



**UNIVERSITÀ
DI PARMA**

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICO-VETERINARIE

Corso di laurea magistrale in Produzioni Animali Innovative e Sostenibili

EFFETTO DELLE VARIANTI GENETICHE A1 E A2 DELLA β -
CASEINA SUL CONTENUTO E SULLA DISTRIBUZIONE DI
CALCIO, FOSFORO E MAGNESIO NEL LATTE BOVINO

EFFECT OF GENETIC VARIANTS A1 AND A2 OF β -CASEIN
ON THE CONTENT AND DISTRIBUTION OF CALCIUM,
PHOSPHORUS AND MAGNESIUM IN BOVINE MILK

Relatore: Prof. Massimo Malacarne

Laureanda:
Martina Pallastrelli
Matricola 340413

ANNO ACCADEMICO 2022-2023

RIASSUNTO	4
ABSTRACT	5
1 INTRODUZIONE GENERALE	6
1.1 SALI MINERALI	8
1.1.1 Calcio	8
1.1.2 Fosforo	8
1.1.3 Magnesio	9
1.2 CASEINA	10
1.2.1 Geni che codificano per le caseine	10
1.2.2 β -caseina e polimorfismo genetico	12
1.2.3 Varianti A1 e A2 della β -caseina	12
1.2.4 Effetti delle varianti e processabilità	13
1.3 MICELLA DI CASEINA	14
1.3.1 Composizione della micella	14
1.3.2 Modelli della struttura micellare	15
1.4 LIBERAZIONE PEPTIDI BIOATTIVI A PARTIRE DALLE CASEINE	17
1.4.1 BAPs ed effetti sulla salute	18
1.4.2 BCM7 e varianti A1 e A2	19
2 SCOPO	21
3 MATERIALI E METODI	22
3.1 CRITERI DI SCELTA DEI SOGGETTI SPERIMENTALI	22
3.2 CAMPIONAMENTO	24
3.3 ANALISI EFFETTUATE	25
3.3.1 Determinazione del calcio con metodo per assorbimento atomico	25
3.3.2 Determinazione del tenore di fosforo	26
3.3.3 Determinazione del magnesio con metodo per assorbimento atomico	27
3.4 ANALISI STATISTICA	27
4 RISULTATI	28
4.1 CRITICITÀ DELLE ANALISI	34
5 CONCLUSIONI	35
6 RINGRAZIAMENTI	36
BIBLIOGRAFIA	37
SITOGRAFIA	44

RIASSUNTO

La tesi si focalizza sulla possibile relazione tra le varianti A1 e A2 della β -caseina e la presenza e la distribuzione di calcio, fosforo e magnesio nel latte vaccino.

Le varianti A1 e A2 sono importanti per i loro presunti effetti sulla salute umana. La sostituzione genetica che le caratterizza influisce sull'espressione proteica e potrebbe favorire il rilascio di peptidi bioattivi come il BCM7, maggiormente rilasciato dalla variante A1. Anche se studi futuri sono necessari per chiarire gli effetti sulla salute, molte nazioni hanno promosso la selezione di bovini che non presentano la variante A1, senza considerare gli effetti sulle proprietà del latte.

Nell'ambito di questa tesi, le differenze genetiche sono state esaminate per comprendere la loro relazione con i sali minerali nel latte vaccino.

L'analisi è stata condotta presso l'azienda agricola *Carpaneta*, utilizzando campioni di latte individuale e di massa. Sono state condotte due prove sperimentali in diverse stagioni: luglio e marzo 2019. I bovini sono stati suddivisi in tre gruppi in base al genotipo presentato: A1A1, A1A2 e A2A2. Per il calcolo dei contenuti totali dei 3 minerali, le analisi sono state condotte sul latte tal quale. La frazione solubile di ciascuno dei 3 minerali è stata determinata su sieri ultrafiltrati ottenuti mediante ultrafiltrazione del latte. Il contenuto delle frazioni colloidali è stato calcolato per differenza tra totale e solubile.

I risultati dello studio non hanno mostrato differenze statisticamente significative tra i tre genotipi, né a livello di latte individuale né di massa, in nessuna delle due prove sperimentali. Tuttavia, è stato osservato un effetto significativo della stagione su tutti i parametri analizzati sia per il latte individuale che per quello di massa.

ABSTRACT

The thesis focuses on the possible relationship between the A1 and A2 variants of β -casein and the presence and distribution of calcium, phosphorus, and magnesium in bovine milk. The A1 and A2 variants are significant due to their presumed effects on human health. The genetic substitution that characterizes them influences protein expression and may promote the release of bioactive peptides such as BCM7, which is more abundantly released by the A1 variant. Although further studies are needed to clarify the health effects, many nations have promoted the selection of bovine without the A1 variant, without considering the effects on milk properties.

In the context of this thesis, genetic differences were examined to understand their relationship with mineral content. The analysis was conducted at *Carpaneta* Farm, using samples of individual and bulk milk. Two experimental trials were conducted in different seasons, July and March 2019. The milking cows were divided into three groups based on their presented genotype: A1A1, A1A2, and A2A2. For the calculation of total mineral contents, analyses were performed on raw milk. The soluble fraction of each of the three minerals was determined on ultrafiltered whey obtained through milk ultrafiltration. The content of colloidal fractions was calculated as the difference between total and soluble fractions.

The study's results did not show statistically significant differences among the three genotypes, neither at the individual nor bulk milk level, in either of the two experimental trials. However, a significant seasonal effect was observed on all analyzed parameters for both individual and bulk milk.

1 INTRODUZIONE GENERALE

Il latte, per definizione, è il liquido secreto dalla ghiandola mammaria delle femmine dei mammiferi, rappresentando l'unico e più idoneo alimento per il lattante della stessa specie. A livello legislativo, per latte si intende il prodotto della mungitura regolare, completa ed ininterrotta di animali in buono stato di salute e di alimentazione (RD 9/5/29 n. 994).

Il latte è un'ottima risorsa alimentare in quanto contiene nutrienti essenziali, fra cui proteine, carboidrati, minerali e vitamine. Esso si presenta come un liquido, più propriamente un miscuglio eterogeneo, caratterizzato da una fase continua (siero) e contenente:

- Sostanze disciolte, come lattosio, vitamine idrosolubili e porzioni di sali minerali,
- Sostanze in emulsione, come grassi e vitamine liposolubili,
- Sostanze allo stato colloidale, come proteine e fosfato tricalcico.

In media, 100 gr di secreto vaccino sono composti da 87,5 g di acqua e 12,5 g di sostanza secca. La composizione e le caratteristiche del latte variano da specie a specie in base al fabbisogno.

Il contenuto di lipidi varia notevolmente durante le diverse fasi della lattazione ed è influenzato dall'alimentazione: gli acidi grassi a lunga catena derivano direttamente dal circolo sanguigno e sono di origine alimentare, a differenza degli acidi grassi a corta e media lunghezza che sono sintetizzati dalle cellule della ghiandola mammaria a partire da precursori di origine ematica.

I lipidi si ritrovano come gocce di dimensioni variabili (0,1 – 15 μm). Le strutture sono formate da un *core* idrofobico, costituito da trigliceridi ed esteri del colesterolo, circondato da un monostrato di fosfolipidi e da una parte esterna in cui sono presenti molecole di natura proteica, utili per interagire con altre molecole presenti nella superficie interna della membrana citoplasmatica.

Nel latte si ritrovano diverse classi di lipidi: triacilgliceridi (95%), digliceridi (2%), fosfolipidi (1%), colesterolo (0,5%) e acidi grassi liberi (0,5%).

Le proteine del latte sono una delle fonti più importanti di aminoacidi per la dieta umana, in quanto altamente biodisponibili, e, oltre al ruolo fisiologico-nutrizionale, rivestono una funzione fondamentale nell'industria di trasformazione.

Le proteine (3,5%) sono distinte in diverse famiglie (Tabella 1): caseine, proteine del siero (o sieroproteine) e proteine in contenuto inferiore, come enzimi. Sotto il profilo fisiologico-nutrizionale, la frazione proteica fornisce aminoacidi essenziali (attraverso le sieroproteine), calcio e fosforo in forma altamente assimilabile, grazie al legame con la caseina, immunoglobuline e peptidi bioattivi, che sono liberati nel corso della digestione del latte.

Le caseine rappresentano la frazione maggioritaria delle proteine. Sono fosfoproteine sintetizzate nell'alveolo mammario e a pH 4,6 precipitano.

Le sieroproteine sono il 14% delle proteine totali e fra queste le più importanti sono: β -lattoglobulina (specifica dei Ruminanti), α -lattoalbumina (funzione essenziale nella sintesi del lattosio) e lattoferrina, con attività antimicrobica in quanto in grado di legare il ferro ionico.

Tabella 1 Classificazione delle proteine del latte

Proteina	Conc. (g/l)	%	PM (kDa)	Nr. AA	Fosforo (%)
Caseine	24-28	80			0,9
<i>α_{s1}-caseina</i>	12-15	34	23,6 ^a	199	1,1
<i>α_{s2}-caseina</i>	3-4	8	25,2 ^b	207	1,4
<i>β-caseina</i>	9-11	25	19 ^c	209	0,6
<i>κ-caseina</i>	3-4	9	24	169	0,2
<i>γ-caseina</i>	1-2	4	12-21		0,1
Proteine del siero	5-7	20			
<i>β-lattoglobulina</i>	2-4	9	18,3		
<i>α-lattoalbumina</i>	1-1,5	4	14,2		
<i>Proteoso-peptone</i>	0,6-1,8	4	4-41		
<i>Albumina del siero</i>	0,1-0,4	1	66,3		
<i>Immunoglobuline</i>	0,6-1,0	2	80-950		

Il lattosio è un disaccaride sintetizzato direttamente dalle cellule dell'epitelio ghiandolare mammario a partire da due molecole di glucosio prelevate dal circolo sanguigno. Una molecola di glucosio è epimerizzata a galattosio e successivamente, questi due zuccheri, sono attaccati dall'enzima lattosio-sintasi che catalizza la condensazione di una molecola di galattosio e una di glucosio. La funzione principale è quella di trasferire energia al neonato.

I sali minerali che si ritrovano nel latte derivano dal sangue circolante e sono recuperati dall'intestino. Le cellule alveolari mammarie attuano un controllo selettivo: alcuni sali passano in quantità limitata, altri sono trasferiti in proporzione al contenuto ematico e altri possono essere concentrati nel latte.

Si possono dividere in: macroelementi (calcio, magnesio, potassio, fosforo, sodio, cloro) e microelementi (rame, ferro, zinco, cobalto, manganese, fluoro, selenio, molibdeno, iodio). Maggiore è la quantità dei minerali solubili presenti nel lume alveolare, maggiore è il richiamo d'acqua dal circolo sanguigno.

Le vitamine presenti derivano dal sangue. Per quanto riguarda i Ruminanti, la popolazione microbica del ruminante sintetizza tutte le vitamine appartenenti dal gruppo B. Le restanti frazioni hanno origine alimentare.

1.1 SALI MINERALI

Il contenuto minerale varia da 3 a 13 g/L a seconda della specie analizzata, per il latte vaccino il quantitativo è circa 1 g/100 mL (Corradini, 1995).

I minerali rappresentano una piccola frazione del latte (0,6-0,7%) e sono distribuiti fra la fase solubile e quella colloidale (o micellare), in base alla molecola presente. Il loro quantitativo e la loro distribuzione dipendono da diversi fattori, come specie, razza, caratteristiche individuali, stadio della lattazione, numero di parti e condizione di salute generale (Zamberlin et al., 2012).

Calcio, magnesio e fosforo ricoprono un ruolo rilevante per la produzione di formaggi grazie alla loro influenza sulle proprietà della micella, come struttura e stabilità, condizionando il processo di coagulazione (Malacarne et al., 2014).

1.1.1 Calcio

Il 25% del calcio si ritrova in forma solubile, la restante quota è presente legata a fosfato o citrato oppure a micelle di caseina nel composto di fosfato di calcio colloidale (CCP) (Lucey e coll., 2017). Lo ione Ca^{2+} , in fase solubile, è in grado di influenzare il comportamento delle caseine riducendo la forza di repulsione tra di esse e neutralizzando le cariche negative presenti sulla superficie delle micelle. Lo stesso ione, in fase colloidale, è coinvolto direttamente nella stabilità interna della caseina, in quanto partecipa alla formazione di ponti tra le sub-micelle (D.G. Schmidt, 1982).

1.1.2 Fosforo

Nel latte, il fosforo è presente in forma organica legato alla caseina (20%), oppure in forma inorganica (80%). Della seconda forma, il 44% è legato alla micella di caseina come fosfato-tri-calcico e il 56% è presente in fase solubile, principalmente come ione fosfato libero (Zamberlin, 2012).

Nelle micelle di caseina, c'è un'ulteriore complicazione nel definire il fosfato di calcio micellare perché il calcio e il fosfato inorganico sono in forte interazione con le residui di fosfoerina delle caseine. Infatti, il calcio micellare non è totalmente associato al fosfato inorganico colloidale, una parte di esso è legata direttamente alla caseina tramite l'intermediazione dei residui di fosfoerina, che sono fosfati organici. Pertanto, il calcio colloidale nel latte può essere definito come una miscela di caseinato di calcio (contenente fosfato organico) e fosfato di calcio (che è un fosfato inorganico).

La sua concentrazione è massima nelle prime fasi della lattazione e tende a diminuire con il passare dei giorni.

Il contenuto di fosforo è in grado di influenzare il pH del latte, con ripercussioni sull'attitudine alla lavorazione del prodotto.

Uno dei fattori che determina la caratteristica di latte ipoacido è rappresentato da una carenza di fosforo solubile, cui si correlano strettamente i valori di pH: alla diminuzione degli idrogenioni, corrisponde un allungamento del tempo di coagulazione. L'iperacidità è correlata, in parte, al contenuto di fosforo più alto rispetto al valore fisiologico (Marchini, 2014).

1.1.3 Magnesio

Per quanto riguarda il magnesio, esso è prevalentemente concentrato nella fase magra del latte (98-100%). Il 65% del minerale, si trova in fase solubile sottoforma di magnesio-citrato (40%), magnesio fosfato (7%) e ione libero (16%).

La rimanente frazione è in fase colloidale, dove il magnesio forma un legame con la micella di caseina: il 50% è legato al fosfato di calcio colloidale e il 50% è legato alla fosfoserina (Zamberlin, 2012).

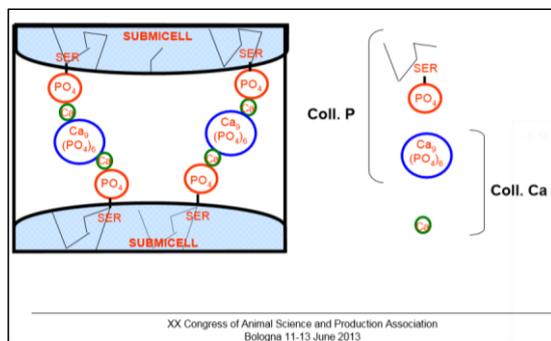


Figura 1 Ruolo dei sali minerali (Malacarne, appunti lezione 2017)

1.2 CASEINA

Le caseine rappresentano la frazione proteica che precipita quando il latte è acidificato a un pH pari a 4,6 (caseina isoelettrica), mentre le sieroproteine rimangono in fase solubile a tale acidità.

La caseina rappresenta circa l'80% delle proteine del latte bovino ed è composta da quattro frazioni principali: (α)alpha-S1-CN, (β)beta-CN, (α)alpha-S2-CN e (κ)kappa-CN (Farrell, 2004).

1.2.1 Geni che codificano per le caseine

I geni che codificano per le frazioni di caseina bovina sono collocati sul cromosoma autosomico 6 (BTA6) e sono raggruppati in ordine *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN1S2* e *CSN3* in una regione di 250 kb (Threadgill e Womack 1990). Questi geni codificano rispettivamente per α S1-, β -, α S2- e κ -caseina. Le quattro frazioni differiscono nella loro sequenza di aminoacidi, struttura e nel tipo e/o livello di modificazioni post-traduzionali (fosforilazione e glicosilazione) (Formaggioni et al., 1999). Le varianti della caseina sono originate da mutazioni del DNA (principalmente sostituzioni di nucleotidi), che determinano variazioni nella sequenza amminoacidica della proteina (principalmente sostituzioni di aminoacidi e, in alcuni casi, delezioni) (Farrell et al., 2004).

Tabella 2 Polimorfismo genetico della β -caseina: posizione e differenze degli amminoacidi fra le varianti genetiche (Farrell et al., 2004)

Protein ¹	Variant	Position and amino acid in the protein													
α_{s1} -CN (199)	A	Deleted													
	B	53 <i>Ala</i>													
	C	59 <i>Gln</i>													
	D	66 <i>SerP</i>													
	E	192 <i>Glu</i>													
	F	192 <i>Glu</i>													
	G	192 <i>Gly</i>													
	H	192 <i>Glu</i>													
α_{s2} -CN (207)	A	Deleted													
	B	51-59													
	C	130 <i>Thr</i>													
	D	130 <i>Ile</i>													
β -CN (209)	A ¹	18	25	35	36	37	67	72	88	93	106	122	137/138	152	?
	A ²	<i>SerP</i>	<i>Arg</i>	<i>SerP</i>	<i>Glu</i>	<i>Glu</i>	<i>His</i>	<i>Gln</i>	<i>Leu</i>	<i>Met</i>	<i>His</i>	<i>Ser</i>	<i>Leu/Pro</i>	<i>Pro</i>	<i>Gln</i>
	A ³	Complete sequence not yet determined													
	B	47 <i>Ala</i>													
	C	33 <i>Glu</i>													
	D	47 <i>Thr</i>													
	E	Deleted													
	F	Deleted													
	G	Deleted													
	H ¹	Deleted													
	H ²	Deleted													
κ -CN (169)	A	10 <i>Arg</i>													
	B	97 <i>Arg</i>													
	C	104 <i>Ser</i>													
	E	135 <i>Thr</i>													
	F ¹	136 <i>Thr</i>													
	F ²	136 <i>Ile</i>													
	G ¹	148 <i>Asp</i>													
	G ²	155 <i>Ser</i>													
	H	148 <i>Ala</i>													
	I	148 <i>Ala</i>													
	β -LG (162)	A	45	50	56	59	64	70	78	108	118	126	129	158	
B		<i>Glu</i>	<i>Pro</i>	<i>Ile</i>	<i>Gln</i>	<i>Asp</i>	<i>Lys</i>	<i>Ile</i>	<i>Glu</i>	<i>Val</i>	<i>Pro</i>	<i>Asp</i>	<i>Glu</i>		
C		56 <i>Ile</i>													
D		59 <i>Gln</i>													
E		64 <i>His</i>													
F		70 <i>Asp</i>													
G		78 <i>Gly</i>													
H		108 <i>Lys</i>													
I		118 <i>Ile</i>													
J		126 <i>Ile</i>													
α -LA (123)		A	10 <i>Gln</i>												
	B	10 <i>Arg</i>													
	C	10 <i>Arg</i>													

¹Numbers in parentheses indicate the total number of amino acid residues in the reference protein. Amino acids in the reference protein

1.2.2 β -caseina e polimorfismo genetico

Per quanto concerne la β -caseina, oggetto di studio, essa rappresenta circa il 35% della caseina nel latte bovino (Huppertz, 2012) ed è caratterizzata dal più ampio polimorfismo, come si può vedere nella tabella 1. Ad oggi, se ne conoscono dodici varianti genetiche: A1, A2, A3, B, C, D, E, F, H1, H2, I, G, che differiscono fra loro per mutazioni del DNA che comportano sostituzioni di uno, due o tre amminoacidi, senza presentare mai una delezione (Gallinant et al., 2013). La β -caseina svolge un ruolo importante nella resa e nella qualità del formaggio derivato, oltre alla produzione e alla composizione del latte, e sembra influenzare anche la sostenibilità ambientale dei processi di produzione del formaggio (Gislon et al., 2023).

1.2.3 Varianti A1 e A2 della β -caseina

In particolare, fra le varianti della β -caseina, sono importanti le forme A1 e A2, per le quali alcune ricerche hanno evidenziato possibili effetti sulla salute umana. Queste sono i due polimorfismi più comuni fra questa famiglia e si distinguono fra loro per un amminoacido differente (Summer et al., 2020). L'analisi genomica ha individuato la variante A2 come la più antica forma della β -caseina, ritrovata nel genoma delle razze di tipo europeo antico e nelle razze pure asiatiche, mentre la forma A1 è il risultato di una mutazione ottenuta da selezione naturale (Brooke-Taylor et al., 2017) e predomina nei bovini europei moderni da qualche migliaio di anni (Sebastiani et al., 2020).

La diversità fra la β -caseina A1 e A2 risiede nella posizione 67 della catena amminoacidica, dove nella prima si ritrova una istidina (His), mentre nella seconda vi è una prolina (Pro). Questa differenza è imputabile a una variazione nello SNP (single nucleotide polymorphism) nel codone numero 67: la sequenza CCT sintetizza per la prolina (variante A2), mentre la sequenza CAT, sintetizza l'istidina (variante A1) (Parashar e Saini 2015).

Questa sostituzione puntiforme all'interno del gene, che mostra come conseguenza una sola sostituzione di un amminoacido, può causare diverse differenze a livello fisiologico nell'espressione della proteina.

La presenza di una istidina al posto della prolina potrebbe modificare i peptidi bioattivi rilasciati durante la digestione del latte, così come durante la produzione di formaggio.

La variante A1 è stata associata alla *maggiore* liberazione di un peptide bioattivo (β -casomorfina-7, BCM7) durante la digestione proteica nel tratto intestinale, rispetto alla variante A2 (Summer et al., 2020). Tale peptide è accusato di essere un potenziale fattore di rischio per il diabete di tipo 1 e per problemi cardiaci, anche se numerosi studi hanno evidenziato la mancanza di prove sostanziali per sostenere tale tema (Truswell, 2006). Inoltre, altri studi hanno relazionato il peptide a patologie infiammatorie intestinali (Pal et al., 2015), come verrà approfondito più avanti.

Tuttavia, anche se sono ancora in atto studi per chiarire gli eventuali effetti della variante A1 sulla salute umana, molte nazioni hanno spinto gli allevatori a selezionare bovini che non presentino geni per la codifica della β -caseina di tipo A1, senza aver valutato i possibili effetti sulle le proprietà tecnologiche del latte.

Tali differenze alleliche sono prese in considerazione in questo progetto, per evidenziare eventuali relazioni presenti fra le varianti A1 e A2 della β -caseina sul contenuto e la distribuzione dei sali minerali nel latte vaccino.

1.2.4 Effetti delle varianti e processabilità

I polimorfismi con cui si presenta la β -caseina, come risultato di inserzione o modificazione post-traduzionale nello SNP, sono stati studiati negli ultimi anni in quanto hanno un forte impatto sulle proprietà del latte. Essi, infatti, sono in grado di apportare modifiche per quanto riguarda il quantitativo prodotto, il profilo proteico, le proprietà funzionali e cambiamenti nelle proporzioni dei componenti (Amalfitano et al., 2020). Di conseguenza, questi cambiamenti influenzano le proprietà di coagulazione del latte (*MCP*), processo fondamentale per la produzione di formaggi e alimenti derivati (Cipolat-Gotet et al., 2018).

Da uno studio effettuato da Cecchinato et al. (2022) è emerso che i polimorfismi A1 e A2 con cui si presenta la β -caseina sono in grado di alterare le caratteristiche del latte, con ripercussioni anche sulla processabilità di tale alimento. Infatti, è emerso che:

- Il genotipo A2A2, insieme ad altre combinazioni, è fra quelli che aumentano la produzione di α s2-caseina, al contrario del latte A1A1 che è associato ad una minor concentrazione. Fra tutte le caseine presenti, l' α s2-CN sembra abbia scarsa influenza sull'efficienza del processo di produzione del formaggio (Cipolat-Gotet et al., 2018) o possa addirittura influire negativamente sul recupero delle proteine del latte nella cagliata (Amalfitano et al., 2019);
- La produzione di β -caseina in generale è sfavorita con il genotipo A2A2; questo è spiegato dalla ipotesi secondo cui, quando l'espressione di un gene di caseina viene ridotta, l'espressione di altri geni venga aumentata in compensazione (Martin et al., 2003);
- In conseguenza a quanto detto sopra, il genotipo A2A2 è responsabile della produzione più alta di proteine totali, al contrario del tipo A1A1;
- La concentrazione di lattoferrina risulta più alta con il genotipo A1A1, anche se sono necessari ulteriori approfondimenti;
- Per quanto riguarda le analisi tromboelastografiche, il latte A2A2 ha mostrato, ad esempio, valori più alti tempo di coagulazione (RCT) e valori inferiori di a30 (consistenza della cagliata a 30 min dall'aggiunta del caglio) rispetto alle altre varianti genetiche. Il valore medio di RCT per il latte A1A1 era di 20,8 minuti, quasi 2 minuti più breve rispetto al latte A2A2 (22,4 minuti); con opportune analisi sono state evidenziate le peggiori performance di coagulazione del latte A2A2 rispetto al genotipo A1A1 (Jensen et al., 2012);

Cecchinato et al. (2022) concludono affermando che se si dimostrasse una maggiore digeribilità del latte con genotipo della β -caseina A2A2, allora l'industria di produzione dovrebbe favorire il consumo di questo genotipo nel latte destinato al consumo fresco. Tuttavia, sconsigliano l'utilizzo del latte contenente l'allele A2 per la produzione di formaggio dato che è associato a un peggioramento delle caratteristiche tecnologiche del latte e ad una conseguente minore efficienza nella produzione di formaggio.

Considerati tutti i fattori precedenti, è importante analizzare l'influenza dei genotipi più comuni di β -caseina sulla distribuzione dei sali minerali, data la loro rilevanza nei processi di caseificazione.

1.3 MICELLA DI CASEINA

La caseina è la frazione proteica che, di per sé, conferisce stabilità al latte. Questa caratteristica è definita come l'abilità di tale proteina di rimanere in sospensione colloidale, cioè non precipitare, quando il latte è sottoposto a trattamenti termici o fisici (entro determinati limiti). Essa precipita per azione del caglio oppure tramite coagulazione acida a pH 4,6 a una temperatura di 20 °C (Lucey e coll., 2017).

1.3.1 Composizione della micella

La frazione caseinica si ritrova principalmente nella micella (94%), una struttura globulare che raggruppa le diverse proteine α s1-, α s2-, β -, κ -, il gruppo fosfato, il calcio e, in piccola parte, gli ioni magnesio; la restante frazione è rappresentata dalla "caseina solubile" (5-10%) che si ritrova sottoforma di piccoli aggregati (Alais, 2000). Le frazioni proteiche si ritrovano in rapporto 3:1:3:1.

Le micelle hanno un diametro compreso fra 20 nm e 300 nm. Le differenze di dimensione sono riconducibili a variazioni individuali e stagionali. Queste strutture sono composte da subunità denominate submicelle, con diametri compresi tra 12 e 20 nm (Alais, 2000; Corradini, 1995)

Il fosfato di calcio colloidale è parte integrante della micella di caseina, grazie ai legami di natura elettrostatica secondaria che forma con i residui fosforilati delle caseine calcio-sensibili (α s1-, α s2-, β -). Il gruppo si presenta come elemento "cementante" fra le submicelle, condizionando, entro certi limiti, anche la dimensione degli aggregati (Decelles, 1967; Holt e Muir, 1978). Questo è un sale, di natura amorfa, composto da calcio, fosfato e piccole quantità di magnesio. Il fosfato di calcio micellare, che è principalmente associato alle α s1-, α s2-, e β -caseine, è responsabile della struttura e della stabilità delle micelle di caseina. Allo stesso tempo, agisce come agente di cross-linking e come agente di neutralizzazione dei residui di fosfoserina perché è carico positivamente e si lega ai siti negativi delle molecole di caseina.

Lo ione calcio, in fase solubile, influenza il comportamento delle caseine riducendo la forza di repulsione tra esse, neutralizzando le cariche negative sulle micelle.

Gli ioni calcio, in fase colloidale, sono coinvolti direttamente nella stabilità interna della micella, partecipando alla formazione di ponti tra le submicelle di caseina (Schmidt, 1982).

1.3.2 Modelli della struttura micellare

Vi sono due modelli maggiormente accreditati fra la comunità scientifica.

Il primo è stato proposto da Schmidt nel 1982 (Figura 2) e prevede che le submicelle citate siano formate da un nucleo idrofobo, dove si trovano le parti apolari delle caseine. Questo è circondato da uno strato polare dove sono presenti le frazioni ricche di gruppi fosforici delle caseine α_1 -, α_2 -, β -. Le submicelle sono legate tramite interazioni elettrostatiche tra i gruppi esteri fosforici delle caseine, carichi negativamente, e il fosfato di calcio $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ (Alais, 2000).

Il secondo modello proposto è quello di Horne (Figura 3), che non prevede la presenza di submicelle in quanto le caseine si legano fra di loro tramite l'interazione tra il fosfato di calcio colloidale e i centri fosfato (regioni aventi 2-4 amminoacidi fosforilati), oppure tramite interazioni secondarie tra le regioni idrofobiche.

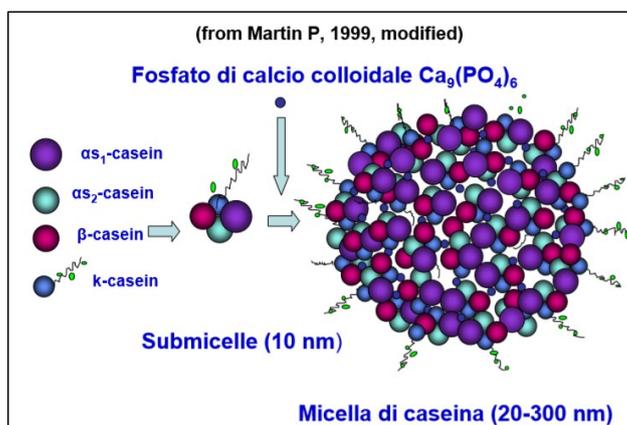


Figura 2 Modello di micella di caseina secondo Schmidt (1982). Questo modello prevede la formazione di submicelle costituite dalle caseine α_1 -, α_2 -, β - e κ - (rapporto ponderale 3:1:3:1), attraverso interazioni di natura secondaria. La formazione della micella di caseina vera e propria avviene grazie 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_1 -, α_2 -, β -. L'estremità carbossiterminale (106-169) della κ -caseina è rappresentata da un filamento in cui sono evidenziati i gruppi glicosidici

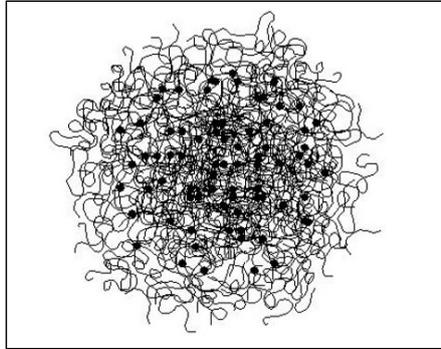


Figura 3 Modello di micella di caseina secondo Holt e Horne (Gaucheron, 2005). In questo modello non sono considerate le submicelle, le caseine sono viste come un insieme fluido, il calcio fosfato è composto da un *core* di calcio fosfato e un guscio composto da caseina fosfopeptide

1.4 LIBERAZIONE PEPTIDI BIOATTIVI A PARTIRE DALLE CASEINE

Nell'uomo, la digestione proteica inizia nello stomaco, dove le proteine sono attaccate da enzimi idrolitici che liberano peptidi di diversa lunghezza. Il processo continua nel duodeno, dove avvengono ulteriori idrolisi dei peptidi e termina quando gli enzimi degli enterociti idrolizzano le catene rimaste, liberando amminoacidi e peptidi a corta catena. Questi possono essere potenzialmente assorbiti nel digiuno e nell'ileo, per poi entrare nel circolo sanguigno attraversando la barriera intestinale (Webb, 1990; Giromini et al., 2019). Le proteine di origine alimentare contengono, nella loro sequenza aminoacidica primaria, diversi peptidi, con attività biologiche differenti (Mine e Shahidi, 2006), che si possono liberare durante i processi di trasformazione del prodotto o durante la digestione.

Il processo di idrolisi può portare alla liberazione di peptidi bioattivi (BAPs), che sono silenti nella proteina nativa, ma si formano durante la digestione e, potenzialmente, anche durante la trasformazione del latte per la produzione di derivati (Boutrou, Henry and Sanchez-Rivera, 2015). La comunità scientifica e i consumatori stanno concentrando gli studi su questi peptidi, cercando una possibile correlazione fra essi e alcune patologie diffuse, come: problemi cardiovascolari, obesità, ipertensione, diabete e anche cancro, causato da fattori dietetici.

I BAPs possono essere di diversi tipi, classificabili in base all'azione che svolgono, quali antimicrobici, anti-ipertensivi, immunomodulatori, trasportato di minerali e oppioidi. Inoltre, si possono classificare anche in base al distretto anatomico su cui agiscono.

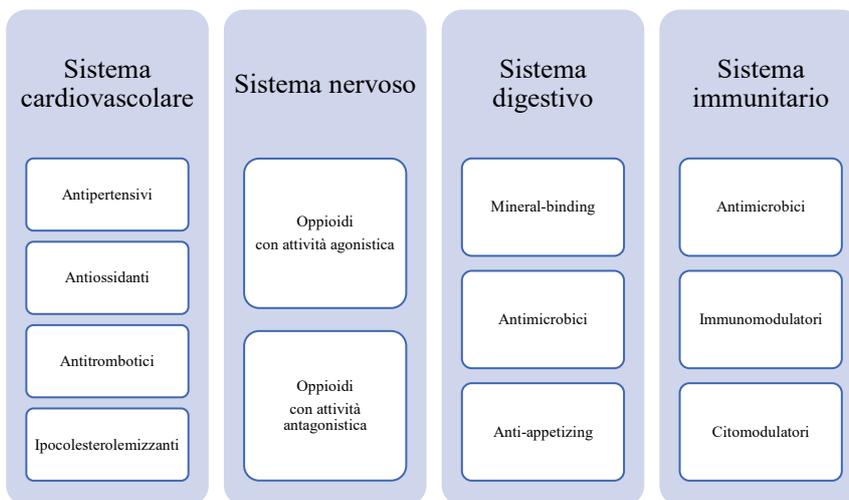


Figura 4 Potenziale funzionalità fisiologica di peptidi bioattivi provenienti da alimenti (Korhonen e Pihlanto, 2007; Summer et al., 2020)

1.4.1 BAPs ed effetti sulla salute

La sequenza amminoacidica di BCM7 corrisponde al frammento 60-66 della sequenza della β -caseina: Tyr⁶⁰-Pro⁶¹-Phe⁶²-Pro⁶³-Gly⁶⁴-Pro⁶⁵-Ile⁶⁶).

La β -casomorfina-7 è un peptide bioattivo, è un agonista esogeno del recettore oppioide μ (MOR) (Meisel and FitzGerald, 2000). Da studi effettuati, utilizzando il test biologico GPI (preparazione del plesso mioenterico del muscolo longitudinale dell'ileo della cavia) e il test MVD (del dotto deferente del topo) è emerso che i BCMs tendono legarsi appunto al recettore di tipo μ .

La BCM7 è classificata come oppioide esogeno, in quanto possiede un residuo di tirosina nella sua sequenza (Teschemacher, 2003). Da test effettuati sui recettori oppiacei del ratto, è emerso che i BCM bovini sono più potenti rispetto a quelli umani e che BCM5 risulta il più potente, mentre BCM7 è il meno potente (Brantl e altri, 1981). Tuttavia, dal report EFSA, emerge che gli effetti oppioidi di tale molecola sono stati osservati solo in caso di somministrazione intra-peritoneale o intra-cerebro-ventricolare, quindi non per assunzione tramite l'alimentazione.

Affinché il peptide rilasciato possa avere effetti sull'organismo, è necessario che attraversi la barriera epiteliale intestinale e che rimanga stabile durante l'attraversamento epatico e che, nel caso di effetti sul sistema nervoso centrale, sia in grado di attraversare la barriera emato-encefalica (EFSA, 2009). Ad oggi, vi sono pochi studi che provano la capacità di un peptide di lunghezza superiore a tre amminoacidi di superare la barriera intestinale. Le proprietà fisico-chimiche dei peptidi, come la dimensione molecolare, il legame idrogeno, la conformazione, il coefficiente di partizione, l'idrofilia, la lipofilità e il potenziale elettrostatico possono modificare la permeabilità dei peptidi. I peptidi oppioidi sono generalmente altamente idrofobici; pertanto, il loro trasferimento attraverso l'epitelio intestinale potrebbe non avvenire facilmente (Iwan et al., 2008). Inoltre, i meccanismi di trasferimento attivo dei peptidi oppioidi attraverso l'epitelio intestinale non sono chiari.

Tuttavia, molte ricerche hanno cercato di evidenziare la correlazione tra questi peptidi liberati e patologie diverse: ad esempio, Kurek et al. (1995), hanno evidenziato una relazione tra la BCM7 e una reazione cutanea pseudo-allergica nei bambini. Da ulteriori analisi, è emersa una relazione più forte tra la reazione fenotipica e l' α -caseina per cui non sembra esserci correlazione con il peptide.

In ricerca, è stato dimostrato che peptidi delle caseine, ingeriti tramite gli alimenti, possono avere diversi effetti sul lume e sulla mucosa intestinale: i BCMs possono interagire con i sistemi oppioidi endogeni presenti nella parete gastrointestinale sia nei neonati sia negli adulti (EFSA 2009). Claustre et al. (2002) hanno dimostrato che i frammenti di β -casomorfina sono in grado di modulare la secrezione mucosa delle cellule produttrici. Inoltre, i frammenti di BCM sono in grado di prolungare il transito intestinale e modulare l'assorbimento di acqua ed elettroliti, esercitando un'azione antidiarroica.

Alcuni studi hanno cercato di correlare l'assunzione di BCMs con la sindrome della morte improvvisa del lattante (SIDS: sudden infant death syndrome): ciò si basa sull'assunzione che i peptidi bioattivi possono essere assorbiti nel tratto gastrointestinale e possono attraversare facilmente la barriera emato-encefalica in quanto immatura. Sulla base di questa teoria, gli autori ipotizzano che in soggetti con un controllo respiratorio anomalo e uno scorretto sviluppo del nervo vago, i peptidi oppioidi derivati dal latte, compreso BCM7, possono indurre una depressione dei centri respiratori del tronco encefalico, portando ad apnea e morte. Dato che, come detto sopra, i BCMs bovini risultano più potenti di quelli umani, il consumo del latte vaccino può aumentare il rischio di comparsa della

sindrome. Tuttavia, alcuni studiosi affermano che anche i lattanti alimentati con formule derivate da latte materno hanno un rischio simile di sviluppare la SIDS (Sun et al., 2003).

Limitatamente al BCM7, alcuni studiosi hanno teorizzato un'attività pro-aterogena di tale peptide, in quanto sarebbe in grado di promuovere o favorire la formazione di aterosclerosi (condizione caratterizzata dalla presenza di placche di grasso, colesterolo e altre sostanze sulle pareti delle arterie, che può portare a problemi cardiovascolari come infarto o ictus) (Allison and Clarke, 2006). Questo effetto si suppone sia mediato tramite la stimolazione dell'ossidazione delle lipoproteine LDL, essenziali per il trasporto di colesterolo e per il controllo del suo metabolismo (Torreilles and Guerin, 1995).

Al momento, non ci sono dati scientifici definitivi che collegano il consumo di β -caseina alle patologie cardio-vascolari nell'uomo. Ulteriori studi sono necessari per comprendere meglio la relazione tra le varianti di β -caseina e il rischio di malattie cardiovascolari.

Per quanto riguarda il diabete di tipo 1, un importante fattore di rischio per lo sviluppo della patologia è rappresentato dalla dieta, infatti, alcuni studi hanno trovato un'associazione tra tale malattia e un breve periodo di allattamento al seno, una precoce introduzione nella dieta di latte vaccino nei bambini o un consumo elevato di tale alimento (EFSA, 2009). Alcuni studi effettuati in vivo hanno cercato di provare una relazione causativa tra la β -caseina, introdotta tramite il latte vaccino, e il diabete; tuttavia, i risultati sono stati contrastanti (Scott et al., 1985; Elliot et al., 1988).

1.4.2 BCM7 e varianti A1 e A2

La sostituzione amminoacidica alla posizione 67, che definisce la variante A1 o A2 della β -caseina, è importante per la liberazione della BCM7. Il peptide è rilasciato più facilmente dalla variante A1 grazie all'azione differente degli enzimi gastrointestinali rispetto alla variante A2. Quest'ultima, in posizione 67 presenta una prolina e il legame è più resistente all'azione degli enzimi, rispetto al legame Ile⁶⁶-His⁶⁷ caratteristico della A1 (Jinsmaa and Yoshikawa 1999; De Noni 2008; Raies-Ul-Haq, Kapila, and Kapila 2015).

È importante sottolineare che il peptide in questione è rilasciato anche dalla variante A2 sia in ricerche effettuate in vitro sia in vivo, anche se in quantità inferiori rispetto alla variante A1 (Cieslinska et al. 2012; Asledottir et al. 2017; Duarte-Vazquez et al. 2017; Asledottir et al. 2018). A conferma di ciò, Asledottir et al. (2017) hanno dimostrato che la variante A1 è in grado di rilasciare 3 volte in più BCM7/g rispetto alla variante A2. Inoltre, è stato dimostrato che la liberazione del BAP dalla A2 β -caseina può avvenire anche attraverso idrolisi acida, e non solo enzimatica, nell'ambiente gastrico (Cieslinska et al. 2012).

Tailford e altri studiosi (2003) hanno investigato il ruolo della β -caseina A1 e A2 nello sviluppo di aterosclerosi attraverso una ricerca sperimentale, sfruttando come modello i conigli. Dopo aver causato una lesione endoteliale nell'arteria carotidea dei soggetti, hanno somministrato una dieta contenente un isolato di β -caseina A1 in un gruppo e A2 nell'altro; ad alcuni soggetti è stata somministrata una dieta con un contenuto di colesterolo pari allo 0,5%. Gli autori hanno riportato che, in assenza di colesterolo dietetico, la β -caseina A1 ha prodotto livelli significativamente più alti di colesterolo sierico, LDL, HDL e trigliceridi rispetto a una dieta basata solo sul siero di latte, che a sua volta ha prodotto livelli più alti rispetto alla β -caseina A2. Si è riscontrato che i conigli alimentati con β -caseina A1 presentavano una maggiore percentuale di superficie dell'aorta coperta da striature

adipose rispetto a quelli alimentati con β -caseina A2, e lo spessore delle lesioni aterosclerotiche nella volta aortica era significativamente maggiore. Dai loro risultati, gli autori hanno concluso che la β -caseina A1 era aterogena, mentre la β -caseina A2 no. Tuttavia, l'editore della rivista ha ridimensionato gli aspetti di tale ricerca, evidenziando il fatto che durante l'esperimento prevale un processo acuto di riparazione del tessuto aortico, differente dal processo fisiologico di aterosclerosi, inoltre, i conigli sono particolarmente sensibili al colesterolo (Mann and Skeaff, 2003). Date queste considerazioni, lo studio di Tailford non può essere considerato rilevante.

Alcuni studi epidemiologici, cioè che cercano di mettere in relazione diversi fattori, hanno collegato l'assunzione di β -caseina A1 alla mortalità per malattie cardiovascolari utilizzando una stima statistica del consumo pro capite di β -caseina A1 derivante dai prodotti lattiero-caseari. Le cifre calcolate per l'assunzione di β -caseina A1 sono state quindi correlate alla prevalenza delle malattie cardiovascolari nello stesso paese.

Un primo rapporto ipotizzava un'associazione tra l'assunzione stimata di proteine del latte (escludendo il formaggio) e i decessi per malattie coronariche (Seely, 1981). Successivamente, McLachlan (2001) ha suggerito una forte correlazione tra l'assunzione stimata pro capite di β -caseina A1 (escludendo le proteine del formaggio) e la mortalità per malattie ischemiche, suggerendo che "potrebbe esserci una stretta relazione tra il fumo, il consumo di β -caseina A1 e i decessi per malattie cardiovascolari e cancro ai polmoni".

Due studi effettuati sull'uomo sono stati condotti per esplorare la possibile relazione tra il consumo di β -caseina A1 e A2 e le malattie cardiovascolari (CVD). Nel primo studio, 15 soggetti hanno ricevuto β -caseina A1 o A2 per 12 settimane, ma non sono state trovate differenze significative nei test endoteliali e funzionali tra i due trattamenti (Chin-Dusting, 2006). Nel secondo studio, 62 soggetti hanno consumato prodotti lattiero-caseari contenenti β -caseina A1 o A2, e non è stata riscontrata evidenza che le varianti abbiano effetti differenziali sulle concentrazioni plasmatiche di colesterolo (Venn et al., 2006). Questi studi forniscono informazioni preliminari e le conclusioni sono limitate a causa delle dimensioni del campione e dei brevi periodi di intervento.

Diverse ricerche hanno cercato di correlare il consumo di β -caseina di tipo A1 e A2 e l'insorgenza di diabete di tipo 1. Si tratta, tuttavia, di studi epidemiologici, per cui facilmente influenzabili da fattori esterni. Elliot et al. (1999) hanno dimostrato che il consumo totale di proteine non era correlato all'incidenza del diabete, ma il consumo di β -caseina A1 da sola o in combinazione con la β -caseina B era correlato all'incidenza del diabete di tipo 1, teoria confermata anche da McLachlan (2001). A indebolire queste tesi è il fatto di aver considerato delle stime di assunzioni dei diversi polimorfismi della β -caseina già utilizzati in altri studi e, inoltre, l'insorgenza del diabete può essere causata anche da altri fattori esterni.

Diversi studi hanno cercato di provare questa relazione, tuttavia, nella letteratura considerata nel report EFSA (2009), non è stato possibile identificare alcun fattore specifico che possa essere considerato come causa del diabete di tipo 1. Inoltre, non sono emerse considerazioni meritevoli che possano mettere in relazione il consumo di latte vaccino con patologie non ereditarie. Infine, non vi sono evidenze significative che supportino il consumo di latte con β -caseina di tipo A2 rispetto a quella di tipo A1 (EFSA, 2009).

2 SCOPO

Le varianti genetiche delle proteine del latte sono state ampiamente analizzate per evidenziare eventuali differenze presenti che possono influenzare le proprietà tecnologiche dell'alimento.

Recentemente, si è aperto un dibattito sul polimorfismo caratteristico della β -caseina, con particolare attenzione rivolta alle varianti A1 e A2. Ciò è dovuto al fatto che alcuni studi hanno dimostrato che la variante A1, durante la digestione, porta alla formazione di un peptide bioattivo con azione oppioide (BCM7) in quantità superiore rispetto alla variante A2 (Asledottir et al., 2018).

Questi aspetti, ancora oggetto di ricerca, hanno spinto le associazioni e gli allevatori a selezionare bovini che non sintetizzino latte di tipo A1, senza però considerare i possibili effetti sulle caratteristiche tecnologiche dell'alimento (Cecchinato, 2021).

Recenti studi, inoltre, hanno evidenziato una correlazione positiva tra il contenuto di calcio, fosforo e magnesio all'interno della micella di caseina e l'attitudine del latte alla coagulazione presamica, fondamentale per il processo di caseificazione.

Questa ricerca si pone come obiettivo lo studio dell'effetto delle varianti genetiche A1 e A2 della β -caseina sul contenuto e sulla distribuzione dei macroelementi calcio, fosforo e magnesio nel latte bovino, al fine di evidenziare eventuali differenze che potrebbero interferire con le caratteristiche di trasformazione del latte.

3 MATERIALI E METODI

L'Università di Parma ha ricevuto il compito di determinare il contenuto e la distribuzione dei principali minerali del latte (Ca, P, Mg, Na, K e Cl) all'interno del progetto FARM-INN. In questo scritto, sono riportati il contenuto e la distribuzione rispettivamente di calcio, fosforo e magnesio.

3.1 Criteri di scelta dei soggetti sperimentali

L'analisi è stata condotta nell'azienda agricola sperimentale *Carpaneta*, in provincia di Mantova. I soggetti scelti sono vacche di razza Frisona Italiana, in lattazione, divisi in tre gruppi in base ai genotipi ricercati. Sono state prese in considerazione vacche che non mostrassero segni di mastiti clinica o subclinica.

- La valutazione della presenza di mastiti clinica è stata effettuata osservando l'eventuale presenza di alterazioni visibili del secreto mammario e della ghiandola mammaria nelle mungiture precedenti l'inizio della prova sperimentale.
- La presenza di mastiti subcliniche è stata effettuata analizzando i valori delle cellule somatiche del latte di ciascuna vacca, rilevati nel controllo funzionale effettuato prima dell'inizio della prova sperimentale. In particolare, le vacche con cellule somatiche superiori alle 200'000 unità/ml sono state escluse dalla selezione.

Dato che la ricerca si concentra sullo studio delle varianti A1 e A2 della β -caseina, sono state scelte le bovine che presentassero i genotipi A1A1, A1A2 e A2A2.

Per l'identificazione è stata utilizzata la tecnica di *isoelettrofocusing* (IEF), tramite cui sono state evidenziate le varianti di β -caseina A1, A2, A3, B e C. La tecnica dell'isoelettrofocalizzazione (IEF) è un metodo utilizzato nello studio genotipico e proteomico per separare elettroforeticamente le proteine o i peptidi in base al loro punto isoelettrico (pI). L'IEF sfrutta un gradiente di pH lungo una matrice gel o un supporto in cui si trovano le proteine. Quando viene applicato un campo elettrico, le proteine migrano verso il punto in cui il pH corrisponde al loro pI, dove raggiungono la loro carica netta neutra e si fermano; in base al percorso seguito, può avvenire il riconoscimento. Nello studio genotipico, l'IEF può essere utilizzato per analizzare varianti genetiche che influenzano il punto isoelettrico delle proteine.

Questo primo approccio ha permesso di identificare gli individui portatori del genotipo A1A1, che presenta una frequenza del 9% nella razza Frisona italiana.

Per selezionare gli individui portatori del genotipo A2A2 (la cui frequenza è di circa il 28% nella razza Frisona italiana) è stata necessaria un'ulteriore caratterizzazione molecolare per distinguere l'allele A2 dall'allele I, non identificabile con la tecnica IEF. Pertanto, in aggiunta alla caratterizzazione del latte si è effettuato il sequenziamento dell'esone 7 del gene della β -caseina utilizzando il DNA estratto da campioni di sangue di tutti gli animali. È stato possibile identificare gli animali con i genotipi II (la cui frequenza è meno dell'1% nella razza Frisona italiana) e A2I (la cui frequenza è di circa il 3% nella razza Frisona italiana).

Tabella 3 Suddivisione dei soggetti nei gruppi in base al genotipo rilevato

<i>Genotipi</i>	<i>A1A1</i>	<i>A1A2</i>	<i>A2A2</i>	<i>Altri genotipi</i>
<i>n° individui</i>	8 (23)*	75	75	27

Dato che i soggetti non in lattazione, con sintomi clinici e con alte cellule somatiche sono stati rimossi dalla ricerca, il gruppo con genotipo A1A1 è passato da 23 campioni iniziali a 8 totali, come si può vedere in tabella.

Sono stati formati tre gruppi (gruppo A1A1, gruppo A1A2, gruppo A2A2) considerando i parametri fisiologici delle bovine: giorni di distanza dal parto, numero di lattazioni e produzione giornaliera di latte rilevata al controllo funzionale precedente l'inizio della prova. Il progetto FARM-INN richiedeva che i gruppi fossero composti da almeno 9 soggetti, ciò è stato rispettato per i genotipi A1A2 e A2A2, ma non per A1A1. I gruppi A1A2 e A2A2 erano composti di 10 vacche ciascuno in entrambe le prove.

3.2 Campionamento

Per l'analisi, sono state effettuate due prove sperimentali: una in inverno (marzo 2019) e una in estate (luglio 2019). Dato il tempo trascorso fra le due analisi, alcune bovine sono state sostituite, in quanto avevano terminato la lattazione o avevano sviluppato patologie, come mastiti.

Il gruppo con genotipo A1A1, nella prova estiva, è stato ridotto a sette soggetti. I gruppi A1A2 e A2A2 erano composti di 10 vacche ciascuno in entrambe le prove

I valori medi di giorni di distanza dal parto, numero di lattazioni e produzione giornaliera dei tre gruppi sono riportati in tabella (Tabella 4).

Tabella 4 Suddivisione dei gruppi nelle due stagioni in base a: giorni di distanza dal parto, numero di lattazioni, produzione di latte

Gruppo	Prova invernale				Prova estiva			
	n.	Giorni di distanza dal parto	N° di lattazioni	Produzione latte, kg/d	n.	Giorni di distanza dal parto	Numero di lattazioni	Produzione latte, kg/d
A1A1	8	161	3	33	7	146	3	43
A1A2	10	216	2	31	10	165	2	40
A2A2	10	180	2	34	10	200	2	41

Le vacche sono state lasciate in gruppo per evitare un periodo di adattamento, che altrimenti sarebbe stato necessario per permettere la formazione di nuove gerarchie sociali. Solo al momento della mungitura sono state divise per raccogliere i campioni di latte in modo che fosse presente in sala un solo gruppo per volta. I soggetti dell'esperimento sono stati munti sempre per primi alla mattina, e le restanti bovine della stalla sono state munte successivamente.

Nel primo giorno di ciascuna prova sperimentale si è proceduto alla raccolta di un campione di latte individuale da ciascuna vacca dei tre gruppi, durante la mungitura della mattina.

Per ogni vacca, è stato raccolto un campione di circa 1 litro di latte rappresentativo dell'intera mungitura. In ciascuno dei sei giorni successivi (dal giorno 2 al giorno 7 della sperimentazione) è stato raccolto un campione di latte di massa da ciascuno dei tre gruppi, sempre durante la mungitura della mattina, conservato in bidoni appositi per mantenere i campioni separati.

3.3 Analisi effettuate

Di seguito, sono descritti i metodi di determinazione di calcio, fosforo e magnesio nei campioni di latte di massa e individuali, raccolti nel corso delle due prove sperimentali. Per il calcolo dei contenuti totali dei 3 minerali, le analisi sono state condotte sul latte tal quale. La frazione solubile di ciascuno dei 3 minerali è stata determinata sui sieri ultrafiltrati ottenuti mediante ultrafiltrazione del latte (cut-off membrana 30'000 D) con celletta AMICON 8200. Il contenuto delle frazioni colloidali è stato calcolato per differenza tra totale e solubile. Il contenuto di caseina è stato determinato da un'altra unità operativa del progetto FARM-INN, per mezzo di spettroscopia IR.

3.3.1 Determinazione del calcio con metodo per assorbimento atomico

Principio del metodo

Il campione è incenerito e le ceneri riprese con HCl concentrato. Si aggiunge una soluzione di cloruro di lantanio (LaCl_3) e si diluisce con acqua. Il contenuto di Ca nella soluzione risultante è determinato per assorbimento atomico a 422,7 nm.

Campo di applicazione

Latte e prodotti a base di latte.

Procedura

Si pesano 5 g di latte, con un errore accettabile di $\pm 0,001$ g, in una capsula di quarzo.

Il campione deve essere essiccato in stufa a $102\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ e trasferito in una muffola dotata di sistema di programmazione della temperatura. Si imposta un programma che varia dalla temperatura ambiente a quella finale di $500\text{ }^\circ\text{C}$, alla velocità di $50\text{ }^\circ\text{C/h}$. La temperatura deve essere mantenuta per 3 h.

Se dopo questo trattamento, le ceneri non sono bianche, si procede addizionando 0,5 ml di acqua e 3 gocce di acido nitrico concentrato (HNO_3).

Si fa evaporare l'acqua residua su becco Bunsen e il campione deve essere nuovamente trasferito in muffola a $500\text{ }^\circ\text{C}$ per 30 minuti.

Al termine è necessario aggiungere 0,5 ml di HCl concentrato, 0,5 ml di acqua per riprendere le ceneri e trasferirle in un matraccio tarato da 100 ml, dove è necessario portare a volume con acqua.

Si prelevano 5 ml dalla soluzione precedente e si pongono in un matraccio tarato da 50 ml, si aggiungono 2 ml di cloruro di lantanio al 5% p/p e si porta a volume con acqua.

Si mette in funzione lo spettrometro di assorbimento atomico, si seleziona la lunghezza d'onda di 422,7 nm e si accende la fiamma nel bruciatore.

In cinque matracci da 100 ml, trasferire 0,0 (solo acqua), 0,2, 0,5, 0,8, 1, 2 ml di una soluzione di calcio a concentrazione di 100 mg/l e portare a volume. Le cinque soluzioni preparate, a concentrazione nota, corrispondono alle letture da eseguire per ottenere la retta di taratura.

Si misura la soluzione campione, ripetendo la lettura almeno quattro volte, e si ottiene il valore ricercato (Tateo et al., 1992).

3.3.2 Determinazione del tenore di fosforo

Principio del metodo

Il campione è incenerito e il P è determinato colorimetricamente mediante la riduzione del fosfomolibdato di ammonio con il diaminofenolo (amidolo), misurando l'assorbanza della soluzione ottenuta.

Procedura

Il campione deve essere a una temperatura di $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ e deve essere mescolato. Nel caso in cui non dovesse avvenire una dispersione omogenea della materia grassa, deve essere scaldato fino a 40 °C , agitato delicatamente e, successivamente, raffreddato a $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.

In una capsula di quarzo, si pesano 10 g di latte $\pm 10\text{ mg}$ e si fa evaporare a secco, con bagnomaria bollente.

Dopo l'essiccazione completa, il campione si calcina nel forno a muffola ad una temperatura compresa tra 500 °C e 550 °C , fino ad ottenere le ceneri bianche.

Si fa raffreddare il campione in capsula, si copre con un vetrino da orologio, si sciolgono le ceneri in 2-3 ml di acido cloridrico (HCl) 1 N e si diluisce con acqua distillata.

Si trasferisce la soluzione di ceneri in un matraccio di 100 ml, si lavano il vetrino da orologio e la capsula e si raccolgono i liquidi nel matraccio.

Si porta a volume con acqua distillata, si agita e si filtra.

Si prelevano 10 ml del filtrato e si introducono in un matraccio da 100 ml. Si porta a volume con acqua distillata e si agita.

Si prelevano 5 ml della soluzione, si introducono in un matraccio tarato da 25 ml.

Si aggiungono: 2 ml di acido perclorico (HClO_4) al 65%, 2 ml di soluzione di amidolo, 2 ml di soluzione di molibdato di ammonio. Si porta a volume con acqua distillata e si mescola.

Si attendono 25 minuti e si misura l'assorbanza utilizzando una cella da 10 mm alla lunghezza d'onda di 750 nm.

Si prepara la curva di calibrazione e con opportuni calcoli, si ottiene la quantità di fosforo contenuta nel matraccio da 25 ml, corrispondente all'assorbanza letta, la quale è espressa in μg (Balestrieri e Marini, 1996).

3.3.3 Determinazione del magnesio con metodo per assorbimento atomico

Principio del metodo

Il campione è incenerito e le ceneri riprese con HCl concentrato. Si aggiunge una soluzione di cloruro di lantanio (LaCl_3) e si diluisce con acqua. Il contenuto di Mg nella soluzione risultante è determinato per assorbimento atomico a 285,2 nm.

Procedura

Il processo è identico a quello per la determinazione del calcio con metodo per assorbimento atomico. Tuttavia, le letture devono essere effettuate a lunghezza d'onda di 285,2 nm.

La retta di taratura è preparata a partire da una soluzione di magnesio a concentrazione di 100 mg/l (Tateo et al., 1992).

3.4 Analisi statistica

I dati raccolti sono stati analizzati per mezzo di analisi della varianza univariata, utilizzando un modello fattoriale completo che aveva come fattori fissi il genotipo (3 livelli: A1A1, A1A2, A2A2) e il periodo di campionamento (2 livelli: marzo e luglio). Inoltre, per l'analisi della variazione della concentrazione di Ca e P all'interno della micella di caseina nel corso della lattazione, è stato utilizzato un secondo modello in cui sono stati considerati come fattori fissi il periodo di campionamento (2 livelli: marzo e luglio) e il periodo di lattazione (3 livelli: 0-100 giorni di distanza dal parto, 101-200 giorni, oltre 200 giorni).

4 RISULTATI

Le tabelle seguenti raggruppano i dati ottenuti dalle analisi effettuate sui campioni di latte individuale e di massa, raccolti nelle prove di marzo e di luglio, dei tre diversi genotipi analizzati. Occorre premettere che non sono state osservate differenze statisticamente significative tra i tre genotipi per nessuno dei parametri qui riportati, sia a livello di latte individuale, sia di massa, in nessuno dei due periodi di campionamento. Al contrario, la stagione ha esercitato un effetto statisticamente significativo su tutti i parametri analizzati, sia a livello di latte individuale, sia di massa.

Partiamo dall'analisi dei valori registrati nella prima tabella (Tabella 5), che si riferisce al latte individuale.

Confrontando i dati delle mungiture di marzo dei tre genotipi, emerge che il calcio totale è compreso in un range che varia da 113,12 a 114,09 mg/100 g; mentre nella stagione estiva si rileva un aumento del quantitativo, che raggiunge un valore di 117,56 mg/ 100 g, aumento che si denota maggiormente nel genotipo A1A2.

Il valore del calcio colloidale è stabile nei tre genotipi, con una leggera diminuzione del contenuto nella stagione estiva nei genotipi A1A2 e A2A2.

Durante il campionamento di marzo, il fosforo totale rilevato è coerente fra i tre genotipi, con un intervallo che varia da 89,72 a 90,80 mg/100 g. Nella stagione estiva, si evidenzia un quantitativo totale di fosforo superiore rispetto all'inverno ($91,96 \pm 92,84$; $P < 0,05$).

Il fosfato colloidale ha un range di variabilità da 47,84 a 49,77 mg/100 g; per i genotipi A1A1 e A1A2 si riscontrano valori più alti in inverno, rispetto all'estate.

Il fosfato colloidale inorganico risulta più stabile nel genotipo A1A1, mentre le misurazioni più alte e più basse sono rilevate nel genotipo A1A2 ($28,96 \pm 3,10$). Questo presenta valori superiori in inverno; mentre durante l'estate, il quantitativo si riduce.

Il fosforo legato alle caseine è quello che presenta minore variabilità, sia all'interno dei genotipi, sia fra i genotipi ($0,52 < DS < 0,81$); i valori sono più alti durante la stagione estiva, tranne che per il genotipo A1A1, dove il valore medio registrato è inferiore.

Analizzando il contenuto di magnesio totale, i valori non discostano in maniera rilevante fra i vari genotipi o con il cambiamento della stagione. Stesso andamento si può notare con il magnesio colloidale.

Tabella 5 Composizione dei campioni di latte individuale nelle due diverse rilevazioni, in base al genotipo

	<i>Prova marzo</i>							<i>Prova luglio</i>					
	A1A1		A1A2		A2A2			A1A1		A1A2		A2A2	
	n. 8		n. 10		n. 10			n. 7		n. 9		n. 10	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	
<i>Sostanza Secca</i>	g/100g	11,61	1,73	10,81	0,74	10,79	1,24	11,83	1,25	11,42	0,75	12,11	1,30
<i>Ceneri</i>	g/100g	0,71	0,02	0,73	0,03	0,72	0,01	0,74	0,03	0,74	0,02	0,74	0,03
<i>Ca totale (tot)</i>	mg/100g	113,14	4,36	113,12	3,55	114,09	3,74	114,83	4,18	117,57	3,21	117,56	2,82
<i>Ca colloidale (coll)</i>	mg/100g	85,10	1,08	85,90	2,12	86,59	3,63	85,66	0,80	84,76	1,12	84,72	1,42
<i>P tot</i>	mg/100g	90,22	2,69	89,72	2,49	90,80	2,47	91,26	2,62	93,08	2,50	92,84	1,97
<i>P coll</i>	mg/100g	48,61	1,49	49,77	2,84	47,84	2,99	47,10	2,26	47,42	1,08	46,87	1,64
<i>P coll Inorganico (in)</i>	mg/100g	27,69	1,23	28,96	3,10	26,90	3,20	26,36	1,36	25,87	1,05	25,68	1,19
<i>P caseina (cas)</i>	mg/100g	20,92	0,52	20,81	0,81	20,94	0,78	20,74	1,02	21,55	0,88	21,19	0,90
<i>Mg tot</i>	mg/100g	10,39	0,74	10,30	0,45	10,54	0,81	10,56	0,51	10,56	0,37	10,62	0,36
<i>Mg coll</i>	mg/100g	2,59	0,24	2,53	0,10	2,59	0,17	2,60	0,09	2,63	0,13	2,62	0,12
<i>Na</i>	mg/100g	49,71	0,35	50,25	0,68	50,28	6,38	56,36	8,18	53,20	3,51	52,48	0,60
<i>K</i>	mg/100g	161,98	1,30	161,14	4,41	161,27	4,41	157,41	7,26	161,63	3,25	162,91	2,85
<i>Cloruri</i>	mg/100g	94,26	1,01	94,85	2,51	94,69	1,56	98,93	6,47	95,87	3,00	94,17	2,21
<i>Ca coll/Cas</i>	g/100g	3,48	0,24	3,69	0,33	3,54	0,30	3,36	0,44	3,13	0,27	3,12	0,29
<i>P coll/Cas</i>	g/100g	1,99	0,18	2,15	0,32	1,97	0,30	1,84	0,23	1,75	0,16	1,73	0,19
<i>P coll in/Cas</i>	g/100g	1,13	0,12	1,26	0,25	1,11	0,23	1,03	0,13	0,96	0,11	0,95	0,11
<i>P collCas/Cas</i>	g/100g	0,85	0,07	0,89	0,08	0,86	0,08	0,81	0,10	0,79	0,05	0,78	0,08
<i>Mg coll/Cas</i>	g/100g	0,11	0,00	0,11	0,01	0,11	0,01	0,10	0,01	0,10	0,00	0,10	0,01

Per quanto riguarda l'analisi dei dati provenienti dal latte di massa (Tabella 6), i valori sono tendenzialmente simili a quelli già analizzati per il latte individuale.

Il calcio totale risulta leggermente inferiore rispetto a quello descritto prima, sia nella mungitura invernale sia in quella estiva, con un aumento nella rilevazione di luglio.

Il calcio colloidale segue l'andamento del calcio totale, evidenziando un aumento del quantitativo nella stagione estiva.

Riguardo al fosfato totale presente, tutti e tre i genotipi mostrano un aumento nel periodo estivo.

Il fosforo colloidale è presente in concentrazione maggiore nel latte di tipo A1A2, in entrambe le misurazioni, e si osserva un leggero aumento in tutti i genotipi durante la stagione invernale.

Stesso andamento si osserva per il fosfato colloidale inorganico.

Il fosforo caseinico è presente con valori stabili fra i genotipi e fra le due rilevazioni.

Il magnesio totale è costante fra i vari genotipi e nelle diverse stagioni. Il magnesio colloidale segue l'andamento del quantitativo totale.

Relativamente al latte di massa, si possono prendere in considerazione gli ultimi parametri espressi in tabella (Tabella 6) riguardo la concentrazione dei minerali e la composizione della micella di caseina.

Per quanto riguarda la concentrazione di calcio colloidale, fosfato colloidale, fosfato colloidale inorganico, per tutti e tre i genotipi, si osserva una concentrazione maggiore in marzo rispetto alla rilevazione estiva, con il genotipo A1A1 che presenta valori più alti rispetto agli altri due.

Limitatamente al fosfato colloidale caseinico, la concentrazione è maggiore in marzo per tutti e tre i polimorfismi; mentre fra di loro, le concentrazioni presentano valori più simili rispetto agli altri parametri.

Il magnesio colloidale risulta stabile sia fra i diversi genotipi, sia con il cambiamento di stagione.

Tabella 6 Composizione dei campioni di latte di massa nelle diverse rilevazioni, in base al genotipo

	<i>Prova marzo</i>						<i>Prova luglio</i>						
	A1A1		A1A2		A2A2		A1A1		A1A2		A2A2		
	n. 6		n. 6		n. 6		n. 6		n. 6		n. 6		
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	
<i>Sostanza Secca</i>	g/100g	11,43	0,46	11,15	0,74	11,51	0,34	11,94	0,60	12,57	0,21	12,19	0,43
<i>Ceneri</i>	g/100g	0,70	0,02	0,70	0,03	0,71	0,01	0,74	0,02	0,74	0,01	0,74	0,00
<i>Ca totale (tot)</i>	mg/100g	110,64	0,46	111,29	1,00	111,87	0,96	115,00	1,05	114,01	0,56	116,15	0,69
<i>Ca colloidale (coll)</i>	mg/100g	86,18	1,52	85,04	2,07	86,38	0,68	83,69	0,66	85,28	0,64	88,53	1,01
<i>P tot</i>	mg/100g	87,06	0,84	88,60	1,34	88,58	0,77	90,50	0,34	93,48	0,17	91,97	0,36
<i>P coll</i>	mg/100g	47,06	0,93	48,48	0,78	47,86	0,52	45,58	0,65	47,72	0,27	45,85	0,42
<i>P coll Inorganico (in)</i>	mg/100g	27,30	1,04	27,92	0,70	27,49	0,85	26,25	0,84	26,71	0,72	25,14	0,60
<i>P caseina (cas)</i>	mg/100g	19,76	0,41	20,56	0,34	20,37	0,38	19,33	0,67	21,01	0,67	20,71	0,65
<i>Mg tot</i>	mg/100g	9,96	0,10	10,12	0,16	10,17	0,18	10,75	0,08	10,57	0,07	10,57	0,07
<i>Mg coll</i>	mg/100g	2,44	0,06	2,51	0,03	2,54	0,06	2,66	0,04	2,59	0,06	2,61	0,03
<i>Na</i>	mg/100g	50,22	0,71	51,23	1,24	50,05	0,46	51,80	1,00	52,62	1,87	50,17	1,06
<i>K</i>	mg/100g	161,68	2,58	163,38	1,44	161,72	0,55	162,50	0,80	162,75	0,94	161,92	1,17
<i>Cloruri</i>	mg/100g	92,54	1,44	94,41	1,56	93,59	1,70	95,31	1,77	96,83	3,56	94,37	1,14
<i>Ca coll/Cas</i>	g/100g	3,72	0,08	3,52	0,15	3,52	0,08	3,34	0,03	3,14	0,02	3,33	0,03
<i>P coll/Cas</i>	g/100g	2,03	0,06	2,01	0,10	1,95	0,07	1,82	0,03	1,76	0,01	1,72	0,02
<i>P coll in/Cas</i>	g/100g	1,18	0,06	1,16	0,07	1,12	0,06	1,05	0,03	0,98	0,03	0,95	0,02
<i>P collCas/Cas</i>	g/100g	0,85	0,01	0,85	0,03	0,83	0,02	0,77	0,03	0,77	0,02	0,78	0,02
<i>Mg coll/Cas</i>	g/100g	0,11	0,00	0,10	0,01	0,10	0,00	0,11	0,00	0,10	0,00	0,10	0,00

Oltre alle differenze tra i tre genotipi, i dati raccolti hanno permesso di studiare la variazione della concentrazione di minerali all'interno della micella di caseina - Ca, P e Mg colloidali per 100 g di caseina – nel corso della lattazione. Questi valori esprimono, in modo grossolano, il grado di mineralizzazione micella.

Nel corso della lattazione è stata osservata una progressiva diminuzione ($P < 0,05$) della concentrazione di Ca, P e Mg all'interno della micella di caseina (Tabella 7). Per quanto riguarda il P micellare, il calo della sua concentrazione all'interno della micella ha riguardato entrambe le frazioni che lo compongono: il P inorganico (costituente del fosfato di calcio colloidale) e quello della caseina (sotto forma di amminoacidi fosforilati delle caseine). Si tratta di un'informazione preliminare, che necessita di ulteriori approfondimenti, sia ampliando il numero di campioni e delle informazioni/parametri su di essi, sia utilizzando modelli statistici più raffinati.

Tabella 7 Concentrazione di Ca, P, Mg colloidali in 100 g di caseina in funzione dei giorni di lattazione

Giorni di lattazione	≥100		101-200		≥ 200		P	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS		
<i>Ca colloidale/Caseina</i>	g/100g	3,82	0,26	3,35	0,39	3,22	0,26	<0,05
<i>P Colloidale/Caseina</i>	g/100g	2,18	0,27	1,92	0,29	1,77	0,19	<0,05
<i>P Colloidale inorganico/Caseina</i>	g/100g	1,26	0,22	1,07	0,21	0,99	0,13	<0,05
<i>P Caseina/Caseina</i>	g/100g	0,92	0,07	0,84	0,09	0,79	0,06	<0,05
<i>Mg Colloidale/Caseina</i>	g/100g	0,11	0,01	0,10	0,01	0,10	0,01	<0,05

← **Formattato:** Allineato al centro, Posizione: Verticale: 3,76 cm, Rispetto a: Pg

← **Formattato:** Allineato al centro, Posizione: Verticale: 3,76 cm, Rispetto a: Pg

← **Formattato:** Allineato al centro, Posizione: Verticale: 3,76 cm, Rispetto a: Pg

← **Formattato:** Allineato al centro, Posizione: Verticale: 3,76 cm, Rispetto a: Pg

← **Formattato:** Allineato al centro, Posizione: Verticale: 3,76 cm, Rispetto a: Pg

← **Formattato:** Allineato al centro, Posizione: Verticale: 3,76 cm, Rispetto a: Pg

← **Formattato:** Allineato al centro, Posizione: Verticale: 3,76 cm, Rispetto a: Pg

4.1 Criticità delle analisi

È importante evidenziare che il campione analizzato è di pochi soggetti, per di più non sono stati mantenuti stabili durante le due diverse rilevazioni stagionali. Di fatti, alcune vacche sono state sostituite fra la prima e la seconda prova, per motivi sanitari o perché avevano terminato la lattazione.

La lattazione, nelle diverse analisi, si è presentata a stadi successivi: alcune l'hanno terminata prima della fine dell'esame sperimentale, per cui i dati raccolti possono essere stati influenzati dalle diverse caratteristiche del latte dovute alla durata della lattazione stessa. Di fatti, la concentrazione minerale varia in base ai giorni di lattazione: il calcio è più alto nel colostro e nel latte degli ultimi giorni (Gaucheron, 2005).

Per quanto riguarda le analisi, il latte individuale è stato raccolto per ogni soggetto una sola volta a marzo e una sola volta a luglio per facilitare le operazioni. È più significativo considerare i valori ricavati dal latte di massa, in quanto è stato raccolto per 6 giorni consecutivi (II-VII giorno) in marzo, e per altrettanti in luglio, ed è stato ridotto il fattore di variabilità individuale.

Terminate queste considerazioni, è necessario affermare che le differenze evidenziate sopra sono insignificanti, non presentano caratteristiche comuni o riproducibili nelle varie analisi effettuate e i valori si discostano fra di loro per quantitativi non statisticamente significativi.

5 CONCLUSIONI

Per quanto riguarda i risultati riguardanti l'obiettivo della tesi, non sono state osservate differenze significative tra i tre genotipi e il contenuto e la distribuzione dei minerali considerati, né nel latte di massa, né nel latte individuale.

Da queste considerazioni, dal punto di vista della composizione minerale della micella di caseina, non si rende opportuno evidenziare differenze che potrebbero influenzare gli obiettivi di selezione genetica degli animali a favore di un genotipo piuttosto che un altro.

Per quanto riguarda il contenuto di Ca, P e Mg nella micella di caseina, i risultati mostrati in tabella hanno evidenziato una diminuzione di tutte le frazioni con l'avanzare dei giorni di lattazione. Ciò ha potenziali ripercussioni sotto il profilo nutrizionale e quello tecnologico-caseario. Sotto il profilo nutrizionale, le micelle meno mineralizzate sono più digeribili, pertanto il latte diventa più digeribile col procedere della lattazione. Dal punto di vista tecnologico-caseario, la diminuzione della concentrazione di minerali nella micella potrebbe, almeno in parte, spiegare il peggioramento delle caratteristiche di coagulazione del latte che si osserva a fine lattazione, malgrado si noti un contestuale aumento della concentrazione di caseina.

6 RINGRAZIAMENTI

Per lo sviluppo di questa tesi si ringrazia il Progetto *Ager* (Agroalimentare e ricerca), il quale ha dato la possibilità di sviluppare il progetto dal titolo “Farm-level interventions supporting dairy industry innovation (FARM-INN)”, in cui rientra questa tesi, svolta presso l’Università degli Studi di Parma.

BIBLIOGRAFIA

- Alais, C. (2000). *Scienza del latte*. Tecniche nuove.
- Allison, A. J., & Clarke, A. J. (2006). Further research for consideration in 'the A2 milk case'. *European journal of clinical nutrition*, 60(7), 921-924.
- Amalfitano, N., Cipolat-Gotet, C., Cecchinato, A., Malacarne, M., Summer, A., & Bittante, G. (2019). Milk protein fractions strongly affect the patterns of coagulation, curd firming, and syneresis. *Journal of dairy science*, 102(4), 2903-2917.
- Amalfitano, N., Stocco, G., Maurmayr, A., Pegolo, S., Cecchinato, A., & Bittante, G. (2020). Quantitative and qualitative detailed milk protein profiles of 6 cattle breeds: Sources of variation and contribution of protein genetic variants. *Journal of dairy science*, 103(12), 11190-11208.
- Asledottir, T. (2016). *Ex vivo digestion of bovine milk with genetic variants A1 and A2 of beta-casein and identification of bioactive peptides* (Master's thesis, Norwegian University of Life Sciences, Ås)
- Asledottir, T., Le, T. T., Petrat-Melin, B., Devold, T. G., Larsen, L. B., & Vegarud, G. E. (2017). Identification of bioactive peptides and quantification of β -casomorphin-7 from bovine β -casein A1, A2 and I after ex vivo gastrointestinal digestion. *International Dairy Journal*, 71, 98-106.
- Asledottir, T., Le, T. T., Poulsen, N. A., Devold, T. G., Larsen, L. B., & Vegarud, G. E. (2018). Release of β -casomorphin-7 from bovine milk of different β -casein variants after ex vivo gastrointestinal digestion. *International dairy journal*, 81, 8-11.
- Asledottir, T., Picariello, G., Mamone, G., Ferranti, P., Røseth, A., Devold, T. G., & Vegarud, G. E. (2019). Degradation of β -casomorphin-7 through in vitro gastrointestinal and jejunal brush border membrane digestion. *Journal of dairy science*, 102(10), 8622-8629.
- Baldi, A., Ioannis, P., Chiara, P., Eleonora, F., & Roubini, C. (2005). Biological effects of milk proteins and their peptides with emphasis on those related to the gastrointestinal ecosystem. *Journal of Dairy Research*, 72(S1), 66-72.
- Balestrieri, F. & Marini, D. (1996). *Metodi di analisi chimica dei prodotti alimentari* (Vol. 2). Monolite
- Bech, A. M., & Kristiansen, K. R. (1990). Milk protein polymorphism in Danish dairy cattle and the influence of genetic variants on milk yield. *Journal of Dairy Research*, 57(1), 53-62.
- Bijl, E., van Valenberg, H., Sikkes, S., Jumelet, S., Sala, G., Olieman, K., ... & Huppertz, T. (2014). Chymosin-induced hydrolysis of caseins: Influence of degree of phosphorylation of alpha-s1-casein and genetic variants of beta-casein. *International Dairy Journal*, 39(2), 215-221.
- Bisutti, Vittoria & Pegolo, Sara & Giannuzzi, Diana & Mota, Lucio & Vanzin, Alice & Toscano, Alessandro & Trevisi, Erminio & Ajmone-Marsan, Paolo & Brasca, Milena & Cecchinato, Alessio. (2022). The β -casein (CSN2) A2 allelic variant alters milk protein profile and slightly

- worsens coagulation properties in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 105. 10.3168/jds.2021-21537.
- Boutrou, R., Henry, G., & Sanchez-Rivera, L. (2015). On the trail of milk bioactive peptides in human and animal intestinal tracts during digestion: A review. *Dairy science & technology*, 95, 815-829.
- Brandsch, M., Brust, P., Neubert, K., & Ermisch, A. (1994). β -Casomorphins—chemical signals of intestinal transport systems. In *β -Casomorphins and related peptides: Recent developments* (pp. 207-219). VCH, Weinheim.
- Brantl, V., Teschemacher, H., Bläsing, J., Henschen, A., & Lottspeich, F. (1981). Opioid activities of β -casomorphins. *Life Sciences*, 28(17), 1903-1909.
- Brooke-Taylor, S., Dwyer, K., Woodford, K., & Kost, N. (2017). Systematic review of the gastrointestinal effects of A1 compared with A2 β -casein. *Advances in nutrition*, 8(5), 739-748.
- Cattaneo, S., Stuknytė, M., Masotti, F., & De Noni, I. (2017). Protein breakdown and release of β -casomorphins during in vitro gastro-intestinal digestion of sterilised model systems of liquid infant formula. *Food chemistry*, 217, 476-482.
- Cattaneo, Stefano & Masotti, Fabio & Stuknyte, Milda & Noni, Ivano. (2022). Impact of in vitro static digestion method on the release of β -casomorphin-7 from bovine milk and cheeses with A1 or A2 β -casein phenotypes. *Food Chemistry*. 404. 134617. 10.1016/j.foodchem.2022.134617.
- Chin-Dusting, J., Shennan, J., Jones, E., Williams, C., Kingwell, B., & Dart, A. (2006). Effect of dietary supplementation with β casein A1 or A2 on markers of disease development in individuals at high risk of cardiovascular disease. *British Journal of Nutrition*, 95(1), 136-144.
- Cieślińska, A., Fiedorowicz, E., Rozmus, D., Sienkiewicz-Szłapka, E., Jarmołowska, B., & Kamiński, S. (2022). Does a Little Difference Make a Big Difference? Bovine β -Casein A1 and A2 Variants and Human Health—An Update. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24), 15637.
- Cieślińska, A., Kamiński, S., Kostyra, E., & Sienkiewicz-Szłapka, E. (2007). Beta-casomorphin 7 in raw and hydrolyzed milk derived from cows of alternative β -casein genotypes. *Milchwissenschaft*, 62(2), 125-127.
- Cieślińska, A., Kostyra, E., Kostyra, H., Oleński, K., Fiedorowicz, E., & Kamiński, S. (2012). Milk from cows of different β -casein genotypes as a source of β -casomorphin-7. *International journal of food sciences and nutrition*, 63(4), 426-430.
- Cieślińska, A., Sienkiewicz-Szłapka, E., Wasilewska, J., Fiedorowicz, E., Chwała, B., Moszyńska-Dumara, M., ... & Kostyra, E. (2015). Influence of candidate polymorphisms on the dipeptidyl peptidase IV and μ -opioid receptor genes expression in aspect of the β -casomorphin-7 modulation functions in autism. *Peptides*, 65, 6-11.
- Cieślińska, Anna & Fiedorowicz, Ewa & Zwierzchowski, Grzegorz & Kordulewska, Natalia & Jarmołowska, Beata & Kostyra, Elżbieta. (2019). Genetic Polymorphism of β -Casein Gene in Polish Red Cattle—Preliminary Study of A1 and A2 Frequency in Genetic Conservation Herd. *Animals*. 9. 377. 10.3390/ani9060377.

- Cipolat-Gotet, C., Cecchinato, A., Malacarne, M., Bittante, G., & Summer, A. (2018). Variations in milk protein fractions affect the efficiency of the cheese-making process. *Journal of dairy science*, *101*(10), 8788-8804.
- Claustre, J., Toumi, F., Trompette, A., Jourdan, G., Guignard, H., Chayvialle, J. A., & Plaisancié, P. (2002). Effects of peptides derived from dietary proteins on mucus secretion in rat jejunum. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, *283*(3), G521-G528.
- Corradini, C. (1995). *Chimica e tecnologia del latte*. Tecniche nuove.
- Daniel, H., Vohwinkel, M., & Rehner, G. (1990). Effect of casein and β -casomorphins on gastrointestinal motility in rats. *The Journal of nutrition*, *120*(3), 252-257.
- Daniloski, D., Cunha, N. M., McCarthy, N. A., O'Callaghan, T. F., McParland, S., & Vasiljevic, T. (2021). Health-related outcomes of genetic polymorphism of bovine β -casein variants: A systematic review of randomised controlled trials. *Trends in Food Science & Technology*, *111*, 233-248.
- De Noni, I. (2008). Release of β -casomorphins 5 and 7 during simulated gastro-intestinal digestion of bovine β -casein variants and milk-based infant formulas. *Food Chemistry*, *110*(4), 897-903.
- Decelles Jr, G. A. (1967). *Investigation of the caseinate-phosphate-calcium complexes as they exist naturally in milk*. Iowa State University.
- DIAMOND Project Group. (2006). Incidence and trends of childhood type 1 diabetes worldwide 1990–1999. *Diabetic medicine*, *23*(8), 857-866.
- Duarte-Vázquez, M. Á., García-Ugalde, C., Villegas-Gutiérrez, L. M., García-Almendárez, B. E., & Rosado, J. L. (2017). Production of cow's milk free from beta-casein A1 and its application in the manufacturing of specialized foods for early infant nutrition. *Foods*, *6*(7), 50.
- Elliot, R. B., Wasmuth, H., Hill, J., Songini, M., & Bottazzo, G. F. (1996). Diabetes and cows' milk. *The Lancet*, *348*(9042), 1657.
- Elliott, R. B., & Martin, J. M. (1984). Dietary protein: a trigger of insulin-dependent diabetes in the BB rat? *Diabetologia*, *26*, 297-299.
- Elliott, R. B., Harris, D. P., Hill, J. P., Bibby, N. J., & Wasmuth, H. E. (1999). Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus and cow milk: casein variant consumption. *Diabetologia*, *42*, 292-296.
- Elliott, R. B., Reddy, S. N., Bibby, N. J., & Kida, K. (1988). Dietary prevention of diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Diabetologia*, *31*, 62-64.
- Elliott, R. B., Wasmuth, H. E., Bibby, N. J., & Hill, J. P. (1997). VII. 1-The role of β -casein variants in the induction of insulin-dependent diabetes in the non-obese diabetic mouse and humans. *International Dairy Federation special issue*, (2), 445-453.
- Farrell Jr, H. M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G. T., Brown, E. M., Butler, J. E., Creamer, L. K., ... & Swaisgood, H. E. (2004). Nomenclature of the proteins of cows' milk—Sixth revision. *Journal of dairy science*, *87*(6), 1641-1674.

- Ferranti, P., Traisci, M. V., Picariello, G., Nasi, A., Boschi, V., Siervo, M., ... & Addeo, F. (2004). Casein proteolysis in human milk: tracing the pattern of casein breakdown and the formation of potential bioactive peptides. *Journal of Dairy Research*, 71(1), 74-87.
- FitzGerald, R. J., & Meisel, H. (2000). Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. *British journal of nutrition*, 84(S1), 33-37.
- FitzGerald, R. J., & Meisel, H. (2003). Milk protein hydrolysates and bioactive peptides. In *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins: Part A/Part B* (pp. 675-698). Boston, MA: Springer US.
- 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. Vet. Univ. Parma*, 19, 127-165.
- Gallinat, J. L., Qanbari, S., Drögemüller, C., Pimentel, E. C. G., Thaller, G., & Tetens, J. (2013). DNA-based identification of novel bovine casein gene variants. *Journal of dairy science*, 96(1), 699-709.
- Gaucheron, F. (2005). The minerals of milk. *Reproduction Nutrition Development*, 45(4), 473-483.
- Gimeno, S. G. A., & Souza, J. M. P. D. (1997). IDDM and milk consumption: A case-control study in Sao Paulo, Brazil. *Diabetes Care*, 20(8), 1256-1260.
- Giromini, C., Cheli, F., Rebutti, R., & Baldi, A. (2019). Invited review: Dairy proteins and bioactive peptides: Modeling digestion and the intestinal barrier. *Journal of dairy science*, 102(2), 929-942.
- Gislon, G., Bava, L., Bisutti, V., Tamburini, A., & Brasca, M. (2023). Bovine beta casein polymorphism and environmental sustainability of cheese production: The case of Grana Padano PDO and mozzarella cheese. *Sustainable Production and Consumption*, 35, 85-94.
- Han, D. N., Zhang, D. H., Wang, L. P., & Zhang, Y. S. (2013). Protective effect of β -casomorphin-7 on cardiomyopathy of streptozotocin-induced diabetic rats via inhibition of hyperglycemia and oxidative stress. *Peptides*, 44, 120-126.
- Haq, M. R. U., Kapila, R., & Kapila, S. (2015). Release of β -casomorphin-7/5 during simulated gastrointestinal digestion of milk β -casein variants from Indian crossbred cattle (Karan Fries). *Food chemistry*, 168, 70-79.
- Henschen, A., Lottspeich, F., Brantl, V., & Teschemacher, H. (1979). Novel opioid peptides derived from casein (beta-casomorphins). II. Structure of active components from bovine casein peptone. *Hoppe-seyler's Zeitschrift für Physiologische chemie*, 360(9), 1217-1224.
- Ho, S., Woodford, K., Kukuljan, S., & Pal, S. (2014). Comparative effects of A1 versus A2 beta-casein on gastrointestinal measures: a blinded randomised cross-over pilot study. *European journal of clinical nutrition*, 68(9), 994-1000.
- Holt, C., & Muir, D. D. (1979). Inorganic constituents of milk: I. Correlation of soluble calcium with citrate in bovine milk. *Journal of Dairy Research*, 46(3), 433-439.
- Huppertz, T. (2012). Chemistry of the caseins. In *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects, 4th Edition* (pp. 135-160). Boston, MA: Springer US.

- Iwan, M., Jarmołowska, B., Bielikowicz, K., Kostyra, E., Kostyra, H., & Kaczmarski, M. (2008). Transport of μ -opioid receptor agonists and antagonist peptides across Caco-2 monolayer. *Peptides*, 29(6), 1042-1047.
- Jensen, H. B., Holland, J. W., Poulsen, N. A., & Larsen, L. B. (2012). Milk protein genetic variants and isoforms identified in bovine milk representing extremes in coagulation properties. *Journal of dairy science*, 95(6), 2891-2903.
- Jinsmaa, Y., & Yoshikawa, M. (1999). Enzymatic release of neocasomorphin and β -casomorphin from bovine β -casein. *Peptides*, 20(8), 957-962.
- Kamiński, S., Cieślińska, A., & Kostyra, E. (2007). Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. *Journal of applied genetics*, 48, 189-198.
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2007). Bioactive peptides from food proteins. *Handbook of food products manufacturing—Health, meat, milk, poultry, seafood, and vegetables*, 5-37.
- Kurek, M., Czerwionka-Szaflarska, M., & Doroszevska, G. (1995). Pseudoallergic skin reactions to opiate sequences of bovine casein in healthy children. *Roczniki Akademii Medycznej w Białymstoku (1995)*, 40(3), 480-485.
- Kurek, M., Przybilla, B., Hermann, K., & Ring, I. (1992). A naturally occurring opioid peptide from cow's milk, beta-casomorphine-7, is a direct histamine releaser in man. *International archives of allergy and immunology*, 97(2), 115-120.
- Laugesen, M., & Elliott, R. (2003). The influence of consumption of A1 beta-casein on heart disease and Type I diabetes—the authors reply. *The New Zealand Medical Journal (Online)*, 116(1170).
- Lucey, J. A., Otter, D., & Horne, D. S. (2017). A 100-Year Review: Progress on the chemistry of milk and its components. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 9916-9932.
- Malacarne, M., Franceschi, P., Formaggioni, P., Sandri, S., Mariani, P., & Summer, A. (2014). Influence of micellar calcium and phosphorus on rennet coagulation properties of cows milk. *Journal of Dairy Research*, 81(2), 129-136.
- Mann, J., & Skeaff, M. (2003). β -casein variants and atherosclerosis—claims are premature. *Atherosclerosis*, 170(1), 11-12.
- Marchini, C., Malacarne, M., Franceschi, P., Formaggioni, P., Summer, A., & Mariani, P. (2011). Milk protein genetic combinations, mineral composition and rennet-coagulation properties of the milk. *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Parma*, 31, 45-64.
- Marko, R., Uros, G., Branislav, V., Milan, M., Danijela, K., Vlado, T., & Zoran, S. (2020). Beta-casein gene polymorphism in Serbian Holstein-Friesian cows and its relationship with milk production traits. *Acta Veterinaria*, 70(4), 497-510.
- Martin, P., Ferranti, P., Leroux, C., & Addeo, F. (2003). Non-bovine caseins: quantitative variability and molecular diversity. In *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins: Part A/Part B* (pp. 277-317). Boston, MA: Springer US.
- McLachlan, C. N. S. (2001). β -casein A1, ischaemic heart disease mortality, and other illnesses. *Medical Hypotheses*, 56(2), 262-272.

- Meisel, H., & FitzGerald, R. J. (2000). Opioid peptides encrypted in intact milk protein sequences. *British Journal of Nutrition*, 84(S1), 27-31.
- Mine, Y., & Shahidi, F. (Eds.). (2005). *Nutraceutical proteins and peptides in health and disease*. CRC Press.
- Nongonierma, A. B., & FitzGerald, R. J. (2015). The scientific evidence for the role of milk protein-derived bioactive peptides in humans: A Review. *Journal of Functional Foods*, 17, 640-656.
- Pal, S., Woodford, K., Kukuljan, S., & Ho, S. (2015). Milk intolerance, beta-casein and lactose. *Nutrients*, 7(9), 7285-7297.
- Parashar, A., & Saini, R. K. (2015). A1 milk and its controversy-a review. *International journal of bioassays*, 4(12), 4611-4619.
- Schmidt, D. G. (1982). Association of caseins and casein micelle structure. *Developments in dairy chemistry*, 1, 61-86.
- Scientific Report of EFSA prepared by a DATEX Working Group on the potential health impact of β -casomorphins and related peptides. EFSA Scientific Report (2009) 231, 1-107
- Scott, F. W., Mongeau, R., Kardish, M., Hatina, G., Trick, K. D., & Wojcinski, Z. (1985). Diet can prevent diabetes in the BB rat. *Diabetes*, 34(10), 1059-1062.
- Sebastiani, C., Arcangeli, C., Ciullo, M., Torricelli, M., Cinti, G., Fisichella, S., & Biagetti, M. (2020). Frequencies evaluation of β -casein gene polymorphisms in dairy cows reared in Central Italy. *Animals*, 10(2), 252.
- Seely, S. (1981). Diet and coronary disease: a survey of mortality rates and food consumption statistics of 24 countries. *Medical Hypotheses*, 7(7), 907-918.
- Summer A., Di Frangia F., Ajmone Marsan P., De Noni I. & Malacarne M. (2020) Occurrence, biological properties and potential effects on human health of β -casomorphin 7: Current knowledge and concerns, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60:21, 3705-3723, DOI: 10.1080/10408398.2019.1707157
- Sun, Z., Zhang, Z., Wang, X., Cade, R., Elmir, Z., & Fregly, M. (2003). Relation of β -casomorphin to apnea in sudden infant death syndrome. *Peptides*, 24(6), 937-943.
- Swinburn, B. (2004). Beta casein A1 and A2 in milk and human health. *Report to New Zealand Food Safety Authority*, 1-43.
- Tailford, K. A., Berry, C. L., Thomas, A. C., & Campbell, J. H. (2003). A casein variant in cow's milk is atherogenic. *Atherosclerosis*, 170(1), 13-19.
- Tateo, F., Bononi, M. & Toppino, P. M. (1992). Guida all'analisi chimica degli alimenti (Vol. 1). Ars.
- Teschemacher, H. (2003). Opioid receptor ligands derived from food proteins. *Current pharmaceutical design*, 9(16), 1331-1344.
- Threadgill, D. W., & Womack, J. E. (1990). Genomic analysis of the major bovine milk protein genes. *Nucleic acids research*, 18(23), 6935-6942.

- Torreilles, J., & Guerin, M. C. (1995). Casein-derived peptides can promote human LDL oxidation by a peroxidase-dependent and metal-independent process. *Comptes rendus des seances de la Societe de biologie et de ses filiales*, 189(5), 933-942.
- Truswell, A. S. (2006). Reply: The A2 milk case: a critical review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 60(7), 924-925.
- Venn, B. J., Skeaff, C. M., Brown, R., Mann, J. I., & Green, T. J. (2006). A comparison of the effects of A1 and A2 β -casein protein variants on blood cholesterol concentrations in New Zealand adults. *Atherosclerosis*, 188(1), 175-178.
- Webb Jr, K. E. (1990). Intestinal absorption of protein hydrolysis products: a review. *Journal of Animal Science*, 68(9), 3011-3022.
- Who, J., & Consultation, F. E. (2003). Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. *World Health Organ Tech Rep Ser*, 916(i-viii), 1-149.
- Zamberlin, Š., Antunac, N., Havranek, J., & Samaržija, D. (2012). Mineral elements in milk and dairy products. *Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka*, 62(2), 111-125.
- Zhang, W., Miao, J., Ma, C., Han, D., & Zhang, Y. (2012). β -Casomorphin-7 attenuates the development of nephropathy in type I diabetes via inhibition of epithelial-mesenchymal transition of renal tubular epithelial cells. *Peptides*, 36(2), 186-191.

SITOGRAFIA

Enciclopedia Treccani <http://www.treccani.it/enciclopedia/>

European Food Safety Authority <https://www.efsa.europa.eu/it>

FAO statistics <http://www.fao.org/faostat/en/>

Food and Agriculture Organization <http://www.fao.org/about/en>

<http://researchgate.net>

<http://www.repository.unipr.it/>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

Journal of Dairy Science <https://www.journalofdairyscience.org/>

Progetto Agroalimentare e ricerca *Ager* <https://progettoager.it/>