a 24 ore del latte in caldaia	9,33	b ± 0,12	8,23	a ± 0,12	8,55	a ± 0,12	8,42	a ± 0,12	***
Resa fuori sale del latte in caldaia	8,93	b ± 0,12	7,89	a ± 0,13	8,15	a ± 0,12	8,04	a ± 0,12	***
Resa a 6 mesi del latte in caldaia	8,27	b ± 0,08	7,47	a ± 0,09	7,65	a ± 0,08	7,51	a ± 0,08	***
Resa a 12 mesi del latte in caldaia	8,19	b ± 0,15	7,33	a ± 0,15	7,54	a ± 0,15	7,36	a ± 0,15	*
Perdita sostanza secca	59,97	a ± 0,40	62,53	b ± 0,42	61,31	ab ± 0,40	62,80	b ± 0,40	***
Perdita grasso	9,18	a ± 0,48	12,15	b ± 0,50	12,38	b ± 0,48	14,81	c ± 0,48	***
Perdita proteina	26,71	a ± 0,24	27,19	ab ± 0,25	27,48	ab ± 0,24	27,93	b ± 0,24	**
Perdita caseina	1,25	± 0,25	1,72	± 0,26	1,33	± 0,25	1,48	± 0,25	NS
Polveri (curd fines)	85,05	a ± 12,18	151,88	b ± 12,72	103,22	ab ± 12,18	117,00	ab ± 12,18	**
Perdita ceneri	72,26	a ± 0,52	76,73	c ± 0,54	74,53	b ± 0,52	74,56	b ± 0,52	***
Perdita fosforo	50,72	ab ± 0,44	51,40	b ± 0,45	49,88	ab ± 0,44	49,64	a ± 0,44	*
Perdita calcio	35,19	± 0,60	36,88	± 0,63	35,45	± 0,60	36,08	± 0,60	NS
Perdita magnesio	77,31	± 0,24	77,98	± 0,50	77,51	± 0,24	77,71	± 0,24	NS

NS, P>0,05; *, P<0,05; **, P<0,01; ***, P<0,001; a, b, c differiscono per P<0,05

In considerazione dei risultati ottenuti con l'analisi statistica suddivisa per le quattro classi corrispondenti alle quattro aziende conferenti, che mostrano le differenze maggiori tra il latte A₁, caratterizzato da un alto valore di κ -caseina B, ed i latti A₂, A₃, A₄, caratterizzati da valori più bassi e statisticamente non differenti di κ -caseina B, si è ritenuto opportuno effettuare anche una elaborazione statistica considerando solo due classi, che si differenziano, appunto, per contenuti di κ -caseina B. Queste sono state denominate con l'acronimo L- κ B per definire i campioni di latte a basso contenuto di κ -caseina B ed H- κ B per definire i campioni ad elevato contenuto di κ -caseina B.

L- κ B vs H- κ B: parametri chimici, fisico-chimici, reologici ed igienico sanitari del latte di massa

Nella Tabella 2.17 sono riportati i risultati (medie stimate ed errori standard) dei parametri chimici, fisico-chimici, reologici ed igienico sanitari del latte di massa.

I valori medi di κ -caseina B (mg/100mL) delle classi L- κ B e H- κ B sono risultati, rispettivamente, 0,037 e 0,339 mg/100mL di latte.

Il latte di allevamento H- κ B, rispetto a quello L- κ B, è caratterizzato da un maggiore valore percentuale di κ -caseina B sulla caseina totale, qui indicato come “indice di κ -caseina B”. Inoltre, esso si contraddistingue per un contenuto maggiore ($P < 0,001$) di grasso, di proteina e di caseina (+1,4%, +20,0%, +12,2%). Entrambe le classi presentano dati in linea e proporzionali ai valori medi che identificano il latte di tipo κ -caseina BB (Alipanah *et al.*, 2007).

Tra i parametri chimico-fisici considerati, solo il pH non ha mostrato differenze statisticamente significative tra il latte H- κ B e quello L- κ B. In particolare il latte H- κ B ha mostrato un valore di acidità titolabile più elevato ed idoneo alla caseificazione (Franceschi *et al.*, 2012). Inoltre, il latte H- κ B ha presentato migliori caratteristiche di coagulazione presamica: più veloci tempistiche di coagulazione e di rassodamento ed una maggiore consistenza del coagulo misurata dopo 30 minuti dall'aggiunta del caglio. Ancora, il latte H- κ B è caratterizzato da un punto crioscopico inferiore rispetto al latte L- κ B, anche se è da notare che pur raggiungendo la significatività statistica, la differenza è da considerarsi esigua ed i valori rientrano tra i minimi ed i massimi riportati in letteratura da Radeljević *et al.* (2012).

Tra i parametri igienico sanitari, solo le cellule somatiche hanno mostrato una differenza statisticamente significativa tra le due classi. Il latte H-κB, infatti, ha evidenziato un minore contenuto in cellule somatiche. Anche in questo caso, entrambi i valori sono al di sotto del limite legale.

L-κB vs H-κB: parametri chimici, fisico-chimici ed igienico sanitari del latte in caldaia

Nella Tabella 2.18 sono mostrati i valori (medie stimate ed errore standard) dei parametri chimici, fisico-chimici igienico sanitari del latte in caldaia L-κB ed H-κB.

Il latte in caldaia H-κB è caratterizzato, rispetto a L-κB, per un più elevato contenuto di κ-caseina B ed un più elevato valore dell'indice di κ-caseina B.

Inoltre, rispetto al latte L-κB, il latte in caldaia H-κB si è contraddistinto per valori più elevati di sostanza secca, grasso, proteina grezza, sieroproteina, caseina, proteina non coagulabile, paracaseina, proteina vera, indice di caseina e paracaseina. Il rapporto grasso:caseina è risultato maggiore nel latte H-κB rispetto a quello L-κB; il valore del primo, inoltre, è da ritenersi elevato e superiore all'intervallo ritenuto ideale (1-1,1) per la produzione del Parmigiano-Reggiano (Franceschi *et al.*, 2008).

L-κB vs H-κB: contenuto minerale ed equilibri salini del latte in caldaia

Nella Tabella 2.19 sono mostrati i risultati (medie stimate ed errore standard) dei parametri riferiti al contenuto minerale dei latti in caldaia L-κB ed H-κB.

Per quanto riguarda le frazioni minerali, il latte in caldaia H-κB ha mostrato un più elevato valore di ceneri e maggiori contenuti di calcio, di fosforo, e di magnesio (+5,2%, +18,7%, +7,8%) nonché un più basso contenuto di cloruri (-5,7%). Quest'ultimo parametro è da mettersi in relazione al minore contenuto di cellule somatiche del latte di massa H-κB.

Oltre ai più elevati contenuti di minerali totali, il latte in caldaia H-κB ha evidenziato un più elevato contenuto delle quote colloidali di calcio, di fosforo e di magnesio, e un più elevato valore di fosforo della caseina. Questo dato è da mettere in relazione al maggiore contenuto di caseina del latte di massa H-κB.

I maggiori contenuti di caseina e di fosforo del latte in caldaia H-κB giustificano il più elevato valore di acidità titolabile del latte ed, inoltre, tali differenze sono da mettere in relazione anche con i più idonei valori dei parametri di coagulazione presamica (tempo di rassodamento e consistenza del coagulo) che hanno contraddistinto tale latte.

L-κB vs H-κB: parametri chimici del siero cotto

Nella Tabella 2.20 sono mostrati i risultati (medie stimate ed errore standard) dei parametri chimici del siero cotto di fine lavorazione ottenuto da latte in caldaia L-κB e H-κB.

Il siero cotto prelevato dalle lavorazioni del latte in caldaia H-κB si è caratterizzato, rispetto a quello ottenuto da latte in caldaia L-κB, per più elevati valori di sostanza secca, proteina grezza, sieroproteina, proteina vera, fosforo e magnesio e per un minore contenuto di grasso.

L-κB vs H-κB: resa del latte in caldaia e perdite di lavorazione del siero cotto

Nella Tabella 2.21 sono mostrati i risultati (medie stimate ed errore standard) dei parametri di resa casearia e di perdite di sostanze nel siero cotto di fine lavorazione del latte in caldaia L-κB e di quello derivato dal latte in caldaia H-κB.

Ai più elevati valori di sostanza secca, proteina grezza e caseina del siero cotto del latte in caldaia H-κB hanno fatto riscontro valori più bassi di perdite di caseificazione degli stessi parametri. Inoltre, il siero cotto derivato H-κB, rispetto a quello L-κB, si è caratterizzato per una minore presenza di particelle di cagliata perse sotto forma di polveri (curd-fines).

La resa è risultata marcatamente ($P < 0,001$) più elevata per il latte H-κB per i tre stadi di maturazione: a 24 ore, fuori sale e a 6 mesi di stagionatura (+8,7%, +8,8%, +11,1%; rispettivamente). Anche per le forme a 12 mesi di stagionatura la resa è risultata maggiore ($P < 0,01$) per il latte H-κB (+10,5%). Il minore livello di significatività è probabilmente da imputare alla inferiorità dei dati elaborati, dal momento che la resa a 12 mesi è stata misurata, come previsto dal piano sperimentale, solo relativamente alle prime 6 prove.

Le elaborazioni dei risultati ottenuti in caseificio hanno permesso di mettere a punto una proposta di metodologia per il pagamento qualità del latte che utilizzi, fra i parametri di calcolo, la percentuale di κ-caseina B.

A tal fine, innanzitutto, è stata definita l'unità di misura ed il peso da assegnare alla percentuale di κ-caseina B; inoltre, l'elaborazioni statistiche hanno stimato l'incidenza di questo elemento sulla resa e su tutti gli altri parametri di qualità compresi nel sistema di pagamento. In questo modo, eventuali scostamenti per difetto (sottostima) sono stati considerati come indice di effetto additivo sulla resa. La variabilità di tale indice è risultata essere legata in modo dipendente alle differenti percentuali di κ-caseina B ed in modo indipendente alla quantità di caseina presente nel latte in lavorazione.

Di seguito vengono illustrati i risultati ottenuti dalla pesatura delle forme a 24 ore, dopo l'estrazione dalla salamoia e a 6 mesi di stagionatura.

Resa stimata vs resa reale a 24 ore

$$\text{Resa stimata} = (1,323 \times \text{grasso IR}) + (1,436 \times \text{caseina IR}) + 0,860.$$

Per ricavare questa formula è stato utilizzato il subset di dati riferito a latte in caldaia L-κB.

La resa stimata media e la resa misurata sono risultate del medesimo valore, pari a 8,41 kg/100kg.

Applicando questa formula di previsione della resa ai dati di caseina IR e grasso IR di latte di caldaia H-κB è stata ottenuta una resa media stimata di 9,09 kg/100kg mentre la resa misurata è risultata di 9,33 kg/100kg.

La differenza tra la resa misurata H-κB e la resa stimata H-κB è risultata positiva in tutte le caseificazioni, con un valore medio pari a 0,24 kg/100kg. La formula, perciò, ha dimostrato di sottostimare la resa in corrispondenza di elevati contenuti di κ-caseina B nel latte in caldaia.

È stata quindi ricavata la differenza esistente fra la caseina effettivamente presente e quella che sarebbe stata “necessaria” per arrivare alla medesima quota di resa misurata, utilizzando la formula della resa stimata.

Il latte H-κB, caratterizzato da un contenuto medio di caseina pari a 2,92 g/100g, fornisce una resa in formaggio Parmigiano-Reggiano pari a quelle di un latte L-κB (che corrisponde alla tipologia di latte comunemente diffusa nel comprensorio) con un contenuto di caseina pari a 3,08 g/100g (differenza di 0,17 g/100g, pari a circa il 5,7% di caseina in più). Tale effetto additivo sulla resa è attribuibile alla presenza di elevati contenuti di κ-caseina B.

Resa stimata vs resa reale all'estrazione dalla salamoia (fuori sale)

$$\text{Resa stimata} = (1,244 \times \text{grasso IR}) + (1,374 \times \text{caseina IR}) + 0,893$$

Per ricavare questa formula è stato utilizzato il subset di dati riferito a latte in caldaia L-κB.

La resa stimata media ed la resa misurata sono risultate pari a 8,05 kg/100kg. Applicando questa formula di previsione della resa ai dati di caseina IR e grasso IR del latte in caldaia H-κB è stata calcolata una resa media stimata di 8,70 kg/100kg ed una resa misurata pari a 8,97 kg/100kg.

Anche in questo caso le differenze per singole caseificazioni sono risultate sempre positive e la media di queste differenze ricavata è stata pari a 0,27 kg/100kg. La formula ha dimostrato di sottostimare la resa in corrispondenza di elevati contenuti di κ -caseina B.

Inoltre, è stato calcolato il quantitativo di caseina corrispondente a questa differenza di resa. Il latte H- κ B, caratterizzato da un contenuto medio di caseina pari a 2,92 g/100g, fornisce una resa in formaggio Parmigiano-Reggiano pari a quelle di un latte L- κ B (che corrisponde alla tipologia di latte comunemente diffusa nel comprensorio) con un contenuto di caseina pari a 3,08 g/100g (differenza di 0,20 g/100g, pari a circa il 6,62% di caseina in più). Tale effetto additivo sulla resa è attribuibile alla presenza di elevati contenuti di κ -caseina B.

Resa stimata vs resa reale a 6 mesi

$$\text{Resa stimata} = (1,446 \times \text{grasso IR}) + (1,216 \times \text{caseina IR}) + 0,382$$

Per ricavare questa formula è stato utilizzato il subset di dati riferito a latte in caldaia L- κ B. La resa stimata media e la resa misurata sono risultate pari a 7,70 kg/100kg.

Applicando questa formula di previsione della resa ai dati di caseina IR e grasso IR al latte in caldaia H- κ B è stata calcolata una resa media stimata di 8,32 kg/100kg ed una resa misurata di 8,57 kg/100kg. Così come nei due casi precedenti, le differenze per singole caseificazioni sono risultate positive e la media ottenuta da queste differenze è risultata pari a 0,25 kg/100kg e la formula ha dimostrato di sottostimare la resa in corrispondenza di elevati contenuti di κ -caseina B.

Anche per questo scenario è stato calcolato il quantitativo di caseina corrispondente a questa differenza di resa. Il latte H- κ B, caratterizzato da un contenuto medio di caseina pari a 2,92 g/100g, fornisce una resa in formaggio Parmigiano-Reggiano pari a quelle di un latte L- κ B (che corrisponde alla tipologia di latte comunemente diffusa nel comprensorio) con un contenuto di caseina pari a 3,13 g/100g (differenza di 0,21 g/100g, pari a circa il 7,13% di caseina in più). Tale effetto additivo sulla resa è attribuibile alla presenza di elevati contenuti di κ -caseina B.

In Tabella 2.23 sono riportati a confronto i risultati riferiti al calcolo delle rese stimate e delle rese misurate corrispettivi ai latti in caldaia L- κ B e H- κ B.

Il latte H- κ B ha mostrato rendere mediamente circa il 10% in più rispetto al latte L- κ B: il diverso contenuto di caseina e grasso ha spiegato solo il 68% circa della differenza di resa tra latte H- κ B e latte L- κ B.

Tabella 2.17: Medie stimate \pm Errore Standard dei latti di massa (L- κ B) ed (H- κ B): parametri chimici, chimico-fisici, reologici ed igienico-sanitari.

		L- κ B		H- κ B		P
		Media	ES	Media	ES	
Lattosio IR	g/100g	4,90	\pm 0,05	4,92	\pm 0,08	NS
Grasso IR	g/100g	3,42	\pm 0,03	3,74	\pm 0,05	***
Proteina IR	g/100g	3,28	\pm 0,02	3,68	\pm 0,03	***
Caseina IR	g/100g	2,57	\pm 0,02	2,90	\pm 0,03	***
Indice caseina	%	78,31	\pm 0,16	78,65	\pm 0,27	NS
κ -caseina B	mg/100mL	0,037	\pm 0,004	0,339	\pm 0,006	***
Indice κ -caseina B	%	1,46	\pm 0,15	11,74	\pm 0,25	***
Urea	mg/100mL	27,11	\pm 0,41	27,53	\pm 0,69	NS
Punto crioscopico	$\Delta^\circ\text{C}$	0,524	\pm 0,001	0,526	\pm 0,001	*
Densità	kg/L	1,0298	\pm 0,0002	1,0308	\pm 0,0003	**
pH	–	6,69	\pm 0,05	6,72	\pm 0,09	NS
Acidità titolabile	$^\circ\text{SH}/50\text{mL}$	3,12	\pm 0,02	3,41	\pm 0,03	***
Tempo coagulazione (r)	min	19,94	\pm 0,36	18,29	\pm 0,61	*
Tempo rassodamento (k_{20})	min	4,19	\pm 0,21	2,31	\pm 0,34	***
Consistenza del coagulo (a_{30})	mm	27,15	\pm 0,81	36,86	\pm 1,39	***
Conta batterica totale	$10^3\text{UFC}/\text{mL}$	38	\pm 7	51	\pm 12	NS
Cellule somatiche	$10^3\text{Cellule}/\text{mL}$	231	\pm 16	170	\pm 27	*
Spore clostridi	Spore/L	88	\pm 5	80	\pm 8	NS

NS, $P>0,05$; *, $P<0,05$; **, $P<0,01$; ***, $P<0,001$ Tabella 2.18: Medie stimate \pm Errore Standard dei latti in caldaia (L- κ B) ed (H- κ B): parametri chimici e frazioni azotate.

		L- κ B		H- κ B		P
		Media	ES	Media	ES	
Sostanza secca	g/100g	11,94	\pm 0,06	12,57	\pm 0,11	***
Lattosio IR	g/100g	4,88	\pm 0,01	5,00	\pm 0,03	**
Grasso IR	g/100g	2,92	\pm 0,03	2,96	\pm 0,06	*
Proteina grezza (Nx6,38)	g/100g	3,30	\pm 0,02	3,66	\pm 0,03	***
Sieroproteina (Nx6,38)	g/100g	0,75	\pm 0,01	0,81	\pm 0,01	***
Caseina (Nx6,38)	g/100g	2,54	\pm 0,02	2,85	\pm 0,03	***
Indice di caseina	%	77,16	\pm 0,09	77,99	\pm 0,15	***
κ -caseina B	mg/100mL	0,043	\pm 0,004	0,38	\pm 0,007	***
Indice κ -caseina B	%	1,71	\pm 0,18	13,22	\pm 0,30	***
Proteina non coagulabile (Nx6,38)	g/100g	0,90	\pm 0,01	0,99	\pm 0,01	***
Paracaseina (Nx6,38)	g/100g	2,39	\pm 0,02	2,67	\pm 0,03	***
Indice paracaseina	g/100g	72,55	\pm 0,17	72,91	\pm 0,28	*
N non proteico (Nx6,38)	g/100g	0,19	\pm 0,01	0,17	\pm 0,01	NS
Proteina vera (Nx6,38)	g/100g	3,11	\pm 0,02	3,49	\pm 0,03	***
Rapporto grasso:caseina	–	1,15	\pm 0,01	1,04	\pm 0,02	***

NS, $P>0,05$; *, $P<0,05$; **, $P<0,01$; ***, $P<0,001$

Tabella 2.19: Medie stimate \pm Errore Standard dei latti in caldaia (L-κB) ed (H-κB): contenuti minerali ed equilibri salini.

		L-κB		H-κB		P
		Media	ES	Media	ES	
Ceneri	g/100g	0,72	\pm 0,01	0,74	\pm 0,01	***
Calcio totale	mg/100g	113,88	\pm 0,38	119,78	\pm 0,65	***
Calcio solubile	mg/100g	35,00	\pm 0,32	36,72	\pm 0,55	**
Calcio colloidale	mg/100g	78,88	\pm 0,37	83,05	\pm 0,64	***
Fosforo totale	mg/100g	89,96	\pm 0,63	106,79	\pm 1,08	***
Fosforo solubile	mg/100g	37,21	\pm 0,65	47,62	\pm 1,12	***
Fosforo acido solubile totale	mg/100g	67,85	\pm 0,65	82,93	\pm 1,11	***
Fosforo colloidale	mg/100g	50,96	\pm 0,62	57,36	\pm 1,05	**
Fosforo colloidale inorganico	mg/100g	30,64	\pm 0,68	35,31	\pm 1,16	NS
Fosforo caseina	mg/100g	20,32	\pm 0,32	22,05	\pm 0,54	**
Magnesio totale	mg/100g	10,29	\pm 0,75	11,09	\pm 0,13	***
Magnesio solubile	mg/100g	7,77	\pm 0,06	8,31	\pm 0,10	***
Magnesio colloidale	mg/100g	2,52	\pm 0,02	2,75	\pm 0,04	***
Sodio	mg/100g	42,78	\pm 0,75	47,62	\pm 1,28	NS
Potassio	mg/100g	145,71	\pm 0,91	147,61	\pm 1,56	NS
Cloruri	mg/100g	95,91	\pm 0,51	89,64	\pm 0,86	*

NS, P>0,05; *, P<0,05; **, P<0,01; ***, P<0,001

Tabella 2.20: Medie stimate \pm Errore Standard dei latti in caldaia (L-κB) ed (H-κB): parametri chimico-fisici, reologici e igienico-sanitari.

		L-κB		H-κB		P
		Media	ES	Media	ES	
Punto crioscopico	$\Delta^{\circ}\text{C}$	0,523	\pm 0,001	0,525	\pm 0,001	NS
Densità	kg/L	1,031	\pm 0,001	1,033	\pm 0,001	***
pH	-	6,75	\pm 0,01	6,75	\pm 0,01	*
Acidità titolabile	$^{\circ}\text{SH}/50\text{mL}$	3,12	\pm 0,02	3,45	\pm 0,03	***
Tempo coagulazione (r)	min	19,69	\pm 0,28	20,25	\pm 0,47	NS
Tempo rassodamento (k_{20})	min	3,23	\pm 0,23	2,00	\pm 0,38	**
Consistenza coagulo (a_{30})	mm	33,57	\pm 1,29	43,02	\pm 2,21	**
Conta batterica totale	$10^3\text{UFC}/\text{mL}$	68	\pm 13	41	\pm 22	NS
Cellule somatiche	$10^3\text{Cellule}/\text{mL}$	171	\pm 32	69	\pm 55	NS
Spore clostridi	Spore/L	66	\pm 5	55	\pm 8	NS

NS, P>0,05; *, P<0,05; **, P<0,01; ***, P<0,001

Tabella 2.21: Medie stimate \pm Errore Standard del siero cotto di fine lavorazione ottenuto da latte in caldaia (L-B) ed (H-κB): parametri chimici e frazioni azotate.

		L-κB		H-κB		P
		Media	ES	Media	ES	
Sostanza secca	g/100g	7,42	\pm 0,03	7,57	\pm 0,06	*
Grasso	g/100g	0,38	\pm 0,01	0,28	\pm 0,02	***
Proteina grezza (Nx6,38)	g/100g	0,91	\pm 0,01	1,00	\pm 0,01	***
Sieroproteina (Nx6,38)	g/100g	0,87	\pm 0,01	0,96	\pm 0,01	***
Caseina (Nx6,38)	g/100g	0,04	\pm 0,01	0,04	\pm 0,01	NS
Indice caseina	%	4,22	\pm 0,40	3,66	\pm 0,69	NS
N non proteico (Nx6,38)	g/100g	0,24	\pm 0,01	0,24	\pm 0,01	NS
Proteina vera (Nx6,38)	g/100g	0,67	\pm 0,01	0,76	\pm 0,01	***
Ceneri	g/100g	0,54	\pm 0,01	0,54	\pm 0,01	NS
Calcio	mg/100g	41,11	\pm 0,41	42,17	\pm 0,70	NS
Fosforo	mg/100g	45,22	\pm 0,37	51,41	\pm 0,64	***
Magnesio	mg/100g	7,99	\pm 0,06	8,58	\pm 0,09	***

NS, P>0,05; *, P<0,05; ***, P<0,001

Tabella 2.22: Medie stimate \pm Errore Standard dell'efficienza del processo di caseificazione con i lattini in caldaia (L-κB) ed (H-κB): resa casearia e perdita di sostanze nel siero cotto.

		L-κB		H-κB		P
		Media	ES	Media	ES	
Peso latte in caldaia	kg	1106,25	\pm 4,80	1026,09	\pm 8,31	***
Peso crema di affioramento	kg/100kg	4,76	\pm 0,14	6,03	\pm 0,24	***
Resa a 24 ore del latte in caldaia	kg/100kg	8,41	\pm 0,07	9,14	\pm 0,12	***
Resa fuori sale del latte in caldaia	kg/100kg	8,03	\pm 0,07	8,76	\pm 0,12	***
Resa a 6 mesi del latte in caldaia	kg/100kg	7,55	\pm 0,05	8,39	\pm 0,08	***
Resa a 12 mesi del latte in caldaia	kg/100kg	7,41	\pm 0,08	8,19	\pm 0,14	**
Perdita sostanza secca	%	62,20	\pm 0,25	59,97	\pm 0,43	***
Perdita grasso	%	13,14	\pm 0,33	9,18	\pm 0,56	***
Perdita proteina	%	27,54	\pm 0,14	26,71	\pm 0,25	**
Perdita caseina	%	1,50	\pm 0,14	1,25	\pm 0,25	NS
Polveri (curd fines)	mg/kg	123,23	\pm 7,59	85,05	\pm 12,97	*
Perdita ceneri	%	75,23	\pm 0,33	72,26	\pm 0,57	***
Perdita fosforo	%	50,27	\pm 0,27	50,72	\pm 0,47	NS
Perdita calcio	%	36,11	\pm 0,35	35,19	\pm 0,61	NS
Perdita magnesio	%	77,72	\pm 0,14	77,31	\pm 0,24	NS

NS, P>0,05; *, P<0,05; **, P<0,01; ***, P<0,001

Tabella 2.23: Resa stimata vs resa misurata dei latti in caldaia (L-κB) ed (H-κB) corrispondente ai quattro stadi di maturazione (24 ore, fuori sale, 6 mesi e 12 mesi di stagionatura).

	Latte caldaia (L-κB) ¹	Latte caldaia (H-κB) ¹	Resa misurata – Resa stimata (latte H-κB) ¹	Effetto additivo sulla resa (latte H-κB) ²
Resa stimata 24 ore	8,41	9,09		
Resa pesata 24 ore	8,41	9,33	0,24	5,70
Resa stimata fuori sale	8,05	8,70		
Resa pesata fuori sale	8,05	8,97	0,27	6,62
Resa stimata 6 mesi	7,70	8,32		
Resa pesata 6 mesi	7,70	8,57	0,21	7,13

¹ espresso in kg/100kg di latte utilizzato

² espresso in termini di % di caseina

Conclusioni

Capitolo III: Conclusioni

Dalla prima ricerca, dal titolo “Studio dell’effetto razza sul contenuto minerale e sugli equilibri salini del latte e le proprietà di caseificazione”, il latte di razza Bianca Val Padana si caratterizza per un elevato contenuto di caseina, di calcio totale e di fosforo. Queste caratteristiche, unite ad un ottimo grado di acidità titolabile, indurrebbero a considerare il latte della BVP, almeno in via potenziale, un latte con una buona attitudine alla coagulazione presamica. Tuttavia, esso presenta valori dei parametri reologici non ottimali e ciò potrebbe essere spiegato dal basso valore del rapporto tra minerali e caseina. Tale caratteristica potrebbe determinare la formazione di una micella di caseina scarsamente mineralizzata, aspetto che porterebbe alla formazione di un coagulo di tipo farinoso. Si tratta di un elemento distintivo del latte della Bianca Val Padana rispetto a quello della razza Frisona, questo ultimo invece contraddistinto da un coagulo gelatinoso, più idoneo alla trasformazione casearia, anche se meno ricco in caseina e in minerali.

I risultati ottenuti dalla seconda ricerca, dal titolo “Valutazione dell’influenza del contenuto in κ -caseina B sulla resa in formaggio Parmigiano-Reggiano”, mostrano che il latte in caldaia A₁ abbia, nel complesso, una ottimale attitudine alla trasformazione in formaggio Parmigiano-Reggiano. Rispetto al latte A₂, A₃, A₄, esso si contraddistingue per maggiori contenuti di caseina e per una ottimale attitudine alla coagulazione presamica, con particolare riferimento alla fase secondaria del processo di coagulazione, vale a dire l’aggregazione delle micelle di paracaseina. Tali differenze sono alla base della diversa efficienza di trasformazione in Parmigiano-Reggiano osservata nel presente lavoro. Infatti, nel corso della caseificazione, il latte A₁ ha riportato minori perdite di sostanze utili nel siero cotto di fine lavorazione, con particolare riferimento al grasso. La resa casearia a 24 ore, ad 1 mese fuori sale, ed a 6 mesi di stagionatura è risultata maggiore di circa 1 kg per ogni 100 kg di latte utilizzato.

La suddivisione in due classi H- κ B e L- κ B conferma i precedenti risultati: il latte in caldaia della classe H- κ B si distingue per maggiori quantitativi di proteina e di caseina. Non disponendo dei dati relativi alla composizione del formaggio (determinazione non prevista dal piano sperimentale) per calcolare correttamente l’efficienza di trasformazione, sono state considerate le perdite in caldaia di caseina e di grasso. Dai dati emerge che, indipendentemente dal contenuto effettivo di caseina totale presente in caldaia, il siero di fine lavorazione L- κ B mostra maggiori perdite di grasso e di proteina e di minerali e il siero cotto

H-κB si caratterizza per una minore presenza di particelle di cagliata perse sotto forma di polveri (curd-fines).

Infine, i risultati, ottenuti dalle simulazioni degli effetti dell'introduzione del parametro "κ-caseina B", attraverso l'utilizzo di formule predittive di resa di trasformazione, evidenziano sottostime in corrispondenza di elevati contenuti di κ-caseina B. Tali differenze mostrano in maniera concreta e quantificabile quanto il "valore aggiunto" dato dalla presenza di elevate percentuali di κ-caseina B sia rilevante per la resa casearia. Soprattutto dimostrano che, tenendo in considerazione unicamente il parametro caseina, non sia possibile dare una giusta interpretazione delle reali potenzialità di caseificazione del latte e di conseguenza una idonea classificazione e retribuzione in termini di pagamento latte a qualità.

Bibliografia

Bibliografia

Letteratura riferita all'Introduzione

- Anema S.G. (1997). *The effects of chymosin on κ -casein-coated polystyrene late particles and bovine casein micelles*. International Dairy Journal, 7, 553-558.
- Annibaldi S., Nanni M. (1979). *Osservazioni preliminari sulla microstruttura del formaggio Parmigiano-Reggiano*. Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia, 30, 191-194.
- Aschaffenburg R. (1968). *Genetic variants of milk proteins: their breed distribution*. Journal Dairy Research, 35, 447-452.
- Amigo L., Martin-Alvarez P.J., Garcia-Muro E., Zarazaga I. (2001). *Effect of milk protein haplotypes on the composition and technological properties of Fleckvieh bovine milk*. Milchwissenschaft, 56, 488-491.
- Aoki T., Kako Y., Imamura T. (1986). *Separation of casein aggregates cross-linked by colloidal calcium phosphate from bovine casein micelles by high performance gel chromatography in the presence of urea*. Journal Dairy Research, 53, 53-59.
- Auldism M., Mullins C., O'Brien B., O' Kennedy B.T., Guinee T. (2002). *Effect of cow breed on milk coagulation properties*. Milchwissenschaft, 57, 140-143.
- Auldism M., Johnston K.A., White N.J., Fitzsimans W.P., Boland J. (2004). *A comparison of the composition, coagulation characteristics and cheesemaking capacity of milk from Friesian and Jersey dairy cows*. Journal Dairy Research, 71, 51-57.
- Bacci C., Pari A., Brindani F. (2002). *Ruolo di Clostridium spp. In alterazioni del Parmigiano-Reggiano riconducibili a gonfiore tardivo*. Annali Facoltà Medicina Veterinaria, Università di Parma, 22, 221-231.
- Barbano D.M., Rasmussen R.R., Lynch J.M. (1991). *Influence of milk somatic cell count and milk age on cheese yield*. Journal of Dairy Science, 74, 369-373.
- Battistotti B., Corradini C. (1993). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol. II., Major Cheese Groups, 221-243, (Ed. P. F. Fox). Chapman & Hall, London, UK.
- Bettini T.M., Masina P. (1972). *Proteine e polimorfismo proteico del latte vaccino*. Produzione Animale, 11, 107-111.
- Bittante G., Marusi M., Cesarini F., Pavinelli M., Cassandro M. (2002). *Genetic analysis on rennet-coagulation ability in Italian Holstein cows*. Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Montpellier, France, 19-23 August.
- Bobe G., Beitz D.C., Freeman A.E., Lindberg G.L. (1999). *Effect of milk protein genotypes on milk protein composition and its genetic parameter estimates*. Journal of Dairy Science, 82, 2797-2804.
- Boettcher P.J., Caroli A., Stella A., Chessa S., Budelli E., Canavesi F., Ghiroldi S., Pagnacco G. (2004). *Effects of casein haplotypes on production traits in Italian Holstein and Brown cattle*. Journal of Dairy Science, 87, 4311-4317.
- Borchers K.B. (1985). *The importance of the chemical composition and microbiological quality of milk*. Sevarac Annual Cheesemakers Symp, South Africa, 11-27.
- Bottazzi V. (1983). *Clostridi e fermentazioni butirriche dei formaggi*. Indicatore Latte, 19, 3-5.
- Bottazzi V., Battistotti B., Bertozzi L. (1995). *La qualità del latte crudo per la produzione di formaggi duri a lunga stagionatura*. Workshop "La certificazione dei prodotti alimentari: il caso del latte", 289-308, (Ed. G. Piva & G. Enne), Il Mulino, Bologna.
- Calamari L., Maianti M.G., Bertoni G., Chiarini A. (1995). *Acidità e attitudine alla coagulazione del latte in funzione della fermentiscibilità degli alimenti*. Progetto

- Finalizzato a Moderne Strategie Lattiero-Casearie. Relazione terzo anno di attività, 45-48. Ed. Tecniche Nuove, Milano.
- Carlson A., Hill C.G. Jr., Olson N.F. (1987). *The kinetics of milk coagulation: IV. The kinetics of the gel-firming process*. Biotechnology and Bioengineering, 29, 612-624.
 - Caroli A., Bolla P., Budelli E., Barbieri G., Leone P. (2000). *Effect of kappa -casein E allele on clotting aptitude of Italian Friesian milk*. Zootecnica Nutrizione Animale, 26, 127-130.
 - Caroli A., Chessa S., Balla P., Budelli E., Gandini G.C. (2004). *Genetic structure of milk protein polymorphisms and effects on milk production traits in a local dairy cattle*. Journal of Animal Breeding and Genetics, 121, 119-127.
 - Caroli A., Chessa S., Erhardt G.J. (2009). *Milk protein polymorphisms cattle: effect on animal breeding and human nutrition*. Journal of Dairy Science, 92, 5335-5352.
 - Cassandro M., Comin A., Ojala M., Zotto R., De Marchi M., De Gallo L., Carniere P., Bittante G. (2008). *Genetic parameters of milk coagulation properties and their relationships with milk yield and qualità traits in Italian Holstein cows*. Journal of Dairy Science, 91, 371-376.
 - Coker C.J., Creamer L.K., Burr R.G., Hill J.P. (1997). *The action of chymosin or plasmin on α_{s1} -casein A, B and C*. Seminar, Palmerston North, New Zealand, International Dairy Federation, Brussel, 175-181.
 - Colin O., Laurent F., Vignon B. (1992). *Variations du rendement fromager en pâte molle: relation avec la composition chimique du lait et les paramètres de la coagulation*. Lait, 72, 307-319.
 - Colombari G., Allegretti A., Melani D., Bettoni B., Pecorari M. (2005). *Sviluppo di spore di clostridi nel terreno, negli alimernti zootecnici, nelle feci e nel latte di allevamenti a diverso livello evolutivo in area Parmigiano-Reggiano*. Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia, 57, 571-591.
 - Comberg G. (1967). *New investigations on the mineral content of bovine milk*. Disch Tieraztl Wochenschr, 74, 613-616.
 - Comin A., Cassandro M., Chessa S., Ojala M., Zotto R., De Marchi M., De Carnier P., Gallo L., Pagnacco G., Bittante G. (2008). *Effects of composite beta - and kappa -casein genotypes on milk coagulation, quality, and yield traits in Italian Holstein cows*. J. Dairy Sci., 91 (10), 4022-4027.
 - Corradini C., Pettinau M. (1972). *Possibili riflessi tecnologici del polimorfismo delle caseine*. Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia, 23, 243-253.
 - Corradini C., Battistotti V. (1973). *Indagine elettroforetica della progressiva idrolisi delle proteine durante la maturazione del formaggio Montasio*. Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia, 24, 11-15.
 - Corradini C. (1995). *Chimica e Tecnologia del Latte*. Edizione Tecniche Nuove, Milano.
 - Coulon J.B., Hurtaud C., Remond B., Verité R. (1998). *Factors contributing to variation in the proportion of casein in cows' milk true protein*. Productions Animales, 11, 299-310.
 - Creamer L.K. (1974). *Preparation of α_{s1} -casein*. Journal of Dairy Science, 57, 341-344.
 - Dall'Olio S., Davoli R., Mariani P., Summer A., Tirelli A., Milc J., Russo V. (2001). *Composizione chimica e ripartizione delle caseine e delle sieroproteine del latte di vacche di razza frisona italiana con diverso genotipo per il polimorfismo +15 del gene α -lattoalbumina*. Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia, 52, 115-126.
 - Davoli R., Dall'Olio S., Russo V. (1990). *Effect of kappa -casein genotype on the coagulation properties of milk*. Journal of Animal Breeding and Genetics, 107, 458-464.
 - De Marchi M., Zotto R., Cassandro M., Bittante G. (2007). *Milk coagulation ability of five dairy cattle breeds*. Journal of Dairy Science, 90, 3986-3992.

- Decelles G.A. Jr. (1967). *Investigation of the casinate-phosphate-calcium complexes as they exist naturally in milk*. Abstract, Section B, 28, 1295.
- Delacroix-Buchet A. e Marie C. (1994). *Comparaison des variants A et C de la caséine beta; des laits de vaches Tarentaises en modèle fromager de type Beaufort. Aptitudes fromagères et rendements en frais*. Lait, 74, 343-360.
- Dewan R.K., Chudgar A., Bloomfield V.A., Morr C.V. (1974). *Size distribution and solvation of casein micelles in milk containing α_{s1} -casein A*. Journal of Dairy Science, 57, 394-398.
- Di Stato L. (1983). *Indagine elettroforetica sulle razze bovine Modicana e Cinesara mediante l'analisi dei sistemi proteici del latte*. Rivista Zootecnica Veterinaria, 11, 70-74.
- Ferretti L, Leone P, Sgaramella V. (1990). *Long range restriction analysis of the bovine casein genes*. Nucleic Acids Research, 18, 6829-6833.
- FitzGerald R.J., Walsh D., Guinee T.P., Murphy J.J., Mehra R., Harrington D., Connolly J.F. (1998). *Genetic variants of milk proteins and their association with milk production and processing properties*. Dairy Products Research Centre, 19, 2-11.
- Formaggioni P., Franceschi P., Summer A., Malacarne M., Fieni S., Mariani P. (2002). *Effetti della stagione e dell'allevamento sul contenuto di proteoso-peptoni del latte e rapporti con le caratteristiche di coagulazione*. Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia 53, 53-58.
- Fox P.F e Brodtkorb A. (2008). *The casein micelle: historical aspects, current concepts and significance*. Dairy Journal, 18, 677-684.
- Franceschi P., Formaggioni P., Malacarne M., Summer A., Fieni S., Mariani P. (2003). *Variazioni delle frazioni azotate, proteolisi e caratteristiche di coagulazione di lattici con differente contenuto di cellule somatiche*. Scienze e Tecniche Lattiero-Casearie, 54, 301-305.
- Green M.L., Hobbs D.G., Morant S.V., Hill V.A. (1978). *Intermicellar relationships in rennet-treated separated milk*. Journal Dairy Research, 45, 413-422.
- Grosclaude F. (1974). *Analyse génétique et biochimique du polymorphisme électrophoretique des caseines α_{s1} , β , et κ chez les bovins (*Bos taurus*) et les Zebù (*Bos indicus*)*. Thèse Doctorat d'Etat-ès-Sciences, Université Paris VII.
- Grosclaude F. (1988). *Le polymorphisme génétique des principales lactoprotéines bovines. Relations avec la quantité, la composition et les aptitudes fromagères du lait*. INRA Production Animales, 1, 5-17.
- Hallen E., Allmere T., Noslund J., Audreu A., Lunden A. (2007). *Effect of genetic polymorphism of milk proteins on rheology of chymosin induced milk gel*. International Dairy Journal, 17, 791-799.
- Hartung H., Gernand E. (1997). *Investigation about cheese yielding capacity in relation to casein-polymorphism*. Archive für Tierzucht, 40, 305-308.
- Heck J.M., Schennink L., van Valemberg A., Bovenhuis H., Visker M.H.P.W., van Arendonk, J.A.M., van Hooijdonk A.C.M. (2009). *Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk*. Journal of Dairy Science, 92, 1192-1202.
- Holt C. e Muir D.D. (1978). *Natural variations in the average size of bovine casein micelles*. Journal Dairy Research, 45, 347-353.
- Hossain M. A. (1974). *Genetic variants of milk protein and their importance in dairying*. Milchwirtschaft, 26, 17-21.
- Ikonen T., Ojala M., Syvaioja E. (1997). *Effects of composite casein and β -lactoglobulin genotypes on renneting properties composition of bovine milk by assuming on animal model*. Agricultural and Food Science in Finland, 6, 283-294.

- Ikonen T., Ahlfors K., Kempe R., Ojala M., Ruottinen O. (1999). *Genetic parameters for the milk coagulation properties and prevalence of non-coagulating milk in Finnish dairy cows*. Journal of Dairy Science, 82, 205-214.
- Jakob E. (1993). *Relationships between genetic polymorphism of milk proteins and the rennetability of milk*. Thesis ETH, Zürich, 10224, XIII, 220.
- Jann O.C., Ibeagha-Awemu E.M., Ozbeyoz C., Zaragozza P., Williams J.L., Ajmone-Marson P., Lenstra J.A., Moazami-Goudarzi K., Erhardt G. (2004). *Geographic distribution of haplotype diversity of the bovine casein locus*. Genetics, Selection, Evolution, 36:2, 243-257.
- Keating A.F., Davoren P., Smith T.J., Ross R.P., Cairns M.T. (2007). *Bovine κ -casein gene promoter haplotypes with potential implications for milk protein expression*. Journal of Dairy Science, 90:9, 4092-4099.
- Kitchen B.J. (1981). *Review of the progress of dairy science: bovine mastitis: milk compositionals changes and related diagnostic tests*. Journal Dairy Research, 48, 167-171.
- Law A.J.R., Leaver J., Banks J.M., Horne D.S. (1994). *The effect of κ -casein genotype on the composition of whole casein*. International Dairy Federation, Brussels, Belgium, 9402, 134-141.
- Lenoir J. e Schneid N. (1984). *L'aptitude du lait à la coagulation par la présure*. Le Fromage, 139-149. Technique et Documentation (Lavoisier), Paris.
- Lodes A., Krause I., Buchberger J., Aumann J., Klostermeyer H. (1996). *The influence of genetic variants of milk proteins on the compositional and technological properties of milk. II. Rennet coagulation time and firmness of the rennet curd*. Milchwissenschaft, 51, 543-548.
- Losi G. e Mariani P. (1984). *Significato tecnologico del polimorfismo delle proteine del latte nella caseificazione a formaggio grana*. Industria del Latte, 20, 23- 53.
- Lucey J., Kelly J. (1994). *Cheese yield*. Journal Society Dairy Technology, 47, 1-8.
- Lucey J.A., Johnson M.E., Horne D.S. (2003). *Perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese*. Journal of Dairy Science, 86, 2725-2743.
- Lundén A., Nilsson M., Janson L. (1997). *Marked effect of β -lactoglobulin polymorphism on the ratio of casein to total protein in milk*. Journal of Dairy Science, 80, 2996-3005.
- Macheboeuf D., Coulon J.B., D'Hour P. (1993). *Effect of breed, protein genetic variants and feeding on cows' milk coagulation properties*. Journal Dairy Research, 60, 43-54.
- Malacarne M., Pecorari M., Sandri S., Summer A., Sgorlon S., Stefanon B., Mariani P. (2003). *Rapporti tra contenuto di cellule somatiche del latte, proporzioni delle caseine, attitudine alla coagulazione presamica e difetti di struttura del Parmigiano-Reggiano*. Atti della Società Italiana di Buiatria, XXXVI, 59-71.
- Malacarne, M., Summer A., Fossa E., Formaggioni P., Franceschi P., Pecorari M., Mariani P. (2006). *Composition, coagulation properties and Parmigiano-Reggiano cheese yield of Italian Brown and Italian Friesian herd milks*. Journal Dairy Research. 73, 171-177.
- Malacarne M., Summer A., Franceschi P., Formaggioni P., Sabbioni A., Superchi P., Mariani P. (2010). *Effects of phenotypic combination of protein on some processing properties of milk*. Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia, 61, 67-79.
- Mariani P., Colajacomo A. (1971). *Caseificazione del latte delle razze Reggiana e Frisone: aspetti tecnologici, resa e caratteristiche dei sieri e dei formaggi*. Rivista Zootecnica Veterinaria, 44, 207-212.
- Mariani P. (1973). *Correlazione fra le caratteristiche del latte nelle razze Reggiana e Frisone*. Rivista Zootecnica Veterinaria, 1, 459-463.

- Mariani P., Losi G., Russo V., Castagnetti G.B., Grazia L., Morini D., Fossa E. (1976). *Prove di caseificazione con latte caratterizzato dalle varianti A e B della κ -caseina nella produzione del formaggio Parmigiano-Reggiano*. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 27, 208-227.
- Mariani P., Russo V. (1976). *Ricerche sul contenuto di calcio e fosforo nel latte delle razze Frisona, Bruna alpina, Reggiana e Modenese*. *Rivista Zootecnica Veterinaria*, 4, 23-28.
- Mariani P., Morini D., Losi G., Castagnetti G.P., Fossa E., Russo V. (1979). *Ripartizione delle frazioni azotate del latte in vacche caratterizzate da genotipo diverso nel locus β -lattoglobulina*. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 30, 153-176.
- Mariani P. (1982). *Rapporti tra acidimetria e tempo di coagulazione del latte in quattro razze bovine*. *Annali Facoltà Medicina Veterinaria, Università di Parma*, 2, 197-208.
- Mariani P. (1983). *Genetica e qualità del latte per la caseificazione*. *Obiettivi Documenti Veterinaria*, 9, 25-30.
- Mariani P. (1985). *Osservazioni sul contenuto e la ripartizione dei principali costituenti del sistema micellare del latte in quattro razze bovine*. *Annali Facoltà Medicina Veterinaria, Università di Parma*, 5, 173-183.
- Mariani P., Meazza M., Resmini P., Paganì M.A., Pecorari M., Fossa E. (1986). *Osservazioni su tipi di beta-caseina e caratteristiche di coagulazione del latte*. *L'Industria del Latte*, 22, 35-58.
- Mariani P. e Pecorari M. (1987). *Fattori genetici, attitudine alla caseificazione e resa in formaggio*. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 38, 286-289.
- Mariani P., Bonatti P., Pecorari M. (1988). *Rennet coagulation properties of cow milk in relation to α_{s1} -casein genotype*. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 39, 431-438.
- Mariani P. (1989). *Variazioni delle caseina e delle frazioni colloidali e di fosforo, calcio, magnesio e acido citrico nel latte bovino in rapporto alla stagione di produzione e al periodo di lattazione*. *Annali Facoltà Medicina Veterinaria, Università di Parma*, 9, 303-318.
- Mariani P., Pecorari M. (1991). *Il ruolo delle varianti genetiche della κ -caseina nella produzione del formaggio*. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 42, 255-285.
- Mariani P., Zanzucchi G., Bonatti P., Fossa E., Pecorari M. (1992). *Caratteristiche di coagulazione del latte in rapporto al tipo genetico della beta-caseina in vacche di razza bruna*. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 43, 7-17.
- Mariani P., Anghinetti A., Serventi P., Fossa E. (1993). *Frazionamento della caseina mediante RP-HPLC: sulla osservazione di alcuni lattini individuali caratterizzati da una bassa proporzione di α_{s1} -caseina in vacche di razza Bruna*. *L'Industria del Latte*, 29, 75-85.
- Mariani P., Summer A., Anghinetti A., Senese C., Di Gregorio P., Rando A., Serventi P. (1995). *Effetti dell'allele α_{s1} -Cn G sulla ripartizione percentuale delle caseine α_{s1} , α_{s2} , β e κ in vacche di razza Bruna*. *L'Industria del Latte*, 31, 3-13.
- Mariani P., Zanzucchi G., Summer A., Senese C., Rando A., Masina P., Pecorari M. (1996). *Effects of the α_{s1} Cn-G allele on the main characteristics and nitrogen fractions of milk from Italian Brown cows*. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 47, 245-260.
- Mariani P., Summer A., Rando A., Fossa E., Serventi P. (1996). *N-acetylneuraminic acid content of casein in Italian Brown cows with different genotypes at the casein κ -casein locus*. *Annali Facoltà Medicina Veterinaria, Università di Parma*, 16, 83-95.
- Mariani P., Serventi P., Fossa E. (1997). *Contenuto di caseina, varianti genetiche ed attitudine tecnologico-casearia del latte delle vacche di razza Bruna nella produzione del formaggio grana*. *La Razza Bruna Italiana*, 37, 8-14.

- Mariani P. e Summer A. (1999). *Polimorfismo delle proteine ed attitudine tecnologico-casearia del latte*. Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia, 50, 197-230.
- Mariani P., Summer A., Formaggioni P., Malacarne M., Battistotti B. (2001). *Rilievi sui principali requisiti tecnologico-caseari del latte per la produzione di formaggio grana*. Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia, 52, 49-91.
- Martin B. e Coulon J.B. (1995). *Facteurs de production du lait et caractéristiques des fromages. I. Influence des facteurs de production sur l'aptitude à la coagulation des laits de troupeaux*. Lait, 75, 61-80.
- Marziali A.S., Ng-Kwai-Hang K.F. (1986). *Relationships between milk protein polymorphism and cheese yielding capacity*. Journal of Dairy Science, 69, 1193-1201.
- McGann T.C.A. e Pyne G.T. (1960). *The colloidal phosphate of milk*. Journal Dairy Research, 27, 403-417.
- McGann T.C.A., Buchheim W., Kearney R.D., Richardson T. (1983). *Composition and ultrastructure of calcium phosphate-citrate complexes in bovine milk systems*. Biochimica et Biophysica Acta Journal, 760, 415-420.
- Mehaia M.A., Cheryan M. (1983). *The secondary phase of milk coagulation: effect of calcium, pH, and temperature on clotting activity*. Milchwissenschaft, 38, 137-140.
- Ménard J.L., Chouteau Y., Denieul F. (1986). *Influence du polymorphisme génétique de deux protéines du lait de vache (β -lactoglobuline, κ -caséine) sur sa composition et son aptitude fromagère*. Rapport École Supérieure d'Agriculture d'Angers, 120.
- Mistry V., Brouk Bruk., Kaspersen K., Martin E. (2002). *Cheddar cheese from milk of Holstein and Brown Swiss cows*. Milchwissenschaft, 57, 19-23.
- Mitchell G.E., Fedrick I.A., Rogers S.A. (1986). *The relationship between somatic cell count, composition and manufacturing properties of bulk milk*. Journal Dairy Technology, 41, 12-18.
- Molina L.H., Benovides T., Brito C., Carillo B., Molina I. (2006). *Relationships between A and B variants of κ -casein and β -lactoglobulin and coagulation properties of milk*. International of Dairy Technology, 59:3, 188-191.
- Morini D., Losi G., Castagnetti G.B., Mariani P. (1979). *Prove di caseificazione con latte caratterizzato dalle varianti A e B della κ -caseina: rilievi sul formaggio stagionato*. Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia, 30, 243-262.
- Ng-Kwai-Hang K.F., Hayes J.F., Moxley J.E., Monardes H.G. (1986). *Relationships between milk protein polymorphism and major milk constituents in Holstein-Friesian cows*. Journal of Dairy Science, 69, 22-26.
- Ng-Kwai-Hang K., Dodds C., Boland M., Auldism M.J. (2002). *The influence of genetic variants of beta-lactoglobulin on gelation speed and firmness of rennet curd*. Milchwissenschaft, 57, 267-269.
- Oloffs K., Schulte-Coerne H., Pabst K., Gravert H.O. (1992). *The significance of protein variants for genetic differences in cheesemaking properties of milk*. Züchtungskunde, 64, 20-26.
- Panari G. e Pecorari M. (2004). *Peculiarità qualitative e sicurezza igienica del Parmigiano-Reggiano*. Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia, 55, 443-448.
- Patel R.S. e Reuter H. (1986). *Effect of sodium, calcium and phosphate on properties of rennet coagulation milk*. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, 19, 288-291.
- Pearce M.J., Linklater P.M., Hall R.J., Mackinlay A.G. (1986). *Effect of casein micelle composition and casein dephosphorylation on coagulation and syneresis*. Journal Dairy Research, 53, 381-385.

- Pecorari M. (1984). *Osservazioni sul rapporto fra tecnologie di alimentazione e gonfiore butirrico nel formaggio*. Incontro di studio moderni sistemi di foraggio e qualità casearia del latte, Reggio Emilia, 7 maggio.
- Pecorari M., Mariani P. (1990). *Caseina, attitudine alla coagulazione del latte, resa e qualità del formaggio*. Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia, 41, 225-244.
- Pecorari M., Fossa E., Sandri S., Tedeschi G., Pellegrino L., Mariani P. (1995). *Ruolo del contenuto in caseina del latte nella produzione del Parmigiano-Reggiano: resa, composizione chimica, proteolisi, lipolisi, e caratteristiche organolettiche del formaggio stagionato*. Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia, 46, 221-232.
- Pierre A., Michel F., Le Graët Y. (1995). *Variation in size of goat milk casein micelles related to casein genotype*. Lait, 75, 489-502.
- Pierre A., Michel F., Le Graët Y., Zahoute L. (1995). *Casein micelle size in relation with casein composition and α_1 , α_2 , β and k casein contents in goat milk*. Lait, 78, 591-605.
- Plowman J.E., Creamer L.K., Smith M.H., Hill J.P. (1997). *Restrained molecular dynamics investigation of the differences in association of chymosin to κ -caseins A and C*. Journal Dairy Research, 64, 299-304.
- Puhani Z., Jakob E. (1994). *Genetic variants of milk proteins and cheese yield*. International Dairy Federation, Brussel, 9402, 111-122.
- Rahali V., Ménard J.L. (1991). *Influence des variants génétiques de la beta-lactoglobuline et de la κ -caséine sur la composition du lait et son aptitude fromagère*. Lait, 71, 275-297.
- Rando A., Di Gregorio P., Ramunno L., Mariani P., Fiorella A., Senese C., Marletta D., Masina P. (1998). *Characterization of the CSN1A^G of the bovine α_{s1} -casein locus by the insertion of a relict of a long interspersed element*. Journal of Dairy Science, 82, 1735-1742.
- Reinart A. e Nesbitt J.M. (1956). *The composition of milk in Manitoba*. XIVth International Dairy Congress, 1, 946-950.
- Remeuf F. (1993). *Lactoprotéines caprines et aptitudes technologiques. Influence du polymorphisme génétique de la caséine α_1 caprine sur les caractéristiques physico-chimiques et technologiques du lait*. Lait, 73, 549-557.
- Resmini P., Volonterio G., Annibaldi S. (1971). *Alcune caratteristiche chimiche e chimico-fisiche di lattici destinati alla produzione di formaggio Parmigiano-Reggiano*. Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia, 22, 63-66.
- Robertson N. H. e Dixon A. (1967). *The influence of certain milk salts, their relative ratios and their ratios to total nitrogen on the heat stability of milk in the winter rainfall region*. Journal of Agricultural Science and Technology, 10, 909-914.
- Rollema H.S. (1992). *Casein association and micelle formation*. In *Advanced dairy chemistry*, vol I, 111-140 (Ed. P. F. Fox) Elsevier Applied Science, London, UK.
- Russo V. (1975). *Polimorfismo delle proteine del latte e possibilità di utilizzazione zootecnica*. Il Mondo del Latte, 29, 296-304.
- Russo V., Mariani P. (1978). *Polimorfismo delle proteine del latte e relazioni tra varianti genetiche e caratteristiche di interesse zootecnico, tecnologico e caseario*. Rivista Zootecnica Veterinaria, 6, 289-290 e 365-367.
- Sala G., De Noni I., Pagani M. A., Mariani P., Rando A. (1995). *Alcune caratteristiche delle micelle caseiniche in lattici individuali con bassa proporzione di α_{s1} caseina*. Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia, 46, 290-300.
- Salder A.M., Kiddy C.A., McCann R.E., Mattingly W.A. (1968). *Acid production and curd toughness in milks of different α_{s1} -casein type*. Journal of Dairy Science, 51, 28-30.

- Sandri S., Tosi F., Mariani M., Summer A., Pecorari M. (2008). *Influenza delle cellule somatiche sull'attitudine casearia del latte*. I Congresso Lattiero-Caseario Bologna 12 giugno.
- Schaar J., Hansson B., Pettersson H.E. (1985). *Effects of genetic variants of κ -casein and beta-lactoglobulin on cheesemaking*. Journal Dairy Research, 52, 429-437.
- Schmidt D.G. (1980). *Colloidal aspects of casein*. Netherland Milk Dairy Journal, 34, 42-64.
- Schmidt D.G. (1982). *Association of caseins and casein micelle structure*. In Development in Dairy Chemistry, vol. I, General Aspects, 61, 86 (Ed.P.F.Fox). Applied Science Publ. London, UK.
- Schmidt D.G., Both P. (1982). *Location of α_{s1} , β - and κ -casein in artificial casein micelle*. Milchwissenschaft, 37, 336.
- Sherbon J.W., Ledford R.A., Regenstein J., Thompson M.P. (1967). *Variants of milk proteins and their possible relation to milk properties*. Journal of Dairy Science, 50, 951-957.
- Singh H., Roberts M.S., Munro P.A., Teteo C. (1996). *Acid-induced dissociation of casein micelles in milk: effects of heat treatment*. Journal Dairy Science 79, 1340-1346.
- Storry J.E., Ford G.D. (1982). *Some factors affecting the post-clotting development of coagulum strenght in renneted milk*. Journal Dairy Reserach, 49, 469-474.
- Smith M.H., Hill J.P., Creamer L.K., Plowman J.H. (1997). *Towards understanding the variant effect on the rate of cleavage by chymosin on κ -casein A and C*. Proc. IDF Seminar, Palmestorn North, New Zealand, International Dairy Federation, Brussel, 185-189.
- Summer A., Formaggioni P., Franceschi P., Malacarne M., Mariani P. (2003). *Proteose-peptone content in the milk of Italian Friesian cows with moderate and high somatic cell values*. Italian Journal Animal Science, 2, 266-269.
- Summer A. (2008). *Le cellule somatiche abbassano la qualità*. Informatore zootecnico, 9, 587.
- Summer A., Malacarne M., Formaggioni P., Franceschi P., Mariani P. (2009). *Fattori genetici e valorizzazione tecnologico casearia del latte*. Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia, 60, 415-440.
- Summer A., Santus E., Casanova L., Joerg H., Rossoni A., Nicoletti C., Donofrio G., Mariani P., Malacarne M. (2010). *Characterisation of a monoclonal antibody for κ -casein B of cow's milk*. Journal of Dairy Science, 93, 796-800.
- Thompson M.P., Gordon W.G., Boswell R.T., Farrell H.M. Jr. (1969). *Solubility solvation and stabilization of α_{s1} - and β -caseins*. Journal of Dairy Science, 52, 1166-1173.
- Thompson M. P., Farrell H. Jr. (1974). *Genetic variants of the milk proteins*. Academic Press New-York, 3, 109-112.
- Threadgill D.W., Womack J.E. (1990). *Genomic analysis of the major bovine milk proteins genes*. Nucleic Acids Research, 18, 6935-6942.
- Tervala H.L. e Antila V. (1985). *Milk with anomalous renneting properties*. Meijeritieteellinen Aikakauskirja, 43, 26-32.
- Tziboula A., Horne D.S. (1999). *The role of α_{s1} -casein in the structure of caprine casein micelles*. International Dairy Journal, 9, 173-178.
- van den Berg G., Escher J.T.M., de Koning P.J., Bovenhuis H. (1992). *Genetic polymorphism of κ -casein and beta-lactoglobulin in relation to milk composition and processing properties*. Netherland Milk Dairy Journal, 46, 145-168.
- van Dijk H.J.M. (1990). *The properties of casein micelles: The nature of the micellar calcium phosphate*. Netherland Milk Dairy Journal, 44, 65-81.

- van Hooydonk A.C.M., Walstra P. (1987). *Interpretation of the kinetics of the renneting reaction in milk*. Netherland Milk Dairy Journal, 41, 19-24.
- Walsh C.D., Guinee T.P., Reville W.D., Harrington D., Murphy J.J., O'Kennedy B.T., Fitzgerald R.J. (1998). *Influence of κ -casein genetic variant on rennet gel microstructure, Cheddar cheesemaking properties and casein micelle size*. International Dairy Journal, 8, 707-714.
- White J.C.D. and Davies D.T. (1958). *The relation between the chemical composition of milk and the stability of the caseinate complex*. Journal Dairy Research, 25, 236-255.

Letteratura riferita alla Parte Sperimentale

- Davoli R., Dall'Olio S., Russo V. (1990). *Effect of κ -casein genotype on the coagulation properties of milk*. Journal of Animal Breeding and Genetics, 107, 458-464.
- Fox P.F., Brodtkorb A. (2008). *The casein micelle: historical aspects, current concepts and significance*. International Dairy Journal 18, 677-684.
- Horne D.S., Banks J.M., Miur D.D. (1997). *Genetic polymorphism of bovine κ -casein effects on renneting and cheese yield*. Proc. IDF Seminar Palmestorn North, New Zeland. International Dairy Federation, Brussels, 162-171.
- Marziali A.S., Ng-Kwai-Hang K.F. (1986) *Relationships between milk protein polymorphism and cheese yielding capacity*. Journal of Dairy Science, 69, 1193-1201.
- McLean D.M. (1986). *Influence of milk protein genetic variants on milk composition, yield and cheese making properties*. Animal Genetics, 18, 100-102.
- Morini D., Losi G., Castagnetti G.B., Mariani P. (1979) *Prove di caseificazione con latte caratterizzato dalle varianti A e B della κ -caseina: rilievi sul formaggio stagionato*. Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia, 30, 243-262.
- Pecorari M., Fossa E., Sandri S., Tedeschi G., Pellegrino L., Mariani P. (1995). *Il ruolo del contenuto in caseina del latte nella produzione del Parmigiano-Reggiano: resa, composizione chimica, proteolisi, lipolisi e caratteristiche organolettiche del formaggio stagionato*. Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia, 46, 211-232.
- Rahali V., Ménard J.L. (1991). *Influence des variants génétiques de la beta-lactoglobuline et de la κ -caséine sur la composition du lait et son aptitude fromagère*. Lait, 71, 275-297.
- Resmini P., Volonterio G., Prati F., Pazzaglia C., Motti G. (1982). *Caratteristiche del latte e fenomeni rilevati in caldaia nella lavorazione a formaggio Grana Padano*. Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia, 33, 229-264.
- Shimdt D.G. (1980). *Colloidal aspects of casein*. Netherland Milk Dairy Journal, 34, 42-64.
- van Hooydonk A.C.M., Hagedoorn H.G., Boerrigter I.J. (1986). *The effect of various cations on the renneting of milk*. Netherland Milk Dairy Journal, 40, 369-390.
- Walsh C.D., Guinee T.P., Reville W.D., Harrington D., Murphy J.J., O'Kennedy B.T., Fitzgerald R.J. (1998). *Influence of κ -casein genetic variant on rennet gel microstructure, Cheddar cheesemaking properties and casein micelle size*. International Dairy Journal, 8, 707-714.

Letteratura riferita alle Metodiche Analitiche

- Allen R.J.L. (1940). *The estimation of phosphorous*. Biochemistry Journal, 34, 858-865.
- Annibaldi S. (1969). *Modificazione della prova di Weinzirl per la ricerca dei clostridi nel latte*. Scienza Tecnica Lattiero-Casearia, 20, 75-79.
- Annibaldi S., Ferri G. and Mora R. (1977). *Nuovi orientamenti nella valutazione tecnica del latte: tipizzazione lattodinamografica*. Scienza Tecnica Lattiero-Casearia, 28, 115-126.

- Anonymous (1963). *Determinazione del grado di acidità del latte secondo Soxhlet-Henkel*. *Milchwissenschaft*, 18, 520.
- Anonymous (1982). *Analytical methods for atomic absorption spectrophotometry*. Bodenseewerk Perkin-Elmer & Co GmbH, Überlingen.
- Aschaffenburg R., Drewry J. (1959). *New procedure for the routine determination of the various non-casein proteins of milk*. XVth International Dairy Congress 3, 1631.
- Formaggioni P. (2004). *Effetti della composizione chimica del latte sul rendimento della trasformazione in Parmigiano-Reggiano*. Tesi di Dottorato di Ricerca in “Produzioni Animali, Biotecnologie Veterinarie, Qualità e Sicurezza degli Alimenti”, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Parma.
- Grappin R., Dasen A., Favenec P. (1985). *Rapid automatic counting of bacteria in raw milk using the Bactoscan*. *Lait*, 65, 123-147.
- Luginbuhl W. (2002). *Evaluation of designed calibration samples for casein calibration in fourier transform infrared analysis of milk*. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 35, 554-558.
- Pecorari M., Mariani M.S., Calzolari M.G., Tedeschi G. (1993). *Il contenuto di urea nel latte: variazioni e rapporti con i parametri tecnologici*. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 44, 144-154.
- Savini E. (1946). *Analisi del latte e dei latticini*. Edizioni Hoepli: Milano.
- Schmidt-Madsen P (1975). *Fluoro-opto-electronic cell-counting on milk*. *Journal Dairy Research*, 42, 227-229.
- Summer A., Santus E., Casanova L., Joerg H., Rossoni A., Nicoletti C., Donofrio G., Mariani P., Malacarne M. (2010). *Characterisation of a monoclonal antibody for κ -casein B of cow's milk*. *Journal of Dairy Science*, 93, 796-800.
- van Den Berg G., De Vries E., Arentzen A.G.J. (1973). *Which sampling method should be used for the exact determination of the curd-fines content of first whey*. *Nizo-nieuws*, 7, 825-830.
- Walsh C.D., Guinee T., Harrington D., Mehra R., Murphy J., Connolly J.F., Fitzgerald R.J. (1995). *Cheddar cheesemaking and rennet coagulation characteristics of bovine milks containing κ -casein AA or BB genetic variants*. *Milchwissenschaft*, 50, 492-496.

Letteratura riferita a Risultati e Discussione

- Alipanah M. e Kaloshnikova L.A. (2007). *Influence of κ -casein genetic variant on cheese ability*. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 6, 855-857.
- Cassandro M., Comin A., Ojala M., Dal Zotto R., De Marchi M., Gallo L., Carnier P., Bittante G. (2008). *Genetic parameters of milk coagulation properties and their relationships with milk yield and quality traits in Italian Holstein cows*. *Journal of Dairy Science*, 91 371-376.
- Colombari G., Zapparoli A.G., Melani D., Vulcano T., Zonazzi M., Pecorari M. (2006). *Difetti fermentativi nel formaggio Parmigiano-Reggiano prodotto con latte di aziende agricole a diverso livello tecnologico e manageriale*. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 57, 571-598.
- Custer E.W. (1979). *The effect of milk composition on the yield and quality of cheese. II. The effects of breeds*. *Journal of Dairy Science*, 62, 48-49.
- De Marchi M., Bittante G., Dal Zotto R., Dolvit C., Cassandro M. (2008). *Effect of Holstein Friesian and Brown Swiss breeds quality of milk and cheese*. *Journal of Dairy Science*, 91, 4092-4102.

- Formaggioni P., Pecorari M., Malacarne M., Sabbioni A., Summer A., Franceschi P., Mariani P. (2005). *Variazioni stagionali degli equilibri salini del latte in caldaia nella caseificazione in Parmigiano-Reggiano*. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 56, 359-365.
- Franceschi P., Sandri S., Pecorari M., Vecchia P., Sinisi F., Mariani P. (2008). *Effects of milk storage temperature at the herd on cheesemaking losses in the manufacture of Parmigiano-Reggiano*. *Veterinary Research Community*, 32, 339-341.
- Franceschi P., Malacarne M., Nordera B., Vergnani M., Ghizzoni P.G., Formaggioni P., Mariani P., Summer A. (2012). *Effect of pedoclimatic conditions on the physico-chemical characteristics, hygiene and coagulation properties of milk for Parmigiano-Reggiano cheese*. *Milchwissenschaft*, 67, 117-232.
- Malacarne M., Summer A., Formaggioni P., Franceschi P., Sandri S., Pecorari M., Vecchia P., Mariani P. (2008). *Dairy maturation of milk used in the manufacture of Parmigiano-Reggiano cheese: effects on physico-chemical characteristics, rennet-coagulation aptitude and rheological properties*. *Journal Dairy Research*, 75, 218-224.
- Malacarne M., Summer A., Franceschi P., Formaggioni P., Sabbioni A., Superchi P., Mariani P. (2010). *Effetti delle principali combinazioni fenotipiche delle proteine sulla composizione e su alcune proprietà tecnologico casearie del latte*. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 61, 67-79.
- Mariani P. e Pecorari M. (1987). *Fattori genetici, attitudine alla caseificazione e resa del latte in formaggio*. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 38, 286-326.
- Mariani P., Summer A., Franchetti M., Vecchia P., Fosca E. (1998). *Ripartizione percentuale delle caseine in latti di massa delle vacche di razza Frisona, Bruna, Reggiana e Modenese*. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 49, 181-192.
- Mariani P. e Summer A. (1999). *Polimorfismo delle proteine ed attitudine tecnologico-casearia del latte*. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 50, 197-230.
- Radeljević B., Mikulec N., Zamberlin Š., Horvat J., Maletic M., Antunac N. (2012). *The influence of sample preservation and freezing of cow's, goat's and ewe's milk on the freezing point value*. *Milchwissenschaft*, 67, 2, 169-172.
- Summer A., Malacarne M., Martuzzi F. and Mariani P. (2002). *Structural and functional characteristics of Modenese cow milk in Parmigiano-Reggiano cheese production*. *Annali Facoltà Medicina Veterinaria, Università di Parma*, 12, 163-174.
- Summer A., Sandri S., Tosi F., Franceschi P., Malacarne M., Formaggioni P., Mariani P. (2007). *Seasonal trend of some parameters of the milk quality payment for Parmigiano-Reggiano cheese*. *Italian Journal of Animal Science*, 6, 475-477.

Ringraziamenti

Come dice un proverbio popolare “poche parole, ma buone”, con questo non mi dilungherò in ringraziamenti pomposi e ridondanti anche perché questo non fa parte della mia indole. Tutto ciò che è accaduto nell’ultimo triennio e mi ha portato a crescere non solo in campo tecnico non può essere narrato in poche righe e rimarrà un ricordo indelebile, perciò un saluto ed un grazie a tutti coloro che ho conosciuto, con cui ho lavorato, con cui ho discusso e soprattutto con cui ho condiviso la pausa pranzo, segno di democrazia intellettuale e sociale (Summer, Piero, Massimo, Gian Maria, Paolo).

Con affetto Costi