



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA

DOTTORATO DI RICERCA

IN PRODUZIONI ANIMALI, BIOTECNOLOGIE VETERINARIE,

QUALITÀ E SICUREZZA DEGLI ALIMENTI

CICLO XXIII

Fattori genetici nella scelta di nuovi parametri qualitativi del latte con particolare riguardo alla sua attitudine tecnologico-casearia

Coordinatore:

Chiar.mo Prof Primo Mariani

Tutor:

Chiar.mo Prof Andrea Summer

Dottoranda: CHIARA NICOLETTI

*Dietro ogni traguardo c'è una nuova partenza,
dietro ogni risultato c'è un'altra sfida.
Finché sei vivo, sentiti vivo.*

(Madre Teresa di Calcutta)

INDICE

INDICE.....	5
1 ABSTRACT.....	11
2 RIASSUNTO.....	13
3 INTRODUZIONE	17
3.1 La selezione nel bovino da latte	18
3.1.1 Registrazioni anagrafiche	19
3.1.2 Registrazioni fenotipiche.....	19
3.1.2.1 Controlli funzionali: dati produttivi, anagrafici e riproduttivi	20
3.1.2.2 Caratteri morfologici	21
3.1.2.3 Caratteri funzionali.....	21
3.1.3 La valutazione genetica	22
3.1.3.1 Obiettivo di selezione e schema di selezione.....	22
3.1.3.2 Indice di selezione	23
3.1.3.3 Progresso genetico atteso.....	23
3.1.3.4 Metodo di stima	24
3.1.4 Selezione genomica.....	26
3.2 Qualità del latte.....	27
3.2.1 Caratteristiche chimiche	27
3.2.1.1 Il grasso	28
3.2.1.2 Le sostanze azotate.....	28

3.2.1.3	La caseina: composizione e caratteristiche strutturali.....	29
3.2.2	Parametri igienico-sanitari	32
3.2.2.1	Contenuto di cellule somatiche	32
3.2.2.2	Carica batterica	32
3.2.2.3	Inibenti	33
3.2.3	Requisiti tecnologico-caseari.....	33
3.2.3.1	La caseina	34
3.2.3.2	Attitudine alla coagulazione.....	37
3.2.3.3	pH e acidità titolabile	42
3.2.3.4	Il polimorfismo genetico delle proteine del latte.....	44
3.2.3.5	Minerali.....	46
3.2.3.6	Infiammazioni mammarie	46
3.2.3.7	La resa in formaggio.....	48
3.2.4	Proprietà organolettiche	48
3.2.5	Conclusioni	49
4	OBIETTIVO.....	51
5	CONTRIBUTI SPERIMENTALI.....	53
5.1	β -caseina: qualità del latte per la salute umana	53
5.1.1	Ipotesi sulle proprietà bioattive delle varianti di β -caseina	54
5.1.2	La β -caseina e la razza Bruna italiana.....	56
5.1.3	Linkage β -caseina - k-caseina nella razza Bruna.....	57

5.1.3.1	Obiettivo	57
5.1.3.2	Materiali e metodi.....	57
5.1.3.3	Risultati	58
5.1.3.4	Conclusioni	60
5.2	Indice di caseina	61
5.2.1	Introduzione	61
5.2.2	Obiettivo	63
5.2.3	Materiali e metodi.....	63
5.2.4	Risultati	65
5.2.5	Conclusioni	69
5.3	Test kappa	70
5.3.1	L'idea	71
5.3.2	Lo scopo	71
5.3.3	Lo sviluppo del test	71
5.3.3.1	Creazione dell'anticorpo monoclonale (Mab).....	72
5.3.3.2	Verifica della reattività dell'anticorpo monoclonale (Mab)	73
5.3.4	Test ELISA per il contenuto in k-caseina B su latte di massa	74
5.3.4.1	Come funziona	74
5.3.4.2	Calcolo dei risultati.....	76
5.3.4.3	Dotazione nel kit d'analisi	77
5.3.4.4	Preparazione dei reagenti.....	77

5.3.4.5	Protocollo del test.....	78
5.3.4.6	Test di funzionalità su diverse tipologie di conservante	80
5.3.5	Il brevetto.....	81
5.3.6	Il test kappa: uno strumento utile per tutti.....	81
5.4	Variabilità del contenuto in k-caseina B nel latte di massa.....	83
5.4.1	Introduzione.....	83
5.4.2	Obiettivo	83
5.4.3	Materiali e metodi.....	83
5.4.4	Risultati	85
5.4.5	Conclusioni	87
5.5	Analisi del contenuto di k-caseina B in campioni di latte di massa.....	88
5.5.1	Introduzione.....	88
5.5.2	Obiettivo	89
5.5.3	Materiali e metodi.....	89
5.5.4	Risultati	92
5.5.4.1	Paragone tra i due laboratori.....	92
5.5.4.2	Distribuzione k-caseina B	96
5.5.4.3	Differenza k-caseina B tra zone e province	97
5.5.4.4	Differenze k-caseina B tra razze	98
5.5.4.5	Differenze k-caseina B per dimensione allevamento.....	100
5.5.4.6	Indice di caseina e k-caseina B	100

5.5.4.7	Fattori che influenzano la k-caseina B.....	101
5.5.4.8	Fattori che influenzano i parametri lattodinamografici	102
5.5.5	Conclusioni	105
5.6	Variabilità del contenuto di k-caseina B in campioni di singole vacche	106
5.6.1	Introduzione	106
5.6.2	Obiettivo	106
5.6.3	Materiali e metodi.....	106
5.6.4	Risultati	107
5.6.5	CONCLUSIONI	111
5.7	Nuovo archivio per le varianti genetiche delle proteine del latte.....	112
5.7.1	Introduzione	112
5.7.2	Obiettivo	112
5.7.3	Materiali e metodi.....	112
5.7.4	Risultati	115
5.7.5	Conclusioni	116
6	BIBLIOGRAFIA.....	117
7	RINGRAZIAMENTI.....	127

1 ABSTRACT

The purpose of this research is to identify new milk quality parameters with particular emphasis on its cheese processing aptitude.

The research was focused on milk casein because of its strong influence on cheese yield and quality.

On casein fractions, particular attention was addressed to k-casein, which is the most interesting and important casein component in that it is centrally involved in the formation and stabilization of casein micelles, in the coagulation of milk by rennet and in many other technologically-important properties of the milk protein system.

Since the methods used so far to determine both the genotype and the relative content of k-casein in the sample require the use of sophisticated tools, this research reports the setting up and the validation of a rapid test (an ELISA test called “Test Kappa”) which successfully quantify the content of k-casein B in bulk milk samples. The “Test Kappa” is not expensive, fast and, consequently, compatible with the routine laboratory analyses.

The contents of k-casein B in bulk milk of significant number of farms were monitored with “Test Kappa”. The average percentage of k-casein B on total casein shows a wide variability (ranging from 0.10 to 12.56 %) and the analyses demonstrate that this parameter is influenced by genetic factors, such as cattle breed, and not by environmental factors. The k-casein B content affects both curd firming time and curd firmness.

Therefore, it was verified that the “k-casein B content” parameter can provide additional information on the processing quality of milk.

2 RIASSUNTO

Migliorare la qualità del latte è una sfida che le Associazioni Nazionali Allevatori Italiane hanno intrapreso con vigore negli ultimi anni: solo stimolando gli allevatori a produrre un latte idoneo alla caseificazione e, quindi, particolarmente adatto alla produzione di prodotti lattiero caseari di esclusivo valore sarà possibile diversificare le produzioni e contrastare quindi il fenomeno dell'omologazione di tutti i prodotti caseari.

E' risaputo come la produzione di latte sia diversa a seconda della razza bovina allevata, sia in termini quantitativi che qualitativi.

Ma la diversa composizione del latte non è sufficiente per indicare una differente predisposizione alla trasformazione casearia delle singole razze.

Attualmente negli indici di selezione delle varie razze sono inseriti vari parametri legati alla qualità del latte.

I chilogrammi di proteina prodotti dalla singola vacca sono un indicatore diretto della quantità di formaggio che si può ottenere per ogni singolo animale. Questa informazione, però, risulta solo un'indicazione di carattere generale, non sufficiente per indicare esattamente la quantità e la qualità del formaggio prodotto dal latte di ogni singola bovina.

Il contenuto percentuale di proteina fornisce un dettaglio maggiore perché è connesso sia alla qualità delle produzioni che allo sforzo metabolico richiesto alla bovina per una tale produzione.

La variante genetica della k-caseina è un altro elemento fondamentale che ha importanti riflessi sulla resa alla caseificazione.

Tutti questi parametri, senza dimenticare il contenuto in grasso e le cellule somatiche, sono certamente importanti ma non sono però sufficienti per indicare la reale qualità casearia del latte.

Scopo di questa ricerca è individuare nuovi parametri qualitativi e sviluppare nuovi strumenti in grado di descrivere con maggior precisione le caratteristiche tecnologico-casearie del latte. Analizzando le differenze genetiche esistenti tra le bovine per tali parametri, si vuole, inoltre, studiare la possibilità di intervenire con azioni selettive per

variare l'assetto genetico degli animali in produzione al fine di ottimizzare la resa casearia e la qualità del prodotto finito.

Per far ciò, in primo luogo, si è presa in considerazione la caseina del latte, un carattere conosciuto da lungo tempo ma per cui solo negli ultimi anni è possibile analizzarne di routine il contenuto su campioni di singole vacche a prezzi contenuti. L'obiettivo principale di questo studio è stato quello di analizzare i vantaggi ottenibili, per la razza Bruna, selezionando direttamente sul valore di caseina anziché su quello di proteina. E' la caseina, infatti, che influisce sulla resa della trasformazione casearia e la qualità del formaggio (Pecorari *et al.*, 1990). E' stato dimostrato che l'indice di caseina, ovvero il rapporto tra il contenuto di caseina e il contenuto di proteina grezza, può variare anche in maniera consistente da un animale all'altro (con valori che variano da 70 a 85) con differenze significative nelle caratteristiche casearie del latte prodotto.

I risultati ottenuti mostrano che la selezione effettuata negli ultimi decenni sulla produzione di proteina, ha avuto nella Razza Bruna effetti molto positivi anche sulla caseina. Il progresso genetico della % di caseina, infatti, è di 0,91 deviazione standard in 10 anni ovvero il 30% più alto se comparato con quello della % di proteina (0,66 ds).

Spostando l'enfasi relativa dell'indice di selezione dalle proteine alle caseine si evidenzia un aumento del progresso genetico sia dei kg di latte prodotto che di tutti i parametri che garantiscono una buona resa casearia sia in termini qualitativi che quantitativi: +0,20 % di deviazione standard genetica per i kg di latte, +0,16% per i kg di caseina e +0,11 per la % di caseina.

La k-caseina è un altro importante parametro che denota le qualità casearie del latte prodotto da una singola bovina. La variante B influenza positivamente le caratteristiche tecnologiche e la "lavorabilità" del latte, migliora la resa casearia nonché la qualità del formaggio. Le metodiche utilizzate finora per determinare sia il tipo di variante presente nel campione che il contenuto relativo della stessa richiedono, però, l'utilizzo di apparecchiature sofisticate e di personale specializzato, i tempi di analisi sono lunghi e i costi piuttosto elevati.

Per questo motivo si è lavorato per creare un test di analisi rapido (Test Kappa) che riesca a quantificare il contenuto di k-caseina B in campioni di latte di massa con costi contenuti e tempi d'analisi compatibili con la routine di laboratorio.

Potendo poi misurare il contenuto in k-caseina B, grazie al test kappa, sul latte di massa, si è dato il via ad un ulteriore studio per approfondire le conoscenze su questo parametro completamente nuovo. L'obiettivo del progetto è verificare la variabilità, durante l'anno, del contenuto in k-caseina B nel latte di massa ed evidenziarne eventuali differenze dovute alla razza e alla dimensione dell'allevamento.

I risultati hanno dimostrato che, in generale, il contenuto di k-caseina B nel latte di caldaia è un parametro molto più costante durante l'anno rispetto agli altri caratteri qualitativi perché è influenzato direttamente dalle caratteristiche genetiche della mandria. Per quanto concerne le dimensioni d'allevamento, le aziende piccole mostrano una maggiore variabilità per il contenuto di k-caseina B rispetto alle medio grandi. Ci sono, infatti, piccoli allevamenti che hanno una % media di k-caseina B di 0,09 ma altri che arrivano addirittura a sfiorare lo 0,40 dimostrando quindi una spiccata attenzione alle caratteristiche genetiche degli animali presenti in stalla. Le grosse aziende hanno invece un range di variazione del contenuto di k-caseina B molto più contenuto (da 0,18 a 0,30).

Per quanto riguarda la razza, gli allevamenti composti da animali con un'elevata frequenza di k-caseina B, presentano un'oscillazione dei valori per il contenuto di k-caseina B molto più ampia (da 0 a 0,42) rispetto a quelli di razza con bassa frequenza (da 0 a 0,20).

Sempre considerando il latte di massa, si è valutato come variazioni discrete del contenuto in k-caseina B influenzino anche le caratteristiche casearie del latte.

I risultati mostrano un forte legame di questo parametro con il tempo di rassodamento e la consistenza del coagulo. Infatti lavorando latte con contenuto di k-caseina B intorno al 6% rispetto ad uno con sola k-caseina A, il tempo di rassodamento passa da 12 a 4 minuti e la consistenza del coagulo da 23 a 38 mm.

Il contenuto di k-caseina B non sembra, invece, particolarmente legato al tempo di coagulazione che sembra influenzato più dal pH e dall'acidità.

Nel seguente studio si è voluto verificare l'utilizzo del Test Kappa calcolando il contenuto di k-caseina B anche su latte di singole vacche. I risultati sono stati confortanti perché, analizzando su tutti i campioni l'andamento della % di k-caseina B, calcolata come rapporto fra il contenuto di k-caseina B misurato col "test kappa" e la caseina

totale, si è riusciti a determinare direttamente, per quasi l'85% delle bovine, gli assetti genici per l'allele B. L'allele alternativo è sempre stato considerato quello A visto che le altre varianti alleliche sono estremamente rare.

Riconoscendo l'importanza che le proteine k-caseina, α_{s1} -caseina e β -lattoglobulina rivestono sulle caratteristiche casearie del latte, si è infine implementato uno studio per creare una procedura di calcolo probabilistico in grado di assegnare, ai soggetti senza analisi per le tre varianti proteiche, il genotipo più probabile utilizzando genotipi noti di soggetti appartenenti alla stessa linea parentale.

Così facendo si è riusciti ad incrementare, in modo cospicuo e senza ricorrere ad analisi costose, l'archivio delle tre frazioni proteiche del latte.

Tutte queste analisi dimostrano che, operando una selezione mirata su nuovi parametri cardine della qualità casearia del latte, è possibile ottenere animali con una maggiore attitudine alla produzione di latte per la caseificazione e alla produzione di formaggi di qualità.

Un altro argomento particolarmente innovativo di questo lavoro riguarda i parametri nutraceutici del latte. L'obiettivo è stato quello di raccogliere informazioni sulle casomorfine prodotte dalla digestione della β -caseina. Infatti, durante il processo digestivo, dalla degradazione della β -caseina A1 e B -ma non dalla variante A2- viene prodotta la β -casomorfina-7 (BCM-7), un peptide di 7 amminoacidi che agisce come potente oppioide nell'organismo umano. Vari studi hanno dimostrato che il Bcm-7 può essere uno dei fattori di rischio per varie malattie umane quali le patologie cardiovascolari, il diabete di tipo 1 e la sindrome di morte improvvisa dei neonati.

Si sono verificate, inoltre, le frequenze alleliche della β -caseina nella popolazione di razza Bruna per analizzare come queste siano variate negli anni anche in relazione alla selezione attuata dalla razza per la k-caseina.

3 INTRODUZIONE

La selezione genetica delle popolazioni bovine è uno strumento estremamente valido per perseguire i propri obiettivi ed è il principale strumento per creare nuovi animali in grado di garantire maggior reddito agli allevatori. Il fine ultimo è sempre un risvolto economico vantaggioso per l'allevatore. Ma, se fino a qualche anno fa, tale scopo veniva perseguito principalmente attraverso la quantità di latte prodotta, negli ultimi anni sta aumentando in modo considerevole l'interesse per caratteri "secondari", -longevità, ipofertilità- e soprattutto per la qualità delle produzioni.

Ciò è dovuto al fatto che il latte prodotto in Italia ha una spiccata vocazione casearia. La disponibilità totale di latte in Italia nell'anno 2009 è stata di circa 13.540.000 tonnellate. Di questa quota, il 92,5 % circa era di origine bovina, il 4,5 % di origine ovina, il 2 % circa di origine bufalina e la rimanente quota, poco meno di 1 %, di origine caprina. Il 78,8 % del latte disponibile, poco meno di 10.667.500 tonnellate, è stato destinato alla trasformazione industriale (formaggi, yogurt e altri prodotti a base di latte). Gran parte di questa quota, pari a circa 9.606.000 tonnellate -il 71 % del latte disponibile- è stato indirizzato alla produzione di formaggi di vario tipo, di cui, poco più della metà - 5.226.300 tonnellate circa-, alla produzione di formaggi a Denominazione di Origine Protetta (DOP). Grana Padano e Parmigiano-Reggiano -formaggi tipo grana- hanno assorbito, complessivamente, i 3/4 circa della quota di latte destinato alla produzione di formaggi DOP, pari a circa 3.903.500 tonnellate (Assolatte, 2009).

Alla luce di questi dati si capisce il perché, attualmente, gli obiettivi di selezione delle principali razze bovine in Italia puntino alla produzione di latte di qualità elevata e adatto alla trasformazione casearia.

3.1 La selezione nel bovino da latte

L'inizio della selezione si perde nella notte dei tempi, quando l'uomo iniziò a addomesticare gli animali e a sceglierli per la riproduzione basandosi su criteri estetici o prediligendo quelli più mansueti. La selezione così come la intendiamo oggi, invece, è molto più recente. Le prime esperienze di selezione efficiente si fanno risalire al 1700 ad opera di Robert Backwell (1725-1795) (Hodges, 1999), al quale fecero seguito sperimentazioni che andarono verso un lento perfezionamento, fino a quando, non si affrontò la selezione in modo scientifico partendo dalle scoperte dell'abate Gregor Mendel.

Selezionare significa scegliere; il miglioramento genetico non è altro che un piano di selezione atto a portare, nelle generazioni successive, solo gli alleli più favorevoli e cioè permettere agli animali migliori, portatori nel loro genoma di tali alleli, di avere molta discendenza. E' grazie all'applicazione di programmi selettivi, aggiornati di volta in volta con le nuove conoscenze genetiche e genomiche, e il concomitante miglioramento della gestione, dell'alimentazione e della sanità degli animali, che si è assistito, negli ultimi 40 anni, ad un cospicuo aumento quanti-qualitativo delle produzioni.



Figura 1: Robert Backwell il primo allevatore che fece i primi esperimenti di selezione sistematica degli animali

3.1.1 Registrazioni anagrafiche

Uno dei punti chiave della valutazione genetica degli animali è rappresentato dalle registrazioni anagrafiche (Bertrand e Wiggans, 1998) che sono indispensabili per costruire la matrice di parentela che sta alla base della selezione.

Le strutture custodi delle informazioni genealogiche delle specie animali sono chiamate libri genealogici che in inglese prendono il nome di “Herd Books”.

Le prime registrazioni genealogiche in Italia risalgono ai primi del Novecento ma è con la legge 126 del 1963 che la gestione dei libri genealogici viene delegata alle associazioni nazionali delle diverse razze. La legge 30/91 definisce in modo molto preciso cosa si intende per libro genealogico *«Per libro genealogico si intende il libro tenuto da un’associazione nazionale di allevatori dotata di personalità giuridica o da un ente di diritto pubblico, in cui sono iscritti gli animali riproduttori di una determinata razza con l’indicazione dei loro ascendenti e per i quali sono stati effettuati controlli delle attitudini produttive»*.

Per lo svolgimento delle proprie funzioni istituzionali le Associazioni Nazionali di Razza si avvalgono della collaborazione delle Associazioni Provinciali Allevatori che hanno il compito di espletare, sul piano provinciale, le attività del libro genealogico, di provvedere alla tenuta dei moduli e delle registrazioni delle informazioni anagrafiche e al rilascio di documenti ufficiali del libro genealogico (ANARB, 2001).

3.1.2 Registrazioni fenotipiche

Per poter stimare il valore riproduttivo dei soggetti è indispensabile poter disporre delle misurazioni delle performance loro, dei loro progenitori e/o dei loro discendenti.

In Italia la registrazione dei dati produttivi e riproduttivi dei bovini da latte è affidata all’Associazione Italiana Allevatori (AIA) con D.M. del 28-9-1981, mentre i dati morfologici ed alcuni dati funzionali sono registrati dalle Associazioni Nazionali Allevatori.

Il disciplinare AIA recita: *“I controlli hanno lo scopo di realizzare in modo sistematico il rilevamento, la registrazione, l’elaborazione, la pubblicazione e la divulgazione dei dati tecnici occorrenti per l’attività di incremento e di miglioramento della produttività animale e per la valorizzazione economica delle produzioni”* (AIA, 1981).

Essendo oramai fondamentale lo scambio di informazioni a livello mondiale esiste un organismo internazionale -“International Commitee for Animal Recording”, ICAR- che ha lo scopo di armonizzare la registrazione dei dati all’interno delle nazioni associate. Le valutazioni morfologiche sono escluse dalle attività di ICAR ma esiste comunque l’armonizzazione della valutazione morfologica a livello europeo per sviluppare metodi e criteri di valutazioni validi ed uniformi.

3.1.2.1 Controlli funzionali: dati produttivi, anagrafici e riproduttivi

Ad ogni controllo funzionale viene effettuata la registrazione sia dei dati produttivi che riproduttivi. I controlli funzionali possono essere eseguiti secondo diverse modalità che sono determinate da chi effettua il controllo -controllore zootecnico o allevatore-, dal numero di mungiture controllate nel giorno -1, 2 o 3- e dalla periodicità di controllo -ogni 4 o 6 settimane-.

Durante il controllo è misurata la quantità di latte prodotta (Figura 2) e viene prelevato un campione di latte che viene inviato al laboratorio di analisi preposto. I laboratori autorizzati AIA effettuano le seguenti analisi: contenuto % di proteina, contenuto % di grasso, conta delle cellule somatiche e contenuto in lattosio. Grazie alle nuove tecnologie alcuni laboratori sono in grado di fornire anche l’analisi del contenuto di caseina, contenuto di urea e contenuto in CLA -coniugati dell’acido linoleico-.

Tutti i laboratori che effettuano l’analisi dei campioni individuali devono essere sottoposti ad un ring test in modo da garantire la precisione delle analisi effettuate.



Figura 2: controllore zootecnico che effettua un controllo funzionale utilizzando un lattometro

Al momento del controllo funzionale, il controllore zootecnico è chiamato alla registrazione anche di altri dati di importanza fondamentale dal punto di vista genetico e gestionale.

Vengono, infatti, raccolti e catalogati tutti gli eventi intercorsi dal controllo precedente, come i parti (data parto, numero di vitelli nati, matricola e peso del vitello, genitori del vitello), le fecondazioni (data, tipo di fecondazione e matricola del toro fecondante), le eliminazioni (data e causa dell'uscita).

Tali dati vengono utilizzati sia dalle associazioni di razza per il calcolo dei valori riproduttivi sia dalla Associazione Italiana Allevatori che li aggrega e li restituisce agli allevatori sotto forma di indicatori di efficienza aziendale.

3.1.2.2 Caratteri morfologici

La valutazione morfologica viene fatta sulla singola bovina e comprende la descrizione lineare dei caratteri morfologici, con la quale si quantifica la misura biologica di ogni aspetto considerato e la punteggiatura (punteggi parziali e finale) che esprime il grado di perfezione di ogni singolo animale rispetto al modello ideale.

La descrizione lineare è espressa su una scala di valori e rappresenta la stima delle caratteristiche dell'animale. Per difficoltà, pratiche ed economiche, si tratta sempre di stime e non di misure con metro o nastro misuratore.

Oltre alla descrizione dei singoli caratteri, esiste un punteggio unico che esprime il giudizio complessivo dell'animale.

3.1.2.3 Caratteri funzionali

I caratteri funzionali sono sicuramente i più difficili da rilevare ma, nella moderna zootecnica, rivestono ormai un ruolo fondamentale per il successo economico degli allevamenti (Soelkner e Fuerst, 2002).

I caratteri di fertilità (numero di fecondazioni, interparto, etc.) e longevità (data di eliminazione e motivo dell'eliminazione) vengono rilevati di routine. Per la determinazione della mungibilità viene utilizzato il metodo del sondaggio a parte per la razza Bruna che ha organizzato un piano di raccolta nazionale dei dati facendo uso di lattoflussometri elettronici, una registrazione elettronica che garantisce una maggiore accuratezza della misurazione e, quindi, una stima dell'ereditabilità del carattere molto più precisa (Santus e Bagnato, 1998).

3.1.3 La valutazione genetica

L'elemento fondamentale di un programma di miglioramento genetico di una qualsiasi specie si basa sulla capacità di poter stimare il più correttamente possibile il valore genetico degli individui oggetto di selezione.

L'indice genetico è una stima, attribuita ad ogni animale, del suo valore genetico additivo o valore riproduttivo -EBV = "Estimated Breeding Value"- (Pagnacco, 1996).

L'attendibilità indica il grado di precisione di questa stima ed è determinata dall'ereditabilità del carattere, dalla quantità e dalla qualità delle fonti di informazioni utilizzate nel processo di stima. Due sono le fonti di informazioni utilizzate per creare un indice genetico: la parentela tra gli animali nella popolazione -matrice di parentela- e le registrazioni fenotipiche.

La valutazione genetica può essere effettuata solo relativamente a caratteri misurabili -devono esistere registrazioni fenotipiche- ed ereditabili -devono essere caratteri controllati dai geni-; più l'ereditabilità del carattere è elevata maggiore è la possibilità di effettuare stime accurate dei valori genetici. La selezione richiede inoltre che vi sia variabilità: se tutti gli individui sono uguali non ha alcun senso la scelta di un individuo piuttosto di un altro.

3.1.3.1 Obiettivo di selezione e schema di selezione

La definizione degli obiettivi di selezione è certamente prioritaria ad ogni altra decisione in uno schema di miglioramento genetico. E' necessario fissare gli obiettivi e le priorità in modo da identificare gli animali che maggiormente si avvicinano al modello ideale. Decidere che caratteri selezionare è uno degli elementi fondamentali per definire lo schema di selezione della razza. Decidere quali e quanti debbono essere gli animali da utilizzare per "costruire" la generazione successiva ci consente di portare nelle generazioni successive solo gli alleli più favorevoli ovvero permettere agli animali migliori, quelli che posseggono tali alleli nel loro genoma, di avere molta discendenza.

E' importante esprimere e indirizzare sempre più le caratteristiche e le attitudini della razza secondo quelle che sono le esigenze e le opportunità di profitto dell'uomo. Il principale obiettivo è selezionare animali che diano il maggior rendimento economico agli

allevatori e, per ottenere ciò, è necessario operare su due fronti: incrementare i ricavi e contenere il più possibile i costi.

3.1.3.2 Indice di selezione

Per misurare quanto un animale è migliore rispetto ad un altro si usa l'indice di selezione che riassume in un unico valore le caratteristiche del riproduttore e quanto queste si avvicinino all'obiettivo di selezione. La creazione di un indice di selezione si basa sull'analisi degli obiettivi di razza, sui legami genetici esistenti tra i caratteri - correlazioni genetiche- e sull'importanza economica di ogni carattere.

3.1.3.3 Progresso genetico atteso

La scelta degli animali migliori in base all'indice di selezione produce, generazione dopo generazione, un miglioramento genetico della popolazione. Tale risposta alla selezione misura quanto la media dei figli, per i diversi caratteri, si sposti rispetto alla media dei genitori.

La selezione condotta per un solo carattere determina anche delle variazioni della media di altri caratteri che non sono oggetto di selezione ma che risentono della correlazione genetica esistente col carattere selezionato.

Il metodo generalmente usato per misurare l'efficienza di un programma di selezione è quello di stimare il progresso genetico previsto. Per tale scopo si utilizza la seguente formula:

$$\Delta G = \frac{I * r_{AI} * \sigma_A}{L}$$

dove: ΔG è il progresso genetico in un anno

I intensità di selezione

r_{AI} accuratezza di stima dell'indice genetico

σ_A deviazione standard genetica additiva del carattere

L intervallo di generazione

(Rendel e Robertson, 1950).

Nei bovini da latte tale formula si può meglio definire in quanto è possibile identificare 4 vie di selezione distinte: padri di toro (PT) madri di toro (MT) padri di

vacche (PV) e madri di vacche (MV). Ognuna di queste vie di selezione è caratterizzata da una propria accuratezza, intensità di selezione e intervallo di generazione e la formula quindi diventa:

$$\Delta G = \frac{(I_{PT} * r_{PT}) + (I_{MT} * r_{MT}) + (I_{PV} * r_{PV}) + (I_{MV} * r_{MV})}{L_{PT} + L_{MT} + L_{PV} + L_{MV}} * \sigma$$

Negli ultimi 50 anni si è registrato un progresso genetico molto forte per i principali caratteri produttivi, ciò è stato possibile grazie ad un aumento dell'accuratezza delle valutazioni genetiche, ad una diminuzione dell'intervallo di generazione dovuta ad una maggiore precocità degli animali e, soprattutto, dall'introduzione di tecniche riproduttive che hanno permesso di aumentare considerevolmente l'intensità di selezione.

3.1.3.4 Metodo di stima

La scelta del modello e del metodo di stima più adatto al tipo di carattere in esame, alla modalità di registrazione dei dati fenotipici e al tipo di popolazione è la base fondamentale per poter effettuare una stima dell'indice genetico accurata e attendibile.

Esistono modelli lineari per dati con registrazioni continue come la maggior parte dei caratteri ad interesse zootecnico (es. il latte), modelli threshold per dati categorici (es. la difficoltà al parto) e modelli per l'analisi di sopravvivenza per analizzare dati troncati (es. per la longevità).

Esistono modelli "Sire model" che analizzano esclusivamente la trasmissione di alleli in linea maschile e modelli "Animal model" che, al contrario, analizzano anche i legami di parentela in linea femminile.

Ci sono modelli a registrazione singola utilizzati per analizzare caratteri registrati una sola volta nella vita dell'animale, come ad esempio i caratteri morfologici, e modelli a ripetibilità per caratteri per cui sono effettuate più registrazioni durante la vita dell'animale. Tra questi ultimi troviamo i modelli utilizzati per i caratteri produttivi per i quali è possibile utilizzare un dato per ogni lattazione -modelli a lattazione- o un dato per ogni controllo funzionale -modelli testday o a controlli giornalieri-.

Nel tempo l'applicazione dei diversi modelli si è scontrata con problemi pratici di dimensione e potenza dei mezzi informatici per la risoluzione dei sistemi di equazioni. Si è partiti con modelli a lattazione che consideravano il pedigree solo in linea paterna -Sire model-, passando successivamente a modelli a lattazione che riuscivano a stimare il valore riproduttivo di tutti i soggetti della popolazione -Animal Model-. Oggi viene utilizzato quest'ultimo modello ma non più per i dati produttivi delle singole lattazioni bensì per i dati provenienti dai singoli controlli funzionali.

Lo strumento fondamentale per la predizione del valore riproduttivo (EBV) degli animali è il modello misto, elaborato da Henderson già nel 1953 (Henderson, 1953) ma che trovò largo impiego solo dagli anni 70 quando lo sviluppo tecnologico mise a disposizione elaboratori per la risoluzione di modelli anche per i bovini da latte.

Considerando il vettore y delle osservazioni fenotipiche rilevate su un animale si può assumere che esse siano adeguatamente descritte da un vettore β degli effetti fissi ed uno u degli effetti casuali che normalmente rappresenta l'effetto genetico additivo. L'equazione espressa in termini matriciali pertanto risulta:

$$y = X \beta + Zu + e$$

dove X e Z sono le matrici di incidenza che mettono in relazione i fenotipi rispettivamente con gli effetti di uno o più fattori ambientali fissi e con gli effetti di un fattore casuale.

La particolarità del modello misto è che la soluzione del modello prende in considerazione sia effetti fissi, che sono stimati in modo indipendente per i diversi livelli di ciascun fattore, sia effetti casuali che vengono stimati garantendo la distribuzione normale dei valori stimati con media zero e varianza specifica. Inoltre può essere anche fissata una covarianza tra le classi dei fattori casuali.

Nello specifico della stima dei valori riproduttivi il fattore casuale principale è l'effetto genetico additivo e la distribuzione delle stime è fissata a media zero e varianza specifica del carattere mentre la covarianza tra i livelli del fattore è determinata dalla matrice di parentela tra gli individui.

La vera svolta nell'applicazione pratica della selezione si è avuta con la messa a punto del metodo "Restricted Maximun Likelihood" (REML) per la stima delle

componenti della varianza e del “Best Linear Unbiased Prediction” (BLUP), ovvero la migliore stima lineare priva di errori sistematici, per la stima degli EBV. Questi due metodi lavorano in sincronia in quanto il BLUP assume la conoscenza delle componenti della varianza dei fattori casuali che possono essere stimate per mezzo del metodo REML (Lynch e Walsh, 1998).

Mentre il metodo REML è utilizzato solo in fase di ricerca per la stima delle componenti della varianza per un determinato carattere il BLUP è utilizzato successivamente in routine per la stima dei valori riproduttivi.

3.1.4 Selezione genomica

Ai giorni nostri il miglioramento genetico è di fronte ad una nuova frontiera: l’impiego diretto e sistematico delle informazioni provenienti dall’analisi del DNA degli animali.

Il considerevole progresso genetico fino ad oggi ottenuto è frutto di schemi selettivi strutturati grazie alla genetica quantitativa, materia che stima il valore genetico degli animali senza conoscerne però la struttura genomica. Oggi sono sempre più numerosi gli studi relativi al genoma bovino e alle tecniche per utilizzare le informazioni di genetica molecolare nelle valutazioni genetiche.

Il possibile utilizzo diretto delle informazioni molecolari può supplire alcuni dei limiti della genetica quantitativa, in quanto il DNA può venire estratto da animali di qualsiasi età (embrioni ma anche animali morti), da entrambi i sessi e le informazioni molecolari non sono influenzate da aspetti ambientali. La genomica potrà dare vantaggi evidenti su tutti quei caratteri interessanti ma per i quali oggi non è possibile fare selezione.

Le esperienze d’attuazione di schemi selettivi che prevedono il connubio della genetica quantitativa e di quella molecolare sono adesso una realtà. La genetica molecolare, infatti, ad oggi è in grado di spiegare solo una parte della struttura genetica dei caratteri quantitativi e, quindi, la massima risposta alla selezione può essere ottenuta solo combinando la selezione basata sulla genetica molecolare e quella basata sul fenotipo (Dekkers, 2003).

3.2 Qualità del latte

Il latte, essendo l'alimento che da solo nutre per intero il neonato, è l'alimento più completo dal punto di vista nutrizionale -non a caso la vacca da latte è stata definita la madre che nutre l'umanità!-. Viene sintetizzato nell'unità costituente della ghiandola mammaria, l'alveolo mammario, ed esso fornisce energia, attraverso lipidi e lattosio, amminoacidi essenziali e gruppi amminici per la sintesi degli amminoacidi non essenziali, acidi grassi, vitamine, elementi inorganici (tra cui calcio, fosforo e magnesio in forma altamente assimilabile) e, infine, acqua. I costituenti principali (acqua, grassi, proteine, zuccheri, sali minerali) e quelli minori, nell'ambito della stessa specie, variano quantitativamente in rapporto a fattori genetici (razza, individuo), fisiologici (stadio di lattazione, n° di parti), patologici (mastiti) ed ambientali (tipo di stabulazione, alimentazione, condizioni climatiche, etc.).

Il concetto di qualità di un alimento viene definito come una convergenza tra i desideri e le necessità dei consumatori e i requisiti qualitativi intrinseci ed estrinseci dei prodotti alimentari.

La qualità del latte è definita da un insieme di parametri complessi che riguardano la materia prima e le fasi di trasformazione fino a giungere al prodotto finale. Si parla infatti di qualità chimica e nutrizionale riferita alla composizione chimica del latte -caratteristiche chimiche-, di qualità igienico-sanitaria per esprimere la salubrità dell'alimento -parametri igienico-sanitari-, di qualità tecnologica-casearia -requisiti tecnologico-caseari- come capacità del latte di trasformarsi, con alte rese, in prodotti di elevata qualità organolettica -proprietà organolettiche-.

3.2.1 Caratteristiche chimiche

Le caratteristiche chimiche sono, forse, quelle che da più tempo vengono tenute in considerazione, sia per il latte destinato al consumo fresco, sia per quello a destinazione casearia. Sono caratteristiche misurabili con metodiche precise e sono immutabili una volta che il latte viene munto. Solo infatti variazioni nella sintesi, nella secrezione e nei processi di eiezione del latte possono influenzare la composizione chimica dell'alimento.

3.2.1.1 Il grasso

E' il principale responsabile del sapore e dell'aroma tipico del latte delle diverse specie, inoltre nella frazione lipidica sono disciolti anche la maggior parte degli aromi che provengono dagli alimenti assunti dagli animali, quali ad esempio gli aromi delle essenze pascolive montane.

Il grasso durante il processo di caseificazione, viene quasi interamente inglobato nella rete della cagliata, ed influenza quindi positivamente la resa in formaggio.

Ha un alto valore nutrizionale per l'elevato potere energetico che possiede ed è un parametro fortemente condizionato da molti fattori sia genetici che ambientali.

3.2.1.2 Le sostanze azotate

Le sostanze azotate rappresentano, senza alcun dubbio, la componente più complessa del latte. Circa il 95% dell'azoto del latte si trova sotto forma di proteina mentre il 5 % risulta composto da sostanze azotate non proteiche (principalmente urea, circa 55%). Per proteina grezza si intende il valore di proteina ottenuto considerando, sia le frazioni azotate di origine proteica che di origine non proteica. Il suo valore risulta di circa 3,2 g/100g di latte. A loro volta, le sostanze proteiche vere e proprie vengono suddivise in due grandi gruppi che si distinguono in rapporto al loro comportamento a pH 4,6. A questo pH, il 77% dell'azoto totale del latte forma un precipitato insolubile definito caseina isoelettrica. La quota di azoto che rimane solubile a pH 4,6 è composta dalle cosiddette sieroproteine o proteine del siero (18 % dell'azoto totale) e dall'azoto non proteico (Tabella 1).

Le sieroproteine sono composte da un gruppo eterogeneo di proteine: alcune sono sintetizzate direttamente dalle cellule dell'epitelio secernente della ghiandola mammaria (β -lattoglobulina e α -lattoalbumina), le rimanenti frazioni (principalmente siero albumina bovina e immunoglobuline), invece, derivano dal circolo sanguigno. Dal punto di fisiologico e biochimico, le sieroproteine svolgono diverse funzioni, quali la capacità di legare e, quindi, trasportare la vitamina A (β -lattoglobulina), fornire immunità passiva al neonato attraverso le immunoglobuline, partecipare e, quindi, regolare la sintesi del lattosio (la α -lattoalbumina è componente della lattosio-sintetasi, l'enzima che catalizza il passaggio finale della sintesi del lattosio). Inoltre, diversamente

dalla caseina, le sieroproteine sono ricche in amminoacidi essenziali. Dal punto di vista biochimico, si tratta di proteine facilmente cristallizzabili, con una chiara e ben caratterizzata struttura terziaria.

	Proporzioni medie	
	g per litro	relative
Protidi totali	32	100
Proteine		
A – Caseina isoe	25	78
a) caseina α_{s1}	9,0	36
b) caseina α_{s2}	2,5	10
c) caseina β	8,5	34
d) caseina κ	3,2	13
e) caseine γ	1,75	7
B – Proteine del siero	5,4	17
a) β -lattoglobulina	2,7	50
b) α -lattoalbumina	1,2	22
c) siero-albumina	0,25	5
d) immunoglobuline	0,65	12
e) proteoso-peptoni	0,6	10
Sostanze azotate non proteiche	1,6	5

Tabella 1: composizione della proteina grezza del latte (Alais, 1984)

3.2.1.3 La caseina: composizione e caratteristiche strutturali

La caseina isoelettrica risulta composta da 5 frazioni proteiche: α_{s1} -caseina, β -caseina, α_{s2} -caseina, κ -caseina e γ -caseina. Le prime quattro sono sintetizzate direttamente nella ghiandola mammaria, mentre la γ -caseina è composta dai frammenti carbossiterminali della β -caseina che si originano per l'azione idrolitica di una serina-proteasi presente costitutivamente nel latte, la plasmina. Le corrispondenti porzioni aminoterminali della β -caseina, invece, vanno a costituire la quota più rilevante della frazione solubile dei proteoso-peptoni. Dal punto di vista biochimico, le caseine α_{s1} , α_{s2} e β presentano alcune caratteristiche comuni: tutte e 3 sono costituite da catene di circa 200 amminoacidi -199, 207 e 209, rispettivamente-, e presentano un numero variabile di residui fosforilati -8÷9, 10÷13 e 5÷4-, mancano di struttura terziaria stabile, mostrano carattere tendenzialmente idrofobico e precipitano in presenza di calcio sotto forma ionica, alla concentrazione con cui questo ione è normalmente presente nel latte. Al pari delle caseine α_{s1} , α_{s2} e β , anche la κ -caseina manca di una struttura terziaria stabile. Tuttavia, essa mostra caratteristiche biochimiche che la distinguono dalle altre 3

caseine: è lunga 169 amminoacidi, presenta diversi residui glicosilati -variabili tra 0 e 4- e un solo residuo fosforilato, la porzione ammino-terminale della catena polipeptidica mostra carattere tendenzialmente idrofobico, mentre quella carbossi-terminale -nella quale sono presenti i residui glicosidici e quello fosforilato- si contraddistingue per un carattere tendenzialmente idrofilico. La k-caseina, inoltre e soprattutto, risulta insensibile all'azione precipitante dello ione calcio (Fox, 2003).

Circa il 95% della caseina si trova sotto forma di particelle di dimensioni colloidali, denominate micelle. Si tratta di strutture fortemente idratate, in grado di legare circa 2,0 g di acqua per g di proteina. Il residuo della micella risulta composto per il 94% circa di proteina (caseine α_{s1} , α_{s2} , β e k) e per il 6% di fosfato di calcio colloidale costituito, a sua volta, da calcio, fosfato e da piccole quantità di magnesio e citrato (componente salina). Le micelle di caseina al microscopio elettronico presentano una forma pressoché sferica con un diametro compreso tra 50 e 500 nm (in media 150 nm) e una massa variabile tra 106 e 109 Da (in media 108 Da). L'impossibilità di cristallizzare la micella di caseina non ha permesso di chiarirne l'esatta struttura. I diversi modelli proposti (Figura 3 e Figura 4) tuttavia, concordano su alcune caratteristiche fondamentali.

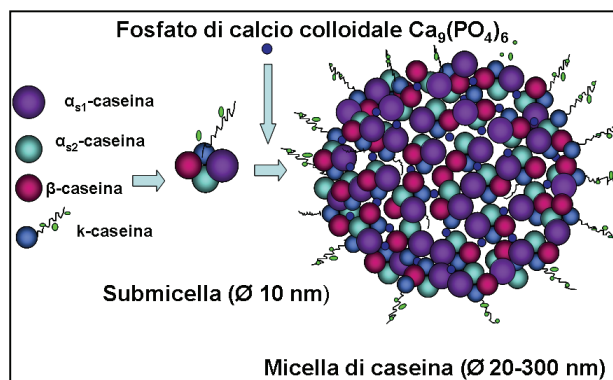


Figura 3: modello di micella di caseina secondo Schmidt (1982). Questo modello prevede la formazione di submicelle costituite dalle caseine α_{s1} , α_{s2} , β - e k- (3:1:3:1), attraverso interazioni di natura secondaria. La formazione della micella di caseina vera e propria avviene grazie al contributo determinante del fosfato di calcio colloidale. Esso funge da elemento cementante tra le submicelle, attraverso legami di natura secondaria con i residui fosforilati delle caseine α_{s1} , α_{s2} , β -. L'estremità carbossiterminale della k-caseina è rappresentata da un filamento in cui sono evidenziati i gruppi glicosidici.

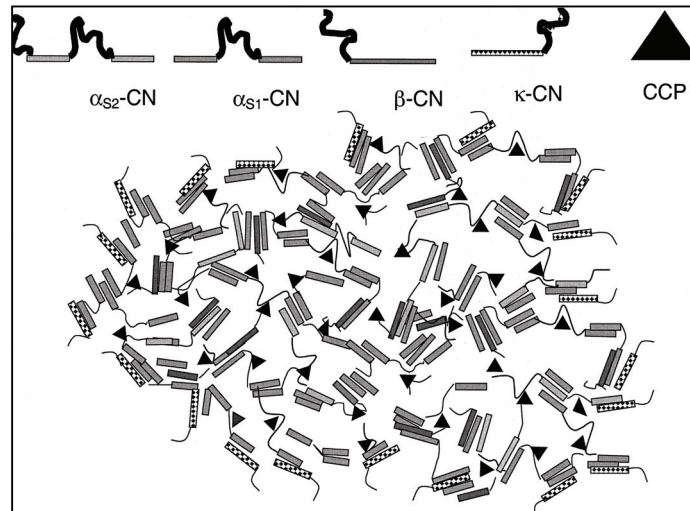


Figura 4: modello di micella di caseina secondo Horne (1998). Questo modello -definito “dual-binding”- non prevede la presenza di un’organizzazione submicellare. Le caseine interagiscono tra loro, sia attraverso interazioni di natura secondaria tra le loro regioni idrofobiche -evidenziate in forma rettangolare- che tramite il fosfato di calcio colloidale -evidenziato in forma triangolare- in grado di interagire con i centri fosfato -regioni in cui sono presenti da 2 a 4 amminoacidi fosforilati- localizzati nelle regioni idrofile -evidenziate a forma di filamento irregolare- delle caseine α_{s1} -, α_{s2} -, β -. La κ -caseina che non è in grado di legare il fosfato di calcio colloidale -in quanto manca di “centri” fosfato-, interagisce con le altre caseine attraverso le regioni idrofobiche e si posiziona nelle regioni superficiali della micella con l’estremità carbossiterminale -quella a carattere idrofilico, in cui sono presenti i residui glicosidici- rivolta all’esterno.

Le caseine calcio sensibili α_{s1} , α_{s2} e β -caratterizzate da elevato grado di fosforilazione e da carattere tendenzialmente idrofobico- si trovano localizzate nella parte centrale della micella di caseina; mentre, la κ -caseina -contraddistinta da un modesto livello di fosforilazione e da un elevato grado di glicosilazione-, si trova localizzata sulla superficie delle micelle. L'estremità carbossiterminale della κ -caseina, nella quale sono localizzati sia il sito fosforilato che quelli glicosilati, protrude dalla superficie micellare e, in virtù delle sue peculiari caratteristiche chimico-fisiche e strutturali (potenziale elettrocinetico negativo, forte grado di solvatazione e notevole ingombro sterico), conferisce stabilità alle micelle prevenendone l'aggregazione in presenza di calcio ionico. Secondo questi modelli, inoltre, il fosfato di calcio colloidale entra a far parte della micella di caseina attraverso legami di natura elettrostatica con i residui fosforilati delle caseine calcio sensibili (α_{s1} , α_{s2} , β). Il fosfato di calcio colloidale è

essenziale ai fini della costruzione e della stabilità del sistema micellare, condizionando, entro certi limiti, anche le dimensioni degli aggregati micellari (Qi, 2007).

3.2.2 Parametri igienico-sanitari

I parametri igienico-sanitari esprimono la salubrità dell'alimento e dipendono da modificazioni intervenute al momento della mungitura o nelle successive fasi di consegna, manipolazione e trasporto del latte.

Il latte prodotto da bovine affette da mastiti cliniche e subcliniche e da gravi disordini secretori presenta alterazioni fisico, chimiche, microbiologiche ed enzimatiche tali da risultare più o meno inadatto per qualsiasi produzione casearia (Bottazzi, 1967 - Waes et van Belleghem, 1969 - Schultz, 1976 - Kitchen, 1981 - Munro *et al.*, 1984 - Redaelli et Zecconi, 1985 - Mitchell *et al.* 1986). Le modificazioni dipendono dal maggiore passaggio nel latte di alcune componenti del sangue, dalla minore capacità di sintesi dell'epitelio secernente, dalla presenza di elevati carichi di cellule somatiche -leucociti- e di germi delle mastiti.

3.2.2.1 Contenuto di cellule somatiche

Le cellule somatiche sono considerate uno dei più attendibili indicatori dello stato sanitario della mammella, quindi dell'igiene e della salubrità del latte secreto.

Sono rappresentate dall'insieme di globuli bianchi e delle cellule di sfaldamento della ghiandola mammaria. I globuli bianchi sono normalmente presenti nel latte perché vi passano dal sangue che irrorava abbondantemente la mammella ed hanno il compito di difendere i tessuti dalle infezioni. La conta delle cellule somatiche serve a misurare il grado di sofferenza della mammella, dovuta a maltrattamenti, infiammazioni, mastiti sub-cliniche o manifeste. In normali condizioni di salute la loro presenza si attesta su valori di 100.000÷150.000 unità per mL di latte. Il controllo periodico delle cellule somatiche costituisce un ottimo sistema per la precoce individuazione e quindi prevenzione di infiammazioni dell'apparato mammario.

3.2.2.2 Carica batterica

E' l'insieme dei germi vivi contenuti in un millilitro di latte, è quindi il risultato della sua contaminazione microbica: un latte di ottima qualità dovrebbe presentare un

contenuto di germi mesofilli inferiore a 100.000 unità formanti colonie (u.f.c.) per mL. Il valore della carica batterica è il parametro utilizzato per valutare le condizioni igieniche delle operazioni di mungitura e stoccaggio del latte. Il latte, infatti, esce da una mammella sana in condizioni pressoché sterili, cioè privo di germi; quest'ultimi arrivano dall'esterno attraverso tutto quello con cui il latte viene a contatto: aria della stalla, cute dell'animale, mani del mungitore, secchi, condutture della mungitrice, bidoni e refrigeratori. Della carica microbica è, quindi, responsabile l'allevatore per l'igiene dell'ambiente in cui vivono gli animali e per le modalità con cui egli munge, conserva e trasporta il latte.

3.2.2.3 Inibenti

La mammella, oltre alla funzione di organo secretorio, ha anche la funzione di organo emuntorio, serve cioè come via di eliminazione di prodotti di rifiuto dell'organismo animale. In teoria nel latte si potrebbero trovare composti chimici nocivi per la salute del consumatore che possono essere classificati in:

- antibiotici e chemio-terapici, sostanze che uccidono o impediscono lo sviluppo di batteri. Il latte che contiene antibiotici non è idoneo per l'alimentazione umana
- detergenti e disinfettanti, si possono trovare se è insufficiente il risciacquo delle attrezzature durante le operazioni di lavaggio
- sostanze indesiderate assorbite a livello intestinale o arrivate nel latte per inquinamenti successivi alla mungitura. Sono rappresentate da pesticidi, composti organici, metalli pesanti, etc.

3.2.3 Requisiti tecnologico-caseari

La qualità del latte destinato alla caseificazione è intesa come la capacità di dare origine ad un buon formaggio, con un rendimento più che accettabile.

La qualità tecnologico-casearia del latte assume significati diversi a seconda del tipo di trasformazione, con particolare riferimento alle condizioni di formazione della cagliata, al grado di acidificazione della massa caseosa sottosiero e ai tempi di stagionatura (Borcherds, 1985 - Colin et Laurent, 1991 - Remeuf *et al.*, 1991 - Colin *et al.*, 1992 - Martin et 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, come il Parmigiano-Reggiano, il cui processo di caseificazione, con implicazioni enzimatiche, fisico-chimiche e fisico-meccaniche, consiste essenzialmente nella formazione e nella disidratazione di una cagliata lattico-presamica.

3.2.3.1 La caseina

Il contenuto di caseina svolge un ruolo fondamentale, con il grasso, nella determinazione della resa della trasformazione casearia (Barbano e Sherbon, 1984 - Kerjean, 1984 - Vandeweghe, 1984 - Gilles e Lawrence, 1985 - Lucey e Kelly, 1994 - Van den Berg, 1994). I dati relativi alla produzione di formaggio Cheddar -a partire da latti aventi 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) (Figura 5). Queste osservazioni mettono in evidenza anche le notevoli differenze che caratterizzano i latti 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. I latti con il 2,57 % (Ayrshire) e il 2,72 % (Guernsey) di caseina si collocano in posizione intermedia.

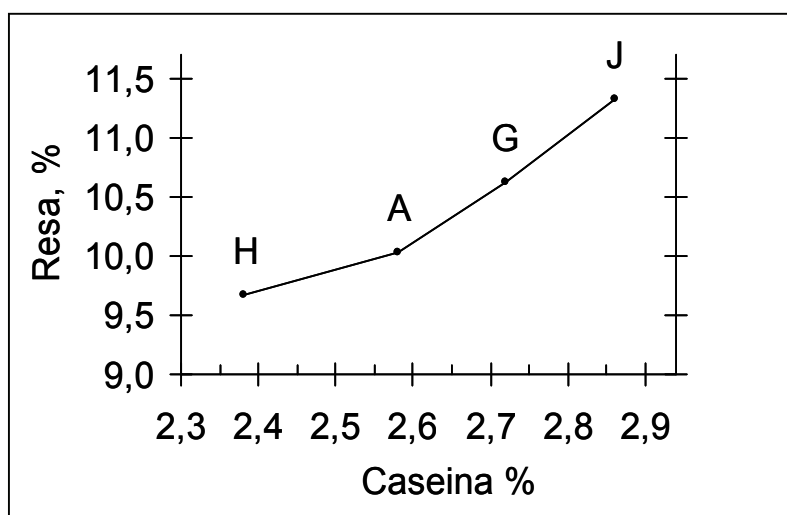


Figura 5: contenuto di caseina e resa in formaggio Cheddar del latte di vacche di differenti razze: Holstein (H), Ayrshire (A), Guernsey (G) e Jersey (J); lavorazione con rapporto grasso/caseina uguale a 1,46 (Custer, 1979).

Il contenuto di caseina concorre in misura importante anche alla determinazione delle caratteristiche reologiche del latte con particolare riferimento alla consistenza del coagulo (Annibaldi, 1959 - Alais, 1965 - Dalgleish, 1980) ed alle proprietà funzionali del reticolo caseinico, cui si rapportano i requisiti di elasticità, permeabilità, omogeneità e compattezza della massa caseosa (Mora, 1985). Si è visto che un aumento del 10% del livello di caseina è in grado di determinare un incremento di circa il 15% della consistenza massima del coagulo (Amram, 1982). Più in generale, con contenuti di caseina inferiori a 0,7% non si ha formazione del coagulo; al di sopra di tali valori la correlazione positiva tra caseina e forza del coagulo risulta inizialmente discreta e a concentrazioni sempre più elevate corrispondono incrementi di consistenza via via maggiori (Storry e Ford, 1982).

È noto, comunque, che i lattici più ricchi di caseina danno normalmente origine a cagliate dotate di maggiore consistenza. In particolare, 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 (Figura 6) mentre, a concentrazioni più elevate di caseina, l'incremento di forza del coagulo risulta più che proporzionale, fino a raggiungere valori di notevole entità (Robertson, 1983).

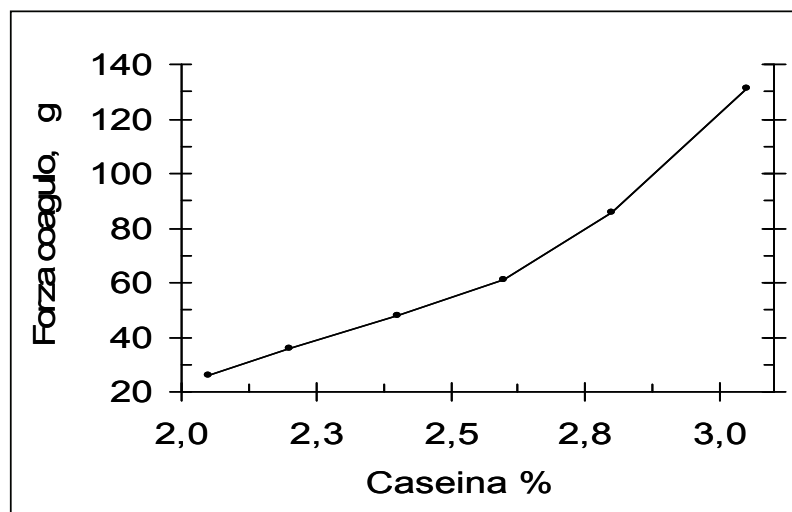


Figura 6: contenuto in caseina del latte e forza del coagulo presamico.

La correlazione positiva tra contenuto in caseina del latte e consistenza del coagulo, misurata a parità di tempo di coagulazione, si manifesta più compiutamente (Mariani,

1997) e risulta particolarmente elevata a livello di latti individuali ($r = 0,75$; $P < 0,001$). Maggiori concentrazioni di caseina, in effetti, determinano in primo luogo un netto miglioramento della velocità di aggregazione delle micelle di paracaseina (Mora e Zannoni, 1986 - Storry e Ford, 1982 - Marziali *et al.*, 1986 - Fossa *et al.*, 1994), con riflessi decisamente positivi sulla consistenza finale del coagulo (Mora, 1985), entrambe condizioni favorevoli nei riguardi della capacità di contrazione del reticolo caseinico; tuttavia, oltre certi livelli di caseina si ha un peggioramento della velocità di sineresi (Lenoir e Schneid, 1984).

Il latte con più caseina fornisce un coagulo dotato di maggiore consistenza e di migliore attitudine alla sineresi (Fossa *et al.*, 1994) (Figura 7). Esso manifesta una maggiore forza di contrazione, cui corrisponde una più elevata capacità di spurgo per unità di tempo, condizione importante per ottenere un formaggio con idoneo gradiente di umidità.

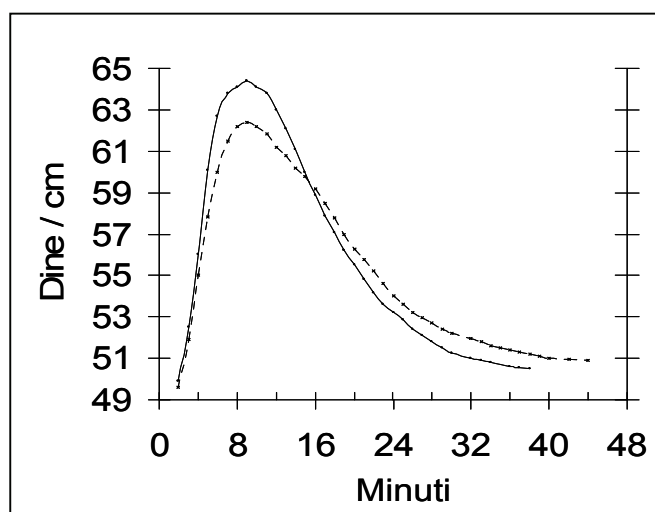


Figura 7: profili tensiometrici del latte prelevato in caldaia: latte con più caseina (—●—) e latte con meno caseina (—x—) (Fossa *et al.*, 1994).

Nella produzione del Parmigiano-Reggiano la cagliata ottenuta da un latte ricco di caseina raggiunge un buon grado di rassodamento; i granuli caseosi sono dotati di maggiore consistenza ed elasticità e manifestano una buona capacità di coesione e di spurgo; il siero risulta meno torbido -indice di minori perdite di grasso e di caseina-; la massa caseosa all'estrazione dalla caldaia presenta migliore impasto e maggiore uniformità e la forma sul banco risulta giustamente elastica, consistente e permeabile

(Mora, 1985). Un'indagine dell'Institut Technique du Gruyère, riguardante la produzione di Emmental, ha messo in evidenza (Kerjean, 1984) che alla trasformazione di un latte avente un contenuto medio-alto di caseina (>2,58%) fa riscontro una percentuale di formaggio "scelto" significativamente più elevata (10÷15%) rispetto al valore mediano; mentre il formaggio prodotto con latte scarsamente provvisto di caseina tende ad essere più frequentemente di qualità inferiore: con il 2,25% circa di caseina, ad esempio, si ha una produzione casearia che si contraddistingue per avere il 20% in meno di formaggio "scelto" (Kerjean, 1984). Queste osservazioni indicano chiaramente che il contenuto di caseina rappresenta non soltanto il più importante criterio nella valutazione della qualità del latte da un punto di vista del suo rendimento caseario -resa industriale-, ma anche un parametro indubbiamente significativo ai fini della determinazione della qualità del formaggio -resa commerciale- (Kerjean, 1984 - Pecorari *et al.*, 1995 - Resmini *et al.*, 1982 - Carini, 1980 - Mariani et Pecorari, 1987 - Mocquot, 1980).

3.2.3.2 Attitudine alla coagulazione

Le caratteristiche biochimiche e strutturali della micella di caseina sono alla base del ruolo fisiologico svolto dalla stessa, vale a dire il trasferimento al neonato di elevate quantità di calcio e di fosforo in forma "solubile" e altamente assimilabile. Inoltre, le stesse caratteristiche sono responsabili della stabilità del latte -entro certi limiti- nei confronti di diversi trattamenti termici (pastorizzazione, sterilizzazione, etc.) e tecnologici (omogeneizzazione, trattamenti ad alta pressione) e vengono sfruttate in tutti i processi di trasformazione che prevedono il fenomeno della coagulazione del latte, quali, ad esempio, la produzione di tutte le tipologie di formaggi (Fox, 2003). In generale, la coagulazione può essere definita come un processo di destabilizzazione irreversibile e conseguente aggregazione della caseina, che forma così un precipitato insolubile definito coagulo. La coagulazione del latte può essere di natura enzimatica, acida o mista (Alais, 1984). In questa tesi tratteremo estesamente quella di natura enzimatica, con particolare riferimento a quella ottenuta aggiungendo caglio al latte -coagulazione presamica-.

In linea generale, il processo di coagulazione presamica del latte (Figura 8) può essere suddiviso in tre fasi: la fase primaria, di natura prettamente enzimatica, consiste

nell'idrolisi della k-caseina -a livello del legame peptidico 105-106- ad opera della chimosina del caglio, con il rilascio nel siero della porzione carbossiterminale (106-169), il glicomacropeptide (Dalglish, 1993).

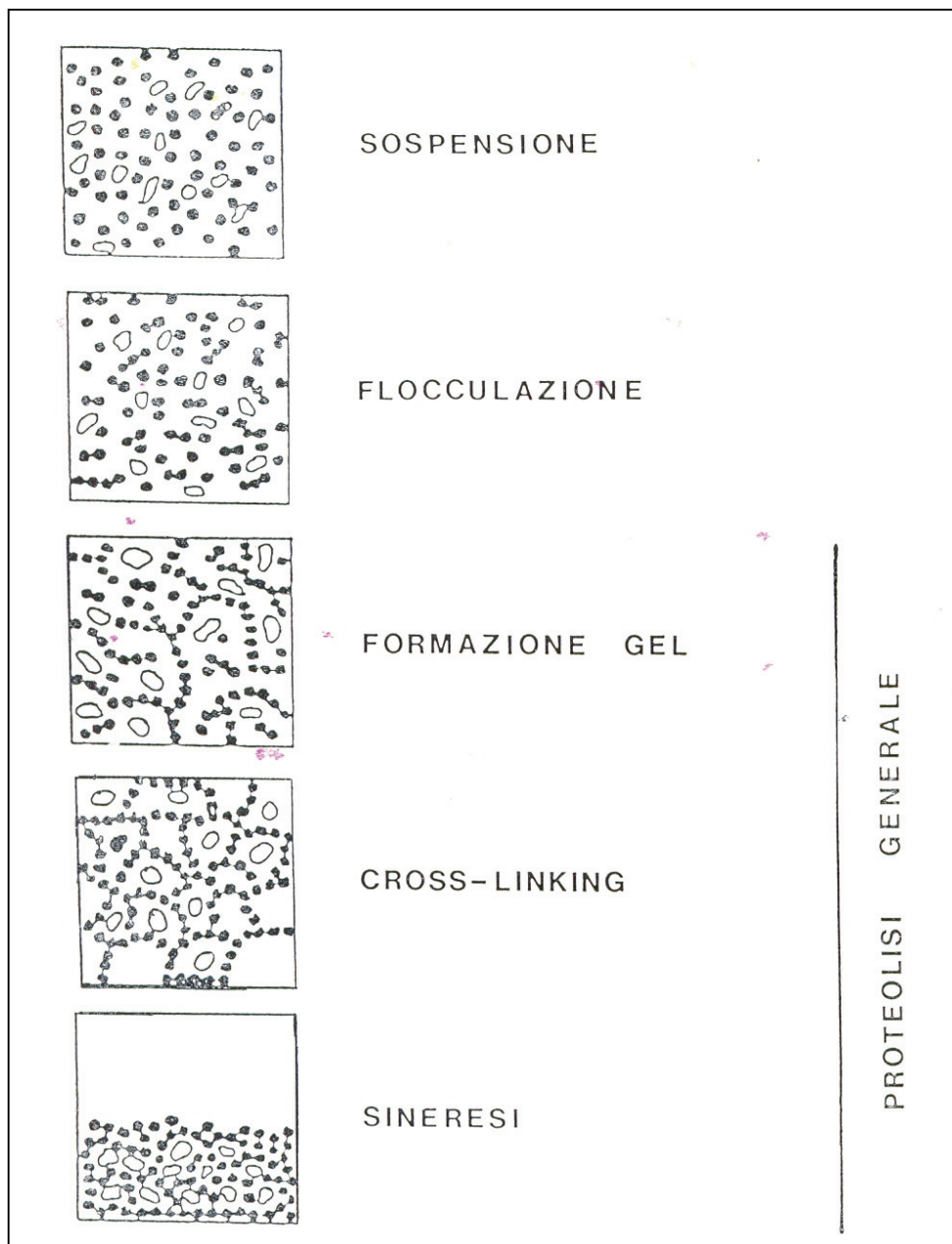


Figura 8: rappresentazione schematica delle principali tappe della coagulazione presamica del latte: dalla dispersione micellare originaria -particelle scure- alla contrazione del reticolo caseinico - particelle chiare = globuli di grasso o batteri- (Carlson *et al.* 1987).

Le micelle di paracaseina -caseina nativa privata di glicomacropetide- interagiscono tra loro sia attraverso legami di natura idrofobica, sia con ponti intermicellari -con il coinvolgimento determinante del calcio ionico- per dare origine ad un reticolo -fase secondaria o di aggregazione-, che racchiude nelle proprie maglie i globuli di grasso, i batteri e tutta la fase acquosa del latte -gel- (Green e Grandison, 1993). Il reticolo caseinico (coagulo) è un sistema dinamico che si modifica sotto l'influenza delle stesse forze che lo hanno originato. I legami tra le micelle di paracaseina, gli aggregati micellari e i filamenti diventano sempre più numerosi e forti, provocando la contrazione del coagulo (sineresi) e la conseguente "espulsione" dell'acqua interstiziale (Walstra, 1993). Dalla capacità di sineresi del coagulo, legata principalmente alle caratteristiche di elasticità, contrattilità e permeabilità dello stesso, dipende l'eliminazione del siero (spurgo) e, in definitiva, il grado di disidratazione della massa caseosa. La fase terziaria consiste in un processo proteolitico aspecifico a carico del coagulo.

L'attitudine del latte alla coagulazione è determinata effettuando l'analisi lattodinamografica che, attraverso i caratteristici tracciati a campana (Figura 9), determina alcuni parametri che indicano il comportamento del latte addizionato di caglio:

- r = tempo di coagulazione (espresso in minuti), è il tempo che trascorre dall'aggiunta del caglio (tempo = 0 min) fino all'inizio del processo di coagulazione ovvero il punto in cui avviene l'apertura del tracciato
- k_{20} = tempo di rassodamento del coagulo (espresso in minuti) è il tempo necessario al coagulo per raggiungere una resistenza meccanica tale da determinare un'ampiezza del tracciato di 20 mm
- a_{30} = consistenza del coagulo, è l'ampiezza del tracciato (espressa in mm) a 30 minuti dall'aggiunta del caglio.

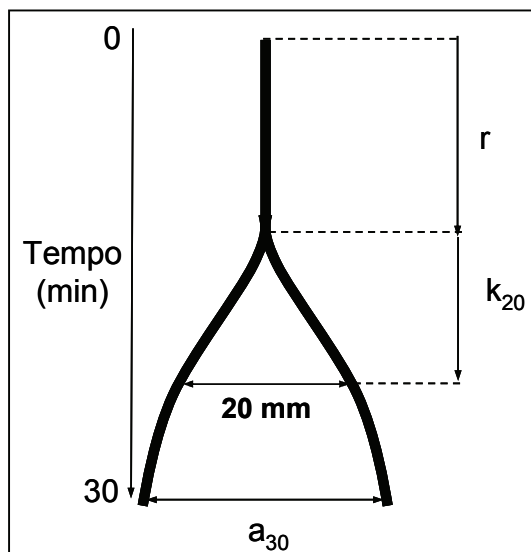


Figura 9: esempio di tracciato lattodinamografico e parametri di coagulazione

La struttura della cagliata e la sua elasticità, sono condizionati da diversi fattori fra i quali si ricordano:

- la concentrazione del caglio: la coagulazione è tanto più veloce e la cagliata tanto più serrata ed elastica quanto maggiore è la concentrazione dell'enzima
- la temperatura del latte: la coagulazione avviene solo a temperature superiori a 15° C ed ha il suo ottimo fra 37° e 42° C; a temperature inferiori a 15° C la paracaseina non precipita ed a temperature superiori a 50° C l'enzima viene inattivato
- la concentrazione salina del latte: la presenza di ioni calcio è indispensabile per la formazione del coagulo e quindi ogni trattamento che modifica la quantità di calcio disponibile -riscaldamento preventivo del latte, lunga conservazione del latte refrigerato, formazione di sali insolubili- rallenta la coagulazione
- l'acidità del latte: la coagulazione avviene solo in ambiente acido; fino alla soglia di pH 4,6 la cagliata risulta tanto più elastica e consistente quanto maggiore è la sua acidità.

Tutte le variabili fisico-chimiche, strutturali e igienico-sanitarie del latte trattate in precedenza concorrono, in misura più o meno importante, singolarmente prese o attraverso interazioni più o meno complesse, alla definizione della sua attitudine alla coagulazione presamica intesa in senso lato come tempo di coagulazione, velocità di

formazione del coagulo, nonché consistenza, permeabilità e contrattilità della cagliata e, di conseguenza, capacità e velocità di sineresi della stessa e dell'intera massa caseosa.

L'attitudine alla coagulazione (Carlson A *et al.*, 1987- McMahon et Brown, 1982) rappresenta il requisito basilare per il latte destinato alla produzione di formaggi di pregio. Le condizioni favorevoli di reattività del latte con il caglio, la velocità di rassodamento e la forza del coagulo, così come la capacità e la velocità di sineresi della cagliata (Pecorari et Mariani, 1999) 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 più regolare; la formazione di granuli più uniformi, maggiore elasticità contrattilità e coesione, minore friabilità; una giusta acidificazione della massa caseosa e, conseguentemente, una migliore sineresi. Il latte che presenta una ottimale attitudine alla coagulazione presamica è in grado di assicurare il raggiungimento degli obiettivi primari del processo di coagulazione: la massimizzazione della resa industriale della trasformazione casearia e l'ottenimento di una massa caseosa adeguatamente ed uniformemente disidratata.

I lattici a coagulazione anomala, lenta, danno origine a cagliate deboli, poco elastiche, che mal sopportano le sollecitazioni fisico-meccaniche (Annibaldi, 1961 - Flüeler et Puhan, 1978 - Losi et Castagnetti, 1981 - Bynum et Olson, 1982 - Resmini *et al.*, 1982 - Mora et Zannoni, 1986). 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. La massa caseosa risulta strutturalmente difettosa, eccessivamente umida e spesso non uniformemente disidratata, tutte condizioni che nei formaggi a medio-lungo periodo di maturazione favoriscono l'instaurarsi di fermentazioni anomale, precoci o tardive, localizzate o diffuse, la formazione di colorazioni anomale e, in quelli a pasta dura, la comparsa di difetti di struttura -strappi, fessurazioni, distacchi di pasta, sfoglia, etc.-, diversamente localizzati nella forma (Bertoni *et al.*, 2001 - Lucey et Kelly, 1994 - Dieci, 1960 - Carini, 1980 - Pecorari *et al.*, 1988 - Castagnetti, 1993).

3.2.3.3 pH e acidità titolabile

L'acidità è la proprietà che esercita la maggiore influenza sulla attitudine del latte alla coagulazione presamica. Il ruolo primario spetta al pH (White et Davies, 1958 - van Hooydonk *et al.*, 1986), -i cui valori sono negativamente correlati con quelli dell'acidità titolabile- che condiziona fortemente l'attività primaria del caglio e la velocità di formazione del coagulo, nonché, entro certi limiti, anche la consistenza e la capacità di sineresi della cagliata. 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 k-caseina che, di conseguenza, perde la sua porzione C-terminale fortemente idrofila, ricca di acido sialico -glicomacropetide- e, quindi, anche la proprietà di proteggere le caseine α_{S1} , α_{S2} e β dall'azione precipitante degli ioni calcio. Il pH normale del latte è molto al di sopra ($6,66 \div 6,72$) di quello ritenuto ottimale per la stabilità e l'attività dell'enzima ($5,5 \div 6,0$); la concentrazione degli ioni idrogeno a pH 6,5 è più che doppia rispetto a quella di pH 6,7; ciò spiega l'effetto rimarchevole che sue variazioni, anche piccole, sono in grado di esercitare sulla velocità della reazione primaria (Garnier *et al.*, 1968 - Fox, 1969 - Ramet et Weber, 1980), specie a valori di pH mediamente elevati. Nel passaggio da pH 6,75 a pH 6,65, ad esempio, la reattività tra latte e caglio aumenta in misura notevole, per cui il tempo di coagulazione diminuisce sensibilmente, dimezzandosi (Fox, 1969) (Figura 10).

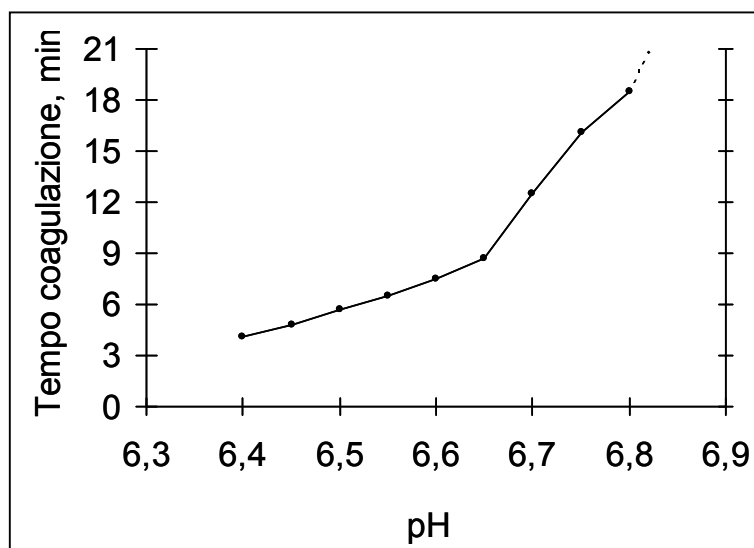


Figura 10: influenza del pH sul tempo di coagulazione presamica del latte (Green et Grandison, 1993)

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. La fase di coagulazione vera e propria risulta addirittura più sensibile rispetto a quella enzimatica -circa 4 volte-. Quando il pH si abbassa da 6,6 a 5,6 la durata della "coagulazione" -quasi esclusivamente per l'effetto complessivo del pH sulla fase "secondaria"- diminuisce di circa 30 volte (Mehaia et Cheryan, 1983 - Green et Grandison, 1993). L'aumento della velocità di coagulazione per effetto dell'abbassamento del pH accelera la capacità di aggregazione delle micelle di paracaseina e quindi il rassodamento del coagulo, condizione che si riflette favorevolmente anche sul grado di consistenza massima della cagliata. Intorno a pH 6,0÷6,2, però, a causa della demineralizzazione delle micelle, l'effetto viene completamente meno (Ramet et Weber, 1980 - Storry et Ford, 1982) e la forza del coagulo diminuisce in misura considerevole. Un buon grado di acidificazione influisce favorevolmente anche sulla sineresi (Annibaldi, 1959 - Kiermeier et von Wüllerstorff, 1963 - Patel *et al.*, 1972 - Weber, 1984). Quando il coagulo si ottiene per via "prevalentemente" enzimatica, l'abbassamento del pH rende più incisiva l'azione del caglio e provoca una parziale solubilizzazione dei sali di calcio; ciò, entro limiti ben determinati, favorisce la formazione di legami secondari tra le micelle di paracaseina e i filamenti del reticolo, migliorando la capacità di contrazione, la permeabilità e, in definitiva, l'eliminazione del siero.

Dato il rapporto molto stretto che esiste tra i valori di pH e quelli dell'acidità titolabile (White et Davies, 1958 - Mariani, 1982 - Mariani et. Artoni, 1982), anche quest'ultima caratteristica rappresenta un requisito importante nella valutazione della qualità tecnologica del latte, spesso misurata in alternativa al pH, proprio in quanto in grado di esercitare un'influenza determinante e particolarmente significativa nei riguardi di quasi tutti i principali parametri di coagulazione presamica (Mariani, 1982 - Mariani *et al.*, 1981 - Mariani *et al.*, 1991 - Mariani *et al.*, 1992 - Mariani *et al.*, 1994 - Calamari *et al.*, 1995).

Il ruolo dell'acidità naturale del latte è di basilare importanza nella caseificazione a Parmigiano-Reggiano: il pH di coagulazione è intorno a 6,40 e quello della massa caseosa

in fase di giacenza in caldaia si mantiene inizialmente elevato, prossimo a 6,20, poi non dovrebbe diminuire più di circa 0,15 unità. Date le peculiari condizioni di lavorazione, in presenza di latte ipoacido -povero di caseina e di fosforo-, un eccessivo incremento dell'azione lattica, per aggiunta di forti dosi di siero innesto, allo scopo di rettificare la scarsa attitudine alla coagulazione del latte ipoacido, finisce per influire negativamente sulla capacità di contrazione del coagulo (Annibaldi, 1961). Ciò comporta una alterazione del giusto equilibrio tra azione enzimatica ed azione acida, equilibrio che è di basilare importanza per ottenere un formaggio adeguatamente disidratato (Weber, 1984). Le micelle subiscono meno intensamente e meno a lungo l'azione del caglio e, per effetto della più incisiva azione lattica, tendono a demineralizzarsi, con pregiudizio per l'integrità funzionale del reticolo caseinico e quindi per la reologia della cagliata (Resmini *et al.*, 1982), che risulta meno elastica, poco contrattile, fragile ed eccessivamente umida.

3.2.3.4 Il polimorfismo genetico delle proteine del latte

Con il termine polimorfismo genetico si intende che ogni proteina del latte può presentare due o più forme, geneticamente determinate da alleli autosomici e codominanti. L'assenza di dominanza è molto utile per il conteggio delle frequenze alleliche all'interno della popolazione, in quanto, in elettroforesi, gli individui omozigoti presentano una sola banda, mentre, quelli eterozigoti, presentano entrambe le bande corrispondenti ai due alleli.

Il polimorfismo genetico riveste un ruolo significativo in diversi campi applicativi, quali le scienze zootecniche e l'industria casearia. In particolare, in questi settori, la ricerca è focalizzata allo studio di eventuali associazioni tra varianti genetiche e caratteristiche produttive, efficienza riproduttiva e capacità di adattamento della vacca da latte, così come l'individuazione di possibili influenze sulle caratteristiche nutrizionali e tecnologico-casearie del latte. Le relazioni tra varianti proteiche, composizione e proprietà del latte sono state riportate da diversi autori; in particolare, è stato evidenziato come il latte caratterizzato dalla presenza della variante B della k-caseina, della β -caseina e della β -lattoglobulina si caratterizzi per una composizione azotata e/o per caratteristiche di coagulazione presamica migliori rispetto a quelle mostrate dalla

variante A delle stesse proteine e, per questo, più favorevoli per la caseificazione (Formaggioni *et al.*, 1999).

Il tipo genetico della k-caseina è in grado di esercitare un'influenza significativa sulla quantità con cui questa proteina entra nella composizione della caseina totale (Law *et al.*, 1994), con riflessi importanti sulla dimensione delle micelle: più k-caseina equivale a micelle più piccole.

I sistemi micellari più uniformi, comunque contraddistinti da maggiori proporzioni di micelle di piccole dimensioni come, ad esempio, quelli caratterizzati dalla presenza della k-caseina B (Morini *et al.*, 1975), tendono a coagulare in minor tempo (Losi *et al.*, 1973) (Figura 11).

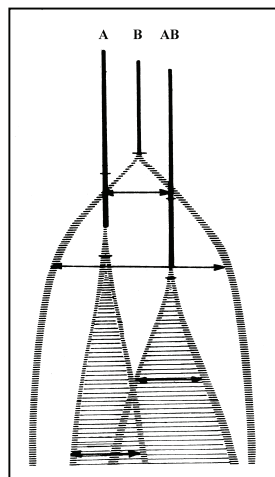


Figura 11: tracciati lattodinamografici di latti individuali di tipo k-caseina A, k-caseina B e k-caseina AB (Losi *et al.*, 1973).

La variante B della k-caseina esercita un ruolo fondamentale in tutte le fasi della coagulazione presamica del latte (Mariani et Summer, 1999). Il latte k-caseina B manifesta una maggiore reattività con il caglio e presenta una migliore attitudine alla formazione del coagulo, il cui reticolo tende ad essere più compatto e più elastico rispetto a quello di tipo k-caseina A (Niki et Arima, 1984 - Mariani et Pecorari, 1991 - Lodes *et al.*, 1996). In tali condizioni le perdite di caseina e di grasso risultano inferiori (Rahali et Ménard, 1991 - Horne *et al.*, 1997 - Pabst, 1998), con ripercussioni favorevoli sulla resa (Hartung et Gernand, 1997 - Walsh *et al.*, 1998) e sulla qualità del formaggio.

In termini di resa alla caseificazione le differenze sono sostanziali e sono state riscontrate nella produzione di vari tipi di formaggi.

Ad esempio, nella produzione del Parmigiano-Reggiano, è stata osservata una differenza per caldaia (1.000 kg di latte) di circa 6 kg di formaggio in più, lavorando latte k-caseina B invece di latte k-caseina A (Mariani *et al.*, 2001).

In uno studio irlandese (Fitzgerald *et al.*, 1998), è stato dimostrato che se un caseificio con una produzione media annua di 20.000 tonnellate di formaggio lavora latte k-caseina B invece di latte k-caseina A, può aumentare la resa produttiva a circa 21.780 tonnellate di Mozzarella o a 21.180 tonnellate di Cheddar.

3.2.3.5 Minerali

Il fosfato di calcio colloidale è essenziale ai fini della costruzione e della stabilità del sistema micellare, condizionando, entro certi limiti, anche le dimensioni degli aggregati micellari. Esercita inoltre un'azione importante in tutte le fasi del processo di coagulazione, con particolare riferimento allo sviluppo della fase secondaria, di natura prettamente fisico-chimica. Gli equilibri minerali della micella, ovvero i rapporti tra i costituenti minerali della micella di caseina con particolare riferimento a calcio e fosforo, si riflettono sulla composizione del formaggio, con possibili ripercussioni sulla tessitura della pasta e sulle caratteristiche reologiche del prodotto finito (Mariani *et al.*, 2001).

3.2.3.6 Infiammazioni mammarie

Il latte mastitico, principalmente a causa di elevati valori di pH, coagula molto lentamente e talvolta non coagula affatto (Pecorari et Fossa, 1978) (Figura 12).

Il coagulo risulta particolarmente difettoso: dotato di scarsa elasticità, esso durante la cottura manifesta una ridottissima capacità di coartazione -scarsa contrattilità-, cui fa riscontro una minore sineresi (Annibaldi, 1959 - Waes et van Belleghem, 1969 - Pecorari et Fossa, 1978 - Kiermeier et Keis, 1964 - Tallamy *et al.*, 1969 - Butkus *et al.*, 1973 - Annibaldi *et al.*, 1974 - Annibaldi *et al.*, 1975 - Ruffo *et al.*, 1975 - Annibaldi *et al.*, 1976 - Ritcher, 1976 - Ali *et al.*, 1980 - Politis et Ng-Kwai-Hang, 1988-1 - Rogers et Mitchell, 1994). I granuli caseosi risultano di dimensioni molto eterogenee. Quelli più piccoli manifestano una eccessiva "sensibilità" al "fuoco", non si disidratano in misura adeguata

e perdono la capacità di coesione. Essi, per lo più restano nel siero -sotto forma di “polvere”- e concorrono a determinare una minore efficienza di resa della trasformazione casearia. Aumentano le perdite di grasso e di caseina, conseguenti, rispettivamente, ai difetti di struttura del reticolo caseinico e ad una più intensa attività proteolitica aspecifica (Rogers et Mitchell, 1994 - Politis et Ng-Kwai-Hang, 1988-2 - Murphy *et al.*, 1989 - Barbano *et al.*, 1991 - Barbano, 1994). Le perdite contribuiscono ad abbassare la resa in formaggio del latte mastitico, già di per sé inferiore rispetto a quella di un latte normale a causa del suo minore contenuto di caseina (Lucey et Kelly, 1994, Munro *et al.* - 1984, Barbano *et al.* - 1991, Olson, 1977, Leavitt *et al.* - 1982, Polis et Ng-Kwai-Hang - 1988).

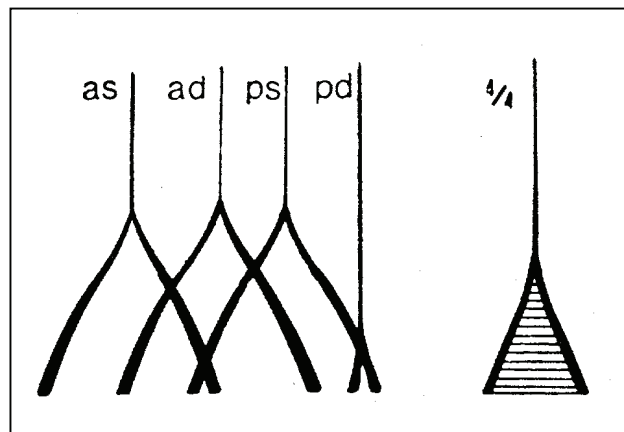


Figura 12: tracciati lattodinamografici di latte normale (as, ad, ps) e di latte mastitico -pd = quarto posteriore destro- (Pecorari et Fossa, 1978).

Le masse caseose, poco contrattili, risultano molto più ricche di siero (Annibaldi *et al.*, 1975 - Rogers et Mitchell, 1994) e, soprattutto, caratterizzate da una pasta non omogenea, con zone o parti a diverso grado di umidità (Annibaldi *et al.*, 1975). Quest'ultima condizione, marcatamente anomala, specie nel caso di formaggi a pasta cotta, dura e a lunga maturazione (es. Parmigiano-Reggiano), rappresenta l'origine di numerosi difetti e alterazioni che si manifestano a breve, medio e lungo periodo, difetti in grado di penalizzare in misura notevole la resa commerciale della trasformazione casearia (Annibaldi *et al.*, 1975 - Ruffo *et al.*, 1975 - Annibaldi, 1978 - Pecorari, 1984). I ristagni di siero, localizzati sia nelle porzioni interne della forma sia sottocrosta, danno origine alla formazione dei cosiddetti “bianchi” o “smorbi”, che si manifestano

precocemente come macchie o chiazze biancastre (Annibaldi *et al.*, 1974 - Annibaldi *et al.*, 1975 - Sandri, 1999). Nel corso della stagionatura la pasta di queste zone anomale perde progressivamente di elasticità diventando “gessosa”, difetto da cui deriva la “correzione” della forma, con conseguente notevole deprezzamento commerciale del formaggio (Pecorari, 1984). Più in generale, il formaggio risulta soggetto ad un andamento maturativo decisamente anomalo, con comparsa di sapore amaro e di gusto piccante, nonché di colorazioni accentuate e spesso non uniformi e di altri difetti, che nel lungo periodo possono determinare un sensibile aumento degli scarti.

3.2.3.7 La resa in formaggio

La resa in formaggio è il parametro tecnico più importante e indica la quantità di formaggio espressa in kg che si ricava da 100 kg o litri di latte.

Per una buona resa casearia risulta fondamentale la qualità del latte, composta da tutto l'insieme di parametri analizzati fin d'ora.

La trasformazione del latte in formaggio consiste fondamentalmente nel processo di separazione tra la parte solida (la cagliata) da quella liquida (il siero).

Se nel processo di caseificazione si ottiene il massimo recupero possibile della parte solida; maggiore sarà la quantità di solidi recuperati e migliore sarà la resa.

La resa, oltre che dai parametri che caratterizzano il latte è ovviamente condizionata dalla tecnica di lavorazione e stagionatura -temperatura, umidità e tempi di lavorazione, differenti manipolazioni sulla cagliata- e quindi i valori di resa devono essere riferiti al tipo di formaggio ottenuto.

3.2.4 Proprietà organolettiche

Fra le proprietà intrinseche di un alimento, quelle organolettiche occupano in genere un ruolo predominante nel determinare l'interesse e il gradimento del consumatore (Carlson *et al.*, 1987). Le proprietà organolettiche di un alimento sono l'insieme delle sue caratteristiche fisiche e chimiche percepite dagli organi di senso e che, nel complesso, suscitano nella persona delle reazioni emotive più o meno intense. Manifestazioni della percezione delle proprietà organolettiche sono, ad esempio, il sapore, il profumo, il colore, la freschezza, la consistenza, la dimensione, la forma, il gradimento, il piacere.

Tali sensazioni manifestano una più o meno elevata intensità secondo l'impatto che le proprietà hanno nei confronti della persona.

Risulta difficile catalogare le singole proprietà organolettiche in quanto alcune, per la loro complessità, sono in realtà composte da un insieme di caratteristiche percepite globalmente. Nell'insieme esse si possono riassumere in tre categorie generali che sono valutate, più o meno consciamente, nel seguente ordine cronologico (Cappelli et Vannucchi, 1990):

- aspetto fisico: in questa categoria si riassumono la forma, la dimensione, il colore e la tessitura. Nella percezione dell'aspetto assume un ruolo primario la vista
- caratteristiche chimiche: in questa categoria si riassumono l'odore e il sapore. La percezione delle caratteristiche chimiche è una prerogativa dei chemiorecettori dislocati nella lingua e nel naso
- caratteristiche meccaniche: in questa categoria si riassumono la resistenza meccanica, la tessitura, l'omogeneità, la croccantezza, ecc. Si tratta di caratteristiche che vengono percepite in modo complesso dal tatto e, in qualche caso, con l'intervento dell'udito.

3.2.5 Conclusioni

Riassumendo, un "latte di qualità" deve possedere 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 e un'ottimale attitudine specifica alla coagulazione, intesa come buona reattività con il caglio, elevata capacità di rassodamento della cagliata e conseguente idonea capacità di contrazione e di eliminazione del siero (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 (Battistotti e Corradini, 1993).

4 OBIETTIVO

In un momento economico molto critico per la zootecnia italiana, come quello che stiamo vivendo, è difficile ipotizzare l'utilizzo di nuove tecnologie, che implicino impegni finanziari considerevoli per aumentare l'efficienza della selezione.

Oggi più che mai è quindi fondamentale riuscire ad integrare in modo organico tutti gli strumenti gestionali e di miglioramento genetico per riuscire a contrarre il costo di produzione del latte ed ad incrementare la produzione sia in termini quantitativi che qualitativi così da accrescere la competitività delle realtà zootecniche.

Scopo di questa ricerca è individuare nuovi parametri qualitativi e nuovi strumenti in grado di descrivere con maggior precisione le caratteristiche tecnologico-casearie del latte e studiare gli aspetti genetici e selettivi di tali nuovi caratteri.

I parametri descrittivi della qualità casearia del latte sono, in parte, influenzati da fattori ambientali, come ad esempio la stagione di produzione, il regime alimentare, l'andamento climatico, lo stadio di lattazione, ecc. e, in parte, influenzati dalle caratteristiche genetiche delle bovine come ad esempio la razza ed il tipo genetico delle caseine. I caratteri per cui esiste una componente genetica possono essere migliorati tramite il processo di miglioramento genetico, sempre che esista un sistema organizzato di raccolta delle informazioni e si conosca quanta della variabilità fenotipica del carattere è dovuta alla genetica (ereditabilità del carattere).

Analizzando quindi le differenze genetiche esistenti tra le bovine per tali parametri, si è studiata la possibilità di intervenire con azioni selettive per variare l'assetto genetico degli animali in produzione al fine di ottimizzare la resa casearia e la qualità del prodotto finito.

La qualità del latte non è soltanto una caratteristica "innata" di una razza ma è anche un elemento che va preservato nel tempo, a fronte di un continuo aumento produttivo che, se incontrollato, potrebbe causare un deperimento della qualità.

Essendo l'obiettivo generale della tesi molto vasto; lo si è sviluppato attraverso diversi contributi sperimentali dagli obiettivi ben precisi e delineati:

- parametri nutraceutici del latte. E' un argomento estremamente innovativo; l'obiettivo di questo studio è stato inizialmente quello di raccogliere informazioni sulle casomorfine prodotte dalla digestione della β -caseina e, in un secondo momento, verificare le frequenze alleliche della β -caseina nella popolazione di razza Bruna e analizzare come queste siano variate negli anni anche in relazione alla selezione attuata per la k-caseina
- selezione per caratteri "di qualità". Si è analizzata la caseina del latte, un carattere conosciuto da lungo tempo ma per cui solo negli ultimi anni è possibile analizzarne di routine il contenuto sui campioni di singole vacche. L'obiettivo di questo studio è stato, in un primo momento, quello di verificare come la selezione attuata nella razza Bruna per la proteina abbia avuto effetto sulla caseina. Successivamente si sono analizzati i vantaggi per una selezione diretta sulla caseina e, quindi, verso una maggior qualità casearia delle produzioni
- strumenti per nuovi parametri qualitativi per il latte di massa. Lo scopo di questo progetto è stato quello di creare un test di analisi rapido per analizzare il contenuto di k-caseina B in campioni di latte di massa (test Kappa), ponendo così le basi per l'introduzione del parametro nel sistema di pagamento latte-qualità
- variabilità della k-caseina B. Sui risultati del progetto precedente, si è dato il via ad un ulteriore studio con l'obiettivo di verificare la variabilità del contenuto in k-caseina B nel latte di massa in funzione di molteplici fattori (razza, allevamento, etc.)
- effetto del contenuto di k-caseina B sulle qualità casearie. Partendo da latte di massa, si è voluto analizzare come variano i parametri lattodinamografici del latte in funzione dei diversi contenuti in k-caseina B
- stima del genotipo per la k-caseina su singole vacche, sia attraverso l'utilizzo del test kappa, che attraverso un calcolo probabilistico a partire dai genotipi noti di soggetti appartenenti alla stessa linea parentale.

Per la disponibilità di dati e per la collaborazione dell'associazione nazionale di razza (ANARB) la maggior parte degli studi sono stati sviluppati nell'ambito della razza Bruna Italiana.

5 CONTRIBUTI SPERIMENTALI

5.1 β -caseina: qualità del latte per la salute umana

Il latte è il primo alimento ingerito alla nascita da tutti i mammiferi. Rappresenta un alimento completo perché costituito da tutti gli elementi nutritivi indispensabili per la sopravvivenza: acqua, zuccheri (lattosio), proteine, grassi, sali minerali e vitamine. In particolare, circa il 78% delle proteine è rappresentato da caseina, di cui circa un terzo è costituito dalla β -caseina (Figura 13) (Rijnkels, 2002).

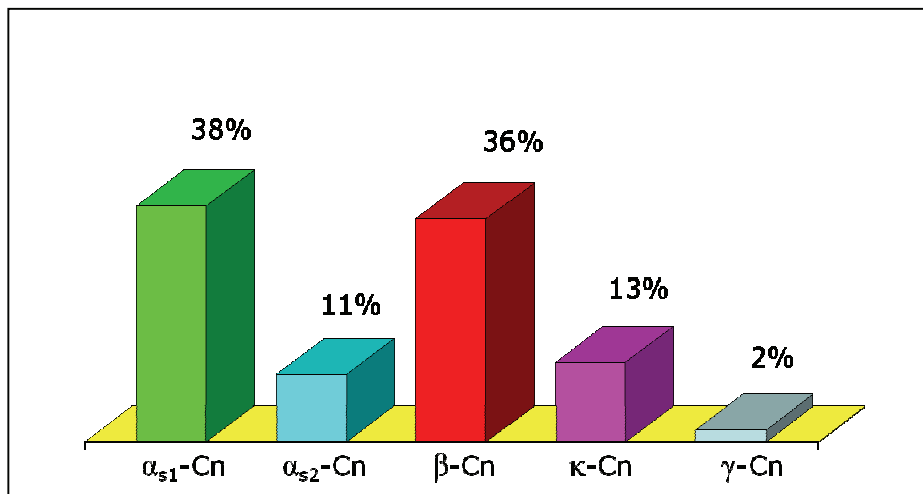


Figura 13: le caseine

Il gene responsabile della sintesi della β -caseina è stato localizzato sul cromosoma 6 in una regione di circa 250 kb in cui sono presenti anche i geni che codificano per le altre frazioni proteiche (α_{s1} -caseina, α_{s2} -caseina e κ -caseina) che compongono la caseina. Mutazioni puntiformi a livello di DNA -sostituzioni nucleotidiche- in questo gene hanno dato origine a 13 differenti varianti genetiche della β -caseina: A1, A2, A3, B, C, D, E, F, G, H1, H2 e I (Kamiński *et al.*, 2007). La sostituzione della prolina in posizione 67 della variante A2 ha dato origine alla variante A1 (Figura 14); da quest'ultima è derivata la variante B, che si distingue per l'aminoacido in posizione 122. Le varianti A1, A2 e B sono quelle maggiormente diffuse nelle popolazioni bovine mondiali. Le varianti A3 e C sono considerate rare. Le frequenze alleliche delle varianti A1 e A2 mostrano un'elevata variabilità a seconda della razza: l'A1 è la più frequente nella Holstein (66%), nella Red

danese (71%) e nella Ayrshire (72%), mentre l'A2 ha percentuali maggiori nella Jersey (70%) e Guersey (95%) (Kamiński *et al.*, 2007).

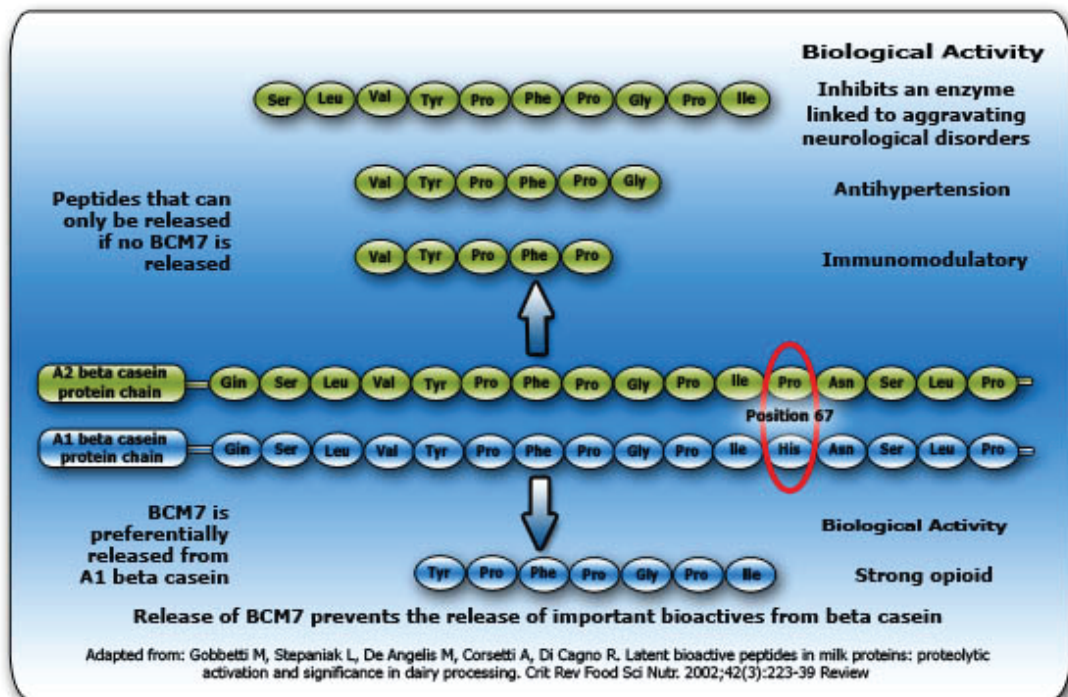


Figura 14: formazione di differenti macropeptidi generati dalla digestione di β -caseina A1 o β -caseina A2 (www.betacasein.org)

5.1.1 Ipotesi sulle proprietà bioattive delle varianti di β -caseina

Le proteine sono una famiglia molto eterogenea di composti organici e sono coinvolte in numerosi processi biologici. L'idrolisi enzimatica delle proteine, a seguito di processi industriali o nel corso della digestione, può determinare il rilascio di frammenti, della lunghezza di alcuni amminoacidi, dalla sequenza primaria (Figura 14). Questi frammenti sono chiamati peptidi e per molti di loro è stata riconosciuta un'attività biologica. Negli ultimi anni è aumentato significativamente l'interesse nei confronti di peptidi bioattivi in grado di esercitare effetti benefici su diverse funzioni fisiologiche dell'organismo umano -funzione antipertensiva, antimicrobica, antivirale-.

Per alcuni peptidi di origine alimentare, diverse ricerche hanno suggerito un effetto negativo per la salute dell'uomo. Già nel 1997 Elliott *et al.*, (1997) e Hartwig *et al.*, (1997) riconducevano alle varianti genetiche della β -caseina una diversa incidenza della predisposizione all'insorgenza del diabete mellito insulino dipendente (IDDM / DM-1)

negli infanti della popolazione scandinava. L'azione patogena sarebbe dovuta a casomorfine, polipeptidi ad attività oppioidi ottenuti dal metabolismo di prodotti contenenti caseina (Svedberg *et al.*, 1985). L'attività oppioidi delle casomorfine è ulteriormente confermata da uno studio finalizzato all'ottenimento di molecole β -omologhe utilizzabili come farmaci di origine alimentare (Chiarella, 2000). Nello studio condotto da Laugesen (Laugesen e Elliott, 2003) è evidente il legame tra il livello di ingestione di β -caseina A1 e l'incidenza di morti per malattie cardiache, legame non presente con altri fattori di rischio quali tabacco, alcool e alimentazione con diversi livelli di grassi saturi (Tabella 2).

Paese	A1/pro-capite (g/giorno)	Mortalità per IHD (su 100.000 persone)	Altri fattori di rischio (g/giorno):		
			Tabacco	Alcool	Grassi saturi
Irlanda	3,84	131,1	2.279	16,2	14,5
Finlandia	3,11	113,0	1.933	16,4	14,2
Islanda	1,82	72,5	2.255	8,0	16,6
Italia	1,19	50,5	1.907	17,6	12,7
Francia	0,93	32,8	2.204	22,9	16,2

Tabella 2: rischio di morte associato a diversi fattori in alcune nazioni

Durante il processo digestivo, dalla degradazione della β -caseina A1 e B -ma non dalla variante A2- viene prodotta la β -casomorfina-7 (BCM-7), un peptide di 7 amminoacidi che agisce come potente oppioidi nell'organismo umano. La β -casomorfina-7 è stata ritrovata nel contenuto intestinale dopo aver ingerito latte.

Vari studi (Knivsberg *et al.*, 2003 - Laugesen e Elliott, 2003) hanno ipotizzato che la BMC-7 possa essere uno dei fattori di rischio per l'insorgenza di patologie neurologiche, quali schizofrenia ed autismo, di patologie cardiache di natura ischemica (IHD), del diabete di tipo 1 (IDDM/DM-1) e della sindrome di morte improvvisa dei neonati.

C'è da sottolineare, però, come studi più recenti (EFSA, 2009) abbiano un po' messo in discussione il ruolo della BMC-7 nell'eziologia delle patologie riportate poc'anzi. Secondo gli autori, una relazione causa-effetto tra l'assunzione orale di BMC-7 e l'insorgenza delle malattie non può essere stabilita con certezza.

5.1.2 La β -caseina e la razza Bruna italiana

In Italia, studi condotti nel 2004, hanno stimato che, tra le principali razze da latte italiane, la Bruna ha una frequenza allelica per la variante A2, quello più favorevole per la salute umana, nettamente superiore -pari al 70%- rispetto a Frisona e Pezzata Rossa, le quali si caratterizzano per una frequenza allelica di circa il 50% (Figura 15).

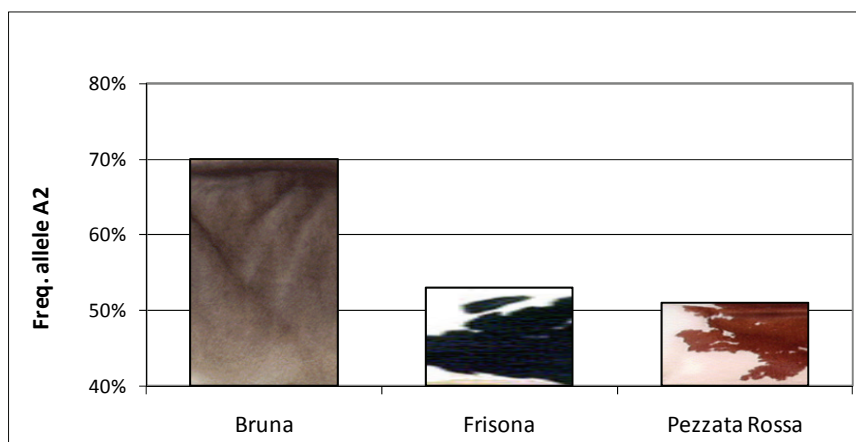


Figura 15: frequenza della β -caseina A2 in alcune razze da latte italiane (Caroli *et al.*, 2004)

Da qualche anno ANARB effettua routinariamente la genotipizzazione al locus della β -caseina su tutti i tori avviati alle prove di progenie e per tutti i tori che possono essere utilizzati nella popolazione.

L'indagine condotta su 605 tori nati tra il 1999 e il 2006 ha evidenziato che l'allele A2 è nettamente quello più rappresentato in popolazione con una frequenza del 70%. Gli alleli A1 e B sono presenti entrambi con frequenze alleliche di circa il 14%. E' stata riscontrata la presenza anche degli alleli rari C e I (Figura 16).

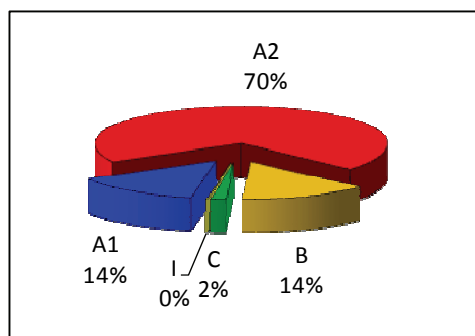


Figura 16: frequenze alleliche nella razza Bruna italiana

Un'ulteriore analisi per anno di nascita dei tori (Figura 17) evidenzia un sensibile trend positivo, pari a circa +1,5% annuo, per la frequenza allelica della variante A2.

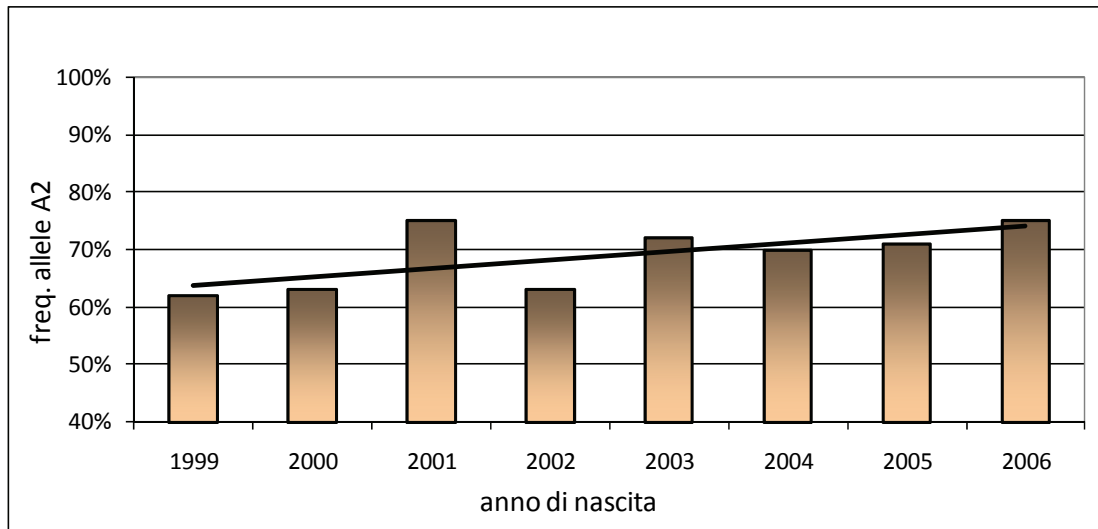


Figura 17: frequenza della β -caseina per i tori nella Bruna italiana

5.1.3 Linkage β -caseina - k-caseina nella razza Bruna

5.1.3.1 Obiettivo

Il trend positivo della variante A2 si pensa che non sia legato ad un effetto selettivo diretto sulla variante, ma piuttosto al *linkage disequilibrium* tra i loci della β -caseina e della k-caseina (Comin *et al.*, 2008), visto che quest'ultima è in selezione da molti anni nella Bruna Italiana. Si è voluto quindi verificare l'esistenza di un'associazione preferenziale tra alcuni alleli della k-caseina e alcuni alleli della β -caseina.

5.1.3.2 Materiali e metodi

Per verificare questa ipotesi sono state utilizzate le analisi di 868 tori di razza Bruna caratterizzati, a livello di DNA, sia per la k-caseina, che per la β -caseina.

Sono state calcolate le frequenze osservate nel dataset e quelle attese in popolazione secondo la regola di Hardy-Weinberg; si è poi applicato il test di significatività del X^2 (Figura 18) per decidere se accettare o meno l'ipotesi nulla ad un certo grado di significatività.

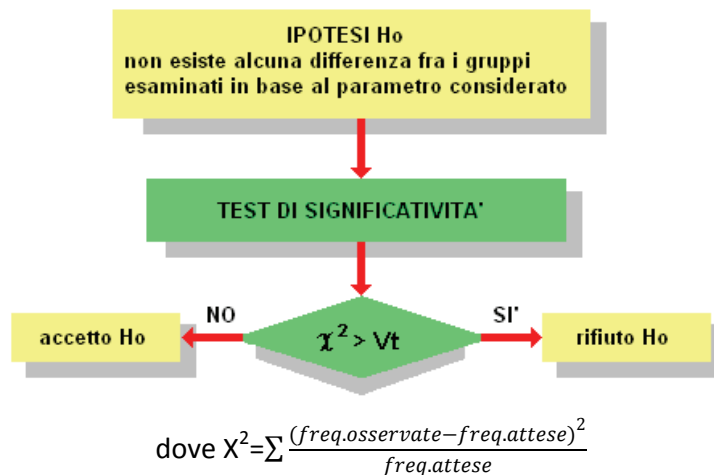


Figura 18: test del X^2

5.1.3.3 Risultati

Nelle tabelle 3 e 4 sono riportate, rispettivamente le frequenze alleliche e genotipiche del dataset che rispecchiano quanto dichiarato dalla Associazione Nazionale Allevatori (ANARB, 2009) considerando che il dataset utilizzato include solo animali con entrambe le analisi e quindi relativamente giovani.

β -caseina	%	k-caseina	%
A1	13,1	A	24,8
A2	71,1	B	74,8
B	13,9	H	0,4
I	1,9		

Tabella 3: frequenze alleliche

β -caseina	%	k-caseina	%
A1A1	1,15	AA	5,30
A1A2	19,7	AB	39,06
A1B	2,30	BB	54,95
A1I	1,84	BH	0,69
A2A2	48,16		
A2B	24,88		
A2I	1,27		
BI	0,69		

Tabella 4: frequenze genotipiche

Guardando la distribuzione dei genotipi composti di k-caseina e β -caseina (Tabella 5) risulta evidente l'elevata frequenza di k-caseina BB e β -caseina A2A2. Questo aplotipo, con 326 soggetti, copre il 38% del totale e fa pensare quindi ad una associazione preferenziale tra l'allele A2 della β -caseina e l'allele B della k-caseina.

Frequenze		BETA-CASEINA								Totale
		A1A1	A1A2	A1B	A1I	A2A2	A2B	A2I	BI	
K-CASEINA	AA	8	10	14	0	1	13	0	0	46
	AB	2	101	5	11	87	121	6	6	339
	BB	0	60	1	5	326	80	5	0	477
	BH	0	0	0	0	4	2	0	0	6
	Totale	10	171	20	16	418	216	11	6	868
	%	1.15	19.7	2.3	1.84	48.16	24.88	1.27	0.69	100

Tabella 5: genotipi di k-caseina e β -caseina presenti nel dataset

Per verificare ciò, dopo aver calcolato le frequenze attese per il genotipo BB della k-caseina e quello A2A2 della β -caseina, si è applicato su di esse il test del X^2 .

Come si può vedere nelle tabelle 6 e 7 il valore del X^2 per la β -caseina A2A2 è di 92,26 mentre quello della k-caseina BB è di 84,79. Entrambi i valori, ad un livello di significatività inferiore del 1% (Tabella 8), portano a rifiutare ampiamente l'ipotesi nulla. Si è dimostrato quindi che, con una probabilità molto significativa, esiste l'associazione tra i due loci della β -caseina e della K-caseina.

β-CASEINA A2A2							
osservate	AA	AB	AH	BB	BH	HH	Totale
Totale	1,0	87,0	0,0	326,0		4,0	418,0
%	0,2%	20,8%	0,0%	78,0%		1,0%	100,0%
attese	AA	AB	AH	BB	BH	HH	Totale
Totale	25,8	155,3	0,7	234,0		2,2	418,0
%	6%	37%	0%	56%		1%	100,0%
test chi quadro	5 gradi di libertà, livello di significatività inferiore all'1%						92,26

Tabella 6: test del X^2 per la β -caseina A2A2

KCASEINA BB											
osservate	A1A1	A1A2	A1B	A1I	A2A2	A2B	A2I	BI	BB	II	Totale
Totale	0,0	60,0	1,0	5,0	326,0	80,0	5,0	0,0	0,0	0,0	477,0
%	0,0%	12,6%	0,2%	1,0%	68,3%	16,8%	1,0%	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%
attese	A1A1	A1A2	A1B	A1I	A2A2	A2B	A2I	BI	BB	II	Totale
Totale	8,2	88,7	17,4	2,4	241,0	94,5	12,9	2,5	9,3	0,2	477
%	2%	19%	4%	0%	51%	20%	3%	1%	2%	0%	100,0%
test chi quadro	9 gradi di libertà, livello di significatività inferiore all'1%										84,7867

Tabella 7: test del X^2 per la k-caseina BB

Gradi di libertà	Probabilità	
	5%	1%
1	3.841	6.635
2	5.991	9.210
3	7.815	11.345
4	9.488	13.277
5	11.070	15.086
6	12.592	16.812
7	14.067	18.475
...

Tabella 8: valori di significatività del χ^2

5.1.3.4 Conclusioni

L'associazione tra k-caseina B e β -caseina A2 non è dovuta al caso bensì esiste effettivamente un'associazione preferenziale tra i due alleli che codificano per le due caseine.

Ciò consentirà alla razza Bruna di mantenere alta in popolazione, senza eccessivi sforzi selettivi, la frequenza della β -caseina A2 visto che questa risente positivamente della selezione che già da parecchi anni interessa la k-caseina B.

5.2 *Indice di caseina*

5.2.1 *Introduzione*

La qualità del latte è sempre stato un obiettivo primario per la Razza Bruna italiana tant'è che nel suo indice di selezione (ITE - indice totale economico) viene assegnata un'enfasi relativa del 45% ai chili di proteina e del 9% al contenuto di proteina (Rossoni *et al.*, 2006). Constatato però che il latte di razza Bruna è destinato prevalentemente alla caseificazione e che, come già descritto precedentemente, è la caseina che influisce sulla resa della trasformazione casearia e la qualità del formaggio (Pecorari *et al.*, 1990), per questa razza che ha come principale obiettivo di selezione la produzione in caseina sarebbe ipotizzabile utilizzare caratteri in selezione diversi dall'attuale proteina. In un primo studio svolto su un piccolo dataset di vacche di razza Bruna è stato dimostrato come l'indice di caseina, ovvero il rapporto tra il contenuto di caseina e il contenuto di proteina grezza, può variare anche in maniera consistente da un animale all'altro (Ghiroldi *et al.*, 2004). Altri studi, inoltre, hanno evidenziato come l'indice di caseina abbia riflessi importanti sulla resa casearia e la forza del coagulo (Mariani *et al.*, 1997). A titolo dimostrativo, tramite un semplice calcolo, è possibile stimare come lattini con lo stesso contenuto in proteina ma con un diverso indice di caseina (Tabella 9), portino a caratteristiche casearie nettamente migliori per il latte con un più alto indice di caseina (figure 19 e 20).

Proteina %	Caseina %	Indice di caseina
3,4	2,52	74
3,4	2,55	75
3,4	2,58	76
3,4	2,62	77
3,4	2,65	78
3,4	2,69	79
3,4	2,72	80
3,4	2,75	81
3,4	2,79	82
3,4	2,82	83
3,4	2,86	84

Tabella 9: animali tutti con ugual valore di % proteina ma con % caseina significativamente diverse

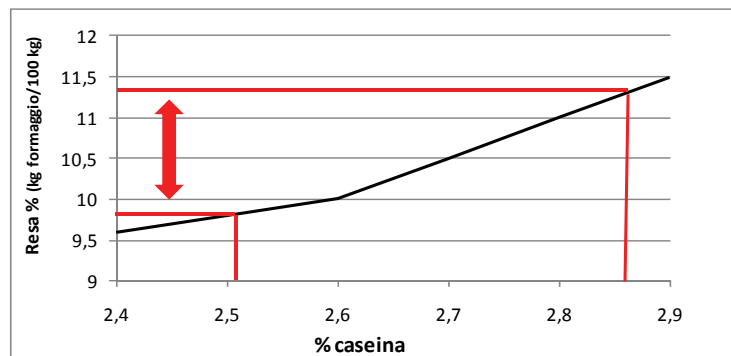


Figura 19: differenza di resa all'aumentare del contenuto di caseina

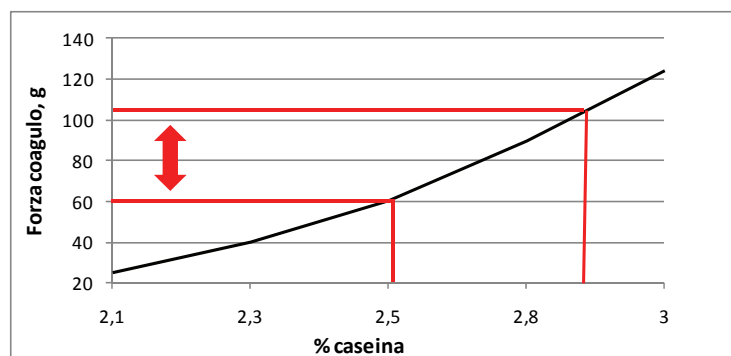


Figura 20: diversa forza del coagulo all'aumentare del contenuto di caseina

Anche altri lavori (Wood *et al.*, 2003; Ikonen *et al.*, 2004; Mitchell *et al.*, 2005) hanno dimostrato l'esistenza di variabilità fra singole vacche per il contenuto di caseina avvalorando quindi la possibilità di fare selezione direttamente su questo carattere.

Le ereditabilità calcolate nel progetto BruCa (Samorè *et al.*, 2007), che ha investigato su come la selezione può influenzare il contenuto di caseina nel latte, mostrano sia per la % caseina che per i chili caseina valori addirittura maggiori rispetto alla proteina (Tabella 10). Anche la correlazione tra il contenuto di caseina e di proteina è molto stretta (99%) e ciò ci rassicura sul fatto che la selezione effettuata negli ultimi decenni sulla proteina, ha portato a migliorare il patrimonio genetico delle vacche anche per quanto riguarda la caseina. D'altro canto, la correlazione non è uguale ad uno quindi è possibile che una selezione diretta per la produzione di caseina dia risultati maggiori rispetto ad un selezione per la proteina.

5.2.2 Obiettivo

Obiettivo di questo studio è verificare l'effetto sulla caseina dell'attuale indice di selezione per la razza bruna e, inoltre, ipotizzare un indice di selezione che dia un maggior progresso genetico per questo importante carattere.

5.2.3 Materiali e metodi

La possibilità di selezionare direttamente per il carattere caseina è un elemento abbastanza nuovo perché, solo negli ultimi anni, la tecnologia ha fornito strumenti in grado di rilevare, in modo economico e compatibile con la routine dei controlli funzionali, il contenuto in caseina nei campioni di latte.

Per questo studio sono state utilizzate l'ereditabilità e le correlazioni fra caratteri stimate dal progetto BruCa (Samorè *et al.*, 2007), (Tabella 10).

	Latte Kg	Grasso Kg	% Grasso	Proteina Kg	% Proteina	Caseina Kg	% Caseina	Indice caseina	Lattosio %	Urea %
Latte Kg	8,4%	89,5%	-10,6%	86,7%	-21,0%	95,6%	-16,7%	14,0%	13,7%	16,0%
Grasso Kg	80,1%	8,0%	74,4%	86,4%	13,9%	85,3%	19,0%	12,6%	15,0%	10,4%
% Grasso	-83,0%	5,0%	11,5%	13,7%	71,4%	21,7%	65,9%	20,2%	14,3%	39,7%
Proteina Kg	94,8%	79,6%	2,0%	10,6%	30,5%	99,6%	35,5%	36,1%	13,4%	-24,0%
% Proteina	-25,4%	-40,0%	27,8%	10,5%	27,5%	23,1%	99,1%	39,0%	44,0%	10,2%
Caseina Kg	93,8%	75,3%	98,7%	99,2%	97,0%	12,4%	40,5%	43,5%	18,9%	-31,0%
% Caseina	-20,9%	-24,0%	28,3%	14,0%	96,7%	14,9%	30,1%	61,0%	15,6%	97,0%
Indice caseina	13,5%	14,6%	64,0%	14,7%	13,0%	21,9%	25,1%	11,4%	73,0%	-10,2%
Lattosio %	17,5%	11,1%	-2,6%	16,3%	-8,2%	19,5%	4,1%	73,0%	25,5%	20,0%
Urea %	0,4%	6,1%	11,3%	-1,2%	0,3%	-1,4%	-0,5%	-10,2%	89,0%	12,9%

Tabella 10: correlazioni genetiche sopra la diagonale, correlazioni fenotipiche sotto la diagonale, ereditabilità sulla diagonale (dati BruCa)

L'archivio dei dati fenotipici a disposizione (Tabella 11) è molto consistente perché raccoglie quasi 580.000 controlli funzionali con il dato relativo alla caseina il cui contenuto è stato determinato avvalendosi dello strumento a infrarossi *MilKoscan FT 6000* (www.foss.dk).

Provincia / Regione	anno di controllo				
	2003	2004	2005	2006	2007
Bolzano	0	0	1	0	0
Lombardia	0	18778	84264	86943	99457
Trento	0	0	0	0	18947
Veneto	0	0	33975	50688	55992
Piemonte	577	2682	4576	11581	13527
Friuli V.G.	0	0	2570	9133	12589
Emilia Romagna	0	0	8	6068	10736
Abruzzo	0	0	2453	10179	11777
Molise	0	0	3169	9585	10253
Basilicata	0	0	0	2631	6825
Campania	0	0	0	0	0
Totale	577	21460	131016	186808	240103

Tabella 11: archivio dati fenotipici

Utilizzando il software PEST (Groeneveld e Kovac, 1990) si è effettuata una valutazione genetica sperimentale per i caratteri produzione di caseina, contenuto di caseina, indice di caseina -ovvero il rapporto tra la % di caseina e la % di proteina grezza- contenuto di lattosio e urea utilizzando un modello testday a ripetibilità i cui fattori sono gli stessi impiegati, nella razza Bruna, per gli altri caratteri produttivi (Rossoni e Nicoletti, 2006):

$$y_{ijkl} = \mu + htd_i + age_j * ordpar_k * dim_l * grav_m + perm_n + a_o + e_{ijklmno}$$

dove: y_{ijkl} : carattere in esame

μ : media generale

htd_i : effetto fisso allevamento-giorno di controllo

age_j : effetto fisso età al parto (32 classi di 2 mesi ciascuna)

$ordpar_k$: effetto fisso ordine di parto (2 classi, primipare vs pluripare)

dim_l : effetto fisso del giorno di lattazione (19 classi di 20 gg ciascuna)

$grav_m$: effetto fisso stadio di gravidanza (4 classi)

$perm_n$: effetto casuale ambientale permanente

a_o : effetto casuale genetico additivo

$e_{ijklmno}$: effetto casuale residuo.

Successivamente si è stimato il progresso genetico atteso in Bruna in 10 anni per questi caratteri adottando dapprima l'attuale indice di selezione (Tabella 12) che pone un interesse selettivo sulle proteine con un' enfasi relativa del 45% sulla produzione e del 9% sul contenuto. Ciò ci è servito per analizzare in che modo la selezione indiretta ha influito sui caratteri di studio. In un secondo momento, si è ristimato il progresso

genetico utilizzando gli stessi pesi statistici dell'indice di selezione ma sostituendo i kg e la percentuale di proteina con i kg e la percentuale di caseina.

Carattere	peso	enfasi relativa
Proteina (kg)	5	45%
Proteina %	1	9%
Longevità	2	18%
Mungibilità	1	9%
Cellule somatiche	-0,5	5%
Punteggio finale	1	9%
Pastoie	0,5	5%

Tabella 12: composizione indice di selezione (ITE) della Razza Bruna

5.2.4 Risultati

I risultati ottenuti analizzando i dati presenti in archivio dimostrano che, dal punto di vista fenotipico, esiste una buona variabilità del carattere, con differenze anche molto forti tra gli animali; inoltre, la media dell'indice di caseina della razza Bruna è oltre un punto superiore al valore di 77% riportato in bibliografia (Rowlands, 1938) (Figura 21).

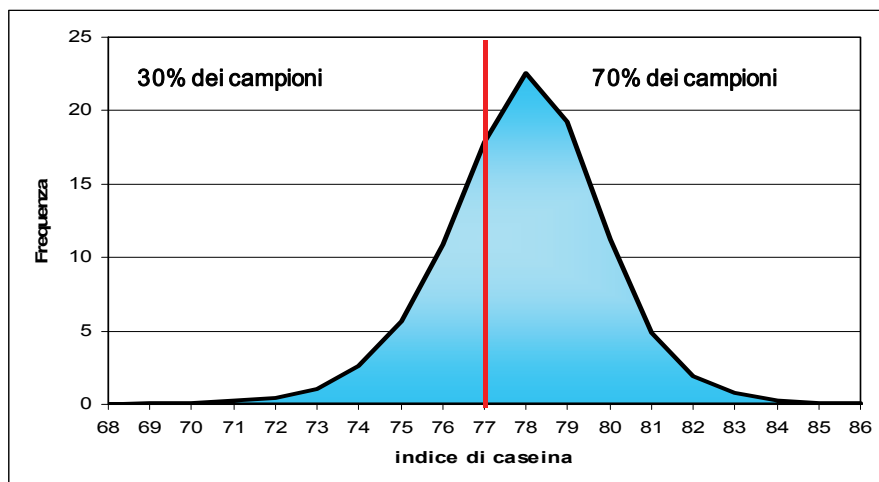


Figura 21: distribuzione fenotipica dell'indice di caseina nel dataset

Come si può vedere nel grafico 22, negli ultimi anni si evidenzia un progresso genetico maggiore per il contenuto in caseina rispetto a quello ottenuto per la proteina. Ciò fa supporre che l'attuale attenzione selettiva nei confronti della proteina abbia, in pratica, influenzato molto di più la produzione in caseina rispetto alle altre componenti della proteina totale del latte.

Ciò è ben evidenziato nel trend positivo dell'indice di caseina, un parametro direttamente connesso all'efficienza delle produzioni della vacca e che stima quanta della proteina prodotta dall'animale sia effettivamente utile in termini di produzione casearia.

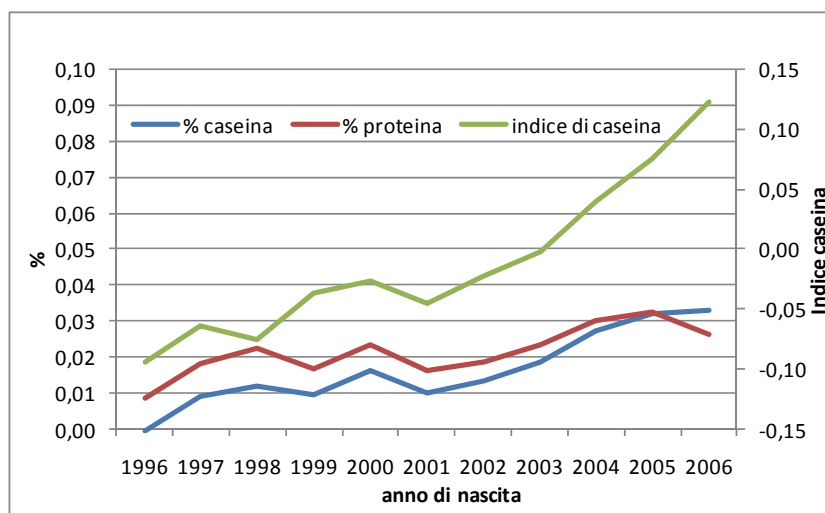


Figura 22: trend genetico vacche per l'indice caseina e per il contenuto di caseina e proteina

La valutazione genetica sperimentale per la produzione di caseina stila una classifica dei riproduttori molto simile a quella della proteina, come atteso visto l'elevata correlazione genetica esistente tra i due caratteri (99,6%). Tuttavia, per i singoli riproduttori, esistono differenze significative tra la valutazione genetica per i kg di proteina e quella per i kg di caseina. Come si può vedere in figura.23, per i riproduttori con un indice di kg proteina di 20 si osserva una variabilità dell'indice kg caseina che varia da 15 a 18 kg. Le differenze fra tori sono ancora più evidenti se si confronta l'indice kg di proteina con l'indice di caseina: tori con lo stesso indice di proteina mostrano una notevole variabilità per l'indice di caseina (da -0,4 a +0,7). Anche se si hanno valori percentuali di caseina e proteina molto simili tra loro, si potrebbe basare la selezione sulle piccole differenze presenti tra questi due tratti per ridurre la quantità di azoto assunto dalla bovina ma non utile per la produzione di formaggio.

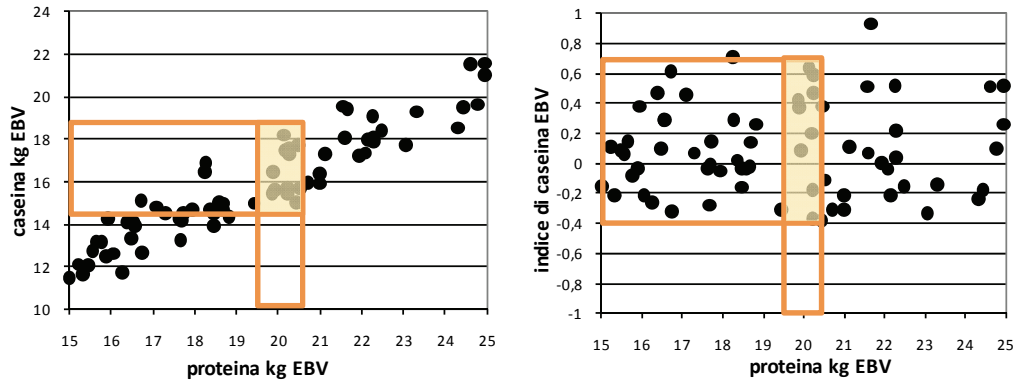


Figura 23: Plots degli indici kg proteina, kg caseina e indice di caseina per alcuni tori autorizzati all'IA

Il progresso genetico atteso dei caratteri analizzati utilizzando l'attuale indice di selezione nella razza Bruna è riassunto in tabella 13.

Carattere	Progresso genetico	
	assoluto	in dev. st.
Latte kg	492,7 (ds 431,33)	1,14
Caseina kg	21,93 (ds 14,92)	1,47
Proteina kg	23,92 (ds 16,12)	1,48
Caseina %	0,11 (ds 0,12)	0,91
Proteina %	0,1 (ds 0,15)	0,66
Indice di caseina	0,38 (ds 0,49)	0,78
Urea %	-0,01 (ds 1,57)	0,00
Lattosio %	0,03 (ds 0,11)	0,26

Tabella 13: progresso genetico atteso in 10 anni con l'indice di selezione attuale

Come si può vedere il progresso genetico per i kg di caseina è dello stesso range di quello dei kg di proteina, come atteso visto le alte correlazioni genetiche tra i due caratteri. Il progresso genetico della % di caseina, invece, è di 0,91 deviazione standard in 10 anni ovvero il 30% più alto se comparato con quello della % di proteina (0,66 ds). Ciò è dovuto alla più alta correlazione genetica tra il contenuto di caseina e la produzione di proteina (0,35) rispetto al contenuto di proteina con la produzione della stessa (0,30).

L'attuale indice di selezione sembra avere un piccolo impatto su urea e lattosio mentre mostrano un grosso effetto sul numero di caseina. Ciò è causato dalle correlazioni genetiche positive dell'indice di caseina sia con la produzione (0,36) che con il contenuto di proteina (0,39).

Spostando, invece, l'enfasi relativa dell'indice di selezione dalle proteine alle caseine non si osservano cambiamenti di un certo rilievo nei risultati selettivi.

I risultati ottenuti (tabella 14) mettono in evidenza un aumento del progresso genetico sia dei kg di latte prodotto che di tutti i parametri che garantiscono una buona resa casearia sia in termini qualitativi che quantitativi: +0,20 % di deviazione standard genetica per i kg di latte, +0,16% per i kg di caseina e +0,11 per la % di caseina.

Si riduce leggermente (0,06 deviazioni standard) il progresso genetico per la percentuale di proteina ma ciò è positivo se collegato all'aumento del progresso genetico per la percentuale di caseina perché significa che si ha una minor produzione di proteine non utili dal punto di vista della trasformazione casearia del latte.

Carattere	Progresso genetico		
	assoluto	in dev. st.	diff. in dev.st. rispetto proteina
Latte kg	580,62 (ds 431,33)	1,34	0,20
Caseina kg	24,34 (ds 14,92)	1,63	0,16
Proteina kg	25,59 (ds 16,12)	1,58	0,10
Caseina %	0,13 (ds 0,12)	1,02	0,11
Proteina %	0,09 (ds 0,15)	0,6	-0,06
Indice di caseina	0,38 (ds 0,49)	0,77	-0,01
Urea %	-0,02 (ds 1,57)	-0,01	-0,01
Lattosio %	0,04 (ds 0,11)	0,38	0,12

Tabella 14: progresso genetico atteso in 10 anni inserendo la caseina, invece della proteina, nell'indice di selezione

5.2.5 Conclusioni

La percentuale di caseina e la percentuale di proteina non hanno un rapporto costante in tutti i soggetti della popolazione e l'indice di caseina può, quindi, variare anche in modo consistente. A pari contenuto proteico possono perciò corrispondere differenti indici di caseina e, di conseguenza, differenze significative nelle caratteristiche casearie del latte prodotto.

La selezione effettuata negli ultimi decenni sulla produzione di proteina, ha portato nella Razza Bruna ad un innalzamento anche della quantità di caseina prodotta.

Grazie a nuovi strumenti tecnologici, anche il contenuto di caseina è diventato un parametro rilevabile nella routine dei controlli funzionali; di conseguenza è ipotizzabile una sua diretta inclusione tra i parametri oggetto di selezione. Ciò avrebbe un limitato impatto dal punto di vista operativo ma permetterebbe di indirizzare maggiormente la selezione verso una maggiore resa casearia, una migliore qualità del formaggio prodotto ed una maggiore efficienza alimentare delle bovine allevate.

5.3 Test kappa

Come già ampiamente descritto precedentemente, la variante B della k-caseina influenza positivamente le caratteristiche tecnologiche e la “lavorabilità” del latte, migliora la resa casearia nonché la qualità del formaggio. Ad oggi, lo studio della variante B della k-caseina in campioni di latte è stato effettuato per mezzo di tecniche cromatografiche, quali l’elettroforesi e la HPLC (“*high pressure liquid chromatography*” ovvero cromatografia liquida ad alta pressione). Le tecniche elettroforetiche (Urea-PAGE a pH alcalino e IEF) sono di natura qualitativa, vale a dire esse permettono di stabilire la presenza o meno della variante oggetto di studio, ma non di quantificarne il contenuto, se non in maniera grossolana ed approssimativa. Un metodo quantitativo, invece, è la HPLC, con particolare riferimento alla HPLC in fase inversa (RP-HPLC) (Figura 24). Si tratta di una tecnica analitica che permette di determinare sia il tipo di variante presente che il contenuto relativo della stessa. Per contro, la metodica richiede l’utilizzo di apparecchiature sofisticate e di personale specializzato; inoltre, i tempi di analisi sono lunghi e i costi piuttosto elevati.

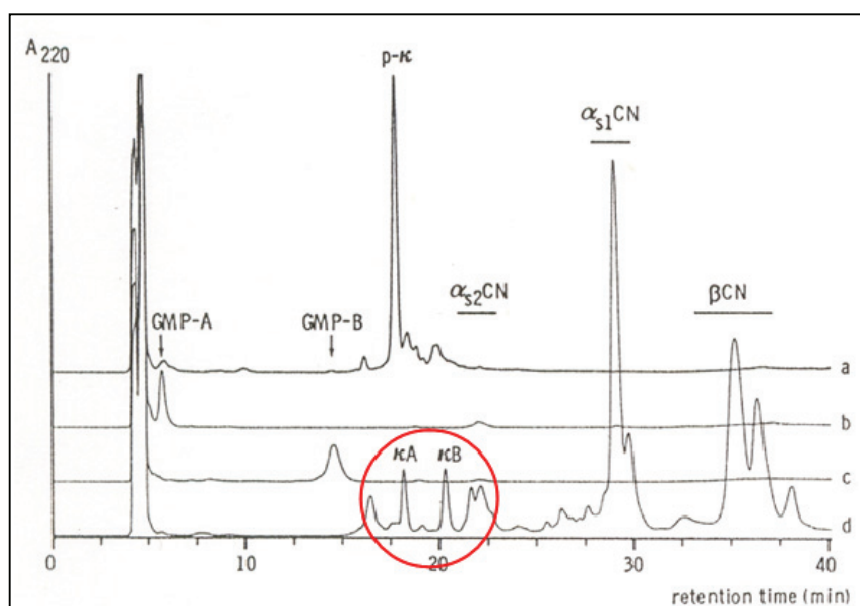


Figura 24: RP-HPLC caseina

La vera sfida è quindi riuscire a quantificare il contenuto di k-caseina B in campioni di latte di massa con costi contenuti e tempi d’analisi compatibili con la routine dei controlli funzionali. E’ proprio per questo scopo che è nato il “test kappa”.

5.3.1 L'idea

Come spesso accade, le novità migliori nascono dall'incontro di una buona idea con chi vede in essa la possibilità di ottenere buoni risultati per sé o per chi esso rappresenta.

Così è avvenuto anche per il "test kappa". È stato ideato dall'Università degli Studi di Parma ma sviluppato insieme all'Associazione Nazionale Allevatori Razza Bruna (ANARB) e alla Federazione Svizzera della razza Bruna che vedevano nel "test kappa" lo strumento per riuscire a misurare oggettivamente, in modo rapido e con un costo compatibile con i normali controlli latte qualità, il contenuto di k-caseina B in campioni di latte di massa e vedere così finalmente riconosciuta agli allevatori, in termini economici, la maggiore qualità casearia del latte.

L'intero progetto è stato supportato dal Ministero delle Politiche Agricole che ha visto, in questa idea, la possibilità di caratterizzare ulteriormente il latte italiano ai fini delle trasformazioni casearie.

5.3.2 Lo scopo

Lo scopo di questo progetto era la creazione di un test ELISA -"Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay"- che misuri, con buona precisione, il contenuto di k-caseina di tipo B presente in campioni di latte di massa, indipendentemente da tutti gli altri fattori quali l'alimentazione, la tipologia di allevamento e, soprattutto la razza o le razze incluse nel campione di latte.

5.3.3 Lo sviluppo del test

Per raggiungere quest'obiettivo sono stati sviluppati i seguenti passi (Summer *et al.*, 2010):

- creazione di un anticorpo monoclonale (Mab) in grado di riconoscere specificamente la variante B della k-caseina bovina
- verifica della reattività di Mab nei confronti di campioni di latte individuale raccolti da vacche con genotipo noto al *locus* della k-caseina (*CSN3*)
- messa a punto di un test ELISA per la determinazione del contenuto di k-caseina B in campioni di latte bovino.

5.3.3.1 Creazione dell'anticorpo monoclonale (Mab)

Il test, di natura immunoenzimatica, si basa sul riconoscimento specifico della k-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 (www.morphosys.com - Morphosys, 82152 Martinsried/Planned, Germania). L'anticorpo è una proteina particolare costituita da una porzione in grado di legare, in maniera specifica, un determinato antigene. Nel nostro caso, è stato generato un anticorpo in grado di reagire specificamente con un oligopeptide corrispondente alla sequenza 131-153 della variante B della k-caseina bovina e che è risultato inattivo nei confronti dello stesso oligopeptide della variante A. In questa regione, in effetti, si trovano entrambe le mutazioni, in posizione 136 e in posizione 148, che distinguono la variante B dalla variante A (Figura 25).

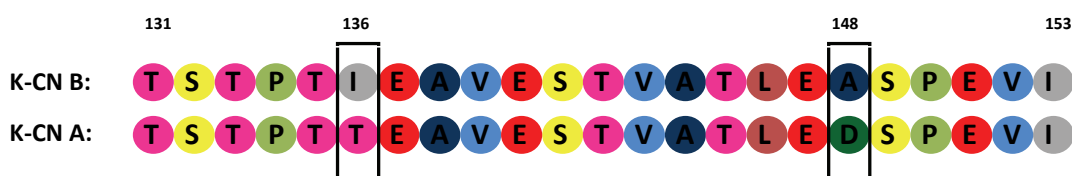


Figura 25: peptide della k-caseina A e della k-caseina B

Si è detto che l'anticorpo lega in modo specifico la variante B della k-caseina, senza reagire con la variante A. Ciò è stato verificato in un test ELISA (figura 26), studiando la reattività di Mab nei confronti di diversi antigeni. Mab ha evidenziato reattività nei confronti degli antigeni che presentavano la sequenza 131-153 della variante B della k-caseina bovina (bokCaB24-TRF e bokCaB24-BSA) ed è risultato non reattivo nei confronti degli antigeni che presentavano la stessa sequenza della variante A della k-caseina (bokCaA24-TRF).

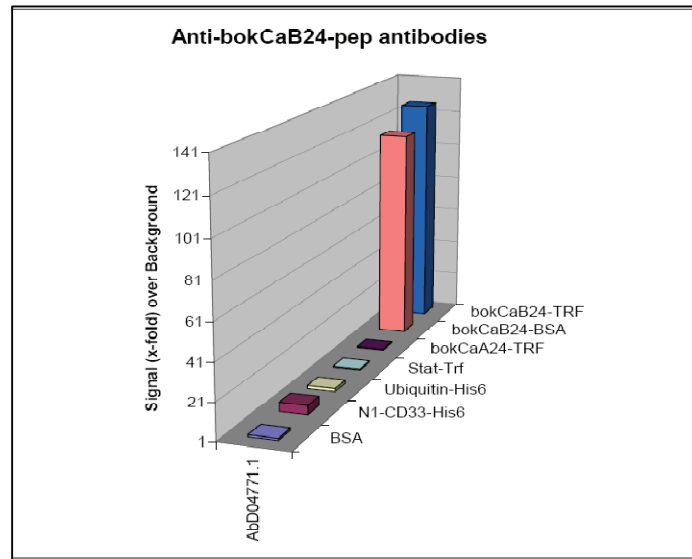


Figura 26: verifica dell'anticorpo in vitro

5.3.3.2 Verifica della reattività dell'anticorpo monoclonale (Mab)

Una volta selezionato in vitro, occorre verificare il comportamento immunologico di Mab nei confronti della k-caseina B nativa -proteina intera- e di tutte le altre frazioni proteiche presenti nel latte. A tale scopo, è stata utilizzata la metodica Western Blot (figura 27) su campioni di latte e di siero presamico raccolti da vacche genotipizzate al locus della k-caseina. Nei pozzetti 1 e 2 sono stati caricati i controlli dell'analisi: bokCaA24-TRF, oligopeptide 131-153 della k-caseina A coniugato con la transferrina, e bokCaB24-TRF, oligopeptide 131-153 della k-caseina B coniugato con la transferrina. Come atteso, Mab ha evidenziato reattività nei confronti di bokCaB24-TRF (presenza di banda) ed è risultato non reattivo rispetto a bokCaA24-TRF. Mab, quindi, ha mostrato lo stesso comportamento immunologico evidenziato in ELISA (figura 26) anche in un saggio WB. Rispetto ai campioni di latte e di siero presamico, Mab è risultato reattivo nei confronti di campioni di vacche k-caseina BB e AB mentre non ha manifestato reattività nei confronti di campioni di vacche k-caseina AA. La regione riconosciuta da Mab si trova nella porzione carbossiterminale della k-caseina (106-169, glicomacropeptide) che viene rilasciata nel siero -in questo caso siero presamico- a seguito del taglio proteolitico operato dalla chimosina del caglio tra il residuo 105 e quello 106 della k-caseina. Le bande osservate nei pozzetti dei sieri presamici AB e BB, quindi, sono ascrivibili alla reazione tra Mab e il gliomacropeptide di tipo B. Si è dimostrato, così, che Mab reagisce

specificamente con la k-caseina B, che tale reazione non è condizionata dalla presenza o meno della k-caseina A e che lo stesso anticorpo non riconosce altri frammenti proteici nel latte.

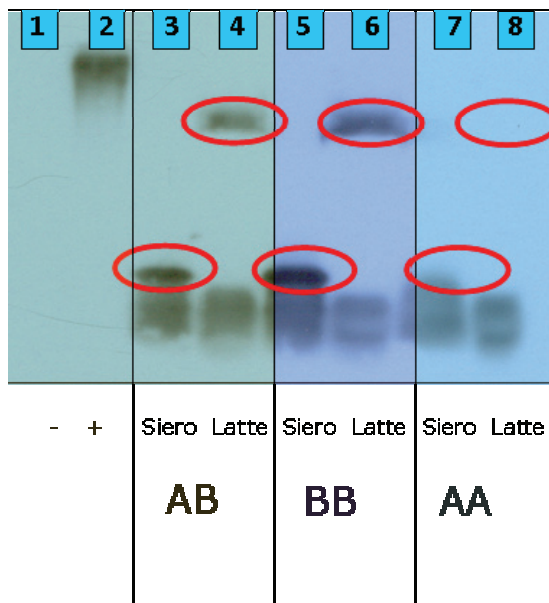


Figura 27: verifica dell'anticorpo su latte e siero

5.3.4 Test ELISA per il contenuto in k-caseina B su latte di massa

Il test per la determinazione del contenuto di k-caseina B presente in campioni di latte di massa è stato sviluppato da Bender MedSystems (Vienna, Austria). Si tratta di un test ELISA competitivo indiretto basato su una reazione colorimetrica. Dall'intensità del colore sviluppato si misura la quantità di k caseina B contenuta nel campione di latte.

5.3.4.1 Come funziona

Il principio di questo test viene illustrato in figura 28.

La piastra del kit è costituita da un supporto in materiale plastico dove molecole di k-caseina B purificata sono adsorbite sulla superficie di ogni pozzetto. Il protocollo di analisi può essere suddiviso in alcuni passaggi fondamentali: incubazione primaria, incubazione secondaria e colorazione.

Incubazione primaria - In questa fase nel pozzetto viene messa una quantità opportunamente diluita del campione di latte da analizzare. Si procede, quindi, all'aggiunta dell'anticorpo primario, vale a dire dell'anticorpo monoclonale in grado di

legare in maniera specifica la variante B della k-caseina. La k-caseina B presente sulle pareti del pozzetto (k-caseina B legata) e quella nel campione da analizzare (k-caseina B libera) “competono” tra loro per legare l’anticorpo monoclonale. In pratica, maggiore è la quantità di k-caseina B presente nel campione di latte, minore sarà la quantità di anticorpo monoclonale che si legherà alla k-caseina B adsorbita alle pareti del pozzetto. L’incubazione ha la durata di circa 2 ore. Al termine dell’incubazione, si procede al lavaggio del pozzetto. Il lavaggio ha lo scopo di rimuovere l’anticorpo monoclonale che si è legato con la k-caseina B libera -quella del campione di latte-.

Incubazione secondaria - Una volta ultimato il lavaggio, si procede all’aggiunta dell’anticorpo secondario. La caratteristica dell’anticorpo secondario è quella di legarsi all’anticorpo monoclonale specifico per la k-caseina B. Inoltre, esso è associato ad un enzima, la perossidasi di rafano che permette la sua colorazione. Nel corso dell’incubazione, l’anticorpo secondario si lega all’anticorpo monoclonale presente, vale a dire quello che è legato alla k-caseina B, adsorbita sulle pareti del pozzetto. L’incubazione ha la durata di circa un’ora. La quota di anticorpo secondario in eccesso viene rimossa dai pozzetti con lavaggi specifici.

Colorazione - Al termine dell’incubazione, si aggiunge tetrametil-benzidina che, grazie all’azione enzimatica della perossidasi di rafano, viene convertita in un composto che è in grado di generare una colorazione blu (rilevabile a 450 nm). L’intensità della colorazione è direttamente proporzionale alla quantità di perossidasi di rafano presente nel pozzetto e, soprattutto, è inversamente proporzionale alla quantità di k-caseina B presente nel campione di latte analizzato. Al fine di bloccare la reazione di colorazione e fissare l’intensità del segnale colorimetrico, si aggiunge un’ulteriore sostanza (acido fosforico) in grado di convertire la colorazione da blu a gialla e si procede quindi alla lettura del campione. La trasformazione del dato analitico -il valore della densità ottica rilevato allo spettrofotometro- in quantità di k-caseina B è funzione di una curva di calibrazione costruita utilizzando diluizioni successive di una soluzione standard di k-caseina B (inclusa nel kit analisi) e di un bianco analitico (i soli reagenti previsti).

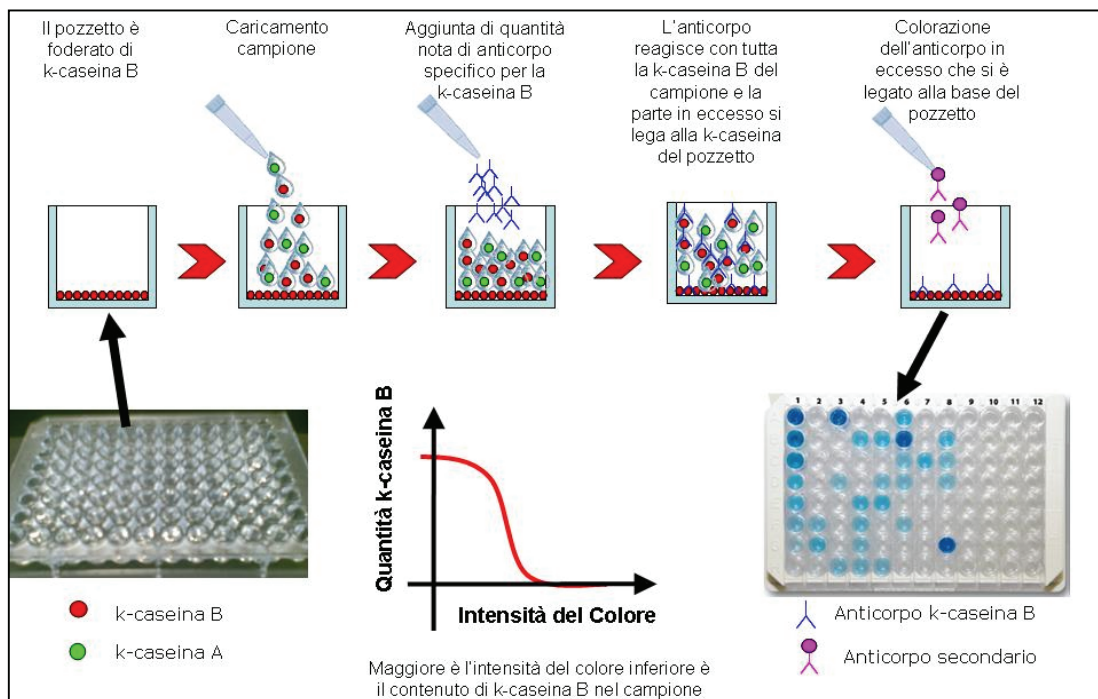


Figura 28: come si utilizza il kit di analisi

5.3.4.2 Calcolo dei risultati

Innanzitutto si procede al calcolo dell'assorbanza media per i campioni degli standard caricati in doppio. Si crea la curva di calibrazione (Figura 29) costruita utilizzando i valori medi di assorbanza degli standard (asse delle ordinate) con quelli del corrispondente contenuto di k-caseina B (asse delle ascisse).

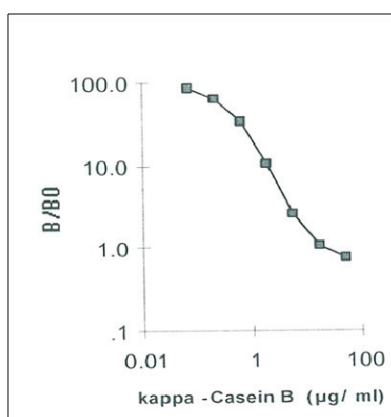


Figura 29: curva di calibrazione

Dopodiché per trasformare il dato analitico, ovvero il valore della densità ottica rilevato allo spettrofotometro, in quantità di k-caseina B si prende, per ciascun

campione analitico, sull'asse delle ordinate il valore medio di assorbanza, espresso come percentuale rispetto al bianco, e per interpolazione con la curva di taratura, si ottiene la concentrazione di k-caseina B sull'asse delle ascisse.

Il protocollo determina una diluizione dei campioni di 1:200; di conseguenza, il valore di concentrazione ricavato dalla curva di taratura deve essere moltiplicato per 200.

5.3.4.3 Dotazione nel kit d'analisi

Il materiale incluso nel test comprende tutte le soluzioni (quella per diluire i campioni e quella per i lavaggi), due standard di k-caseina B in polvere, l'anticorpo primario (monoclonale, specifico per la k-caseina B), l'anticorpo secondario, i reagenti per generare la colorazione e la piastra con i pozzetti (12 x 8). I pozzetti sono organizzati in file di otto, rimovibili e conservabili in frigo a 4° C.

5.3.4.4 Preparazione dei reagenti.

A. Wash buffer

Trasferire l'intero contenuto (50 mL) del Wash buffer concentrate in un cilindro graduato da 1000 mL. Portare al volume finale di 1000 mL con acqua distillata o deionizzata. Agitare gentilmente per evitare la formazione di schiuma. Il pH finale della soluzione deve essere portato a 7,4.

La soluzione è stabile per 30 giorni ad una temperatura compresa tra 2 e 25° C.

B. Assay buffer

Trasferire l'intero contenuto (5 mL) dell'Assay Buffer Concentrate in cilindro graduato da 100 mL. Portare al volume finale di 100 mL con acqua distillata. Agitare gentilmente la soluzione evitando la formazione di schiuma.

La soluzione è stabile per 30 giorni ad una temperatura compresa tra 2 e 8° C.

C. Preparazione dello standard di k-caseina

Ricostituire lo standard di k-caseina aggiungendo acqua distillata. La quantità di acqua distillata da aggiungere è riportata sull'etichetta della fialetta. Assicurarsi che il contenuto sia completamente disciolto capovolgendo, gentilmente e a più riprese, la fialetta. La soluzione standard così ottenuta ha una concentrazione di 50 µg/mL.

D. Preparazione dell'anticorpo anti-bovine k-Caseina B

Diluire 1:100 con Assay buffer la quantità necessaria a seconda delle strips che si prevede di utilizzare:

fino a 6 strips: 30 μ L di anticorpo in 2,97 mL di Assay buffer

fino a 12 strips: 60 μ L di anticorpo in 5,94 mL di Assay buffer

E. Preparazione del HRP-Conjugate

Diluire 1:10 HRP-Conjugate aggiungendo 90 μ L di Assay buffer alla fialetta contenente HRP-Conjugate concentrato. Rimescolare la soluzione facendo su e giù con la pipetta 5÷6 volte. Diluire ulteriormente 1:1000, sempre utilizzando Assay buffer, trasferendo 12 μ L del HRP-Conjugate diluito 1:10 in 12 mL di Assay buffer.

5.3.4.5 Protocollo del test

I passi da seguire per ottenere i risultati del test sono i seguenti:

- a. preparare i reagenti A, B e C
- b. preparazione dei campioni. Prediluire i campione di latte: 100 μ L di latte in 900 μ L di acqua bidistillata. Quindi prendere 10 μ L della prediluizione e aggiungere 990 μ L di Assay buffer
- c. determinare il numero di strips che si prevede di utilizzare. Rimuovere le strips che non servono e riporle nell'apposita bustina, chiusa correttamente, provvista di essiccante e conservarle alla temperatura di 2°÷8° C
- d. lavare i pozzetti delle strips due volte con 300 mL di Wash buffer, facendo attenzione a non toccare/graffiare il fondo del pozzetto. Dopo il doppio lavaggio, riporre la piastra capovolta su carta assorbente per non più di 15 minuti; ciò al fine di rimuovere l'eccesso di Wash buffer e, al contempo, evitare l'essiccamento dei pozzetti
- e. a partire dal secondo pozzetto della fila riservata agli standard (B1) fino al penultimo, quindi dal pozzetto B1 al pozzetto G1, aggiungere 100 microlitri di Assay buffer.

Nel primo pozzetto (A1) aggiungere 150 microlitri di Soluzione standard di k-caseina. Da questo primo pozzetto, prelevarne 50 μ L e trasferirli nel secondo pozzetto (B1). Fare su e giù 4÷5 volte con la pipetta al fine di miscelare adeguatamente il tutto. Quindi, da questo secondo pozzetto prelevarne 50 μ L e

trasferirli nel terzo pozzetto (C1), ripetendo la procedura di miscelazione. Procedere in questo modo fino al penultimo pozzetto (G1). Da questo pozzetto (G1) prelevarne 50 μ L e buttarli via. In questo modo si è costruita una curva standard che va da 50 (A1) a 0,07 μ g/mL (G1).

- f. aggiungere 100 μ L di Assay buffer ai pozzetti dedicati al “bianco” dell’analisi (H1)
- g. aggiungere 50 μ L di Assay buffer ai pozzetti dedicati ai campioni di latte
- h. aggiungere 50 μ L di ciascun campione diluito -punto b del protocollo- ai pozzetti designati
- i. preparare l’anticorpo anti-bovine k-Casein B seguendo la procedura indicata del punto D del capitolo dedicato alla preparazione dei reagenti
- j. aggiungere 50 μ L di anti-bovine k-Casein B a tutti i pozzetti, “bianchi” compresi
- k. coprire la piastra con le strisce adesive fornite nel test e tenerla in incubazione a temperatura ambiente (tra 18° e 25° C), per 120 minuti e, se possibile, in agitazione ad una frequenza pari a 200 rpm
- l. rimuovere la striscia adesiva che ricopre la piastra e vuotare i pozzetti. Quindi, lavare i pozzetti 5 volte con Wash buffer seguendo la procedura indicata nel punto d del protocollo
- m. preparare HRP-conjugate seguendo la procedura indicata nel punto E del capitolo dedicato alla preparazione dei reagenti
- n. aggiungere 50 μ L di HRP-conjugate a tutti i pozzetti, “bianchi” compresi
- o. coprire la piastra con le strisce adesive fornite nel test e tenerla in incubazione a temperatura ambiente (tra 18° e 25° C), per 60 minuti e, se possibile, in agitazione ad una frequenza pari a 200 rpm
- p. rimuovere la striscia adesiva che ricopre la piastra e vuotare i pozzetti. Quindi, lavare i pozzetti 5 volte con Wash buffer seguendo la procedura indicata nel punto d del protocollo
- q. aggiungere 100 μ L di TMB substrate solution a tutti i pozzetti, “bianchi” compresi
- r. incubare la piastra a temperatura ambiente (18°÷25° C) per circa 10 minuti. Evitare l’esposizione diretta a luce intensa. Lo sviluppo della colorazione deve essere controllata e la reazione con TMB substrate solution “stopzata” prima che i pozzetti positivi sviluppino una colorazione tale da non permetterne una

adeguata lettura con spettrofotometro. A tal fine, si raccomanda di “stoppare” la reazione quando i bianchi sviluppano un colore blu intenso. In alternativa, si consiglia di monitorare lo sviluppo del colore con spettrofotometro a 620 nm. La reazione va stoppata non appena il bianco raggiunge una OD di $0,60 \div 0,65$

- s. stoppare la reazione enzimatica aggiungendo 100 μ L di Stop solution in ciascun pozzetto, bianco compreso. È importante che la Stop solution venga aggiunta in maniera rapida e uniforme a tutti i pozzetti, al fine di inattivare completamente la reazione enzimatica colorimetrica. La piastra va letta immediatamente dopo l’aggiunta della Stop solution o entro 1 ora purché essa venga conservata ad una temperatura di $2^\circ \div 8^\circ$ C e al buio
- t. la lettura va fatta ad una lunghezza d’onda di 450 nm (in via opzionale, è possibile leggere a 620 nm).

5.3.4.6 Test di funzionalità su diverse tipologie di conservante

Per testare la possibilità di non pretrattare il campione e di poter utilizzare diverse tecniche di conservazione dei campioni di latte senza alterare il risultato dell’analisi, sono state eseguite delle prove in cinque diversi allevamenti verificando l’efficacia del test su campioni di latte fresco, con conservante -Bronopol e sodio mertiolato- e congelato. Le analisi sono state ripetute dopo 4, 8 e 12 gg.

I risultati (tabella 15) sono stati positivi, in quanto hanno mostrato che i metodi di conservazione del latte non determinano effetti sulle performance del test.

	Fresco*	Bronopol*	Sodio mertiolato*	Congelato*
campione 1	0,101	0,105	0,106	0,09
campione 2	0,089	0,095	0,094	0,099
campione 3	0,095	0,102	0,094	0,089
campione 4	0,084	0,091	0,099	0,089
campione 5	0,089	0,09	0,083	0,086
campione 6	0,087	0,087	0,087	0,103
campione 7	0,108	0,102	0,108	0,095
campione 8	0,078	0,078	0,084	0,067
campione 9	0,096	0,098	0,066	0,084
campione 10	0,071	0,081	0,065	0,062
campione 11	0,062	0,066	0,085	0,059
campione 12	0,085	0,084	0,065	0,069
campione 13	0,086	0,075	0,078	0,084
Significatività		0.57 n.s.	0.18 n.s.	0.68 n.s.

* Measure in optical intensity

Tabella 15: risultati sui campioni di latte

Sono state infine effettuate analisi di ripetibilità del test e gli esiti ottenuti nelle varie prove sono risultati sovrapponibili fra loro.

5.3.5 Il brevetto

“Il brevetto è un diritto allo sfruttamento esclusivo, per un certo periodo di tempo, di un’invenzione da utilizzare nell’industria”. “Possono costituire oggetto di brevetto per invenzione le invenzioni, di ogni settore della tecnica, che sono nuove e che implicano un’attività inventiva e sono atte ad avere un’applicazione industriale” (Codice della Proprietà Industriale, 2010).

Per tale motivo si è ritenuto particolarmente utile, per uno sviluppo futuro del nuovo strumento, avviare le procedure per il riconoscimento del brevetto internazionale.

Il test Kappa è, quindi, protetto da Brevetto internazionale PCT/IB2008/002680 dal titolo “Method of determination of k-casein in bulk milk samples”.

Per facilitare il riconoscimento commerciale del nuovo kit di laboratorio si è, inoltre, istituito il marchio test Kappa.

Il marchio è il segno distintivo che consente, senza possibilità di confusione, di riconoscere i prodotti commercializzati al fine di differenziarli da altri offerti dalla concorrenza. Il logo, rappresentato in figura 30, contraddistingue il “Test Kappa” richiamandone gli aspetti caratterizzanti e diventando indicatore di qualità oltre che di esclusività.



Figura 30: marchio test kappa (www.testkappa.com)

5.3.6 Il test kappa: uno strumento utile per tutti

Con la creazione del test kappa si ha a disposizione un nuovo strumento in grado di identificare le diverse caratteristiche casearie del latte utilizzando materiale e apparecchiature normalmente presenti nei laboratori attrezzati per analisi ELISA. I risultati del test per piastra (96 pozzetti) si ottengono in 4 ore circa. È richiesta una

piccolissima quantità di latte (10 microlitri) e non è necessario alcun pretrattamento del campione.

Lo strumento tecnico ora esiste; vediamo, qui di seguito, quali sono i vari protagonisti del settore lattiero-caseario che potranno trarre un vantaggio da un utilizzo sistematico del test kappa.

- Il singolo allevatore che, grazie ad attente scelte selettive e al continuo monitoraggio del contenuto di k-caseina B del latte della sua mandria, può, nell'arco di qualche anno, presentarsi sul mercato con un prodotto di qualità. Può inoltre sfruttare un'ulteriore potenzialità del test kappa, ovvero stimare la presenza -in duplice o singola copia- o meno dell'allele B al locus della k-caseina a livello di singola vacca.
- Il caseificio industriale o cooperativo perché, inserendo una politica di qualità del latte conferito dai singoli allevatori, potrà da un lato diversificare la destinazione del latte indirizzando quello di maggior pregio a linee produttive più remunerative per il caseificio e, dall'altro, attuare un pagamento del latte maggiormente legato all'effettiva resa economica dello stesso.
- I consorzi di tutela perché, se vogliono mantenere e promuovere la qualità del loro prodotto tipico, hanno tutto l'interesse sia a monitorare le caratteristiche del latte di partenza sia a mettere in atto azioni che garantiscano l'aumento del contenuto di k-caseina B così da assicurarsi, negli anni, un prodotto di qualità sempre migliore, ben distinguibile dai prodotti comuni.



Figura 31: il kit del test kappa

5.4 Variabilità del contenuto in k-caseina B nel latte di massa

5.4.1 Introduzione

Il quantitativo di k-caseina B presente nel latte è un parametro completamente nuovo che, solo ora, grazie al test kappa, è possibile misurare sul latte di massa. E' un importante parametro col quale familiarizzare se si vuole tenere sotto controllo e migliorare la qualità del latte in allevamento.

La k-caseina nel latte rappresenta in media il 13% della caseina totale che, a sua volta, rappresenta circa il 77% della proteina grezza contenuta nel latte. Di conseguenza, da una bovina che produce latte con il 2,8% di caseina e che ha genotipo BB per la k-caseina ci si attende, in media, un contenuto di 0,36% di k-caseina B; al contrario se la bovina è di genotipo AA i valori saranno prossimi allo 0.

Quindi, i valori di k-caseina che ci si può attendere analizzando latte di massa, che risulta dalla miscelazione di latti con contenuti di caseina differenti, oscillano da valori prossimi allo 0%, per il latte povero di k-caseina B a valori prossimi a 0,3% per il latte di elevata qualità.

5.4.2 Obiettivo

Valutare quanto è costante, in campioni di latte di massa, il contenuto di k-caseina B durante l'anno ed evidenziare eventuali differenze dovute alla razza e alla dimensione dell'allevamento.

5.4.3 Materiali e metodi

Tale progetto è stato pensato quando non si avevano ancora a disposizione i risultati di campioni di latte misurati col test kappa ma si voleva comunque approfondire le conoscenze sul contenuto di k-caseina B.

Per far ciò, tramite programma statistico SAS, si è costruita una simulazione su 860000 controlli giornalieri, dati reali di produzione di 91502 vacche distribuite in 6301 allevamenti. Si sono create situazioni aziendali fittizie per quanto concerne la tipologia di razza allevata: attraverso una distribuzione uniforme si è ipotizzato che il 25% delle aziende avesse solo animali di razza pura A, il 25% solo soggetti di razza pura B, il 50%

fossero aziende miste con animali di entrambe le razze in differenti percentuali (Tabella 16).

Razza	Frequenza	%
100%A	1755	27,9%
90%A - 10%B	328	5,2%
80%A - 20%B	317	5,0%
70%A - 30%B	302	4,8%
60%A - 40%B	283	4,5%
50%A - 50%B	316	5,0%
40%A - 60%B	328	5,2%
30%A - 70%B	336	5,3%
20%A - 80%B	280	4,4%
10%A - 90%B	315	5,0%
100%B	1741	27,6%
tot.	6301	100%

Tabella 16: distribuzione delle razze all'interno della simulazione

Sempre attraverso una distribuzione uniforme si è ipotizzato che la razza A fosse caratterizzata da vacche con un'elevata frequenza (65%) di almeno un allele B della k-caseina, mentre la razza B avesse una frequenza del 17% (Tabella 17).

Razza		frequenza genotipi			totale
		AA	AB	BB	
A	freq	5369	19898	18605	43872
	%	12,2%	45,4%	42,4%	
B	freq	32925	13330	1375	47630
	%	69,1%	28,0%	2,9%	
totale		38294	33228	19980	91502

Tabella 17: frequenza varianti alleliche della k-caseina

Tramite vari passaggi, si sono calcolati i contenuti nei latti di massa delle diverse aziende: inizialmente, per ogni soggetto, si è calcolata la % di caseina convenzionale partendo dal dato d'archivio della % di proteina. Conoscendo poi la produzione di latte si sono calcolati i kg di caseina per ogni vacca. Dai kg di caseina si è passati ai kg di k-caseina B ipotizzando che:

- se il soggetto aveva genotipo BB allora $\text{kg k-caseina B} = \text{kg caseina} * 0,13$
- se il soggetto aveva genotipo AB allora $\text{kg k-caseina B} = \text{kg caseina} * 0,065$

- se il soggetto aveva genotipo AA allora kg k-caseina B = 0.

Dai kg di k-caseina B si è passati alla % di k-caseina B e, infine, si è passati da latte individuale a latte di massa calcolando le medie aziendali per giorno di controllo per il contenuto di k-caseina B.

Gli allevamenti sono poi stati analizzati suddividendoli in tre classi: piccoli (con meno di 20 soggetti), medi (tra 20 e 40 vacche), grandi (con più di 40 vacche).

5.4.4 Risultati

Il primo importante risultato ottenuto dall'analisi, espresso bene in figura 32, evidenzia la diversa distribuzione di frequenza della percentuale media di k-caseina B nel latte, degli allevamenti piccoli rispetto a quelli medi e grandi. In questo caso si è preso in considerazione la razza A ma gli andamenti sono analoghi anche per razza mista o B.

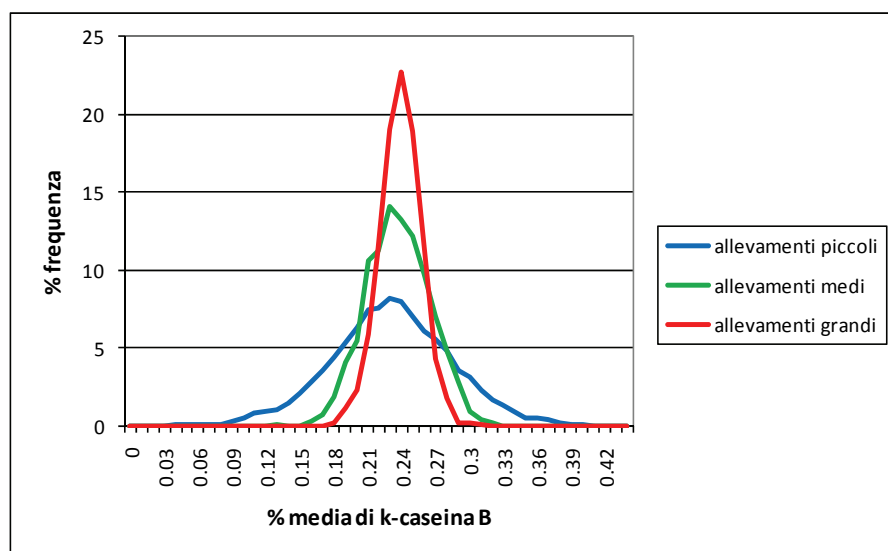


Figura 32: distribuzione di frequenza della % media di k-caseina B

La curva di distribuzione dei piccoli allevamenti è decisamente più bassa e più ampia: ciò significa che le piccole aziende si differenziano di più, tra loro, di quanto non succeda per le aziende più grandi. Ci sono, infatti, piccoli allevamenti che hanno una % media di k-caseina B di 0,09 ma altri che arrivano addirittura a sfiorare lo 0,40 dimostrando quindi una spiccata attenzione alle caratteristiche genetiche degli animali presenti in stalla. Il range di variazione è quindi molto più ampio rispetto alle grosse aziende dove, avendo

un maggior numero di capi, c'è sicuramente una minor variazione nel tempo di questo importante carattere qualitativo.

I risultati ottenuti dalle analisi fatte hanno inoltre evidenziato come la razza rivesta un ruolo importante se si vuole analizzare il contenuto di k-caseina.

Nel grafico 33 si può notare come la razza A abbia una variabilità più ampia rispetto alle altre perché, essendo caratterizzata dall'aver un'elevata frequenza dell'allele B della k-caseina, il range dei valori per il contenuto di k-caseina è molto ampio perché all'interno ci sono sia i pochi valori bassi (attorno a 0,10) delle bovine con genotipo AA che i valori alti (0,40) dei soggetti con genotipo BB. La razza B, invece, che ha un 85% di animali con solo genotipo AA, ha valori molto più concentrati perché la maggior parte sono compresi tra 0 e 0,10. Un'ampia variabilità la si trova negli allevamenti misti che sono altamente influenzati dalla razza degli animali che entrano in produzione tra un controllo e l'altro.

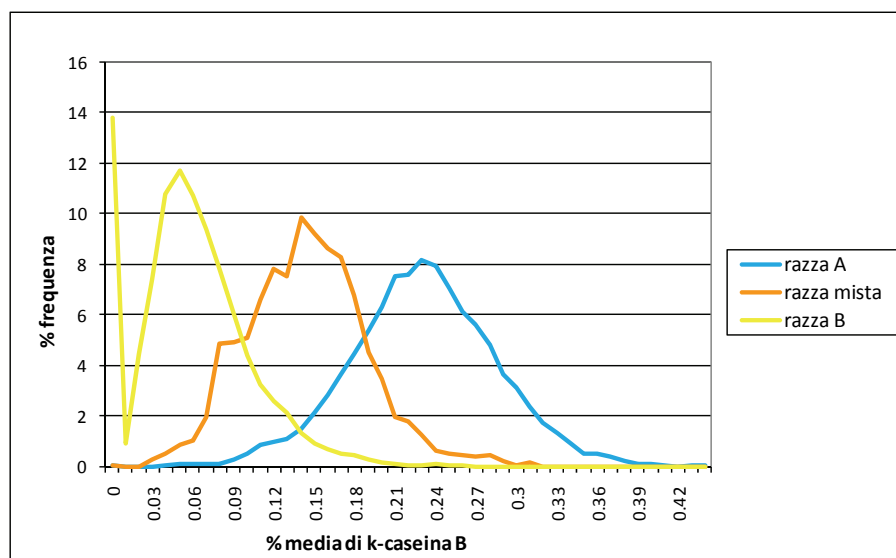


Figura 33: distribuzione di frequenza % media di k-caseina B nelle varie razze in allevamenti piccoli

Inoltre, come si vede nel grafico 34, un'azienda con soli animali di razza A, caratterizzata da un'alta frequenza dell'allele B della k-caseina, avrà ovviamente una media di stalla di k-caseina B molto più elevata rispetto ad un'azienda di razza pura B che si distingue dall'aver invece pochi animali con l'allele favorevole alla caseificazione.

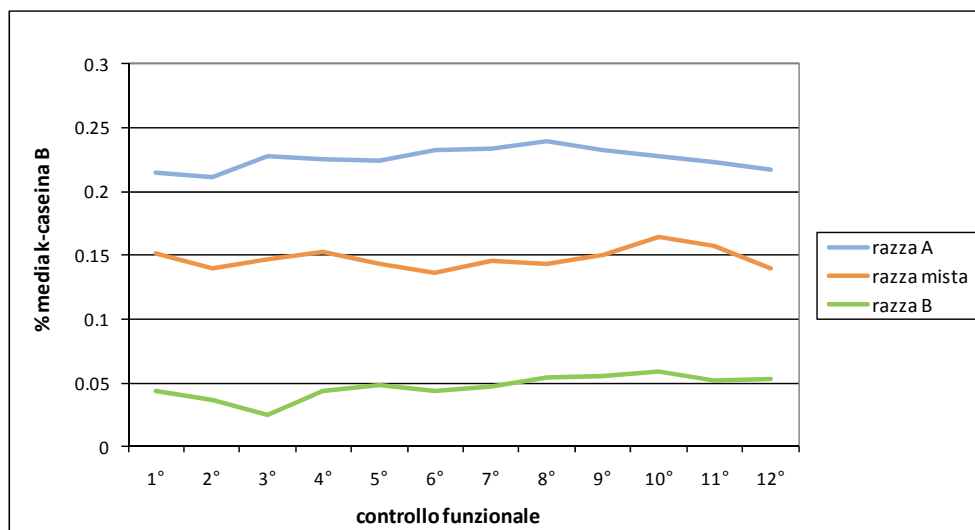


Figura 34: andamento della % media di k-caseina B nell'anno

Dal grafico 34 cogliamo un altro aspetto importante: il contenuto di k-caseina B in un soggetto è stabile nel corso dell'anno, considerando fisiologiche quelle piccole fluttuazioni che si notano tra un controllo funzionale e l'altro. Questo a riconferma del fatto che il contenuto di k-caseina B è esclusivamente determinato della genetica dell'animale.

5.4.5 Conclusioni

Riassumendo i risultati ottenuti si sottolinea che, per quanto concerne le dimensioni di allevamento, le aziende piccole mostrano una maggiore variabilità per il contenuto di k-caseina B rispetto alle medio grandi mentre, per quanto riguarda la razza, gli allevamenti di razza A, ovvero con un'elevata frequenza di k-caseina B, presentano un'oscillazione dei valori per il contenuto di k-caseina molto più ampia rispetto a quelli di razza B.

In generale, però, si può dire che il contenuto di k-caseina B nel latte di caldaia è un parametro molto più costante durante l'anno rispetto agli altri caratteri qualitativi perché è influenzato direttamente dalle caratteristiche genetiche della mandria.

Per questo motivo sarebbe sufficiente effettuare un minimo di quattro controlli nell'arco dei dodici mesi per monitorare tale valore. Questa periodicità permette al caseificio di avere una buona indicazione della qualità del latte consegnato dalle diverse tipologie di aziende, il tutto a costi estremamente ridotti.

5.5 Analisi del contenuto di k-caseina B in campioni di latte di massa

5.5.1 Introduzione

Le relazioni tra varianti genetiche e qualità del latte sono state oggetto di numerose ricerche internazionali che hanno dimostrato l'influenza della k-caseina sulla resa e sulla qualità casearia del latte.

Le varianti più comuni della k-caseina nel latte vaccino, la A e la B, differiscono tra loro per solo due amminoacidi sui 169 totali, una variazione minima ma che determina ripercussioni importanti sulla qualità tecnologica del latte.

Il latte con sola k-caseina B coagula in un tempo sensibilmente inferiore, fornisce un coagulo che rassoda più velocemente -metà del tempo rispetto ad un latte con k-caseina AA- (Figura 35) e che raggiunge una consistenza maggiore -più del 50%- rispetto a quello che si origina dal latte che contiene solo k-caseina A (figura 36) (Mariani *et al.*,2001).

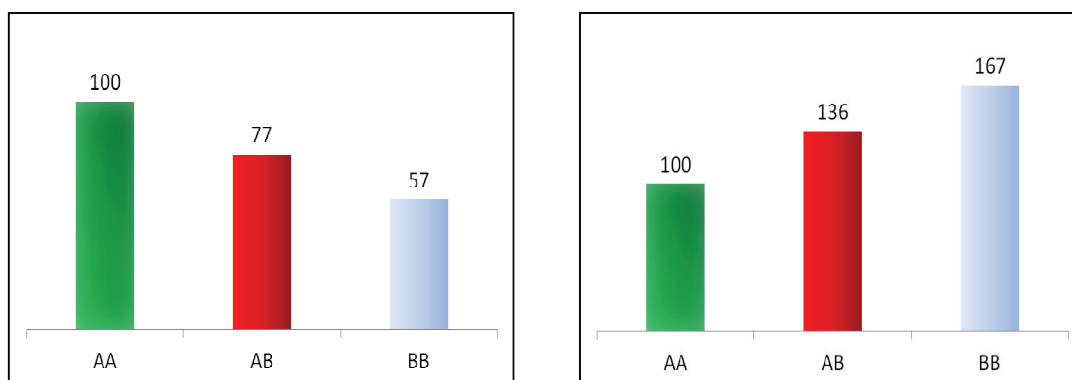


Figura 35: genotipi di k-caseina e tempo di rassodamento Figura 36: genotipi di k-caseina e consistenza del coagulo

Il tipo di k-caseina presente nel latte è molto importante perché influenza in modo significativo la resa casearia, le proprietà tecnologiche, la facilità di lavorazione del latte e la qualità del formaggio prodotto (Mariani e Pecorari, 1991).

Non si riscontrano in bibliografia, però, lavori atti a valutare come variazioni discrete del contenuto in k-caseina B influenzino le caratteristiche casearie del latte; ciò perché fino alla creazione del "test kappa" non era disponibile uno strumento in grado di determinare il contenuto di k-caseina B in campioni di latte di massa.

5.5.2 Obiettivo

L'obiettivo di questo lavoro è stato in primo luogo determinare il contenuto di k-caseina B in un numero significativo di campioni di latte di massa per riuscire poi ad analizzare in dettaglio questo importante parametro in relazione a fattori ambientali, gestionali e genetici e studiare le relazioni che esso ha con le caratteristiche casearie del latte. In particolare si è voluto verificare in che misura i parametri lattodinamografici possano essere influenzati da variazioni discrete della percentuale di k-caseina B nei campioni di latte.

5.5.3 Materiali e metodi

Il progetto ha interessato 579 aziende agricole ubicate in tutto il comprensorio di produzione del Parmigiano-Reggiano. Di ciascuna azienda si conosceva la zona altimetrica di ubicazione della stalla, le caratteristiche in termini di regime alimentare, numero di capi, produzione media, razze presenti e numero di capi in lattazione.

Nelle aziende selezionate si è proceduto al prelievo dei campioni di latte alla munta del mattino. La scelta della munta della mattina è dettata dalla necessità di non avere variabili legate al trasporto/conservazione del campione ed anche per favorire la raccolta dei campioni in caseificio.

Sui 579 campioni di latte di massa prelevati è stata effettuata la determinazione della k-caseina B (K-caseinaB_{tk}) con metodica analitica enzimatica (test Kappa). Inoltre presso due laboratori (X e Y) coinvolti nel progetto, sono state eseguite le analisi qualitative relativamente ai seguenti parametri: acidità titolabile, pH, grasso, proteine totali, caseina diretta (effettuata con apparecchiatura FOSS), lattosio, urea, crioscopia, cellule somatiche (SCS), carica microbica totale, lattodinamografia (r=tempo di coagulazione, k₂₀=tempo di rassodamento, a₃₀=consistenza del coagulo).

In primis si sono paragonati i dati dei due laboratori X e Y, che hanno analizzato rispettivamente un totale di 251 e 328 campioni. Si è verificata la distribuzione dei campioni per zone altimetriche e per province, sono state calcolate le principali statistiche descrittive -medie, deviazione standard, massimi e minimi- e infine si sono analizzati gli andamenti dei parametri lattodinamografici e del contenuto in k-caseina B presente nei campioni di latte di singolo allevamento.

In tutte le successive analisi il contenuto in k-caseina B è stato espresso in tre modi differenti:

- contenuto in k-caseina B (k-caseinaB_tk) è il contenuto in k-caseina B espresso in mg su mL ed è il valore fornito direttamente dal test kappa
- percentuale k-caseina B (%k-caseinaB) è la percentuale di k-caseina B sulla k-caseina totale, dato quest'ultimo ottenuto moltiplicando per 0,13 il contenuto in caseina
- rapporto k-caseina B su caseina totale (kB_su_case) è la percentuale di k-caseina B sulla caseina totale.

Il valore di quest'ultimo parametro, nel caso in cui il latte sia prodotto da vacche omozigoti BB, si aggira intorno al 13% mentre, per un latte prodotto da una mandria con il 50% di frequenza allelica B per la k-caseina, ci si attende un valore attorno al 6%.

Dalle analisi successive sono stati eliminati 77 campioni perché mancanti del dato riferito alla provincia d'appartenenza, o alla zona altimetrica di provenienza o al tipo di alimentazione a cui era sottoposta la vacca. Il dataset finale, su cui è stata eseguita l'elaborazione statistica tramite software SAS, è quindi costituito da 502 campioni.

Le razze presenti nel database sono principalmente quattro -Frisona, Bruna, Modenese e Reggiana-.

Essendo la Frisona la razza preponderante, per catalogare gli allevamenti secondo le razze presenti in stalla, sono stati considerati allevamenti di pura Frisona solo quelli composti esclusivamente da bovine di questa razza, mentre per le altre tre razze, si è optato di considerare un allevamento di razza pura se le bovine di una singola razza rappresentano almeno il 75% degli animali in stalla. Gli allevamenti di razza mista sono quelli costituiti da altre razze, meticcie o senza una razza prevalente.

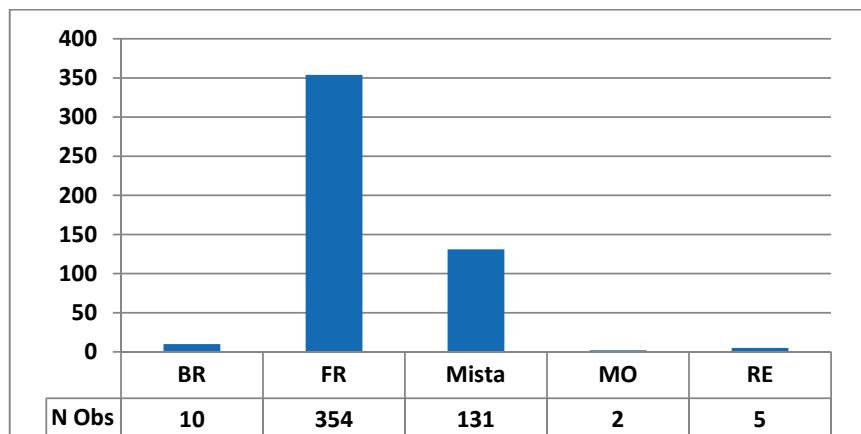


Figura 37: numero di campioni per razza

Gli allevamenti sono stati raggruppati in sei classi a seconda della dimensione della stalla (meno di 10 bovine, tra 10 e 19, tra 20 e 39, tra 40 e 69, tra 70 e 100, più di 100 soggetti).

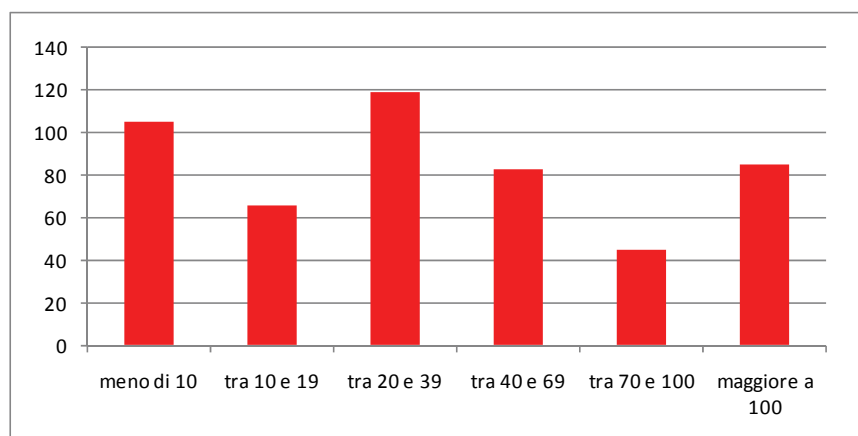


Figura 38: numero di osservazioni per dimensione allevamento

Per studiare la variabilità della k-caseina B si sono analizzati i dati sia all'interno delle singole zone altimetriche che suddivisi per province, per razza o per dimensione allevamento.

Si è calcolato l'indice di caseina e lo si è messo in relazione con il contenuto percentuale di k-caseina B sulla caseina per vedere se c'è una relazione tra i due.

Tramite elaborazione statistica si sono studiati i fattori che influenzano la percentuale di k-caseina B sulla caseina totale partendo da questo modello:

$$y_{hijklm} = \mu + \text{orig_file}_h + \text{zona}_i + \text{pr}_j + \text{razza}_k + \text{alimentazione}_l + \text{allevamento}_m + e_{hijklm} \quad (1)$$

dove: y_{hijklm} : % di k-caseina B su caseina
 μ : media generale
 orig_file_h : laboratorio d'analisi in due classi (X e Y)
 zona_i : zona di allevamento in 3 classi (pianura, collina, montagna)
 pr_j : provincia in cinque classi (BO, MN, MO, PR, RE)
 razza_k : razza allevata (identificata dalla % di Frisona allevata)
 alimentazione_l : regime alimentare in 2 classi (PU=piatto unico, T=tradizionale)
 allevamento_m : dimensione della stalla in 6 classi
 e_{hijklm} : effetto casuale residuo.

In ultima analisi si sono esaminati i fattori che influenzano i parametri lattodinamografici. Per far ciò si sono analizzati i dati applicando il seguente modello:

$$y_{ijkl} = \mu + k_su_case_i + \text{orig_file}_j + \text{acidità}_k + \text{pH}_l + e_{ijkl} \quad (2)$$

dove: y_{ijkl} : tempo di rassodamento, consistenza del coagulo, tempo di coagulazione
 μ : media generale
 $k_su_case_i$: contenuto di k-caseina B in 10 classi discrete
 orig_file_j : laboratorio di analisi in due classi (X e Y)
 acidità_k : acidità titolabile
 pH_l : pH
 e_{ijkl} : effetto casuale residuo.

5.5.4 Risultati

5.5.4.1 Paragone tra i due laboratori

Nella tabella 18 si evidenzia la distribuzione dei campioni tra i due laboratori, sia suddivisi tra le province che per zone altimetriche.

Laboratorio	provincia					Totale
	BO	MN	MO	PR	RE	
X	0 0%	0 0%	29 11,55%	215 85,66%	7 2,79%	251 43,35
Y	54 16,46%	33 10,06%	61 18,60%	37 11,28%	143 43,60%	328 56,65
Totale	54 9,33%	33 5,70%	90 15,54%	252 43,52%	150 25,91%	579

Laboratorio	zona			Totale
	Collina	Montagna	Pianura	
X	29 11,55%	33 13,15%	189 75,30%	251 43,35%
Y	41 12,50%	127 38,72%	160 48,78%	328 56,65%
Totale	70 12,09%	160 27,63%	349 60,28%	579

Tabella 18: distribuzione dei dati analizzati dai due laboratori

Si può notare come i laboratori abbiano operato principalmente su aree diverse e solo in parte sovrapposte. In questo modo si è potuto avere una copertura completa del comprensorio del Parmigiano-Reggiano.

Le differenze che emergono invece in Tabella 19 sono principalmente ascrivibili a realtà zootecniche diverse e a periodi stagionali tendenzialmente differenti, in quanto i due laboratori hanno concentrato le loro attività in due epoche stagionali diverse.

Variabile	laboratorio X					laboratorio Y				
	N°	media	Std Dev	Min	Max	N°	media	Std Dev	Min	Max
acidità	246	6,747	0,025	6,680	6,820	327	6,658	0,034	6,500	6,750
pH	246	3,228	0,101	2,800	3,600	328	3,157	0,172	2,650	3,890
grasso	251	3,673	0,308	2,990	4,770	327	3,476	0,303	2,640	4,890
proteina	251	3,296	0,166	2,810	3,970	328	3,287	0,163	2,780	4,090
caseina	251	2,541	0,136	2,160	3,040	328	2,535	0,113	2,220	3,080
lattosio	251	4,793	0,100	4,430	5,070	328	4,785	0,090	4,340	5,010
urea	246	24,120	4,847	11,200	40,100	328	25,332	5,969	9,000	46,000
crioscopia	246	-0,516	0,069	-0,531	0,521	328	-0,526	0,005	-0,544	-0,482
SCS	251	9007	64744	51	689000	327	270450	141444	41000	950000
r	246	18,813	2,625	15,300	25,000	310	19,782	3,301	11,000	35,500
k ₂₀	224	3,493	1,255	1,450	6,300	310	11,037	4,100	3,000	45,000
a ₃₀	246	30,735	6,834	15,600	45,400	310	20,723	9,625	0,000	79,000
k-caseinaB _{tk}	251	0,035	0,033	0,003	0,268	328	0,072	0,060	0,003	0,326
%k _{caseinaB}	251	10,464	9,414	0,796	71,581	328	21,410	16,982	0,830	96,650

Tabella 19: statistiche descrittive del dataset

Gli andamenti dei parametri lattodinamografici (Figura 39, Figura 40, Figura 41) sono, per le ragioni esposte precedentemente, differenti. Inoltre, questi parametri sono sensibili alle piccole variazioni analitiche presenti nel dataset. Ciò succede nonostante i tecnici dei due laboratori abbiano partecipato ad incontri dedicati per uniformare le modalità di esecuzione del test in tutte le sue fasi -preparazione dei campioni, esecuzione dei test e lettura dei dati dopo preparazione della curva-. Di questo fatto se ne è tenuto conto nell'elaborazione del dato.

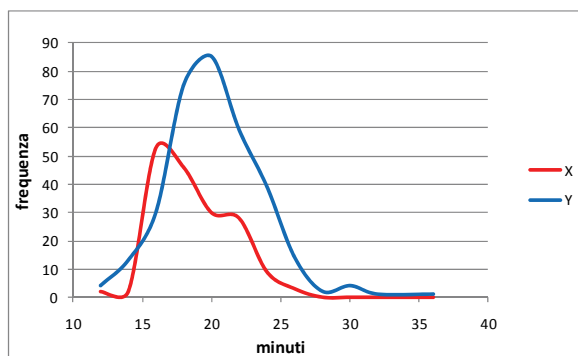


Figura 39: paragone del tempo di coagulazione (r) tra i due laboratori

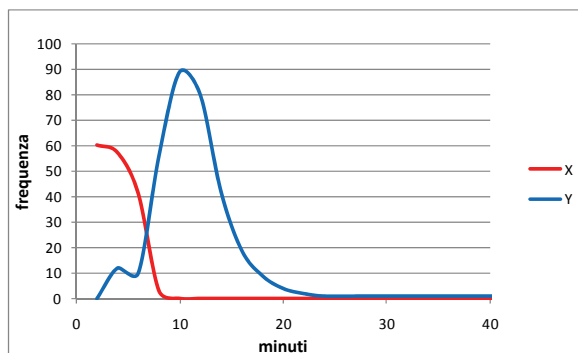


Figura 40: paragone del tempo rassodamento (k_{20}) tra i due laboratori

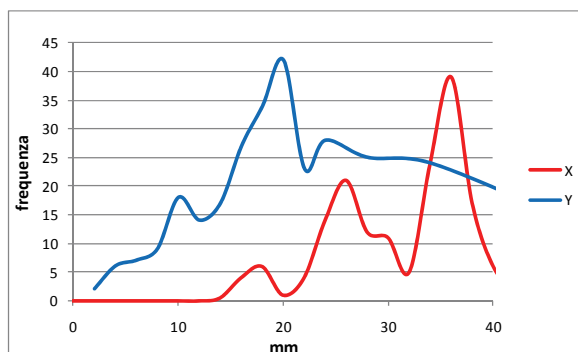


Figura 41: paragone della consistenza coagulo (a_{30}) tra i due laboratori

Nei grafici 42, 43 e 44 è riportata, invece, la distribuzione del contenuto in k-caseina B nei campioni di latte di singolo allevamento suddivisa tra i due laboratori.

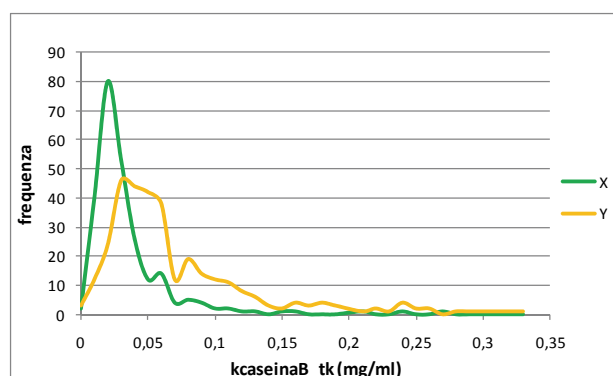


Figura 42: contenuto in k-caseina B rilevato dai due laboratori nei rispettivi campioni

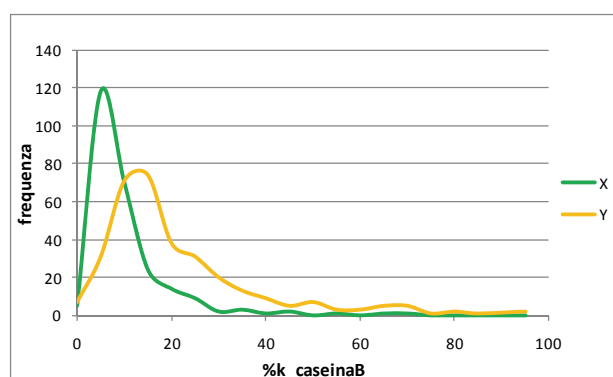


Figura 43: percentuale k-caseina B rilevata dai due laboratori nei rispettivi campioni

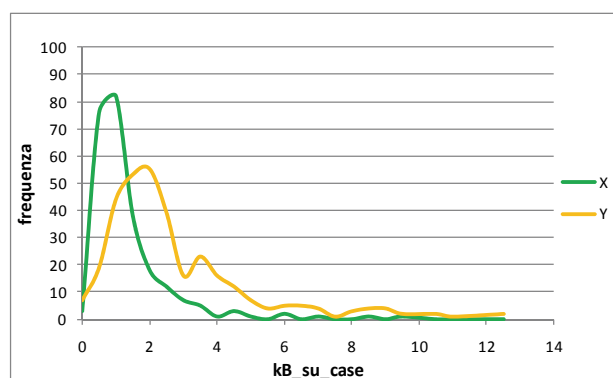


Figura 44: rapporto k-caseina B su caseina rilevata dai due laboratori nei rispettivi campioni

Anche in questo caso si può vedere come gli andamenti siano effettivamente diversi tra i due laboratori a dimostrazione della diversità dei campioni analizzati.

5.5.4.2 Distribuzione k-caseina B

In Figura 45 è riportata la frequenza percentuale del contenuto di k-caseina B, suddivisa per zona altimetrica.

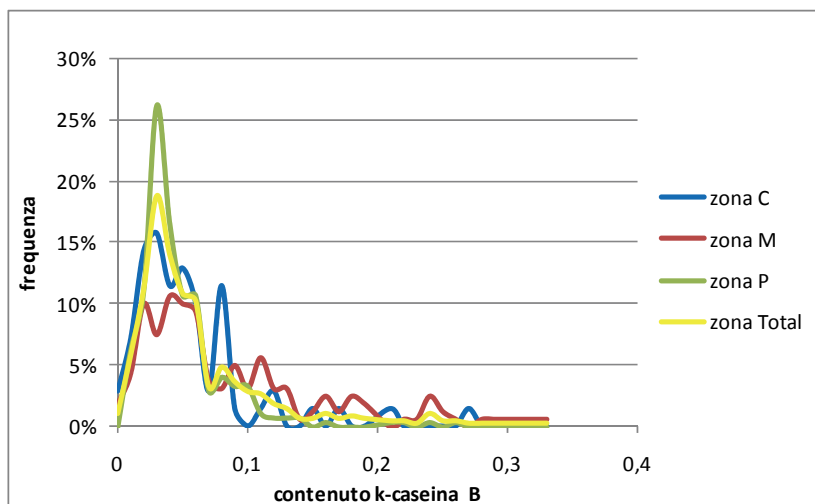


Figura 45: frequenza percentuale contenuto k-caseina B

Dal grafico si evidenzia come la maggior parte delle aziende abbia un basso contenuto di k-caseina B ma, in tutte le zone altimetriche, vi sia comunque un discreto numero di aziende che mostra contenuti di k-caseina B elevati.

Nel grafico 46 il dato di k-caseina B viene mostrato come percentuale sulla caseina totale e, anche in questo caso, si evidenzia un interessante valore di k-caseina B in tutte le zone altimetriche.

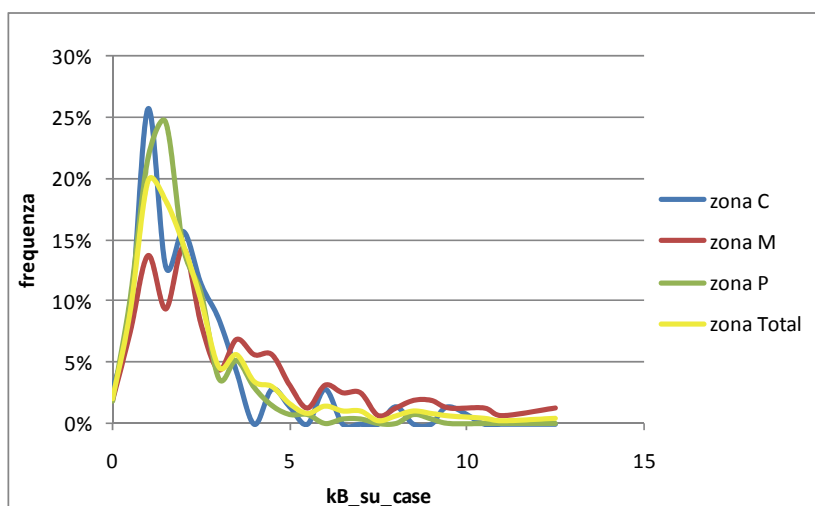


Figura 46: frequenza percentuale della k-caseina B sulla caseina totale

Infine, in Figura 47, la k-caseina B viene mostrata come percentuale sulla k-caseina totale; in questo modo si ampliano le differenze e il dato evidenzia meglio la frequenza dell'allele nella mandria. L'andamento è sostanzialmente sovrapponibile ai grafici precedenti.

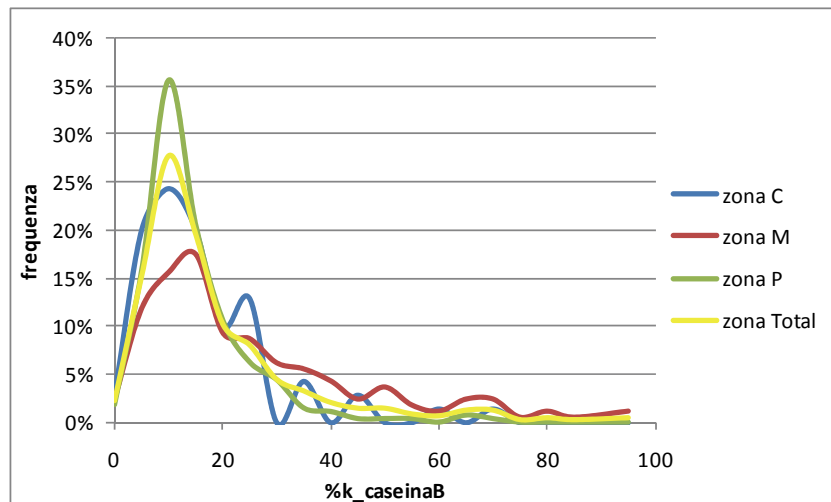


Figura 47: frequenza percentuale della k-caseina B sulla k-caseina totale

5.5.4.3 Differenza k-caseina B tra zone e province

Nelle seguenti analisi si è approfondito lo studio sulla percentuale di k-caseina B sulla caseina andando a calcolarne le differenze tra zone altimetriche all'interno delle singole province.

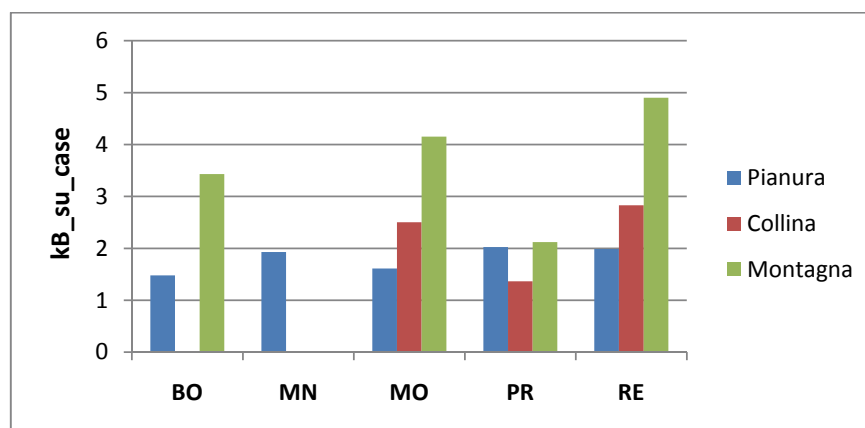


Figura 48: media delle percentuali di k-caseina B sulla caseina totale

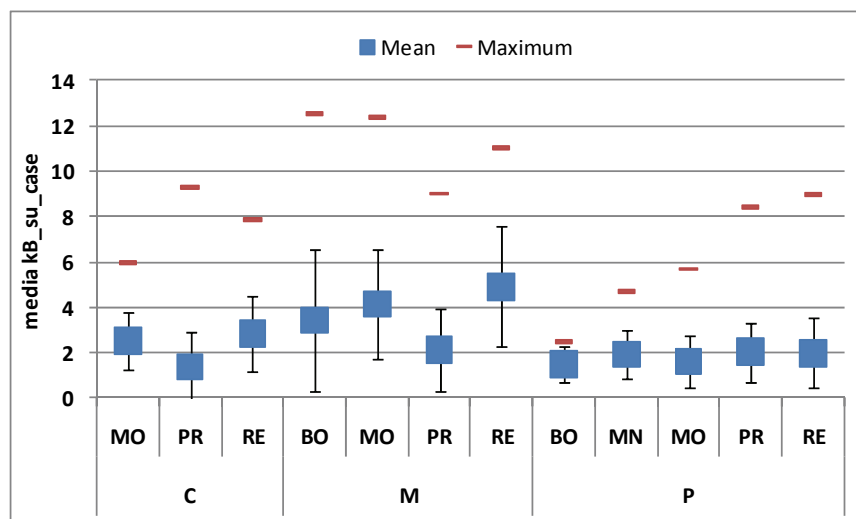


Figura 49: media, deviazioni standard e valori massimi della percentuale di k-caseina B sulla caseina totale

Tra le province e le zone altimetriche si evidenzia una significativa differenza per il contenuto di k-caseina B (Figura 48) oltre che una forte variabilità (Figura 49). La zona di montagna è, come atteso, quella con maggior contenuto medio di k-caseina B in quanto esiste una maggior percentuale delle altre razze, mentre la zona di pianura è molto più standardizzata.

5.5.4.4 Differenze k-caseina B tra razze

Anche la razza riveste un ruolo di primaria importanza sulle variazioni del contenuto di k-caseina B nel latte di massa. Come si può infatti vedere in Figura 50, i valori medi del contenuto percentuale di k-caseina B sulla caseina sono molto diversi fra le varie razze: il valore medio inferiore lo si è riscontrato nel latte proveniente da stalle di razza Frisone, mentre il valore medio maggiore è nel latte di stalle di razza Bruna e Modenese (gli allevamenti di Modenese sono solo 2 nel dataset). Interessanti appaiono anche i valori massimi registrati, Da notare, infatti, come il valore massimo rilevato nel latte proveniente da stalle di razza Frisone sia uguale al valore medio registrato nelle razze Bruna e Modenese e superiore a quello ritrovato nelle aziende definite miste. Questo evidenzia come vi siano aziende costituite da vacche di razza Frisone la cui frequenza allelica della variante B della k-caseina sia superiore a quella riscontrata in altre razze tradizionalmente ritenute più geneticamente favorevoli.

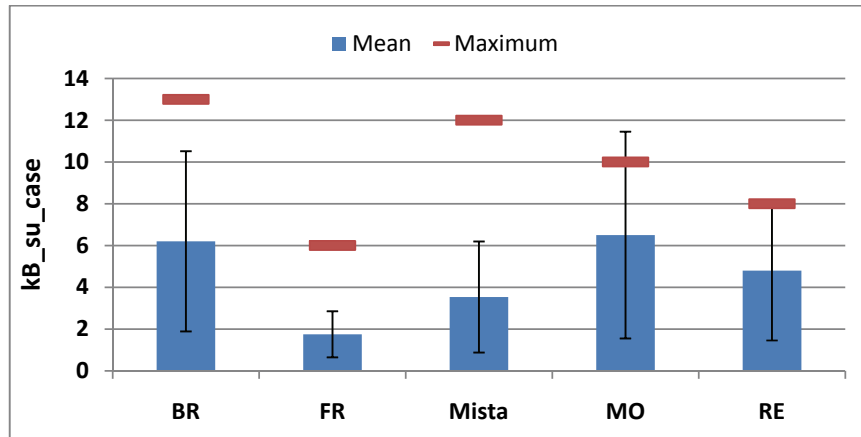


Figura 50: medie, ds e valori massimi per la % di k-caseina B sulla caseina per razza

Si è analizzata la distribuzione percentuale della k-caseina B sulla caseina totale all'interno delle razze suddividendo i dati in stalle di razza Frisona, Mista oppure "Altre" in cui sono racchiuse le aziende di Bruna, Modenese e Reggiana. In Figura 51 si evidenzia la diversa distribuzione nelle aziende definite "Altre" rispetto a quelle Mista e Frisona. Inoltre, è interessante sottolineare che vi sono alcune aziende di Frisona che mostrano un contenuto di k-caseina B sulla caseina totale maggiore rispetto a quello di Mista e Frisona. Infatti, sono circa 23 le aziende di Frisona che mostrano un contenuto di k-caseina B uguale o maggiore rispetto alla media delle aziende di razza Bruna.

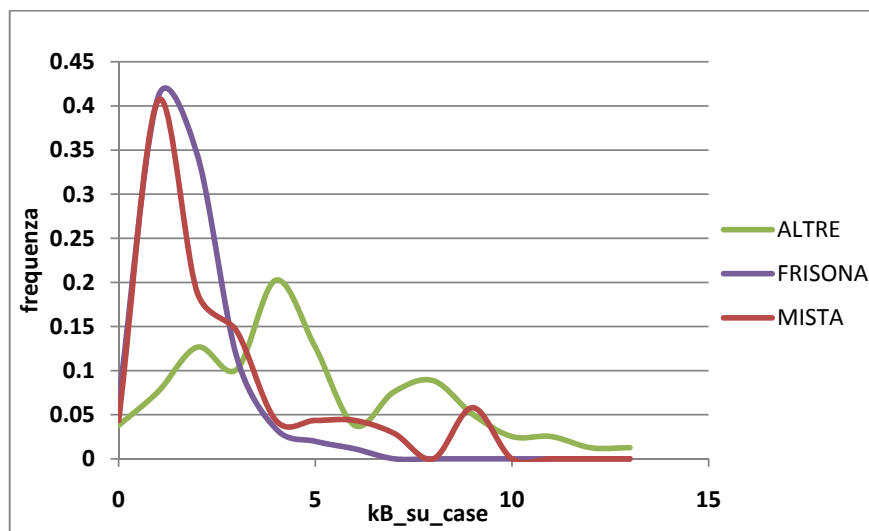


Figura 51: distribuzione percentuale di k-caseina B sulla caseina totale suddivisa per razze

5.5.4.5 Differenze k-caseina B per dimensione allevamento

Il contenuto medio di k-caseina B risulta essere maggiore e più variabile negli allevamenti piccoli rispetto ai medio grandi (Figura 52), risultato che collima con quanto stimato nella simulazione del contributo sperimentale precedente.

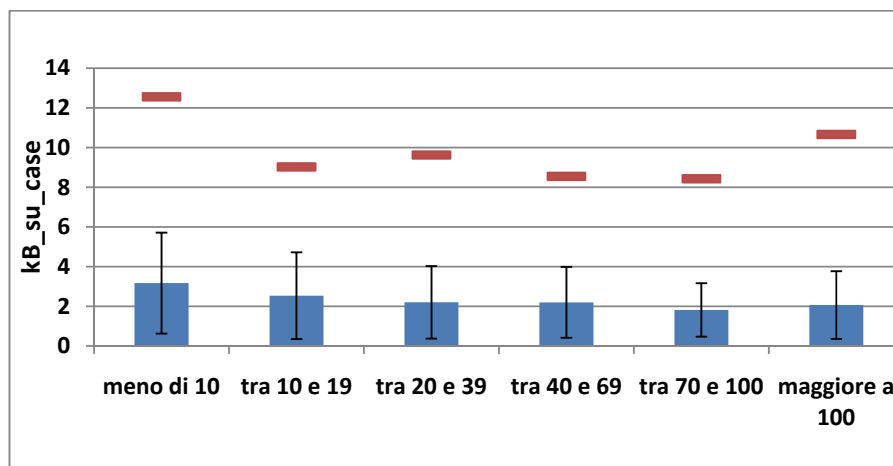


Figura 52: medie, ds e valori massimi della k-caseina B sulla caseina totale per dimensione allevamento

5.5.4.6 Indice di caseina e k-caseina B

Si è calcolato l'indice di caseina che, come mostrato in Figura 53, risulta avere un andamento normale con il valore medio intorno a 77.

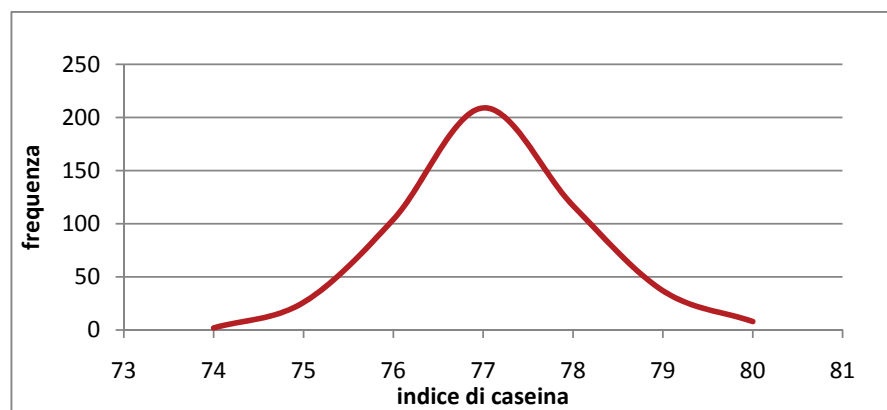


Figura 53: distribuzione dell'indice di caseina

Si è voluto poi mettere in rapporto l'indice di caseina e il contenuto percentuale di k-caseina B sulla caseina ma, come si evidenzia nel grafico 54, non vi è un trend significativo quindi le due variabili non sembrano particolarmente legate.

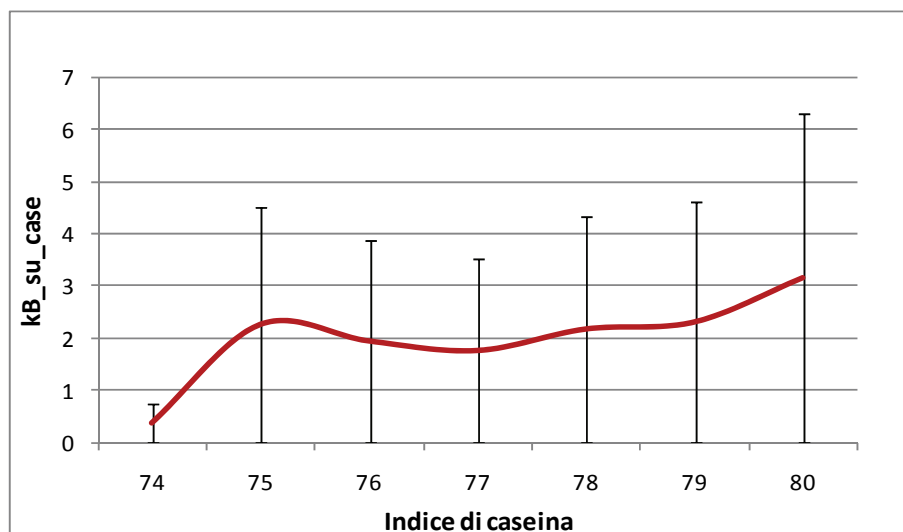


Figura 54: media e ds della k-caseina B sulla caseina totale per classi dell'indice caseina

5.5.4.7 Fattori che influenzano la k-caseina B

Dalla lettura dei dati elaborati utilizzando il modello (1) è risultato subito evidente (Tabella 20) come la dimensione dell'allevamento non avesse nessun effetto significativo sul contenuto di k-caseina B ($P=0,8226$).

R-Square	Coeff Var	Root MSE	k_su_case
0,39	67,02	1,60	2,39

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
orig_file	1	6,64	6,64	2,6	0,1084
zona	2	18,13	9,07	3,53	0,03
pr	4	53,81	13,45	5,24	0,0004
alim	2	12,91	6,45	2,51	0,0819
frisona	1	381,25	381,25	148,55	<.0001
allevamento	5	5,61	1,12	0,44	0,8226

Tabella 20: analisi della varianza per la % di k-caseina B sulla caseina con il fattore allevamento

Si è quindi proceduto ad eliminare tale fattore dal modello e, dalla nuova elaborazione statistica (Tabella 21), risulta evidente come il contenuto in k-caseina B risenta in modo statisticamente significativo della zona altimetrica di allevamento (zona), della provincia (pr) e principalmente della razza allevata (frisona) mentre non sia influenzato dal laboratorio di analisi (orig_file) e dall'alimentazione (alim).

R-Square	Coeff Var	Root MSE	k_su_case		
0,39	66,83	1,60	2,39		
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
orig_file	1	6,62	6,63	2,6	0,1076
zona	2	19,68	9,84	3,86	0,0218
pr	4	56,02	14,01	5,49	0,0003
alim	2	12,2	6,1	2,39	0,0926
frisona	1	394,79	394,79	154,72	<.0001

Tabella 21: analisi della varianza per la % di k-caseina B sulla caseina con modello definitivo

In Figura 55 sono mostrate le medie stimate dal modello del contenuto di k-caseina B. Si vede bene come il fattore razza sia quello che ha maggior impatto sul contenuto di k-caseina B. Partendo con una situazione senza Frisona (0) e procedendo ipotizzando un incremento del 10% si nota un decremento proporzionale del valore medio del contenuto di k-caseina B molto forte: si passa da un valore superiore al 4 in assenza di razza Frisona in stalla ad un valore appena superiore all'1 se l'allevamento è di pura Frisona.

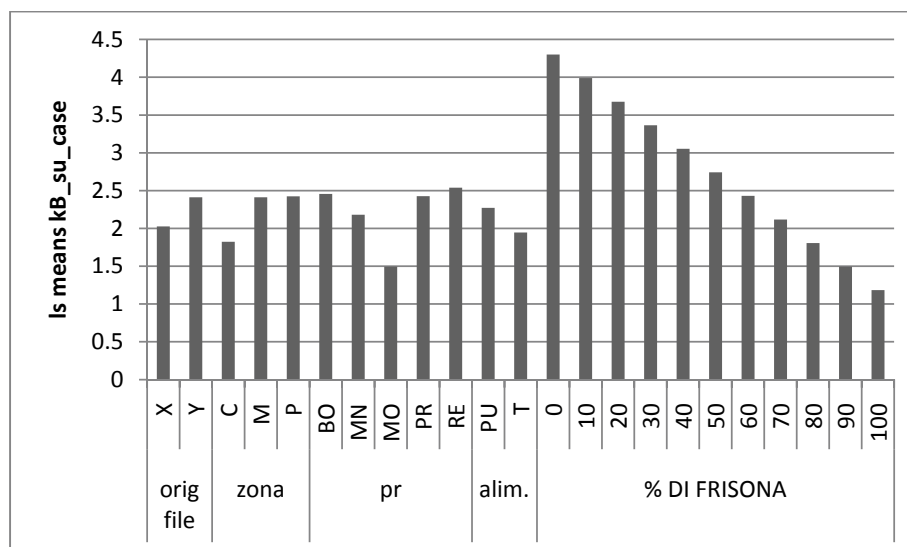


Figura 55: Ls means dei fattori

5.5.4.8 Fattori che influenzano i parametri lattodinamografici

Il modello (2) evidenzia degli R^2 elevati per il tempo di rassodamento e la consistenza del coagulo mentre per il tempo di coagulazione si è riusciti a spiegare solo il 35% della variabilità ($R^2=0,35$). Tale parametro, infatti, più che dalla percentuale di k-caseina B

($P=0,0549$, al limite della significatività) è influenzato dal pH e dall'acidità che risultano infatti altamente significativi (entrambi $P<0,0001$). Si è registrata anche un'influenza del laboratorio ($P<0,0001$) (Tabella 22).

R-Square	Coeff Var	Root MSE	r	Mean	
0,35	13,07	2,53		19,34	
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
pH	1	505,13	505,13	79,04	<.0001
acidità	1	131,86	131,86	20,63	<.0001
kB_su_case	10	116,32	11,63	1,82	0,0549
orig_file	1	513,22	513,22	80,31	<.0001

Tabella 22: analisi della varianza per il tempo di coagulazione (r)

Come si vede in Figura 56 il tempo di coagulazione ha un andamento abbastanza decrescente all'aumentare del contenuto di k-caseina B nel latte di massa.

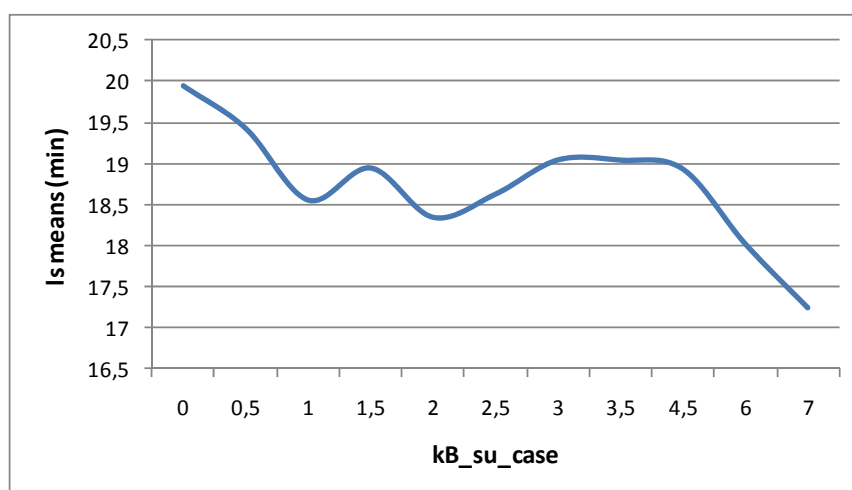


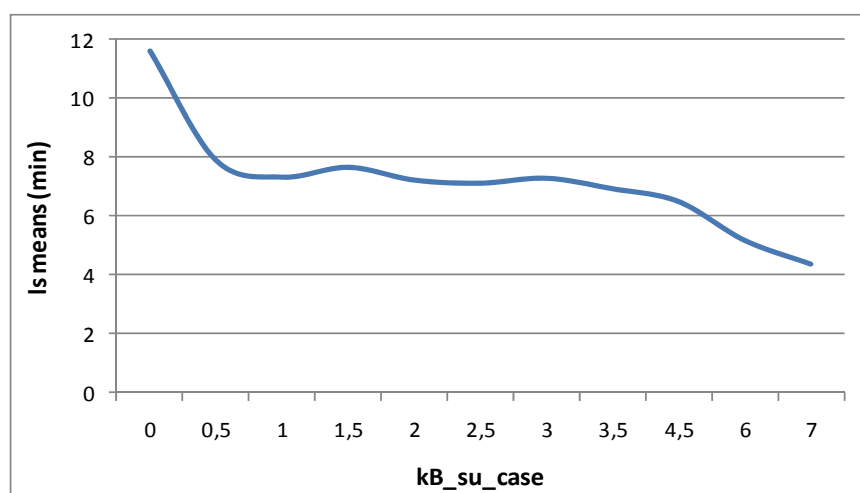
Figura 56: tempo di coagulazione (r)

Per quanto riguarda il tempo di rassodamento (k_{20}) il modello spiega il 65% della variabilità e tutti i fattori inseriti risultano altamente significativi ad eccezione del pH ($P=0,0663$) (Tabella 23).

R-Square	Coeff Var	Root MSE	k20 Mean		
0,65	34,88	2,95	8,46		
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
pH	1	29,52	29,52	3,39	0,0663
acidità	1	500,05	500,05	57,39	<.0001
kB_su_case	10	471,43	47,14	5,41	<.0001
orig_file	1	1672,76	1672,76	191,99	<.0001

Tabella 23: analisi della varianza per il tempo di rassodamento (k_{20})

In Figura 57 è riportato l'andamento decrescente del tempo di rassodamento con l'aumentare della % di k-caseina B nei campioni di latte: il tempo si dimezza (da 12 a 6 minuti) lavorando latte con contenuto di k-caseina B intorno al 4% rispetto a lavorare latte con sola k-caseina A.

Figura 57: tempo di rassodamento (K_{20})

Tutti i fattori sono risultati altamente significativi per la consistenza del coagulo (a_{30}) con un modello che spiega il 50% di variabilità.

R-Square	Coeff Var	Root MSE	a30 Mean		
0,50	27,80	6,80	24,50		
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
pH	1	2073	2073	44,69	<.0001
acidità	1	2663,4	2663,4	57,41	<.0001
kB_su_case	10	2984,4	298,4	6,43	<.0001
orig_file	1	7640,2	7640,2	164,69	<.0001

Tabella 24: analisi della varianza per la consistenza del coagulo (a_{30})

Dal grafico 58 si può apprezzare l'aumento della consistenza del coagulo all'aumentare della presenza di k-caseina B.

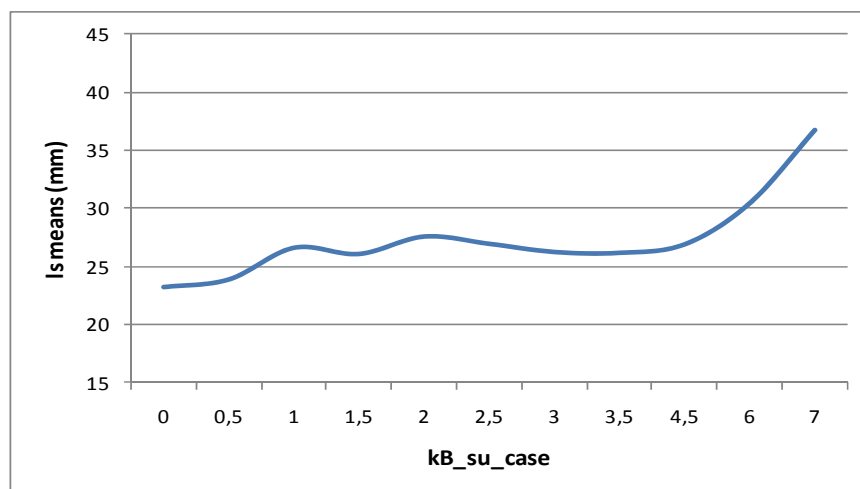


Figura 58: consistenza del coagulo

5.5.5 Conclusioni

Il contenuto di k-caseina B mostra un'ampia variabilità. L'analisi ha evidenziato come esso venga influenzato da fattori di natura genetica, quali la razza di appartenenza delle bovine, e non da altri fattori ambientali.

Ci sono forti differenze nella presenza di k-caseina B nel latte di massa delle diverse aziende e, pur rilevando nel suo insieme un valore di k-caseina B tendenzialmente basso nella razza Frisona, è interessante rimarcare come alcune aziende di pura razza Frisona abbiano mostrato valori medi uguali o maggiori rispetto alle razze tradizionalmente riconosciute con maggiore k-caseina B, quali la razza Bruna Italiana.

Il contenuto di k-caseina B mostra un forte legame con il tempo di rassodamento e la consistenza del coagulo, ovvero quei parametri che descrivono la fase secondaria della coagulazione.

È evidente quindi che, monitorare la qualità del latte attraverso un adeguato piano di selezione per la k-caseina che favorisca la frequenza in popolazione dell'allele B, consentirebbe di produrre un latte particolarmente idoneo alla caseificazione e alla produzione di formaggi di qualità ottenendo così, con un piccolo sforzo, un ottimo risultato.

5.6 Variabilità del contenuto di k-caseina B in campioni di singole vacche

5.6.1 Introduzione

Esiste molta variabilità tra le principali razze da latte italiane per quanto concerne le frequenze alleliche della k-caseina (Figura 59).

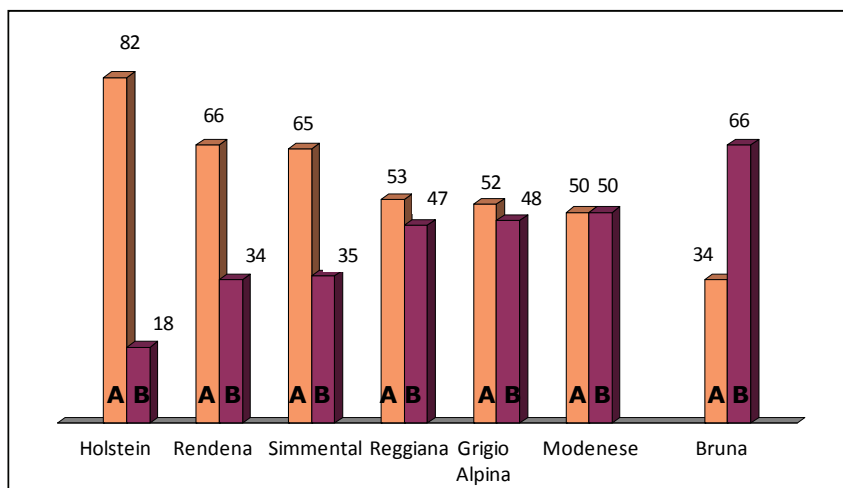


Figura 59: frequenza degli alleli della k-caseina nelle principali razze da latte italiane.

La k-caseina rappresenta circa il 13% della caseina totale quindi, se una vacca ha genotipo BB ci si aspetta mediamente una percentuale di k-caseina B sulla caseina del 13%, se ha genotipo AB ci attendiamo una percentuale attorno al 6% mentre se il genotipo è AA la k-caseina B è nulla. Vista la difficoltà che esisteva fino a qualche anno fa di determinare il contenuto di k-caseina B su un numero elevato di campioni di latte, era difficile determinare se le percentuali sopra esposte erano influenzate esclusivamente dal genotipo dell'animale oppure anche da altri fattori.

5.6.2 Obiettivo

Con questo studio si è analizzata la variabilità del contenuto di k-caseina B tra soggetti di razza Bruna sia in relazione al genotipo dell'animale sia in relazione ad altri fattori di origine non genetica.

5.6.3 Materiali e metodi

Durante i controlli funzionali sono stati raccolti 281 campioni di latte da vacche allevate in 22 allevamenti siti nelle province di Brescia e di Bergamo e, grazie alla

collaborazione con l'Associazione Regionale Allevatori della Lombardia (ARAL), su tutti i campioni è stato analizzato il contenuto di k-caseina B (kBcasetk) tramite il "test kappa".

Sono stati editati i campioni che non avevano una corrispondenza tra i dati dei controlli funzionali forniti da ARAL e quelli presenti nel database ANARB.

Il dataset finale è di 275 campioni di latte per i quali è stato possibile calcolare la percentuale di k-caseina B come rapporto fra il contenuto di k-caseina B misurato col "test kappa" e la caseina totale (kB_su_case).

Analizzando l'andamento di kB_su_case sono stati determinati gli assetti genici per l'allele B -eterozigote, omozigote o assente- per la maggior parte degli animali verificando poi se, tale genotipo assegnato al soggetto, fosse compatibile con il genotipo dei genitori. Si è infine analizzata la variabilità sia del contenuto che della percentuale di k-caseina B sulla caseina totale per mezzo del seguente modello:

$$y_{ijkl} = \mu + \text{genotipo}_i + \text{dim}_j + \text{scs}_k + \text{eta}_l + e_{ijkl}$$

dove y_{ijkl} : kBcasetk o kB_su_case

μ : media generale

genotipo_i: genotipo della k-caseina in 3 classi (AA, AB, BB)

dim_j: stadio di lattazione in 8 classi da 45 giorni ciascuna

scs_k: cellule somatiche in 5 classi (<50, 50-100, 100-200, 200-500, >500)

eta_l: età al controllo funzionale in 3 classi (<4anni, 4-5-6anni, >6anni)

e_{ijkl}: effetto casuale residuo.

5.6.4 Risultati

I valori riportati in tabella 25 mostrano un valore medio per la kB_su_case di circa il 6% ma, come mostrato in figura 60, il valore di tale parametro è molto variabile da vacca a vacca con valori massimi che superano le due deviazioni standard.

Variabile	N°	Media	Std Dev	Minimo	Massimo
kg latte	275	23,71	7,85	4,40	45,80
kg grasso	275	0,99	0,36	0,14	2,18
kg proteina	275	0,89	0,27	0,20	1,61
% grasso	275	4,21	0,74	1,70	6,46
% proteina	275	3,80	0,39	2,77	4,79
% caseina	275	2,94	0,30	2,18	3,78
kBcasetk	275	0,18	0,11	0	0,47
kB_su_case	275	0,06	0,04	0	0,15
cellule somatiche	275	442,34	878,62	11	8974
giorni di lattazione	275	201	136	5	480
n°lattazioni	275	3,00	1,35	1	8

Tabella 25: statistiche sul database

Dall'andamento della kB_su_case si individuano bene i picchi dei tre diversi genotipi della k-caseina B che ci consentono di determinare, per ben 236 animali, gli assetti genici per l'allele B. L'allele alternativo è stato considerato sempre quello A visto che, le altre varianti alleliche, sono estremamente rare. Sono stati assegnati l'omozigote (BB) per percentuali kB_su_case uguali o superiori a 0,7, l'eterozigote (AB) per valori compresi tra 0,3 e 0,5 e l'assente (AA) per percentuale inferiori o uguali a 0,1. Solo in sette casi il genotipo assegnato è risultato incongruente con quello dei genitori e quindi cancellato. Nel dataset i genotipi della k-caseina B sono allora così ripartiti: 29 vacche AA, 117 AB, 83 BB mentre a 46 soggetti non è stato possibile attribuire con certezza alcun genotipo.

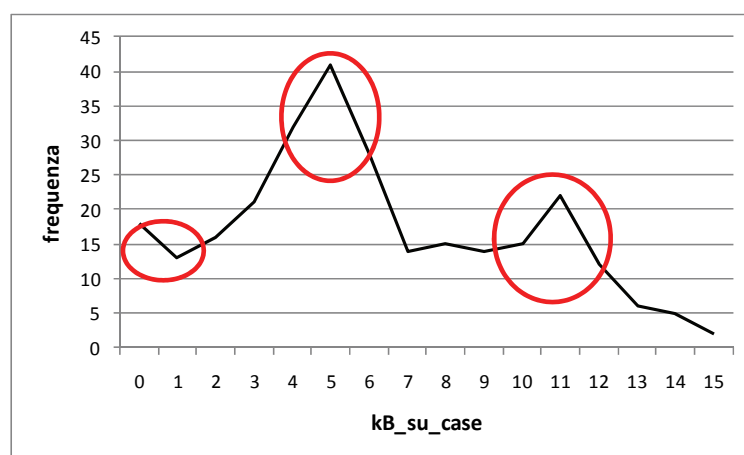


Figura 60: distribuzione della % k-caseina B sulla caseina totale

Dall'analisi statistica si sono ottenuti interessanti risultati.

L'analisi della varianza ha evidenziato la non significatività delle cellule somatiche e dell'età sia per il contenuto che per la percentuale di k-caseina B sulla caseina (Tabella 26 e 27).

R-Square	Coeff Var	Root MSE	kBcasetk Mean		
0,89	20,80	0,04	0,19		
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
genotipo	2	2,41	1,20	770,18	<.0001
dim	8	0,02	0,01	1,97	0,05
SCS	4	0,01	0,01	0,03	0,99
eta	2	0,01	0,01	1,68	0,19

Tabella 26: analisi della varianza per il contenuto di k-caseina B

R-Square	Coeff Var	Root MSE	kB_su_case Mean		
0,90	19,02	0,01	0,06		
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
genotipo	2	0,26	0,13	883,93	<.0001
dim	8	0,02	0,01	1,37	0,21
SCS	4	0,01	0,01	0,10	0,98
eta	2	0,01	0,01	1,01	0,37

Tabella 27: analisi della varianza per la % di k-caseina B sulla caseina

Si è quindi proseguita l'analisi semplificando il modello come segue:

$$y_{ij} = \mu + \text{genotipo}_i + \text{dim}_j + e_{ij} \quad (1)$$

e i risultati ottenuti sono riportati nelle Tabella 28 e 29

R-Square	Coeff Var	Root MSE	kBcasetk Mean		
0,89	20,67	0,04	0,19		
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
genotipo	2,00	2,46	1,23	795,47	<.0001
dim	8,00	0,03	0,01	2,32	0,02

Tabella 28: analisi della varianza del contenuto di k-caseina B utilizzando il modello (1)

R-Square	Coeff Var	Root MSE	kB_su_case Mean		
0,90	18,85	0,01	0,06		
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
genotipo	2,00	0,27	0,14	920,29	<.0001
dim	8,00	0,01	0,01	1,33	0,23

Tabella 29: analisi della varianza della % di k-caseina B sulla caseina utilizzando il modello (1)

Attraverso il genotipo della k-caseina e lo stadio di lattazione si riesce a spiegare ben il 90% della variabilità sia per il contenuto ($R^2=0,89$) che per la percentuale di k-caseina B ($R^2=0,90$). Come si può vedere dai grafici.61 e.62, però, mentre il contenuto di k-caseina B nel latte aumenta nel corso della lattazione risentendo dell'aumento della caseina (i giorni di lattazioni sono infatti significativi nel modello), al contrario, kB_su_case è determinata quasi esclusivamente dal genotipo dell'animale risultando indipendente dallo stadio di lattazione.

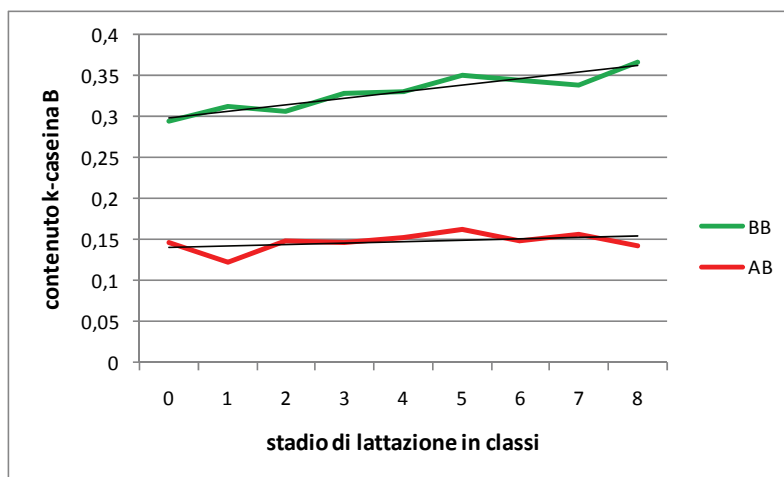


Figura 61: andamento contenuto k-caseina B in funzione dei giorni di lattazione e del genotipo

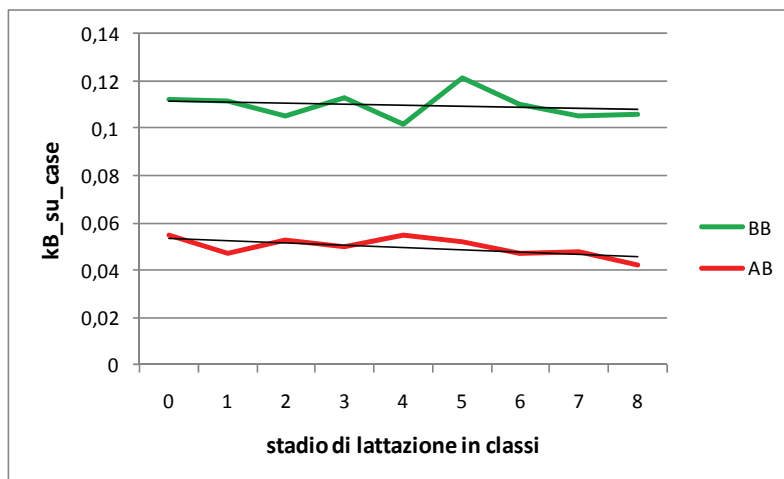


Figura 62: andamento kB_su_case in funzione dei giorni di lattazione e del genotipo

5.6.5 CONCLUSIONI

La percentuale di k-caseina B è un parametro molto variabile da un soggetto all'altro ma, se misurato col "test kappa", è facilmente quantificabile tanto da riuscire a determinare direttamente dal latte il genotipo della singola bovina.

La percentuale di k-caseina B sulla caseina totale è un parametro indipendente dallo stadio di lattazione quindi, in qualsiasi momento si faccia il controllo, il valore rimane invariato.

5.7 Nuovo archivio per le varianti genetiche delle proteine del latte

5.7.1 Introduzione

L'Associazione Nazionale Allevatori Razza Bruna (ANARB), da sempre, ha inserito tra i suoi principali obiettivi di selezione la quantità ma soprattutto la qualità. Per questo, all'interno del suo indice di selezione, riveste una grossa importanza la proteina ma anche la k-caseina. Vengono premiati i soggetti con l'allele B della k-caseina, quello più favorevole alla caseificazione.

Anni orsono Anarb ha creato un archivio in cui sono riportati i risultati delle analisi di genotipizzazione ai loci codificanti per le proteine k-caseina, α_{s1} -caseina e β -lattoglobulina, considerando l'importanza che queste rivestono sulle caratteristiche casearie del latte. L'archivio viene costantemente aggiornato ed implementato sia con analisi provenienti da DNA sia con analisi sul latte effettuate ogni anno a campionatura.

5.7.2 Obiettivo

Con questo progetto si vuole verificare la correttezza delle informazioni presenti nell'archivio delle varianti proteiche e, inoltre, imputare per la k-caseina, la α_{s1} -caseina e la β -lattoglobulina il genotipo più probabile ai soggetti senza analisi utilizzando le informazioni di pedigree.

Tutto ciò con lo scopo di incrementare, in modo cospicuo e senza ricorrere ad analisi costose, l'archivio delle tre frazioni proteiche del latte analizzate.

5.7.3 Materiali e metodi

Gli archivi delle tre varianti genetiche erano così composti:

	Genotipo	Frequenza	% sul totale
k-caseina	AA	2708	12.6%
	AB	9214	43,0%
	BB	9481	44.3%
	AC	8	0,1%
	BC	2	
	BE	1	
	BH	6	
	Tot.	21420 (3703 da DNA, 17746 da latte)	100,0%
α_1-caseina	BB	12408	81,2%
	BC	2788	18,2%
	CC	81	0,5%
	AA	7	0,1%
	AB	1	
	Tot.	15285 (1095 da DNA, 14190 da latte)	100,0%
	β-lattoglobulina	AA	1896
AB		7253	43,1%
BB		7660	45,6%
BC		4	0,0%
Tot.		16813 (1858 da DNA, 14955 da latte)	100,0%

Tabella 30: archivio varianti genetiche

Essendo alcune frequenze molto basse, si è limitata l'analisi solo ai genotipi AA-AB-BB per la k-caseina, BB-BC-CC per la α_1 -caseina, AA-AB-BB per la β -lattoglobulina.

Partendo dagli archivi così composti, è stata inizialmente verificata la presenza di errori d'analisi da DNA o di incongruenze tra le analisi dei genitori in modo d'avere un archivio iniziale più corretto possibile:

- errori analisi DNA: quando l'analisi del soggetto, del padre e della madre provengono da DNA ma sono tra loro incongruenti
- incongruenze tra genitori e figli:
- verifica del genotipo della madre quando l'analisi del figlio e del padre provengono da DNA
- verifica del genotipo del soggetto quando l'analisi del padre e/o della madre provengono da DNA

Successivamente, per ciascuna delle tre proteine del latte oggetto di studio, si è calcolata la probabilità di ogni singolo genotipo per tutti gli animali della popolazione.

Per far ciò, analizzando il pedigree di tutti i soggetti:

- a tutti gli animali che avevano un'analisi in archivio è stato attribuito il rispettivo genotipo
- a tutti i soggetti non testati e senza genitori, è stata attribuita una probabilità dei diversi genotipi in funzione delle frequenze alleliche presenti in popolazione (Tabella 31), secondo l'equilibrio di Hardy-Weinberg.

α_{s1} -caseina	freq. allele B=90%	freq. allele C=10%
k-caseina	freq. allele A=34%	freq. allele B=66%
β -lattoglobulina	freq. allele A=33,18%	freq. allele B=66,82%

Tabella 31: frequenze alleliche in popolazioni per le tre varianti analizzate

- partendo poi dai progenitori e risalendo fino all'ultima generazione, ad ogni soggetto senza un'analisi valida, è stata calcolata la probabilità di ogni singolo genotipo considerando la discendenza mendeliana del carattere.

Per la k-caseina, ad esempio, la probabilità di ogni singolo genotipo è stata calcolata nel seguente modo:

- **pSAA**= $p_{PAA} \cdot p_{MAA} + 0,5 \cdot p_{PAB} \cdot p_{MAA} + 0,5 \cdot p_{PAA} \cdot p_{MAB} + 0,25 \cdot p_{PAB} \cdot p_{MAB}$
- **pSAB**= $p_{PAA} \cdot p_{MAB} + p_{PBB} \cdot p_{MAA} + 0,5 \cdot p_{PBB} \cdot p_{MAB} + 0,5 \cdot p_{PAB} \cdot p_{MAB} + 0,5 \cdot p_{PAA} \cdot p_{MAB} + 0,5 \cdot p_{PAB} \cdot p_{MAA} + 2 \cdot 0,5 \cdot p_{PAB} \cdot 0,5 \cdot p_{MAB}$
- **pSBB**= $p_{PBB} \cdot p_{MAB} + 0,5 \cdot p_{PAB} \cdot p_{MAB} + 0,5 \cdot p_{PBB} \cdot p_{MAB} + 0,25 \cdot p_{PAB} \cdot p_{MAB}$

dove: pS prob. del soggetto

pP prob. del padre

pM prob. della madre.

Si è utilizzato, quindi, un modo indiretto per stimare il genotipo ai tre loci considerati: per ogni animale si considera la probabilità che esso abbia un determinato genotipo tenendo conto di tutti quelli posseduti dai suoi antenati.

Ad esempio: un soggetto che ha k-caseina BB derivante da test genotipico avrà probabilità del 100% di avere k-caseina BB e probabilità dello 0% di avere k-caseina AB o k-caseina AA. Un animale senza test genotipico per la k-caseina ma con padre k-caseina BB e madre k-caseina AA avrà probabilità del 100% di avere k-caseina AB. Un soggetto senza test genotipico per la k-caseina e con genitori entrambi AB per la k-caseina avrà una probabilità del 25% di essere AA, del 50% di essere AB e del 25% di essere BB.

E' stato deciso di riportare in archivio solo i genotipi che raggiungono probabilità sopra il 90% in modo da contenere la probabilità d'errore.

5.7.4 Risultati

La verifica iniziale della presenza di errori in archivio, dovuti ad errori di laboratorio o ad analisi incongruenti tra loro, ha consentito di ripulire efficacemente i dati di partenza.

La tabella 32 evidenzia una percentuale d'errore del 4,2% per la k-caseina, dello 0,07% per la α_{s1} -caseina e dell'1,2% per la β -lattoglobulina.

	k-caseina	α_{s1} -caseina	β -lattoglobulina
analisi errate da laboratorio	8	0	27
analisi da cancellare	902	12	179
tot. errori	910 (4.2% sul dataset totale)	12 (0.08% sul dataset totale)	206 (1.2% sul dataset totale)

Tabella 32: analisi errate presenti negli archivi

Le probabilità di popolazione secondo la regola di Hardy-Weinberg per le tre varianti genetiche risultano come mostrato in Tabella 33.

α_{s1} -caseina	k-caseina	β -lattoglobulina
freq.BB=0.90*0.90=0.81	prob.AA=0.34*0.34=0.1156	freq.AA=0,3318*0,3318=0.11
freq.BC=2*0.90*0.10=0.18	prob.AB=2*0.66*0.34=0.4488	freq.AB=2*0,6682*0,3318=0.4434
freq.CC=0.10*0.10=0.01	prob.BB=0.66*0.66=0.4356	freq.BB=0,6682*0,6682=0.4466

Tabella 33: probabilità di popolazione

I risultati finali ottenuti sono molto positivi perché si è riusciti ad assegnare, con una probabilità minima del 90%, il genotipo ad un cospicuo numero di animali (Tabella 34)

	Nuove prob.assegnate			sesso		
	totale	AA	AB	BB	maschi	femmine
k-caseina	30352 (+142% sul database iniziale)	59	3424	26869	5071	25281
		CC	BC	BB	maschi	femmine
α_{s1}-caseina	32818 (+214% sul database iniziale)	0	96	32722	8664	24154
		AA	AB	BB	maschi	femmine
β-lattoglobulina	4961 (+30% sul database iniziale)	72	971	3918	1315	3646

Tabella 34: nuovi genotipi assegnati alle tre varianti

5.7.5 Conclusioni

La possibilità di calcolare la probabilità di avere un determinato genotipo per la k-caseina, l' α_{s1} -caseina e la β -lattoglobulina, per tutti gli animali mancanti dei rispettivi test, ci consente di:

- avere archivi senza errori per le tre varianti genetiche analizzate
- incrementare in modo cospicuo, con una probabilità d'errore massima del 10%, l'archivio delle varianti genetiche -si raddoppiano le informazioni sulla k-caseina, si triplicano quelle relative all' α_{s1} -caseina mentre aumentano del 28% quelle della β -lattoglobulina-
- ottimizzare il programma di monitoraggio della situazione delle varianti alleliche della k-caseina in popolazione mirando sui soggetti con probabilità più incerta.

6 BIBLIOGRAFIA

- AIA, 1981. Regolamento per lo svolgimento dei controlli della produzione del latte nella specie bovina (D.M. 24-5-1967 modificato con D.M. 28-9-1981).
- Alais C (1984). *Scienza del latte*. Editore tecniche nuove Milano.
- Ali AE, Andrews AT, Cheeseman GC (1980). Influence of elevated somatic cell count on casein distribution and cheesemaking. *J. Dairy Res.*, 47, 393-400.
- ANARB, 2001. *Disciplinari del libro genealogico dei bovini di razza bruna aggiornamenti al 21/06/2001*.
- Annibaldi S (1959). Studio della dinamica della coagulazione presamica del latte. *Il Latte*, 33, 395-400.
- Annibaldi S (1961). Valutazione e importanza della contrattilità del coagulo del latte. *Sci. Tecn. Latt.-cas.*, 11, 17-19.
- Annibaldi S (1978). Le turbe di secrezione mammaria ed il loro significato nei riflessi della caseificazione del latte. *Atti Tavola rotonda "Le turbe di secrezione mammaria ed il loro significato nei riflessi della caseificazione del latte"*, 59-63, Parma, 17 giugno 1978.
- Annibaldi S, Berlani G, Menozzi P, Pecorari M (1974). Osservazioni sull'influenza del tasso cellulare del latte sulla caseificazione. *Sci. Tecn. Latt.-cas.*, 25, 245-260.
- Annibaldi S, Guidetti R, Menozzi P (1976). Osservazioni sulla coagulazione presamica del latte dei diversi quartieri mammari. *Ind. Latte*, 12(3-4), 33-47.
- Annibaldi S, Guidetti R, Mora R, Pecorari M (1975). Nota sulla caseificazione del latte di bovine affette da mastiti subcliniche con diversa eziologia. *Sci. Tecn. Latt.-cas.*, 26, 13-25.
- Assolatte, 2009. *Industria lattiero-casearia italiana rapporto 2009*. Editoriale il Mondo del Latte, Milano.
- Barbano DM (1994). Overview. Influence of mastitis on cheese yield. *IDF, International Dairy Federation, Brussels, Belgium*, s.i. no. 9402, 48-54.
- Barbano DM, Rasmussen RR, Lynch JM (1991). Influence of milk somatic cell count and milk age on cheese yield. *J. Dairy Sci.*, 74, 369-388.
- Battistotti B, Corradini C (1993). Italian cheese. In *"Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology"*. vol. II. Major Cheese Groups (ed. P. F. Fox), 221-243. Chapman & Hall, London, UK.

- Bertoni G, Calamari L, Maianti MG (2001). Producing specific milks for specialty cheeses. *Proc. Nutr. Soc.*, 60, 231-246.
- Bertrand J.K., Wiggans G.R., 1998. Validation of data and review of results from genetic evaluation systems for US beef and dairy cattle. *Proc. 6th World Congr. Genet. Appl. Livest. Prod.* 27:425-432. Armidale, Australia, January 11-16.
- Borcherds KB (1985). Cheddar cheese manufacture. I. The importance of the chemical composition and microbiological quality of milk. In "Sevarac Annual Cheesemakers Symp.", South Africa, 11-27.
- Bottazzi V (1967). I lattici mastitici nei riflessi lattiero-caseari. *Ind. Latte*, 3, 76-85.
- Butkus KD, Butkene VP, Potsyute RYu (1973). Properties of milk coagulum during subclinical mastitis. *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya*, 9, 473-477.
- Bynum DG, Olson NF (1982). Influence of curd firmness at cutting on Cheddar cheese yield and recovery of milk constituents. *J. Dairy Sci.*, 65, 2281-2290.
- Calamari L, Maianti MG, Bertoni G, Chiarini A (1995). Acidità e attitudine alla coagulazione del latte in funzione della fermentescibilità degli alimenti. "Progetto Finalizzato Moderne Strategie Lattiero-Casearie. Relazione terzo anno di attività, 45-48. Ed. Tecniche Nuove, Milano.
- Cappelli P., Vannucchi V. (1990). *Chimica degli alimenti conservazione e trasformazione*, Bologna, Zanichelli. ISBN 88-08-06788-2.
- Carini S (1980). Requisiti fisico-chimici e batteriologici del latte destinato alla caseificazione. *Atti Conv. "Latte alimentare e latte per la caseificazione"*, Parma, 10 aprile 1980.
- Carlson A, Hill CG Jr, Olson NF (1987). The kinetics of milk coagulation: IV. The kinetics of the gel-firming process. *Biotech. Bioeng.*, 29, 612-624.
- Carlson A, Hill CG Jr, Olson NF (1987). The kinetics of milk coagulation: IV. The kinetics of the gel-firming process. *Biotech. Bioeng.*, 29, 612-624.
- Carlson A, Hill CG Jr, Olson NF (1987). The kinetics of milk coagulation: IV. The kinetics of the gel-firming process. *Biotech. Bioeng.*, 29, 612-624.
- Caroli A, Chessa S, Bolla P, Budelli E, Gandini G (2004). Genetic structure of milk protein polymorphisms and effects on milk production traits in a local dairy cattle. *J. Anim. Breed. Genet.* 121, 119-127.
- Castagnetti GB (1993). Mezzi e strategie rivolte al contenimento dei difetti ed al miglioramento della qualità del Parmigiano-Reggiano. *Atti Conv. Progeo "Origine dei principali difetti del formaggio Parmigiano-Reggiano e possibili rimedi."*, 27-50, Reggio Emilia, 28 gennaio 1993.

-
- Chiarella R (2000). Sintesi e affinità ai recettori oppioidi di analoghi delle β -casomorfine contenenti β -omo amminoacidi. Università di Napoli - Tesi di laurea.
- Codice della Proprietà Industriale, art. 45, comma 1, D. Lgs. 10 febbraio 2005, n°30.
- Colin O, Laurent F (1991). Qualité du lait et transformation fromagère. Colloque "Protéines et rendements en Industries Laitières", 159-164, Nancy (France), 2-3 Octobre 1991.
- 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.
- Comin A, Cassandro M, Chessa S, Ojala M, Dal Zotto R, De Marchi M, Carnier P, Gallo L, Pagnacco G, Bittante G (2008). Effects of Composite β and κ -Casein Genotypes on Milk Coagulation, Quality, and Yield Traits in Italian Holstein Cows, *J. Dairy Sci.* 91, 4022-4027.
- Dagleish DG (1993). The enzymatic coagulation of milk. In "Cheese: chemistry, physics and microbiology. Vol. 1" (Ed. PF Fox), pp. 69-100. Chapman & Hall, London, UK.
- Dieci E (1960). I latti lenti e la genesi degli smorbi del formaggio Parmigiano-Reggiano. *Il Latte*, 34, 243-258.
- EFSA Scientific Report (2009) 231, 1-107.
- Elliott R, Wasmuth H, Bibby N, Hill J (1997). The role of β -casein variants in the introduction of insulin-dependent diabetes in the non-obese diabetic mouse and humans. IDF, International Dairy Federation, Brussels, Belgium, s.i. 9702, 445-453.
- Fitzgerald RJ, Guinee TP, Harrington D, Mehra R, Murphy J, Walsh CD (1998). Cheesemaking, compositional and functional characteristics of low-moisture part-skim Mozzarella cheese from bovine milks containing κ -casein AA, AB, or BB genetic variants. *J. Dairy Res.*, 65, 307-315.
- Flüeler O, Puhan Z (1978). Research on slow-renneting milk. II. Technological aspects. *Schweizerische Milchwirtschaftliche Forschung*, 7(4), 61-68.
- Formaggioni P, Summer A, Malacarne M, Mariani P (1999). Milk protein polymorphism: detection and diffusion of the genetic variants in *Bos* genus. *Ann. Fac. Med. Veter. Univ. Parma*, 19, 127-165.
- Fossa E, Pecorari M, Sandri S, Tosi F, Mariani P (1994). Il ruolo del contenuto in caseina del latte nella produzione del Parmigiano-Reggiano: composizione chimica, caratteristiche di coagulazione e comportamento tecnologico-caseario del latte. *Sci. Tecn. Latt.-cas.*, 45, 519-535.

- Fox PF (1969). Milk-clotting and proteolytic activities of rennet, and of bovine pepsin and porcine pepsin. *J. Dairy Res.*, 36, 427-433.
- Fox PF (2003). Milk proteins: general and historical aspects. In "Advanced Dairy Chemistry - Volume 1 - Proteins". (Ed. PF Fox e PLH McSweeney), pp 1-48. Kluwer Academic, London, UK.
- Garnier J, Mocquot G, Ribadeau-Dumas B, Maubois JL (1968). Coagulation du lait par la présure: aspects scientifiques et technologiques. *Ann. Nutr. Alim.*, 22, B495-B552.
- Ghiroldi S., Nicoletti C., Rossoni A., (2004). Genetic parameters estimation for casein in Brown Swiss. *Interbull Bulletin*. 32: 125-128.
- Green ML, Grandison AS (1993). Secondary (non-enzymatic) phase of rennet coagulation and post-coagulation phenomena. In "Cheese: chemistry, physics and microbiology. Vol. 1" (Ed. PF Fox), pp. 101-140. Chapman & Hall, London, UK.
- Green ML, Grandison AS (1993). Secondary (non-enzymatic) phase of rennet coagulation and post-coagulation phenomena. In "Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology", vol. I, General Aspects (ed. P. F. Fox), 101-140. Chapman & Hall, London, UK.
- Groeneveld E. and M. Kovac. 1990. A Generalized Computing Procedure for Setting Up and Solving Mixed Linear Models *J Dairy Sci*. 73: 513-531.
- Hartung H, Gernand E (1997). Investigation about cheese yielding capacity in relation to casein-polymorphism. *Arch. für Tierzucht*, 40, 305-308.
- Hartwig A, Teschemacher H, Lehmann W, Gaulty M, Erhardt G (1997). Influence of genetic polymorphisms in bovine milk on the occurrence of bioactive peptides. IDF, International Dairy Federation, Brussels, Belgium, s.p. 9702, 459-460.
- Henderson C.R. (1953). Estimation of variance and covariance components. *Biometrics* 9: 226-252.
- Horne DS (1998). Casein interactions: casting light on the black boxes, the structure of dairy products. *Int. Dairy J.*, 8, 171-177.
- Horne DS, Banks JM, Muir DD (1997). Genetic polymorphism of bovine k-casein: effects on renneting and cheese yield. "Proc. IDF Seminar, Palmerston North, New Zealand", 162-171. International Dairy Federation, Brussels, Belgium,.
- Ikonen T., Morri S., Tyrisevä A.-M., Ruottinen O., Ojala M., 2004. Genetic and phenotypic correlations between milk coagulation properties, milk production traits, somatic cell count, casein content, and pH of milk. *J. Dairy Sci*. 87:458-467.
- Kamiński S, Cieślińska A, Kostyra E., 2007. Polymorphism of bovine β -casein and its potential effect on human health. *J. Appl. Genet*. 48(3): 189-198.

-
- Kerjean JR (1984). Conséquences fromagères des variations de composition du lait: qualité chimique du lait de fromagerie. Colloque INRA-ENSAR-INAPG "La composition chimique du lait et ses incidences technologiques", 1-15, Rennes (France), 28 septembre 1984.
- Kiermeier F, Keis K (1964). The behaviour of milk in cheesemaking from cows affected by secretory disturbances. *Milchwissenschaft*, 19, 79-82.
- Kiermeier F, von Wüllerstorff B (1963). Factors affecting the drainage of whey from cheese curd. "Milchwissenschaft", 18, 75-79.
- Kitchen BJ (1981). Bovine mastitis: milk composition changes and related diagnostic tests. *J. Dairy Res.*, 48, 167-188.
- Knivsberg A-M, Reichelt K. L, Høien T, Nødland M (2003). Effect of a Dietary Intervention on Autistic Behavior. *Focus on Autism and Other Developmental Disabilities* 18(4), 248-257.
- Laugesen M, Elliott R (2003). Ischaemic heart disease, Type 1 diabetes, and cow milk A1 β -casein. *N. Z. Med. J.*, 116 N.1168.
- Law AJR, Leaver J, Banks JM, Horne DS (1994). The effect of k-casein genotype on the composition of whole casein. IDF, International Dairy Federation, Brussels, Belgium, s.i. no. 9402, 134-141.
- Leavitt BE, O'Leary J, Harmon RJ, Hicks CL (1982). Effect of mastitis on cheese yield, milk production, milk composition and starter culture activity. *J. Food Protection*, 45, 1176.
- 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, Capella P, Castagnetti GB, Grazia L, Zambonelli C, Mariani P, Russo V (1973). Influenza delle varianti genetiche della caseina k sulla formazione e sulle caratteristiche della cagliata. *Sci. Tecnol. Alim.*, 3, 373-374.
- Losi G, Capella P, Castagnetti GB, Grazia L, Zambonelli C, Mariani P, Russo V (1973). Influenza delle varianti genetiche della caseina k sulla formazione e sulle caratteristiche della cagliata. *Sci. Tecnol. Alim.*, 3, 373-374.
- Losi G, Castagnetti GB (1981). Problemi legati alla trasformazione del latte prodotto nei grandi allevamenti. *Atti Conv. "Gestione tecnico-economica grandi allevamenti vacche da latte."*, 18-27, Reggio Emilia, 8-9 ottobre 1981.
- Lucey J, Kelly J (1994). Cheese yield. *J. Soc. Dairy Technol.*, 47(1), 1-14.

- Lucey J, Kelly J (1994). Cheese yield. *J. Soc. Dairy Technol.*, 47(1), 1-14.
- Lynch M. and Walsh B. (1998). Genetics and analysis of quantitative traits, pag. 745.
- Mariani P (1982). Rapporti tra acidimetria e tempo di coagulazione del latte in quattro razze bovine. *Ann. Fac. Med. Veter., Univ. Parma*, 2, 197-208.
- Mariani P, Artoni A (1982). Il latte ad acidità anomala. I. Diffusione nella bassa pianura reggiana. *Sci. Tecn. Latt.-cas.*, 33, 369-387.
- Mariani P, Bonatti P, Sandri S (1992). Contenuto di urea, pH, acidità titolabile e caratteristiche di coagulazione del latte di singoli allevamenti. *Ind. Latte*, 28(3), 3-17.
- Mariani P, Pecorari M (1987). Fattori genetici, attitudine alla caseificazione e resa del latte in formaggio. *Sci. Tecn. Latt.-cas.*, 38, 286-326.
- Mariani P, Pecorari M (1991). Il ruolo delle varianti genetiche della k-caseina nella produzione del formaggio. *Sci. Tecn. Latt.-cas.*, 42, 255-285.
- Mariani P, Pecorari M, Fossa E, Fieni S (1981). Diffusione del latte a coagulazione anomala e rapporti con il contenuto cellulare e l'acidità titolabile. *Sci. Tecn. Latt.-cas.*, 32, 222-236.
- 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(2), (Suppl. 1), 8-14.
- Mariani P, Summer A (1999). Polimorfismo delle proteine ed attitudine tecnologico-casearia del latte. *Sci. Tecn. Latt.-cas.*, 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. *Sci. Tecn. Latt.-Cas.*, 52, 49-91.
- Mariani P, Zanzucchi G, Pecorari M, Fossa E (1991). Variazioni dell'acidità e del tempo di coagulazione del latte in rapporto all'allevamento e alla stagione di produzione. *Ann. Fac. Med. Veter., Univ. Parma*, 11, 277-289.
- Mariani P, Zanzucchi G, Pozzatti A, Summer A, Fossa E, Pecorari M (1994). Variazioni mensili dell'acidità e delle caratteristiche di coagulazione del latte nel corso di un triennio. *Ann. Fac. Med. Veter., Univ. Parma*, 14, 133-148.
- Martin B, Coulon JB (1995). Facteurs de production du lait et caractéristiques des fromages. II. Influence des caractéristiques des laits de troupeaux et des pratiques fromagères sur les caractéristiques du Reblochon de Savoie fermier. *Lait*, 75, 133-149.
- McMahon DJ, Brown RJ (1982). Evaluation of Formagraph for comparing rennet solutions. *J. Dairy Sci.*, 65, 1639-1642.

-
- Mehaia MA, Cheryan M (1983). The secondary phase of milk coagulation: effect of calcium, pH, and temperature on clotting activity. *Milchwissenschaft*, 38, 137-140.
- Mitchell GE, Fedrick IA, Rogers SA (1986). The relationship between somatic cell count, composition and manufacturing properties of bulk milk. II. Cheddar cheese made from farm bulk milk. *Aust. J. Dairy Technol.*, 41(3), 12-18.
- Mocquot G (1980). Citato da Carini, 1980.
- Mora R, Zannoni M (1986). L'importanza della caseina nella produzione del formaggio Parmigiano-Reggiano. *Il Parmigiano-Reggiano*, 16(2), 23-25.
- Mora R. (1985). Contenuto proteico del latte in rapporto alla tecnologia di fabbricazione del formaggio Parmigiano-Reggiano. Incontro Studio "Importanza del contenuto proteico del latte per la produzione dei formaggi tipici", 35-49, Ed. C.R.P.A., Reggio Emilia, 19 novembre 1985.
- Morini D, Losi G, Castagnetti GB, Benevelli M, Resmini P, Volonterio G (1975). L'influenza delle varianti genetiche della k-caseina sulla dimensione delle micelle caseiniche. *Sci. Tecn. Latt.-cas.*, 26, 437-444.
- Munro GL, Grieve PA, Kitchen BJ (1984). Effects of mastitis on milk yield, milk composition, processing properties and yield and quality of milk products. *Aust. J. Dairy Technol.*, 39(3), 7-16.
- Munro GL, Grieve PA, Kitchen BJ (1984). Effects of mastitis on milk yield, milk composition, processing properties and yield and quality of milk products. *Aust. J. Dairy Technol.*, 39(3), 7-16.
- Murphy SC, Cranker K, Senyk GF, Barbano DM, Saeman AI, Galton DM (1989). Influence of bovine mastitis on lipolysis and proteolysis in milk. *J. Dairy Sci.*, 72, 620-626.
- Niki R, Arima S (1984). Effects of size of casein micelle on firmness of rennet curd. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 55, 409-415.
- Olson NF (1977). Factors affecting cheese yields. *Dairy Industries Int.*, 42(4), 14-15, 19.
- Pabst K (1998). The significance of different types of milk protein (particularly k-casein) for cheesemaking. *Archiv. Für Tierzucht*, 41, 269-276.
- Pagnacco G. (1996). *Genetica applicata alle produzioni animali*, cap.9 pag 75.
- Patel MC, Lund DB, Olson NF (1972). Factors affecting syneresis of renneted milk gels. *J. Dairy Sci.*, 55, 913-918.
- Pecorari M (1984). La mastite bovina e sua influenza nella tecnologia del formaggio grana. *Obiettivi Doc. Vet.*, 5(6), 35-38.

- Pecorari M, Fossa E (1978). Turbe mammarie e caratteristiche qualitative dei lattini destinati alla trasformazione in Parmigiano-Reggiano. Atti Tavola rotonda "Le turbe di secrezione mammaria ed il loro significato nei riflessi della caseificazione del latte", 51-58, Parma, 17 giugno 1978.
- Pecorari M, Fossa E, Avanzini G, Mariani P (1988). Il latte a coagulazione anomala: comportamento tecnologico nella caseificazione a Parmigiano-Reggiano. *Sci. Tecn. Latt.-cas.*, 39, 319-337.
- 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. *Sci. Tecn. Latt.-cas.*, 46, 211-232.
- Pecorari M, Mariani P (1999). Dati non pubblicati.
- Pecorari M. and P. Mariani 1990. Caseina, attitudine alla coagulazione del latte, resa e qualità del formaggio. *Sci. Tecn. Latt.-cas.*, 41, 225-244.
- Politis I, Ng-Kwai-Hang KF (1988). Association between somatic cell count of milk and cheese-yielding capacity. *J. Dairy Sci.*, 71, 1720-1727.
- Politis I, Ng-Kwai-Hang KF (1988-1). Effects of somatic cell counts and milk composition on the coagulating properties of milk. *J. Dairy Sci.*, 71, 1740-1746.
- Politis I, Ng-Kwai-Hang KF (1988-2). Effects of somatic cell count and milk composition on cheese composition and cheese-making efficiency. *J. Dairy Sci.*, 71, 1711-1719.
- Qi PX (2007). Studies of casein micelle structure: the past and the present. *Lait*, 87, 363-383.
- Rahali V, Ménard JL (1991). Influence des variants génétiques de la b-lactoglobuline et de la k-caséine sur la composition du lait et son aptitude fromagère. *Lait*, 71, 275-297.
- Ramet JP, Weber F (1980). Contribution à l'étude de l'influence des facteurs de milieu sur la coagulation enzymatique du lait reconstitué. *Le Lait*, 60, 1-13.
- Redaelli G, Zecconi A (1985). Influenza della mastite bovina sul latte destinato alla caseificazione. *Il Latte*, 10, 42-44, 45-50.
- Remeuf F, Cossin V, Dervin C, Lenoir J, Tomassone R (1991). Relations entre les paramètres physico-chimiques des laiti et leur aptitude fromagère. *Lait*, 71, 397-421.
- Rendel J. M., and Robertson A. (1950). Estimation of genetic gain in milk yield by selection in a closed herd of dairy cattle. *J. Genetics* 50:1.

-
- 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. *Sci. Tecn. Latt.-cas.*, 33, 229-264.
- Rijnkels M (2002). Multispecies comparison of the casein gene loci and evolution of casein gene family. *J of mammary gland biology and neoplasia* 7(3), 327-45.
- Ritcher RL (1976). The effect of mastitis on the processing properties of milk. Proc. "15th Ann. Meet. Nat. Mastitis Council", Louisville (USA), 16-18 February 1976.
- Rogers SA, Mitchell GE (1994). The relationship between somatic cell count, composition and manufacturing properties of bulk milk. VI. Cheddar cheese and skim milk yoghurt. *Aust. J. Dairy Technol.*, 49(11), 70-74.
- Rossoni A., and C. Nicoletti. 2006. Migliorie al modello di valutazione genetica dei caratteri produttivi. *La Razza Bruna Vol 2*.
- Rossoni A., Nicoletti C., and E. Santus. 2006. Il nuovo ITE a maggio 2006: inclusione della morfologia. *La Razza Bruna Vol. 2*.
- Rowlands, S.J., 1938. The determination of nitrogen distribution in milk. *J.Dairy Res.* 9:30-47.
- Ruffo G, Carini S, Maffeo G, Lodi R, Fedeli E (1975). Osservazioni sulla caseificabilità del latte normale e patologico (Mastiti bovine e disordini secretori). *Ind. Latte*, 11(1), 19-40.
- Samorè A.B., Romani C., Rossoni A., Frigo E., Pedron O., Bagnato A. (2007). Genetic parameters for casein and urea content in Italian Brown Swiss dairy cattle. *Italian Journal of Animal Science*, 6 (suppl.1) Proceeding of the ASPA 17th congress pag. 201-203.
- Sandri S. (1999). Dati non pubblicati.
- Santus E. and Bagnato A. (1998). Proceedings of 6th WCGALP, 25: 19-22.
- Schmidt DG (1982). Association of caseins and casein micelle structure. In "Developments in Dairy Chemistry: 1" (Ed. PF Fox), pp. 61-86. Applied Science Publishers, London, UK.
- Schultz LH (1976). Mastitis-induced changes in milk composition. Proc. "15th Ann. Meet. Nat. Mastitis Council", Louisville (USA), 16-18 February 1976.
- Soelkner H., Fuerst C. (2002) Proc. 7th WCGALP CD Communication number 01-17.
- Storry JE, Ford GD (1982). Some factors affecting the post-clotting development of coagulum strenght in renneted milk. *J. Dairy Res.*, 49, 469-477.

Summer A., Santus E., Casanova L., Joerg H., Rossoni A., Nicoletti C., Donofrio G., Mariani P., Malacarne M (2010). Short communication: Characterization of a monoclonal antibody for k-casein B of cow's milk, *J. Dairy Sci.* 93, 796-800.

Svedberg J, de Haas J, Leimenstoll G, Paul F, Teschemacher H (1985). Demonstration of β -casomorphin immunoreactive materials in vitro digests of bovine milk and in small intestine contents after bovine milk ingestion in adult humans. *Peptides* 6, 825-83.

Tallamy PT, Randolph HE, Dill CW (1969). Influence of mastitis on properties of milk. I. Curd tension. *J. Dairy Sci.*, 52, 980-983.

Van Hooydonk ACM, Boerrigter IJ, Hagedoorn HG (1986). pH-induced physico-chemical changes of casein micelles in milk and their effect on renneting. II. Effect of pH on renneting of milk. *Neth. Milk Dairy J.*, 40, 297-313.

Waes G, van Belleghem M (1969). Influence de la mammite sur les propriétés technologiques du lait et sur la qualité des produits laitiers. *Le Lait*, 49, 266-290.

Waes G, van Belleghem M (1969). Influence de la mammite sur les propriétés technologiques du lait et sur la qualité des produits laitiers. *Le Lait*, 49, 266-290.

Walsh CD, Guinee TP, Harrington D, Mehra R, Murphy J, Fitzgerald RJ (1998). Cheesemaking, compositional and functional characteristics of low-moisture part-skim Mozzarella cheese from bovine milks containing k-casein AA, AB, or BB genetic variants. *J. Dairy Res.*, 65, 307-315.

Walstra P (1993). The syneresis of curd. In "Cheese: chemistry, physics and microbiology. Vol. 1" (Ed. PF Fox), pp. 141-191. Chapman & Hall, London, UK.

Weber F (1984). L'égouttage du coagulum. In "Le Fromage", (coord. A. Eck), 22-36. Technique et Documentation (Lavoisier), Paris, France.

White JCD, Davies DT (1958). The relation between the chemical composition of milk and the stability of the caseinate complex. III. Coagulation by rennet. *J. Dairy Res.*, 25, 267-280.

White JCD, Davies DT (1958). The relation between the chemical composition of milk and the stability of the caseinate complex. I. General introduction, description of samples, methods and chemical composition of samples. *J. Dairy Res.*, 25, 236-255.

www.betacasein.org

www.foss.dk

www.morphosys.com

www.testkappa.com

7 RINGRAZIAMENTI

GRAZIE al prof. Primo Mariani e al prof. Andrea Summer che hanno creduto in me offrendomi quest'occasione di crescita professionale che mai avrei pensato di compiere in un momento così "impegnato" della mia vita.

GRAZIE all'Associazione Nazionale Allevatori di Razza Bruna e, in particolare, al direttore Enrico Santus, per avermi "incoraggiato" a cogliere quest'opportunità che, nonostante le mie titubanze iniziali, si è dimostrata essere un'esperienza molto positiva sia dal punto di vista lavorativo che personale.

GRAZIE ad Attilio, mio "angelo custode", sempre disponibile all'aiuto e sempre pronto a comprendere e ridimensionare i miei momenti d'agitazione sopportandomi giorno per giorno.

GRAZIE a Massimo, "topo da biblioteca", sempre efficiente e puntuale. Infinitamente paziente nell'ascoltare i miei dubbi e preciso revisore dei miei scritti.

GRAZIE a Piero, Paolo e Serena che con la loro simpatia mi hanno sempre accolto in facoltà facendomi respirare un'aria familiare.

GRAZIE al marito, Roberto, che ha accettato con me questa sfida comprendendone l'utilità ma ben sapendo che non sarebbe stato solo un impegno "lavorativo" ma anche "casalingo". Grazie per la tua presenza, il tuo sostegno morale ma anche fisico nell'aver impegnato i bimbi nei miei momenti di studio.

GRAZIE alle mie due piccole pesti, Marco e Pietro che con la loro spensieratezza sono fonte di gioia ogni giorno. "Se non studi ti sgridano?" è la domanda che sempre ripetete quando mi vedete seduta davanti al computer non sapendo neppure cosa significa. Vi voglio bene, strafantini!!!

GRAZIE a mamma e papà per avermi insegnato a non arrendermi dinanzi alle difficoltà.

GRAZIE alle tante mamme a cui ho "affidato" i figli nei pomeriggi impegnati nello studio.