

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"
FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA



DOTTORATO DI RICERCA IN
PRODUZIONE E SANITÀ DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE
INDIRIZZO: SCIENZE DELL'ALLEVAMENTO ANIMALE
XXI CICLO

**La Bufala Mediterranea Italiana: nuove prospettive di
selezione ed attitudine alla coagulazione del latte**

Tutor:
Chiar.ma Prof.ssa Rossella Di Palo

Candidata:
Dr.ssa Barbara Ariota

Coordinatore:
Chiar.ma Prof.ssa Maria Luisa Cortesi

NOVEMBRE 2008

*Ai miei genitori
per l'amore e la
stima incondizionata*

Indice

	Introduzione	Pag. 1
1.1	Economia della Mozzarella di Bufala Campana a Denominazione di origine protetta	Pag. 2
1.2	Iter legislativo fino al riconoscimento della D.O.P.	Pag. 4
1.3	Produzione della Mozzarella di Bufala Campana nell'anno 2007	Pag. 6
1.4	Vendita, mercati e canali distributivi	Pag. 8
1.5	Il latte di Bufala	Pag. 10
1.6	I minerali del latte	Pag. 13
1.7	Le proteine del latte	Pag. 17
1.8	Le sieroproteine	Pag. 18
1.9	Le caseine	Pag. 19
1.10	Le caseine del latte di bufala	Pag. 24
1.11	Il polimorfismo genetico delle proteine del latte	Pag. 26
1.12	Polimorfismo delle proteine del latte di bufala	Pag. 29
1.13	Qualità tecnologica del latte	Pag. 31
1.14	Caratteristiche della MBC e processo di trasformazione del latte di bufala.	Pag. 34
1.15	La Bufala Mediterranea Italiana ed il processo selettivo	Pag. 41
1.16	La mungibilità	Pag. 46
1.17	Il flusso del latte alla mungitura	Pag. 48
1.18	Il lactocorder	Pag. 50
1.19	Bibliografia	Pag. 55
2	Scopo della tesi	Pag. 61
3	Esperimento A "I lactocorder"	Pag. 64
3.1	Scopo	Pag. 65
3.2	Materiali e metodi	Pag. 66
3.3	Risultati	Pag. 68
3.4	Conclusioni	Pag. 76
3.5	Bibliografia	Pag. 78
4	Esperimento B "I minerali del latte di bufala"	Pag. 79
4.1	Scopo	Pag. 80
4.2	Materiali e metodi	Pag. 81
4.3	Risultati	Pag. 84
4.4	Conclusioni	Pag. 88
4.5	Bibliografia	Pag. 89
5	Esperimento C "Le proteine del latte di bufala"	Pag. 90
5.1	Scopo	Pag. 91
5.2	Materiali e metodi	Pag. 93
5.3	Risultati e conclusioni	Pag. 96
5.4	Bibliografia	Pag. 109

1. Introduzione

1.1 Economia della Mozzarella di Bufala Campana a Denominazione di origine protetta

Alcuni alimenti tipici come vini e formaggi, possono considerarsi come l'espressione della civiltà del paese. L'Italia ha sviluppato nel tempo una inestimabile ricchezza di prodotti enogastronomici tipici, riuscendo negli ultimi anni a superare gli altri paesi dell'Ue, compresa la Francia, che da sempre, rappresenta il maggiore concorrente europeo dell'Italia nell'agroalimentare e in particolare modo per le produzioni a denominazione. A luglio 2008, le denominazioni italiane infatti sono state 171 (159 quelle francesi). Nel 1996 l'Italia aveva 66 registrazioni, più che raddoppiate nel 2003; altri 37 riconoscimenti sono arrivati dal 2004 al 2008 (Elaborazioni Ismea su dati Ue aggiornamento luglio 2008).

La distribuzione in Italia delle produzioni DOP/IGP è così ripartita: circa il 46% delle produzioni è localizzato al Nord con prodotti a base di carne e formaggi, il 21,5% al centro, poco più del 23% al Sud ed il 9,3% nelle isole maggiori, dove predominano i riconoscimenti per i prodotti ortofrutticoli e oli. Nel corso dell'anno 2007 per comparto merceologico sono stati attribuiti i seguenti marchi DOP-IGP: 51 prodotti ortofrutticoli e cereali; 38 per oli extravergine di oliva; 32 per i formaggi; 28 per preparazioni a base di carne; 10 denominazioni per altri prodotti (Consorzio di tutela MBC). Il settore latte caseario ha da sempre rivestito un ruolo fondamentale nel nostro paese, raggiungendo nel 2007 un fatturato di 14,2 miliardi di € su un totale di 110, pari al 13%. Secondo fonti Databank, il fatturato della produzione del comparto *mozzarelle* (MBC DOP, vaccina e di latte di bufala) in Italia è stato di 1.522 milioni di € nel corso del 2007; l'importazione e l'esportazione pesano 250 e 202,5 milioni di euro rispettivamente.

La mozzarella di bufala è il prodotto che rappresenta per eccellenza la regione Campania. Il termine mozzarella, compare per la prima volta nel 1570 in un libro di cucina di un tale Scappi, uno dei cuochi della corte papale (Guadagno 1990). Dalla seconda metà del 700, essa comincia ad essere sempre più presente sui mercati di Napoli, forse per la benefica influenza dell'impianto della Tenuta Reale di Carditello, in provincia di Caserta. Questa, infatti, all'avanguardia nel settore dell'allevamento, dette un contributo non indifferente all'incremento della produzione, commercializzazione e consumo di questo latticino. La diffusione della mozzarella, comunque, va di pari passo con l'accrescimento delle vie di comunicazione: "...con il miglioramento della rete stradale, con l'espandersi delle ferrovie, i prodotti bufalini cominciano a varcare i confini della Campania per raggiungere altre zone di

smercio"(Guadagno1990). La mozzarella ha quindi radici in un passato lontano nel tempo, la sua tradizione è stata tramandata di casaro in casaro, di famiglia in famiglia fino ad arrivare ai giorni nostri e ricevere il marchio di tutela D.O.P.

Questa denominazione offre garanzie su diversi livelli del processo produttivo: origine, provenienza delle materie prime, localizzazione e tradizione del processo produttivo. I prodotti certificati DOP offrono infatti:

- **Serietà**, in quanto sono regolamentati da leggi italiane e comunitarie.
- **Tracciabilità**, semplificata, in quanto provengono da una zona geografica delimitata,
- **Legame con il territorio**, poiché sono il frutto della combinazione tra le caratteristiche geologiche, agronomiche e climatiche dell'areale di produzione.
- **Tipicità**, ovvero rispetto del metodo di produzione tradizionale, unico, derivante da una cultura e da metodiche di lavorazione che si sono consolidate nel tempo.

1.2 Iter legislativo fino al riconoscimento della D.O.P.

La necessità di tutelare alcuni formaggi tipici è stata avvertita già negli anni cinquanta. Infatti proprio in questo periodo fu emanata la legge n. 125/54, che ha permesso di salvaguardare i prodotti tipici attraverso il riconoscimento della denominazione di origine.

L'articolo 2, in particolare, sancisce che la denominazione di origine può essere assegnata a formaggi prodotti, in zone limitate geograficamente, secondo gli usi e le consuetudini locali, che conferiscono al prodotto particolari caratteristiche merceologiche. Questa stessa legge prevede anche la costituzione di due organismi:

- **il Comitato nazionale**, a cui è assegnato il compito di provvedere alla realizzazione del riconoscimento della denominazione;

- **il Consorzio volontario dei produttori**, che deve assicurare l'azione di vigilanza sull'applicazione della legge.

Alla mozzarella di bufala il riconoscimento della denominazione di origine è avvenuta con il D.P.R. 28/9/1979, nel quale si trovano anche disposizioni in materia di disciplinari di produzione.

Il 28/9/1981, nasce dall'unione dei maggiori caseifici produttori il *Consorzio Nazionale per la tutela del formaggio Mozzarella di Bufala*, e ad esso con il DM 21/3/1983, viene assegnato l'incarico di vigilare sull'applicazione delle disposizioni della legge n. 125/54.

La tutela vera e propria della mozzarella di bufala trova un valido alleato nel regolamento CE 2081/92, il quale prevede la **Denominazione di Origine Protetta** riservata al prodotto agroalimentare "*originario di una regione, di un luogo determinato o di un paese e la cui qualità o le cui caratteristiche siano dovute essenzialmente o esclusivamente all'ambiente geografico comprensivo dei fattori naturali ed umani e la cui produzione, trasformazione ed elaborazione avvengano nell'area geografica delimitata*" Reg. CE 2081/92 art. 2 comma 2a.

Con il DPCM del 10 maggio 1993 viene riconosciuta la denominazione di origine controllata alla *Mozzarella di Bufala Campana* e viene definito il disciplinare di produzione. Così all'articolo 2 vediamo definita l'area geografica di provenienza del latte, mentre l'art. 4 ci fornisce prescrizioni circa le tecniche di allevamento e di produzione. Senza dubbio però la svolta vera e propria si ha solo con il regolamento CE

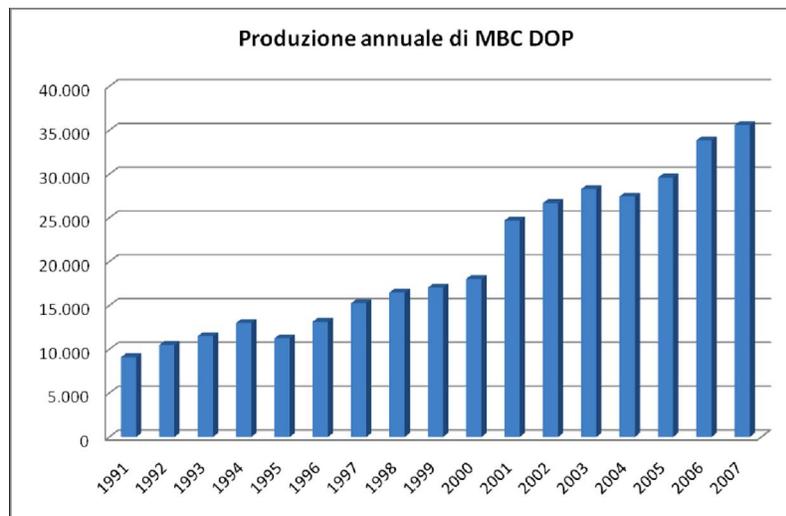
n. 1107 del 12/6/96 che riconosce il DOP e quindi la tutela comunitaria al marchio "mozzarella di bufala campana", la quale entra a pieno titolo fra i prodotti agroalimentari a Denominazione di Origine Protetta. Con successivo regolamento CE n. 103/2008 (pubblicato sulla GUCE L31 del 5 febbraio 2008) sono state approvate alcune modifiche al disciplinare di produzione in ordine alla disciplina produttiva e all'ampliamento dell'area di produzione (le modifiche al disciplinare sono state pubblicate sulla G.U. n. 47 del 25.02.2008, pag. 36).

La produzione della mozzarella DOP così come tutti i prodotti a marchio DOP è tutelata da un consorzio. Il Consorzio è stato riconosciuto dal MIPAF con DM 24 aprile 2002 (pubblicato sulla G.U. 134 del 10.06.2002) in base all'art. 14 della legge 526/99 per la tutela, vigilanza e valorizzazione del prodotto. Al Consorzio di tutela della mozzarella di bufala campana è affidato il compito di promuovere ogni iniziativa intesa a salvaguardare la tipicità, le peculiari caratteristiche e l'uso della denominazione ed a favorire il costante miglioramento delle tecniche di produzione. Esso deve esercitare una costante azione di controllo, al fine di verificare che la mozzarella prodotta nel circuito DOP sia conforme al regolamento. Inoltre, esso svolge anche il ruolo di assistenza alle aziende associate per quanto riguarda leggi e regolamenti presso allevatori, trasformatori, produttori.

1.3 Produzione della Mozzarella di Bufala Campana nell'anno 2007

Secondo i dati del *Consorzio tutela MBC* la "mozzarella" all'interno dei formaggi DOP si colloca al quinto posto per PLV, essa è preceduta solo dai più famosi formaggi italiani: Grana Padano, Parmigiano Reggiano, Gorgonzola e Pecorino Romano. Questi formaggi DOP hanno rappresentato lo scorso anno ben l'85,5% della produzione certificata complessiva dei formaggi DOP. Secondo fonti Assolatte, nell'anno 2007, la produzione di mozzarella (vaccina, bufalina e altri formaggi freschi a pasta filata) è stata pari a 272.100 t con una flessione di circa l'1% rispetto all'anno precedente. Delle 272.100 t di mozzarella, 225.000 t sono mozzarella vaccina (-3% rispetto al 2006) e 47.100 t sono mozzarella di bufala (+5,8% rispetto all'anno 2006). Secondo stime Databank, invece, la quantità di mozzarella di bufala (MBC DOP e di latte di bufala) prodotta in tutto il 2007 raggiungerebbe le 48.500 t. La produzione dichiarata al Consorzio nell'anno 2007 da parte dei 135 caseifici certificati ed autorizzati è stata di 35.587 t rispetto alle 33.850 t dell'anno 2006, con un incremento produttivo del 5,1% (Grafico 1).

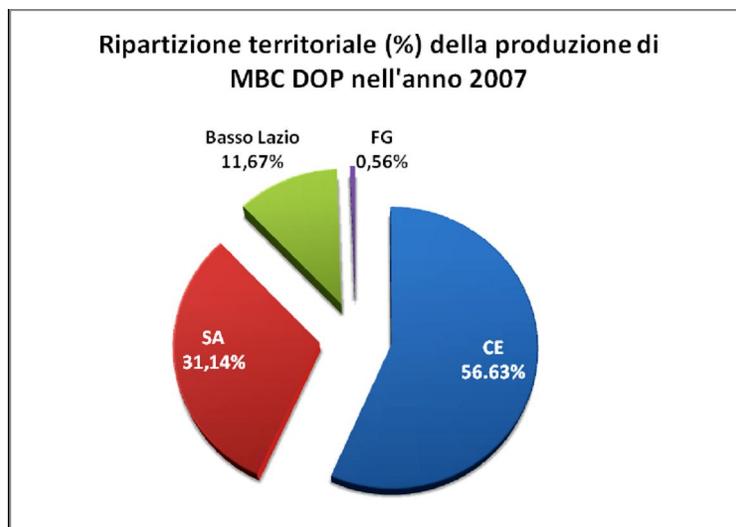
Grafico 1. Produzione annuale di Mozzarella di Bufala Campana



Fonte: Consorzio di tutela (2008)

Le aree di maggiore produzione di MBC risultano essere la province di Caserta e Napoli con il 56,6% seguite dalla provincia di Salerno con circa il 31,1% e dal Basso Lazio con il 11,7% mentre la provincia di Foggia incide per lo 0,6%.

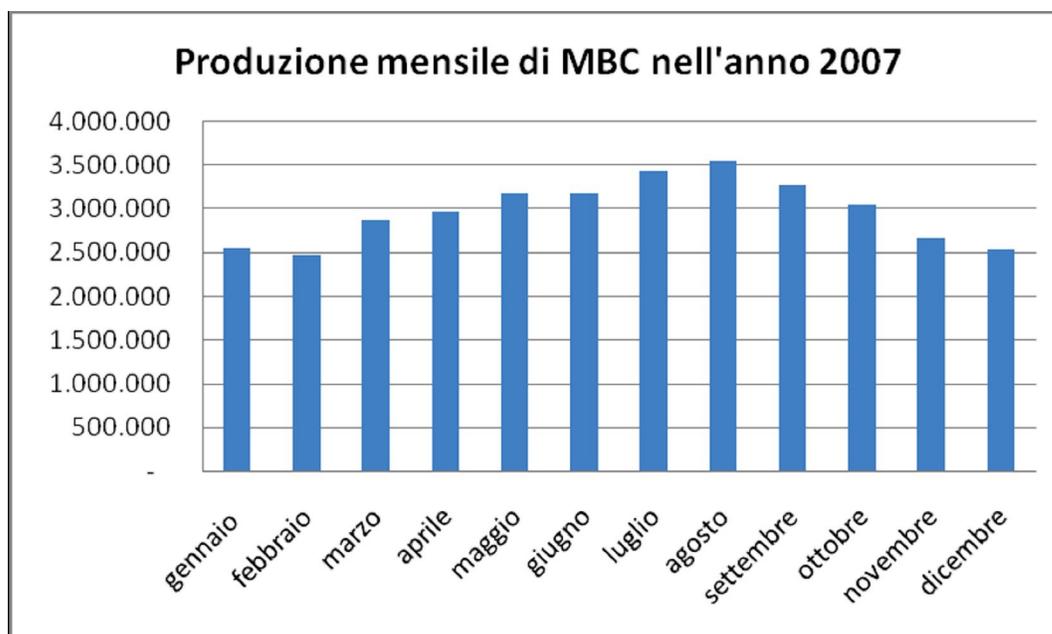
Grafico 2. Produzione di mozzarella DOP per area geografica nel 2007



Fonte: Consorzio di tutela (2008)

Come si nota dal grafico 3, i mesi meno produttivi sono quelli di dicembre e gennaio raggiungendo il minimo nel mese di febbraio secondo una tendenza ormai consolidata negli anni è evidente invece il picco estivo da marzo fino ad agosto.

Grafico 3: Produzione di mozzarella nei mesi del 2007 (in tonnellate)



Fonte: Consorzio di tutela (2008)

1.4 Vendita, mercati e canali distributivi

Nell'anno 2007, circa l'84% della produzione di MBC è andata al mercato nazionale ed il 16% a quello estero. Anche se questi dati coincidono con quelli degli ultimi anni, il volume dell'export di MBC sicuramente è aumentato considerato che c'è stato, nell'anno 2007, un aumento del 5,1% di MBC certificata e dichiarata.

Un dato interessante è che in Italia solo il 38% della MBC è stata venduta nell'area DOP il restante 62% è stato venduto nelle varie regioni italiane.

Le vendite sul mercato nazionale nell'anno 2007, secondo la ripartizione delle **4 aree Nielsen** (Grafico 4), è la seguente:

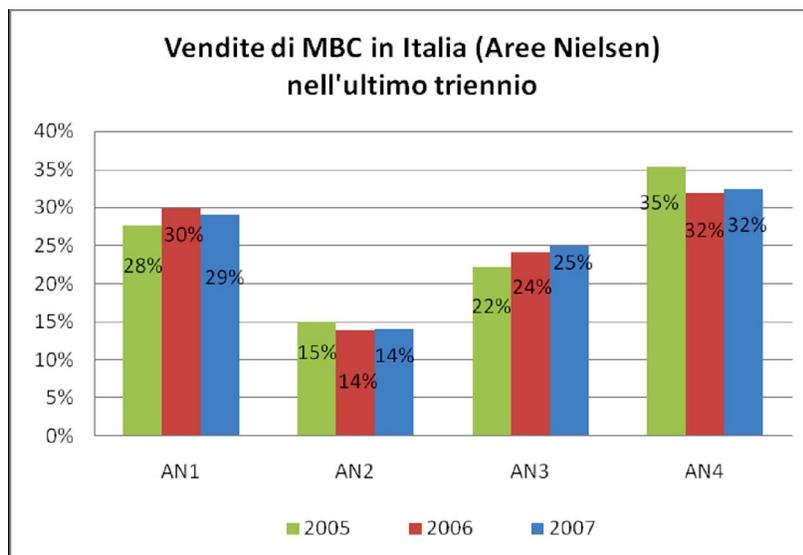
Area 1 ó Nord/Ovest = 29% (-0,9%) (Piemonte, Liguria, Valle d'Aosta, Lombardia);

Area 2 ó Nord/Est = 14% (+0,1%) (Tri-Veneto, Emilia Romagna);

Area 3 ó Centro = 25% (+0,8%) (Toscana, Marche, Abruzzo, Umbria, Molise, Lazio);

Area 4 ó Sud/Isole = 32% (+0,1%) (Campania, Basilicata, Puglia, Calabria, Sicilia e Sardegna).

Grafico 4: Vendite (%) di MBC DOP nelle Aree Nielsen dal 2005 al 2007

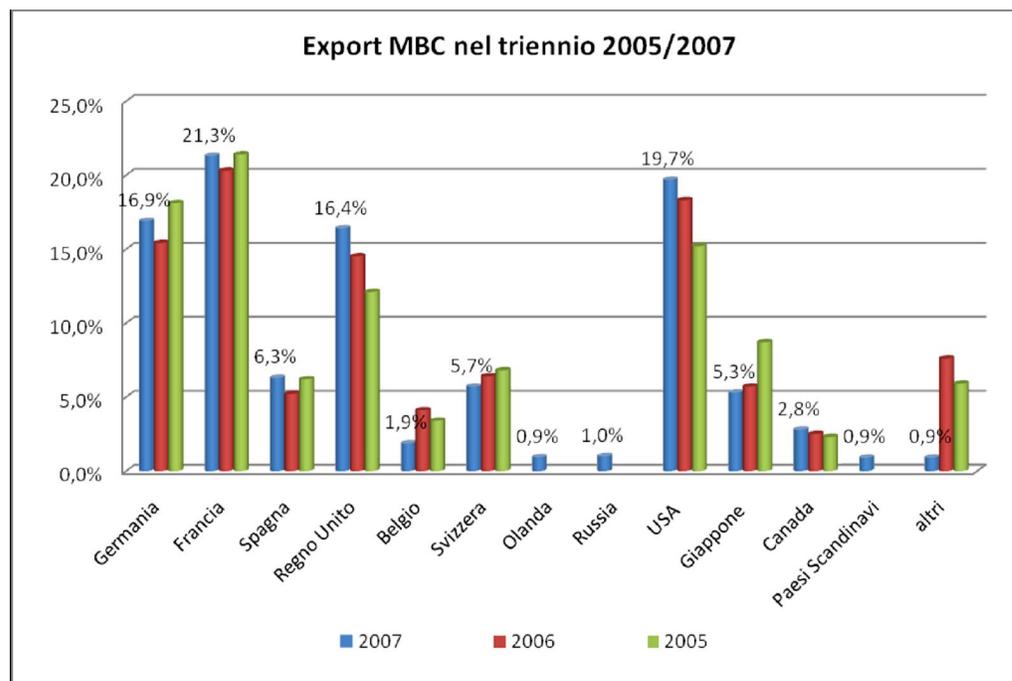


Fonte: Consorzio di tutela (2008)

Per quanto riguarda le vendite di MBC nei diversi canali distributivi il 49% delle vendite nell'anno 2007 viene effettuato attraverso la grande distribuzione, segue la vendita al dettaglio con il 23.3%, il 12.7% è vendita diretta al caseificio, il 9.7% è vendita nel canale Ho.Re.Ca., il 6.7% è venduta ai discount e il restante 1.14% venduta mediante commercio elettronico (Dati consorzio di tutela MBC 2008).

Riguardo al mercato estero, il 51% (+1% rispetto al 2006) delle esportazioni sono dirette verso i paesi dell'UE, il restante 49% verso i paesi extra UE. Come è possibile visionare dal grafico 5 il primo posto è occupato dalla Francia che assorbe il 21.3% delle esportazioni, seguono gli Stati Uniti con il 19.7%, la Germania con il 16,9% e il Regno Unito con il 16.4%. Una leggerissima flessione si registra sui mercati giapponese, svizzero e belga. Nel 2007 rientrano nuove nazioni quali Olanda, Russia e Paesi Scandinavi quali nuove mete dell'export della MBC DOP in ognuno di dei quali viene esportato circa l'1% della MBC prodotta e dichiarata al Consorzio tutela. Nella voce Altri Paesi (0,9%) sono cumulate esportazioni verso Paesi quali Austria, Vietnam, Australia, Corea, Sud Africa, Polonia.

Grafico 5 . Incidenza delle esportazioni di MBC DOP nell'anno 2007 in diversi Paesi



Fonte: Consorzio di tutela (2008)

1.5 Il latte di Bufala

Le proprietà fisiche di formaggio (così come il sapore) sono influenzati da una serie di fattori, tra cui: la composizione del latte; la qualità; la temperatura, il tasso e la misura di acidificazione; il pH; la concentrazione dei sali minerali; misura e tipo di proteolisi, e altre reazioni di maturazione (Lucey et al., 2003).

La produzione di latte, dipende da fattori genetici e fisiologici degli animali, ma anche da fattori ambientali, climatici e dall'alimentazione.

Il peso specifico del latte di bufala è compreso tra 1.026 e 1.035 a temperatura di 15°C. Il pH è compreso tra 6.5 e 6.9; i valori più elevati si ottengono a fine lattazione. Tra pH e residuo magro e tra pH e lattosio è stata riscontrata correlazione significativa (Ferrara, Intrieri 1974). L'acidità espressa in acido lattico oscilla tra 0.005 e 0.28 e nella mungitura del mattino ha valori più elevati. Il residuo intero dipende dalla % lipidica ed oscilla tra 14-22%, quello del residuo magro tra 6-13%. Le sostanze azotate hanno un valore medio del 4.2% con un contenuto di caseina tra 3.4% e 4% e di sieroproteine tra 0.6-0.9%. Delle sostanze azotate non proteiche, il 33-35% è urea, e 18-20% sono amminoacidi liberi. La % di lattosio oscilla tra 3.30 e 5.90. Nella composizione dei minerali il Ca può raggiungere il 2.5% del totale delle ceneri con una media di 0.18g/100ml di latte. Il fosforo invece è presente all'incirca 0.090-0.150g/100ml di latte (Ferrara, Intrieri 1974). È inoltre, caratterizzato da un'elevata percentuale di grasso, di circa il 6-9% con prevalenza dell'acido oleico tra gli acidi insaturi e dell'acido palmitico tra gli acidi saturi. È stato dimostrato che diete con supplementazione di saponi di calcio (Di Palo et al. 1995) influenzano la percentuale di acidi grassi a lunga e corta catena a seconda del periodo di somministrazione. Le caratteristiche qualitative del latte di bufala, dovute soprattutto alla percentuale di grasso e proteine, garantisce rese quasi doppie rispetto a quelle ottenibili con il latte vaccino (da un quintale di latte di bufala si ottengono circa 25 kg di formaggio contro i 13-14 ottenibili con il latte vaccino). La percentuale di grasso è influenzata soprattutto dallo stadio della lattazione e dalla produzione del latte. La percentuale in proteine è influenzata dalla produzione di latte e dalla stagione; mentre il rapporto grasso/proteine dipende dallo stadio della lattazione. Comunque la variabilità del contenuto in grassi risulta essere superiore a quella delle proteine (Pilla et al., 1992). Nonostante la sua alta percentuale di grasso, il contenuto in colesterolo di latte e

mozzarella è più basso nei prodotti bufalini rispetto a quelli vaccini (rispettivamente 275 mg vs 330 mg e 1562 mg vs 2287 mg). Questo risultato è di grande interesse, insieme con alcuni studi che evidenziano un più alto numero di globuli di grasso di piccole dimensioni nel latte di bufala, se comparato con quello bovino e di pecora. È risaputo infatti che globuli di grasso di piccole dimensioni sono maggiormente digeribili, oltre che essere ricchi di acidi grassi poliinsaturi (P.U.F.A.) (Martini et al., 2003).

Tabella 3: Composizione chimica media percentuale del latte di Bufala e di vacca.

Composizione chimica	Latte di bufala	Latte di vacca
Acqua	81,5	87,5
Sostanza secca	18,5	12,5
Residuo magro	10,3	9,0
Caseina	3,6	2,8
Lattoalbumina e lattoglobulina	0,7	0,6
Grasso	8,2	3,5
Lattosio	5,0	4,5
Ca(-)	0.199	0.117
P	0.124	0.088
Rapporto Ca/P	1.61	1.31
Ceneri	0,8	0,75
Acidità (SH)	10.12	10.57
Densità (15°C)	1.031	1.029
Peso specifico	1,033	1,031

Fonte: Istituto Nazionale di ricerca per gli alimenti e la Nutrizione.

Tabella 4 : Composizione degli acidi grassi nel latte di bufala

Acidi Grassi	%
C4	3.59
C6	1.96
C8	1.04
C10	2.06
C12	2.58
C14	11.58
C14:1	1.28
C16	32.54
C16:1	2.36
C18	13.19
C18:1	24.11
C18:2	1.34
Catena corta	8.65
Catena media	15.44
Catena lunga	73.54
Insaturi	29.09

Fonte: Di Palo e Cheli, *Bubalus bubalis* II (1995)

La particolare composizione chimica del latte di bufala influenza la composizione e la struttura del coagulo; infatti il maggiore contenuto in solidi e il potere tampone fanno sì che il pH ottimale della cagliata per la filatura venga raggiunto più tardivamente (Salvadori Del Prato 1998).

Il maggiore contenuto proteico e minerale determinano tempi di coagulazione più brevi e maggiore velocità della cagliata rispetto al latte bovino con aumentata tensione di cagliata, a causa della ricchezza in proteine ed in calcio delle micelle caseiniche (Addeo et al.,1996). Per questo motivo, nella lavorazione della mozzarella di bufala si fa ricorso a minori quantità di caglio. I tempi di acidificazione della cagliata sono mediamente un po' più lunghi rispetto alla cagliata del latte vaccino ed il pH ottimale di filatura un po' minore (4,8-4,9 con acidificazione biologica, 5,6-5,7 con acidificazione chimica) e la temperatura ottimale di filatura risulta più elevata (Salvadori Del Prato 1998).

1.6 I minerali del latte

I minerali rappresentano una piccola frazione di latte rispetto ai lipidi o alle proteine, ma essi svolgono un ruolo molto importante nella struttura e nella stabilità della micella caseinica. Piccole variazioni nella loro composizione o ripartizione possono avere conseguenze importanti sulle micelle di caseina (Gaucheron 2005).

La maggior parte dei componenti salini è costituita da sali inorganici o minerali, da sostanze cioè dissociabili, e da piccole quantità di sali organici, che contengono cioè radicali organici acidi, come l'acido citrico. Li troviamo sotto forma di cationi (calcio, sodio, potassio, magnesio) e anioni (fosforo inorganico, citrato, cloro). I componenti minerali del latte sono sostanzialmente diversi da quelli del siero di sangue, il che significa che la ghiandola mammaria interviene attivamente. La composizione minerale nel latte è relativamente costante anche se sono verificabili delle leggere variazioni. Il calcio ed i fosfati risultano essere più elevati in latte ricco di proteine come ad esempio quello delle Frisone o delle Holstein. Variazioni esistono anche durante i vari stadi di lattazione. Il colostro è ricco in componenti minerali, che decrescono gradualmente fino a portarsi alle concentrazioni normali del latte. Le concentrazioni di sodio, calcio e magnesio, sono le prime a diminuire mentre si ha il progressivo aumento del potassio. (Gaucheron 2005). Negli ultimi mesi di lattazione invece si nota una forte concentrazione di fosforo e cloro. Modificazioni a carico della componente minerali possono verificarsi anche in corso di mastiti, in particolar modo per le concentrazioni di sodio e cloro. Influenze di tipo alimentare invece non dovrebbero influire sul tenore minerale. Infatti eventuali carenze, tendono nel tempo a ridurre la produzione di latte, ma la composizione salina tende a rimanere costante a scapito delle riserve minerali dell'animale.

I sali minerali nel latte, sono presenti in soluzione vera, e colloidale, e cioè legata agli elementi strutturali del latte in forma dispersa o colloidale (grassi e proteine). Le due forme sono in equilibrio mobile cioè, se si verifica una diminuzione dei sali solubili, una parte dei sali colloidali tende a passare in soluzione e viceversa.

Questa distinzione riguarda soprattutto i sali che prendono parte alla costituzione della micella caseinica. Alcuni sali minerali inglobati nella fase colloidale si trovano nel latte ad una concentrazione superiore alla propria solubilità in acqua (fosfati). Gli altri sali minerali si trovano nel latte allo stato solubile per la quasi totalità. Gli ioni di potassio, sodio e cloro sono diffusibili mentre il calcio, fosfato inorganico e magnesio sono legati alle micelle di

caseina, anche se 1/3 di calcio, metà di fosfato inorganico, 2/3 di magnesio e oltre il 90% di citrato sono nella porzione acquosa del latte (Gaucheron 2005).

Nel latte vaccino la concentrazione salina è in media circa 0,80-0,85% e in particolare il calcio presenta valori compresi tra 0,9-1,38 (g/kg), mentre il fosforo presenta valori compresi tra 0.75-1.7 (g/kg). Nel siero di latte cagliato, invece, il calcio è presente in quantità di 0,48 (g/kg) e il fosforo 0.53 (g/kg). Il latte ovino e caprino risulta più ricco in minerali ed i valori per il contenuto di calcio sono rispettivamente 2,10 g/kg e 1.0 g/kg.

Bisogna comunque precisare che il calcio e il fosforo, si trovano nel latte sotto diverse forme.

Il calcio si trova nel latte suddiviso in:

- Ca ionico = 10% del Ca totale
- Ca solubile = 25% legato a citrati di calcio e fosfati anche se questi in minore quantità perché meno solubili.
- Ca colloidale = 20% legato alla caseina ; 45% legato al fosforo in ponti di apatite.

Il fosforo, invece, è suddiviso

- P organico
- P inorganico

Il primo lo troviamo ripartito a sua volta in:

- 20% P colloidale legato alla serina aminoacidica;
- 15% emulsione legata alle membrane di grasso.

Il secondo lo troviamo ripartito in:

- 25% colloidale nei ponti di apatite della caseina;
- 40% solubile come fosfato di calcio.

Calcio e fosforo sono in equilibrio tra loro, ma tale equilibrio si modifica a causa di variazioni di pH e temperatura del latte (Salvadori del Prato 1998). Le variazioni di equilibrio nel latte del fosforo non comprendono tutte le forme presenti ma, è ristretto solo alle forme inorganiche.

Infatti il fosforo esterificato alla serina, non è modificato né dall'acidificazione né dal riscaldamento. La riduzione del pH del latte provoca il passaggio delle caseine nella frazione solubile del latte a causa della perdita, da parte delle micelle, del fosfato calcico micellare e dei pochi contenuti di magnesio e citrato, questo si verifica ad un valore del pH 5.2. Il calcio rimane presente fino al raggiungimento del pH 3.5, oltre il quale si solubilizza (Le Graet et

al;.1993).Queste variazioni sono irreversibili. Il riscaldamento così come il raffreddamento danneggia l'attitudine alla caseificazione del latte.

Un eccessivo riscaldamento per il calcio determina un abbassamento del calcio ionico, aumentando invece la forma colloidale, fino ad arrivare in casi estremi ad una precipitazione di citrato e fosfato di calcio. Tali cambi sono irreversibili a temperature superiori a 120°C.

La bassa temperatura provoca una demineralizzazione della caseina a causa della diminuzione di calcio e fosforo colloidali a favore della fase solubile, con influenza negativa sulla mineralizzazione delle micelle, minor aggregazione e minor consistenza del coagulo (Gaucheron,2005).

Le alterazioni se non drastiche, sono comunque parzialmente reversibili, infatti un latte raffreddato, se riscaldato prima della coagulazione, riacquista una normale reattività al caglio.

Oltre al pH e alle temperatura, anche i chelanti o il cloruro di sodio, possono modificare gli equilibri dei minerali nel latte.

I chelanti sono sostanze, (citrati, ossalato) che se presenti in aggiunta, provocano la riduzione del fosfato di calcio micellare e di conseguenza della struttura della micella, con un aumento del calcio e fosforo inorganici nella frazione acquosa del latte.

Questo si ripercuote in modo negativo sulla resa, in quanto micelle troppo piccole provocano tempi di coagulazione più lunghi.

Mentre l'aggiunta del NaCl provoca riduzione del pH e quindi un aumento del calcio ionico. L'aumento della forza ionica provoca un aumento nella dissociazione delle coppie di ioni e di conseguenza l'idratazione delle micelle aumenta. Gli equilibri ionico-salini nel latte sono molto complessi, ma le loro alterazioni soprattutto riguardanti calcio e fosforo, rivestono una grossa importanza nelle operazioni che precedono la caseificazione e nella caseificazione stessa. Una cagliata più o meno demineralizzata sarà più o meno consistente e capace di trattenere acqua e grasso.

Ad esempio una riduzione del calcio solubile provoca una serie di conseguenze nella lavorazione del latte quali: aumento dei tempi di resa, aumento dei tempi di rassodamento, aumento della fragilità del coagulo, diminuzione dello spurgo spontaneo del coagulo. Naturalmente aumenti del calcio solubile produrranno effetti opposti.

Riguardo alla composizione minerale nel latte di bufala, il calcio rappresenta l'elemento quantitativamente più rappresentativo così come avviene per le altre specie.

I valori di calcio totale oscillano tra 0,1790 e 0,2408; il contenuto di calcio colloidale rappresenta lo 0,162%: quello solubile 0,038% e quello insolubile 0,0113. Il fosforo è presente nel latte di bufala in ragione di 0,090- 0,150 g/100 ml di latte: più abbondante nel latte della sera, non risente della distanza dal parto. La % di fosforo nel latte si eleva all'inizio della primavera ed in estate inoltrata. Il contenuto medio di fosforo colloidale è risultato 0,0847 e di fosforo solubile 0,0441g/100 g (Ferrara et al., 1974).

1.7 Le proteine del latte

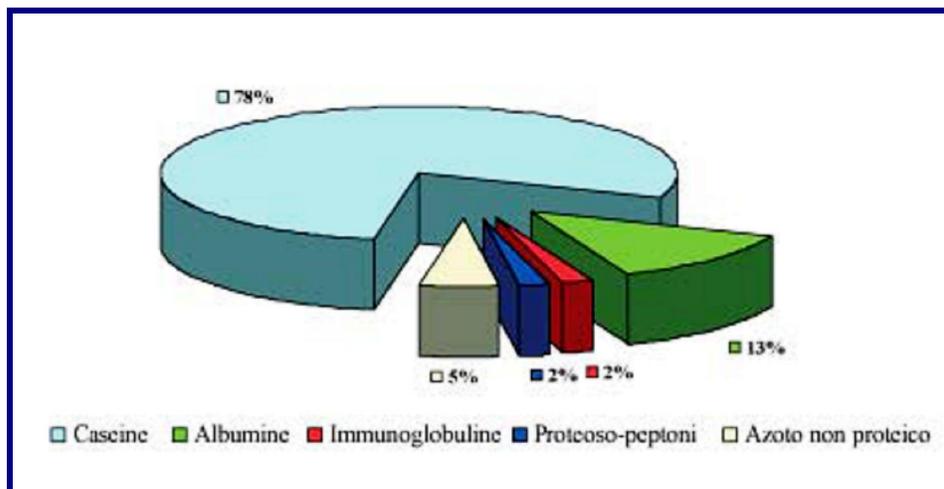
Nel latte le sostanze azotate rappresentano la parte più complessa ed eterogenea, con un'importanza fondamentale dal punto di vista nutrizionale, biologico e tecnologico. Il contenuto delle sostanze azotate totali è molto variabile, mediamente si ritrovano 32gr /l, e il loro contenuto è fortemente influenzato dalla razza, dalla genealogia, dallo stadio di lattazione, dall'età degli animali, dalla stagione, dalle cellule somatiche e dalla nutrizione (McLean et al, 1984; Ng-Kwai-Hang et al., 1982).

Dei 32gr/l di sostanze azotate, il 95% è azoto proteico mentre il 5% è sottoforma di composti azotati solubili a basso peso molecolare (NPN) (Salvadori del Prato 1998). Alcune proteine del latte derivano direttamente dal sangue (meno del 10%, albumina del siero del sangue, parte dell'immunoglobuline), altre per oltre il 90%, sono sintetizzate nella mammella (caseine, frazioni dell'lattoglobulina, e - lattoglobulina) (Matassino et al., 2002).

Le sostanze azotate sono suddivise essenzialmente in quattro gruppi:

- caseine;
- sieroproteine;
- proteoso-peptoni;
- sostanze azotate non proteiche (NPN).

Grafico 6 : Ripartizione delle sostanze azotate nel latte



Fonte : Mordenti A. et al 1986

1.8 Le sieroproteine

Le proteine del siero formano una frazione complessa che rappresenta il 17% circa delle sostanze azotate del latte di vacca e vengono anche denominate proteine solubili. Le sieroproteine si dividono in: albumine 70% ca.; globulina 15% ca.; proteso Peptoni 10% ca.; metalloproteine 5% ca. Le sieroproteine hanno un contenuto in aminoacidi solforati (cistina, cisteina, metionina) molto superiore rispetto alla caseina, il che le rende altamente nutritive per l'uomo. Il carattere che maggiormente distingue le siero proteine dalla caseina è il loro minor peso molecolare (ca. 150000) che fa sì che queste proteine non precipitino al punto isoelettrico (pH ca. 6,0) (Salvatori del Prato, 1998). Le sieroproteine non sono infatti degli aggregati proteici, come le caseine, ma sono presenti nel latte come monomeri o polimeri che precipitano per riscaldamento intenso o per salatura, ma non per azione enzimatica questa proprietà viene sfruttata per l'ottenimento della ricotta.

Distinguiamo la α -lattoglobulina composta da lisina e la β -lattoalbumina, costituita da triptofano, cistina e in maggioranza da lisina. Alcune varianti genetiche delle sieroproteine possono giocare un ruolo importante nei riguardi delle caratteristiche casearie del latte. La β -lattoglobulina presenta una variante, chiamata B più favorevole per la trasformazione del latte in formaggio. Infatti il latte con l'allele B di β -lattoglobulina risulta avere una quantità minore (-12%) di proteine del siero, ma una percentuale più alta (+7%) di caseine (Di Stasio et al, 2000). Bovini omozigoti per l'allele B di β -Lg mostrano contenuti minori di tale proteina, al contrario di quanto accade per individui omozigoti per l'allele A (Aschaffenburg et al, 1955). Per quanto attiene la percentuale del contenuto in caseine nel latte è stato calcolato che, mediamente, ciascun allele B comporta un incremento di 0,2-1 g di caseina per litro di latte (Marletta et al, 1996).

1.9 Le caseine

Valutare le interazioni molecolari delle caseine può essere utile per capire le molte proprietà fisiche e chimiche del formaggio (Lucey et al., 2003). Le caseine sono sintetizzate nella ghiandola mammaria come risposta alla produzione di prolattina o altri stimoli, secrete sotto forme di aggregati colloidali chiamati micelle.

Le caseine sono glicofosfoproteine ad alto valore biologico, sono composte da quattro diverse proteine: s_1 e s_2 -caseine, β -caseina, e κ -caseina. È presente anche la α -caseina, che è un frammento peptidico derivante principalmente dalla proteolisi della β -caseina ad opera della plasmina (Salvadori del Prato 1998)

Tab. 5: Composizione media delle micelle di caseina

Caseine	gr/100gr latte
s_1	33
s_2	11
β	33
κ	11
	4

Fonte: Salvadori del Prato (1998)

Le s_1 -caseine sono caratterizzate dall'essere insolubili in presenza di ioni calcio, per questo motivo insieme alle s_2 e β -caseine rientrano nel gruppo di caseine calcio-sensibili. La differenza tra la famiglia della caseina s_1 e quella della caseina s_2 si basa sulla loro diversa sequenza di aminoacidi (Holt et al, 1988). La caseina s_1 è la più consistente frazione proteica presente nel latte bovino; è composta da una singola catena polipeptidica derivante da 199 aminoacidi e da 8 gruppi fosfatici (Mercier et al, 1971) legati in forma di esteri monofosfatici ad altrettanti residui della serina. Presenta numerosi varianti dette s_1 , s_2 , s_3 , con un numero diverso di gruppi fosfatici legati ad aminoacidi diversi. La caseina s_1 essendo calcio sensibile, a tutte le temperature, forma grossi aggregati che flocculano. Il suo peso molecolare è di 23,616 Daltons.

La caseina κ_2 è composta da 207 amminoacidi fra cui due cisteine. Presenta legata a se un numero diverso di gruppi fosfatici che, in fase di separazione elettroforetica si dispongono fra κ_1 -e la caseine κ_2 . Le caseine κ_2 sono peptidi altamente fosforilati, il latte bovino contiene quattro isoforme diversamente fosforilate, che contengono 10-13 gruppi/mol fosfati (Ginger et al.,2002) La quantità di prolina e la debole idrofobicità, la distingue nettamente dalle altre caseine sensibili al calcio, benché essa sia la più sensibile a questo catione e che venga, come le altre due, resa stabile dalla k-caseina in mezzo calcico. Il suo peso molecolare varia da 25,150 a 25,390 Daltons a causa della variazione della quantità di residui fosforici (Salvadori del Prato 1998).

La caseina κ_1 è una fosfoproteina composta da una singola catena polipeptidica formata da 209 amminoacidi con 5 gruppi fosfatici legati alla serina. E' la meno sensibile al calcio, ma la più idrofobica rispetto alle altre caseine, ha un peso molecolare di 23,982 Daltons, simile a quello dell' κ_1 (Corradini, 1995). Il numero dei siti di fosforilazione e il livello di fosforilazione sono inferiori a quelli osservati per le κ_1 e per le κ_2 caseine. La κ_1 -caseina bovina esiste in una forma completamente fosforilata, che contiene 5 fosfati/mol di proteine (Ribadeau-Dumas et al., 1972). Un certo numero di frammenti di peptidi minori è stato identificato nel latte bovino. Questi frammenti comprendono le caseine 1, 2 e 3 e componenti 5-8 del peptone proteoso. La solubilità del secondo gruppo in ambiente acido ha inizialmente determinato la loro errata individuazione come proteine del siero. Al contrario, come successivamente dimostrato, esse sono il prodotto di una proteolisi parziale delle κ_1 -caseina ad opera della plasmina (Eigel, 1981).

La k-caseina, rappresenta solo il 13% delle caseine totali, le si attribuisce il compito di stabilizzare le micelle di caseina presenti nel latte nei confronti del calcio, cioè ha funzione di colloide-protettore: permette la formazione di micelle stabili in presenza di calcio. E' una fosfo-glicoproteina, composta da una catena polipeptidica derivante da 169 amminoacidi, da un solo gruppo fosforico legato alla serina e da un numero variabile di gruppi glucidici. E' la sola caseina solubile in presenza di ioni calcio a tutte le temperature ed ha componenti fosfati molto più piccoli di qualsiasi altra caseina. I siti di fosforilazione sono confinati nella regione terminale-C della molecola e sono presenti come siti singoli, a differenza dei grappoli, che generalmente si trovano nelle caseine calcio-sensibili. Il peptide-segnale contiene 21 residui (invece dei 15 delle caseine calcio-sensibili). Il legame 105-106 (fenilalanina-metionina) della catena polipeptidica della caseina k è particolarmente debole e

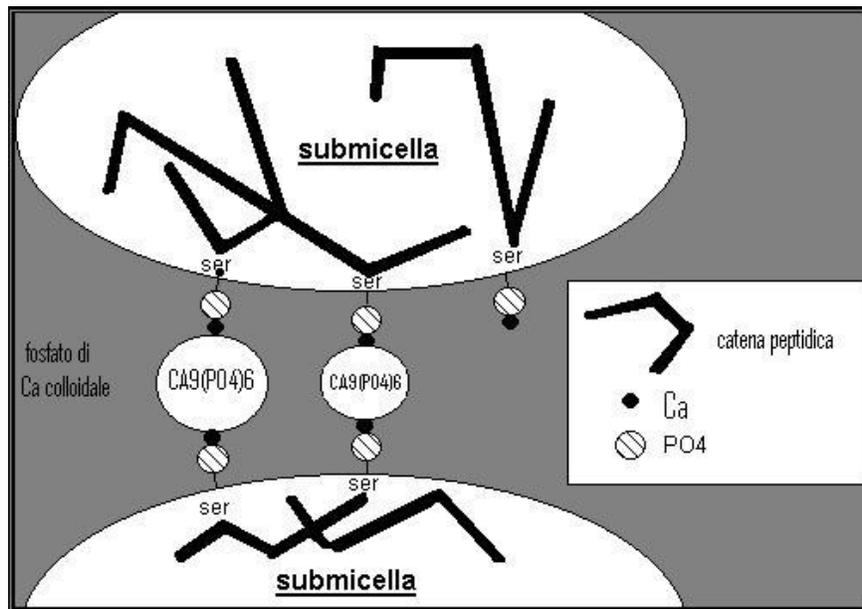
costituisce il substrato specifico della chimosina: la sua rottura dà inizio alla coagulazione e dà luogo alla formazione di due tronconi polipeptidici: para-k-caseina insolubile e caseinoglicopeptide solubile, quest'ultimo riunisce tutti i gruppi glucidici (fortemente idrofili) della k-caseina. (Ginger et al., 2002).

Le k-caseine sono le uniche caseine, che sono glicosilate. I gruppi carboidrati sono attaccati alla k-caseina per mezzo di legami O-glicosidici ai residui di serina e treonina con la porzione terminale-C della molecola. La glicosilazione avviene post traslazionalmente ed è catalizzata dalle transferasi O-glicosilate legate alla membrana all'interno dell'apparato di Golgi delle cellule epiteliali della mammella (Takeuchi et al., 1984) La glicosilazione aumenta durante la produzione del colostro ed in risposta ad una infezione come la mastite, ma diminuisce nei periodi successivi della lattazione (Dziuba et al., 1996).

Le caseine si trovano nel latte non come molecole libere ma sottoforma di micelle, ovvero, aggregati sferici dall'aspetto poroso e spugnoso aventi diametri compresi tra 150 e 300 nm disperse in una fase continua di acqua, sale, lattosio, siero di latte e proteine (Cross et al., 2005).

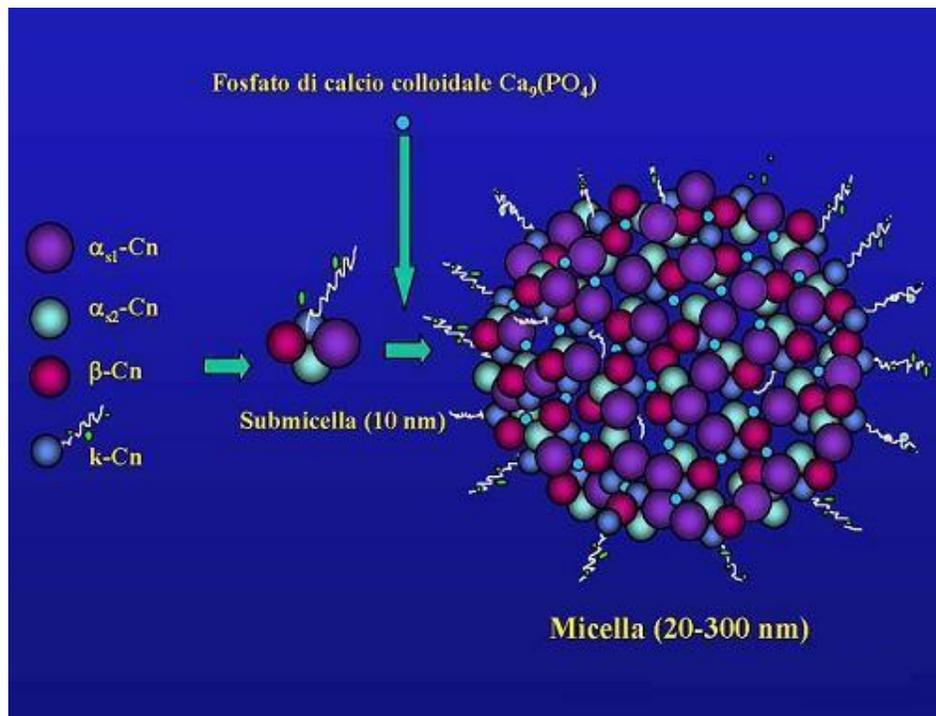
La struttura e la stabilità della micella caseinica è ancora in dibattito, diversi modelli sono discussi in letteratura (Müller-Buschbaum et al., 2007) ma il modello attualmente più soddisfacente è quello proposto da Schmidt (1980) secondo il quale le micelle sono costituite già detto da sottounità, le submicelle, con diametro di 15-20 nm formate da un nucleo idrofobo nel quale troverebbero posto le parti apolari di tutte le caseine, circondate da uno strato polare che riunisce le parti fortemente cariche, ricche di gruppi fosforici delle caseine s_1 e s_2 . La caseina k, che possiede una parte molto polare, occuperebbe lo strato esterno, formando una sorta di calotta protettiva. L'aggregazione delle sub micelle è favorita dalla presenza di siti fosforinici localizzati nella parte esterna delle submicelle. L'amminoacido serina presente nelle catene proteiche può legare i gruppi del fosforo. Inoltre non tutte le caseine presentano gli stessi valori di serina, per esempio l' s_2 possiede molti residui determinando maggiore presenza di gruppi fosforici. I legami tra il calcio-fosfato di calcio e i gruppi fosforilici determinano la formazione di ponti fra le sub micelle (Schmidt 1982).

Figura 8: Schema di unione di due sub-micelle da parte del fosfato di calcio



Fonte: Schmidt 1982.

Figura 9: Formazione della micella caseinica



Fonte: Martini P. 1995

Le diverse frazioni che costituiscono la caseina, pur entrando nella formazione delle micelle in un rapporto piuttosto costante, possono subire variazioni tali che si ripercuotono significativamente sul grado di dispersione del sistema micellare e, di conseguenza, sulle proprietà dell'intero complesso caseinico, nonché sull'andamento sia della fase enzimatica sia di quella fisico-chimica della coagulazione presamica del latte. Il sistema è particolarmente sensibile alle variazioni proporzionali della k-caseina, elemento portante della struttura micellare del latte (più k-caseina= micelle più piccole) (Mariani et al, 2002).

1.10 Le caseine del latte di bufala

La caseina della specie bufalina è simile alla caseina B di vacca e presenta 7 frazioni principali (Addeo et al, 1977), di queste la k4 e k5 ne evidenziano altre due (a e b) e la k7 altre quattro (a, b, c e d). La frazione k1 rappresenta rispettivamente il 40% della k-caseina totale nella bufala ed è molto simile alla k β 1-caseina della bovina, nella quale incide, però, per il 25% sulla k-caseina totale (Addeo et al, 1977). La maggiore quantità di k-caseina rispetto alla bovina rende più veloce la fase enzimatica della coagulazione per la quale è richiesta una minore quantità di rennina. Sempre rispetto alla bovina un'ottimale elasticità del coagulo si ottiene per la bufala a pH 4,9 mentre per la vacca a pH 5,2 - 5,0 (Addeo et al., 1996).

La composizione aminoacidica della caseina delle due specie è differente per la quantità (mole/mole proteina) di N-acetylgalattosamina (0 - 4,3 e 0 ó 6,7 rispettivamente nella bufala e nella bovina) e di ac. sialico (5,5 - 8,5 e 3,5 ó 4,3 nella bufala e nella bovina) sulla k-caseina totale.

Le frazioni α e β 1 caseina costituiscono il 70% della rete micellare delle proteine. L' α caseina è rappresentata dall' α s1 e dall' α s2. L' α s1 caseina non differisce molto tra le due specie ed è costituita dalle frazioni α s0 (Petrilli et al., 1979), α s1II e α s1-I che si differenziano rispettivamente per la presenza di otto, sette e sei gruppi fosfati. Nell' α s1 caseina di bufala, pecora e capra è presente la Gly 192 mentre nella bovina essa è stata sostituita dalla Glu 192. Verosimilmente tale sostituzione si è verificata quando il Bos Taurus (Richardson et al., 1992) si è differenziato dagli altri ruminanti. In ambiente alcalino la mobilità elettroforetica delle tre componenti dell' α s1 caseina del bufalo è minore rispetto a quelle del bovino e tale caratteristica consente di scoprire la presenza (fino al 5%) del latte di bovino in caso di sofisticazioni (Ferranti et al., 1996). Esiste, inoltre, a causa di una mutazione, un residuo fosforilato al posto di uno idrofobico che esalta il carattere non polare di un tratto della proteina. In particolare nel latte di vacca l' α s1 caseina possiede un gruppo fosfoserilico in posizione 115 che è circondato da aminoacidi idrofobici. L'assenza della fosfoserina 115 nell' α s1 caseina della bufala rafforza il carattere non polare di questa proteina (Ferranti et al., 1998). L'interazione dei gruppi idrofobici sono probabilmente responsabili delle caratteristiche dell' α s1 caseina nell'ambito delle micelle caseiniche. In definitiva la perdita di un gruppo fosfato, l'incremento della densità e la più alta sensibilità delle micelle caseiniche di bufala alla chimosina può parzialmente spiegare il minor tempo necessario per

la coagulazione e la maggior resa a favore del latte di bufala (Addeo et al., 1980). L'attitudine alla caseificazione del latte di bufala è, inoltre, migliore di quella della vacca sia per il maggiore tenore in caseina sia per le caratteristiche di fosforilazione dell' α_2 caseina (Ferranti et al., 1996; Addeo et al., 1996): 10 e 11 gruppi fosfati/mole (in quanto costituita da due frazioni) vs quattro rispettivamente nella bufala e nella vacca.

La caseina della bufala è simile a quella della vacca; dalla sua idrolisi con plasmina originano le frazioni α_2 e β . Grazie alla determinazione della frazione α_2 è possibile scoprire nella mozzarella di bufala la presenza (< 1%) di latte vaccino (Addeo et al., 1989). In definitiva il quadro proteico delle due specie si differenzia per la minore presenza di α_1 e per la maggiore di k-caseina e α_2 caseina nella bufala vs. bovina (vedi tabella 6).

Tabella 6: Incidenza delle diverse frazioni caseiniche nella vacca e nella bufala

	Bufala %	Bovina %	Bufala/Bovina %
s1	30.2	38.4	78.6
s2	17.6	10.5	167.6
	33.9	36.5	92.9
k	15.4	12.5	123.2
totale	97.1	97.9	
s1+ s2	47.8	48.9	97.7

1.11 Il polimorfismo genetico delle proteine del latte

La presenza di varianti genetiche, costituisce un aspetto del tutto particolare nel profilo del rendimento industriale della caseificazione, influenza: l'attitudine alla caseificazione, i tempi di coagulazione, la velocità di rassodamento del coagulo e consistenza della cagliata.

Il polimorfismo può essere attribuibile a due ordini di fattori: variazioni genetiche oppure modificazioni post-traslazionali, dovute a una diversa localizzazione nella sequenza amminoacidica della struttura primaria dei siti di fosforilazione e di glicosilazione (Ramunno et al., 1994, Klose 1999). In elettroforesi l'eterogeneità intrinseca delle frazioni caseiniche è il risultato della presenza, nelle proteine, di siti incompletamente fosforilati e glicosilati (Bevilaqua et al., 2002, Ramunno et al., 2004).

Il primo caso di polimorfismo delle proteine del latte fu descritto da Aschaffenburg e Drewry nel 1955. Mediante elettroforesi su carta vennero evidenziate 2 varianti della β lattoglobulina denominate A e B: la successiva analisi genetica dimostrò che le varianti erano determinate da 2 alleli codominanti autosomici (Aschaffenburg e Drewry, 1957). A partire da queste osservazioni le diverse tecniche di elettroforesi del latte prima, e di analisi genomica in seguito, hanno evidenziato l'elevato polimorfismo genetico delle 6 principali proteine del latte bovino. Alcune varianti delle proteine del latte sono universali mentre altre sono ristrette a certe razze (Aschaffenburg, 1968; Kiddy et al., 1970). È ormai appurato che tutti e quattro i geni delle caseine sono raggruppati in un segmento di DNA di circa 200 Kilobasi nella regione q31-33 del cromosoma 6, formando un cluster che si comporta come una singola unità genetica (Ferretti et al., 1990). Per quanto concerne la struttura primaria delle varianti genetiche delle proteine del latte, esse differiscono in genere per una o due sostituzioni aminoacidiche e, talvolta, per la conseguente perdita di un gruppo fosfato. Marcata è l'influenza dei tipi genetici della β -lattoglobulina. Il gene che codifica per β -lattoglobulina è stato mappato sul cromosoma 11 (Vaiman et al., 1994), fuori dal cluster caseinico. Il polimorfismo a questo locus determina importanti ripercussioni sulle caratteristiche del latte e sulla trasformazione in formaggio. Come già detto, della β -lattoglobulina si conoscono 2 varianti genetiche, A e B, che differiscono per la sostituzione di una glicina nella variante B al posto di un acido aspartico presente nella variante A. Le vacche di tipo β -lattoglobulina A forniscono un

latte più ricco di proteina sierica, mentre quelle di tipo β -lattoglobulina B producono un latte mediamente più ricco di caseina, con effetti significativi sul rendimento della trasformazione casearia (Mariani et al., 2002).

Le variazioni genetiche individuali si configurano altresì a livello di allevamento, di popolazione e di razza fino a costituire un carattere differenziale di notevole rilievo. Per la k-caseina ad esempio, la variante B maggiormente favorevole per la caseificazione, risulta sensibilmente più frequente nel latte delle vacche di razza Bruna, Reggiana e Modenese: circa 50% contro 25% della Frisona (Mariani et al., 2002).

La beta-caseina B, più idonea alla caseificazione, risulta nettamente più frequente nella Bruna (28%) che nella Frisona (5%). Nel corso degli ultimi anni, le frequenze dei tipi genetici delle caseine sono andate via via modificandosi: nella bruna, ad esempio, per quanto riguarda la frequenza della k-caseina B si è passati dagli anni 70 ai primi anni 80 dal 44% al 49%, e negli ultimi anni dal 49% al 59%.

Da qui il concetto per cui il latte di alcune razze abbia caratteristiche più idonee alla caseificazione, e quindi effettuare una selezione genetica proprio agendo su queste caratteristiche. (Mariani et al., 1997).

Per quanto riguarda la β -caseina, la variante B ha effetti simili e dello stesso segno di quelli della k-caseina B: il latte contraddistinto dalla presenza della β -caseina B è, infatti, più sensibile all'azione del caglio rispetto a quello contenente la β -caseina A, per cui tende a coagulare in tempi più brevi e a dare origine ad un gel più consistente. La velocità di formazione del coagulo risulta, anche in questo caso, un'importante caratteristica differenziale: il latte β -caseina B dà origine ad un coagulo che rassoda in un tempo significativamente inferiore rispetto a quello del latte β -caseina A; mentre la consistenza del coagulo, se svincolata dal tempo di coagulazione, non sembra variare in misura importante (Mariani et al., 1997).

La k-caseina, come si è detto, riveste un ruolo fondamentale nella formazione della micella: per lo più distribuita nella parte superficiale, conferisce a questa particolare struttura un'elevata capacità di idratazione ed una notevole stabilità, proteggendo le frazioni α_1 , α_2 e β dall'azione precipitante del calcio.

Le due forme alleliche più diffuse, denominate A e B, differiscono per la presenza nell'allele A di una treonina al posto della isoleucina in posizione 136, ed un acido aspartico al posto della alanina in posizione 148 (Mercier et al., 1973). La variante allelica

B sembra essere associata anche ad una più alta proporzione di frazioni glicosilate rispetto alla variante A (Di Stasio e Mariani 2000).

Mariani nel 1983 identifica una variante C che rispetto alle varianti A e B, presenta una sostituzione ArgHis in posizione 97 (Miranda et al., 1993).

Le varianti A e B, manifestano un diverso comportamento, sia nella fase di costruzione sia in quella di destabilizzazione della micella. Il latte k-caseina B reagisce più prontamente con il caglio, coagulando in un tempo sensibilmente inferiore rispetto a quello di tipo k-caseina A. Il latte di tipo k-caseina AB manifesta un comportamento intermedio. Il latte contenente k-caseina B coagula generalmente in tempi più favorevoli e di origine ad un coagulo che rassoda più velocemente, Il latte k-caseina A, invece, tende più frequentemente a collocarsi tra quelli la cui attitudine alla coagulazione risulta meno favorevole (Mariani 1999). La presenza della variante C ha ripercussioni negative sul tempo di coagulazione della cagliata,

che risulta più lungo, probabilmente in seguito ad un cambiamento di conformazione della molecola che rende più difficile l'interazione tra il substrato e la chimosina. Questa sostituzione aminoacidica non sembra influenzare negativamente la compattezza della cagliata, che viceversa, sembra essere buona probabilmente per effetto di una migliore interazione tra le micelle della para-k-caseina (Formaggioni et al., 1999). Un allele E, in Italia questo è stato evidenziato nella razza Frisona Italiana alla frequenza dello 0.12 (Caroli et al., 2000) e in torelli di razza Bruna Italiana alla frequenza dello 0.05 (Leone et al., 1998). Alcuni dati sottolineano l'effetto negativo della variante k-Cas E sulle proprietà di coagulazione del latte (Caroli et al., 2000).

1.12 Polimorfismo delle proteine del latte di bufala

Alla luce di queste conoscenze, recentemente l'attenzione si è focalizzata sullo studio delle proteine del latte di altre specie, tra cui la Bufala.

Sono stati eseguiti studi riguardanti la struttura primaria delle caseine α_{s1} e β nel latte di bufala mediterranea italiana e in popolazioni bufaline venezuelane (Ferranti et al. 1998). Utilizzando una combinazione di studi con spettrofotometro di massa e procedure di degradazione Edman è emersa la presenza di tre bande isoelettriche per quanto riguarda la α_{s1} , differenti per numero di gruppi fosfato (rispettivamente otto, sette e sei); nonché l'esistenza di due varianti genetiche di β -caseina, A e B, che, inoltre, mostravano una diversa distribuzione nella popolazione bufalina: mentre la variante B è risultata largamente presente sia in bufale italiane che venezuelane, la variante A è stata riscontrata solo nella popolazione bufalina venezuelana.

Ancora nel 1998 è stato riscontrato polimorfismo genetico della caseina in diverse razze di bufalo indiano quali Murrah e Nili-Ravi (Mitra A. et al. 1998) con l'identificazione delle varianti alleliche A e B.

È stata studiata la struttura primaria della alfa-lattoalbumina bufalina in bufale di razza Mediterranea Italiana (Chianese et al., 2004), ed è stata dimostrata l'esistenza di due varianti elettroforetiche, rispettivamente A e B, con una frequenza allelica della variante A pari a 0.5%, di molto inferiore a quella B la cui frequenza è risultata pari al 97.1%.

In 4 differenti razze della famiglia river buffalo: Bhadwari, Mehsana, Surti e Murrah è stato verificato un ulteriore polimorfismo genetico della α -lattoalbumina, (Dayal S. et al. 2005). Amplificando mediante PCR due frammenti del gene della α -lattoalbumina (133 bp e 159 bp, rispettivamente esone 1 e esone 2), sono stati trovati diversi pattern allelici e genotipi negli animali in studio, il cui numero variava nelle diverse specie. Per il frammento 133bp, sono stati ritrovati 4 alleli (A,B,C,D); invece per il frammento 159 bp ne sono stati trovati 5 (A,B,C,D,E). È stata dimostrata la presenza di mutazioni funzionali che determinano variabilità della catena polipeptidica.

Ricerche sono state effettuate anche sulla β -lattoglobulina di latte di bufala di tipo river. In particolare sono state scoperte diverse varianti genetiche di questa proteina, e si è cercato di associarle ad una diversa composizione del latte (Vohra et al. 2006). Lo studio è stato effettuato su due frammenti del gene della β -lattoglobulina, il 119bp dell'esone 1, e il 400 bp che comprende l'esone 4 e l'introne 4. Per il frammento 119 bp, sono stati osservati 3

alleli (A,B,C), per il frammento 400 bp, invece, 4 (A,B,C,D). La frequenza della distribuzione dei vari alleli di ciascun frammento è diversa nelle varie razze bufaline.

1.13 Qualità tecnologica del latte

La qualità tecnologica del latte assume significati diversi, a seconda del tipo di trasformazione, specie con riferimento alle condizioni di formazione del coagulo, al grado di acidificazione della massa caseosa sotto siero ed alla durata di stagionatura del formaggio (Mariani, 1999). Il requisito basilare per il latte destinato alla trasformazione è, senza alcun dubbio, rappresentato dall'attitudine alla coagulazione. Il latte deve possedere determinate caratteristiche, quali un buon contenuto di caseina, caseine di tipo genetico potenzialmente favorevole; un discreto contenuto di fosfato di calcio colloidale; un giusto grado di acidità titolabile; un moderato contenuto di cellule somatiche ed una 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, ciò in modo da ottenere una massa caseosa strutturalmente omogenea, adeguatamente disidratata (Mariani et al., 2002). L'attitudine alla coagulazione, può essere valutata mediante i parametri lattodinamografici. Questi infatti permettono di studiare l'andamento della caseificazione e definiscono l'attitudine del latte a coagulare in presenza di caglio, cioè una reazione fra enzimi (naturali o artificiali) e le caseine del latte. È chiaro che un latte destinato alla caseificazione deve formare rapidamente una cagliata ferma e stabile. L'analisi di questi parametri si effettua in laboratorio con una apparecchiatura specifica (lattodinamografo) che misura le caratteristiche di piccole cagliate effettuate con i campioni di latte da analizzare. Il lattodinamografo misurando diversi parametri, quali :

il tempo di coagulazione (r); velocità di formazione del coagulo (k_{20}); consistenza del coagulo misurata a 30 min dall'aggiunta del caglio (a_{30}). Tali parametri forniscono indicazioni tecnologicamente utili ai fini della valutazione complessiva del comportamento del latte con il caglio (Annibaldi et al., 1977).

L'esame del latte effettuato con il lattodinamografo fornisce un tracciato che identifica le caratteristiche d'idoneità del campione alla caseificazione e rappresenta graficamente i tre parametri fondamentali per riconoscere la qualità del latte (Fig 10)

Figura 10: Tracciato lattodinamografico tipo



I diversi test hanno permesso di costruire differenti classi qualitative per il latte di vacca, in rapporto al diverso comportamento in fase di trasformazione:

A: latte con buone caratteristiche, idoneo alla caseificazione

B: latte a lenta coagulazione, ma con buona velocità di presa del coagulo e consistenza finale della cagliata relativamente elevata. Questo latte è tipico di bovine a fine lattazione ed è ricco in caseina.

C: dopo una prima fase con tempo di coagulazione rapido, segue un rallentamento nella velocità di formazione del coagulo, con una consistenza finale della cagliata piuttosto scarsa. Questo latte è piuttosto frequente in bovine ad inizio lattazione e si presenta generalmente povero in caseina.

D: le fasi di caseificazione si svolgono molto velocemente ed il coagulo raggiunge un'altissima consistenza. Questo è un tipo di latte leggermente acido e/o molto ricco in caseina.

E: in questo caso si ha un tempo di coagulazione lungo, con bassa velocità di presa e scarsa consistenza finale della cagliata. In genere è il latte tipico di bovine affette da mastiti settiche e disordini secretori, con elevato numero di cellule somatiche. Altre cause sono la predisposizione genetica, l'ipoacidità, stress ambientali, errori alimentari e patologie in

essere. Oltre a ciò, questo è anche un reperto tipico nel latte da lattazioni eccessivamente prolungate.

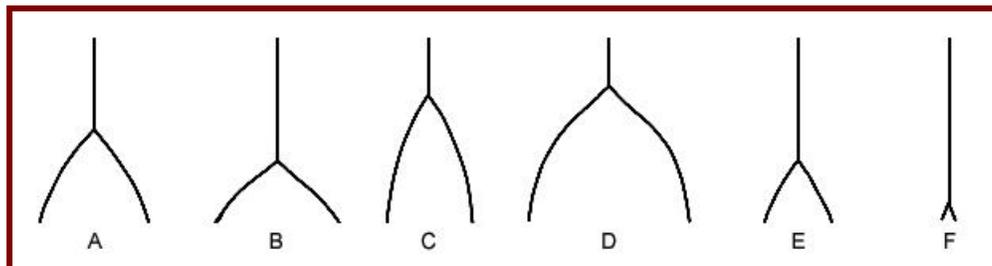
F: in questo caso si hanno lunghissimi tempi di coagulazione, bassissima velocità di presa e scarsissima consistenza finale della cagliata; questo è il quadro tipico in caso di mastiti con elevata conta di cellule somatiche e latte fortemente ipoacido. Ovviamente un latte con queste caratteristiche è totalmente inadatto alla caseificazione.

Tabella 7: I principali tipi di latte, suddivisi per attitudine alla caseificazione secondo i vari parametri lattodinamografici:

Parametri lattodinamografici	A	B	C	D	E	F
Tempo coagulazione r (minuti)	Normale	Lento	Rapido	Molto rapido	Lento	Molto lento
Velocità formazione coagulo k20 (min)	Normale	Elevata	Lenta	Elevata	Lenta	Molto lenta
Consistenza coagulo a30 (mm.)	Normale	Elevata	Scarsa	Molto elevata	Bassa	Inesistente
Attitudine	Ottimale	Buona	Discreta	Buona	Mediocre	Inadatto

Fonte: Mariani 2002

Figura 11: Varie tipologie di latte con i relativi tracciati lattodinamografici.



Fonte: Mariani 2002

1.14 Caratteristiche della MBC e processo di trasformazione del latte di bufala.

La mozzarella di bufala per essere D.O.P. deve rispettare le regole imposte dal disciplinare che prevede:

- le bufale devono essere esclusivamente di razza mediterranea, allevate nella zona D.O.P. ed adeguatamente alimentate;
- il latte utilizzato per la trasformazione deve essere esclusivamente latte di bufala e lavorato entro le 16 ore dalla mungitura;
- la trasformazione deve avvalersi di tecniche tradizionali ed in particolare prevedere l'impiego del siero inesto.

Le caratteristiche della mozzarella di bufala Campana sono la forma rotondeggiante, colore bianco porcellanato, superficie liscia e lucente, crosta sottilissima, aspetto succoso, con sapore dolce o leggermente acidulo. Al taglio lascia scolare un po' di sierosità biancastra, grassa e dal profumo dei fermenti lattici. Non deve presentare occhiature. La struttura a foglie sottili sovrapposte, che tendono a scomparire negli stadi immediatamente sotto il primo. La faccia non deve essere mai viscida (difetto di microflora), né ruvida, né rugosa, né scagliata (difetto di conservazione). Sulla faccia sono presenti dei rilievi sottili, che stanno ad indicare il punto di distacco della mozzarella dalla massa di pasta (Ferrara et al., 1974). In base alle norme ufficiali, non deve avere meno del 52% di grasso sulla sostanza secca e più del 65% di umidità. La fase di lavorazione prevede: un lento innesco della coagulazione, lento sviluppo dell'acidità, lungo tempo di maturazione della cagliata (Abd-Ed-Salam et al., 1990; Ganguli et al., 1974).

La tecnologia utilizzata per ottenere la mozzarella di bufala è quella del formaggio di pasta filata molle. Uno schema tradizionale di lavorazione della Mozzarella di bufala si può articolare in due fasi. Nella prima si realizza la preparazione della cagliata e la successiva maturazione sotto siero fino a raggiungere una sufficiente acidità per essere sottoposta a filatura. Nella seconda, la cagliata acidificata viene filata perché assuma la caratteristica struttura filamentare della mozzarella di bufala a pasta filata.

Formatura, salatura e confezionamento completano il ciclo di lavorazione di questo formaggio. Comunque tutte le fasi della lavorazione della Mozzarella di Bufala Campana devono seguire il disciplinare di produzione del consorzio per la tutela della "Mozzarella di Bufala Campana".

Il latte viene coagulato per effetto della destabilizzazione delle micelle caseiniche. Questo può verificarsi attraverso tre metodiche che possono combinarsi tra loro: proteolisi limitata (utilizzando il caglio o altri coagulanti), l'acidificazione (cultura di avviamento o aggiunta di acidi) e con il calore (Lucey et al., 2003). La coagulazione del latte al fine di produrre mozzarella è provocata da enzimi. Gli enzimi usati nell'industria latte casearia sono generalmente ricavati da materie prime naturali edibili, animali o vegetali o anche per fermentazione di microrganismi proteasi-produttori. Il caglio di origine animale, può derivare da abomasi di bovini, caprini ed ovini. Gli enzimi coagulanti del caglio sono: chimosina, pepsina, gastricsina, lipasi e lisozima. L'effetto coagulante deriva dalla capacità degli enzimi di idrolizzare il legame fenilalanina-metionina. La rottura di questo legame toglie alla k-caseina il suo effetto di colloidale protettore delle micelle di caseina provocando la formazione di parakcaseina cioè caseine private delle caseinglicopeptidi ovvero le κ -caseine esterne delle k-caseine. In questo modo le micelle caseiniche si destabilizzano ed il latte coagula in presenza di calcio. La coagulazione del latte avviene sempre grazie all'azione combinata del pH, dalla temperatura e dai sali minerali e viene preceduta dall'aggiunta di siero innesto naturale. Tale siero ottenuto lasciando acidificare spontaneamente a temperatura ambiente il siero della lavorazione del giorno precedente, contiene una microflora composita costituita da Streptococchi e Lattobacilli termofili, da Streptococchi mesofili, Micrococchi e spesso Lieviti. (Salvadori del Prato 1998)

L'acidità del siero innesto utilizzato è solitamente compresa tra i 40 e i 60 ° SH/100 ml.

Della coagulazione enzimatica, possiamo distinguere tre fasi.

La prima consiste nel distacco del glicopeptide della k-caseina. Il distacco può avvenire in condizioni di pH comprese tra 5 e 7 e temperature tra i 40 e 45°C. Se si verifica solo questa prima fase il latte rimane allo stato liquido. Per passare allo stato di gel devono formarsi legami tra le micelle destabilizzate. Nella seconda fase si ha la formazione di un gel omogeneo. In questa fase molta importanza ha la temperatura che deve essere superiore ai 15 °C ma inferiore ai 65°C e devono essere presenti almeno 80 mg/l di calcio ionico. La temperatura è indispensabile affinché si formino i ponti idrogeno tra le micelle. Il gel che si forma dalla coagulazione del latte è un materiale viscoso-elastico, che cambia continuamente con il tempo. I ponti che si creano tra le micelle si contraggono in modo da far riunire le micelle e farle fondere tra loro. L'aggregazione sembra non iniziare sino a quando almeno il

60% delle k-caseine non sia stato idrolizzato dalla chimosina. La terza fase viene detta sineresi, ovvero avviene la fuoriuscita del siero.

La sineresi è un processo spontaneo che avviene a causa della contrazione delle fibrille del reticolo proteico. Questa contrazione provoca una pressione sul siero imprigionato negli alveoli del reticolo di coagulo e lo spinge ad uscire. La fuoriuscita del siero determina il restringimento della rete intorno ai globuli di grasso, ed il siero rimasto occupa lo spazio tra i globuli di grasso e la rete della caseina fungendo da lubrificante (Addeo et al,1996)

Terminata la coagulazione e la sineresi naturale dei granuli di cagliata, ha inizio la fase di spurgo secondario. Questa fase è influenzata dalle fasi e dalle operazioni di caseificazione. La prima operazione di caseificazione è la preparazione del latte.

Il latte viene trasformato in caldaie di acciaio inossidabile della capacità mediamente di 10 quintali e la quantità di siero innesto aggiunta è variabile ma mai superiore al 2,5%. Il riscaldamento del latte avviene per immissione diretta di vapore addizionando del caglio (18-20 ml/qle di latte). La temperatura ottimale è fra i 34° C ed i 38 °C .

Se il latte coagulato viene tagliato prima che le strutture proteiche siano completamente formate, una grossa quantità di grasso andrà persa durante la sineresi (separazione tra la fase solida e la fase liquida del latte) e la filatura. (Addeo et al.,1996) Questo influirà negativamente sulla struttura e sulla resa del formaggio. Per evitare questo problema, i produttori tagliano il latte coagulato un ora dopo l'aggiunta di caglio. La coagulazione prolungata però può talvolta produrre un formaggio eccessivamente compatto danneggiandone la struttura. Dopo il rassodamento, si inizia la rottura della cagliata, con un semplice taglio, fatto a croce secondo la consuetudine, e dopo un altro riposo di una decina di minuti, si termina la rottura, fino alla grossezza di piselli. La rottura della cagliata viene effettuata di solito manualmente con un ortoloio di legno, bastone alla cui estremità è fissato un disco di legno con la faccia esterna convessa, o con uno spino metallico. La rottura della cagliata comporta quasi sempre perdita di grasso nel siero. Queste perdite possono essere limitate ricorrendo ad un'agitazione lenta. A rottura ultimata, si lascia maturare la pasta, sotto il siero, oppure fuori siero.

Nel ciclo di lavorazione artigianale l'acidificazione dura mediamente 3-4 ore anche se talvolta possono protrarsi anche fino ad 8 ore. La durata dell'acidificazione della cagliata sotto siero è una delle variabili di processo che più influiscono sulla qualità del formaggio. A determinare la durata di questa fase della lavorazione concorrono principalmente la qualità

microbica del latte (acidità) e alcune variabili di processo come la temperatura, il grado di frantumazione della cagliata, la qualità del siero innesto utilizzato.

La variabilità nella durata di maturazione della cagliata che si osserva nei diversi caseifici e nell'ambito di uno stesso caseificio, può essere attribuita al fatto che per la lavorazione della mozzarella di bufala viene impiegato quasi sempre latte crudo e colture naturali di batteri lattici di composizione variabile nel tempo. Da tener presente è che per le modalità di ottenimento del siero innesto, possono svilupparsi in esso microrganismi anticaseari. Il siero della mozzarella, a differenza di quello ottenuto nella produzione di formaggi a pasta cotta, non subisce alcun trattamento termico per cui una eventuale selezione della microflora nativa avviene solo sulla base dello sviluppo dell'acidità.

Il disciplinare di produzione prevede che la maturazione della cagliata debba avvenire esclusivamente per fermentazione naturale e quindi senza poter intervenire sul pH con aggiunta al latte di acidi organici (citrico, acetico lattico) o minerali (acido fosforico) prima della coagulazione del caglio. La fase di maturazione viene ultimata su di un tavolo dove vengono pressati e tagliati i pezzi di cagliata con il falcetto in modo da favorire lo spurgo del siero. Per ottenere una rapida ed omogenea acidificazione della cagliata lo spessore dello strato di cagliata dovrebbe essere inferiore a 20 cm per consentire scambi più rapidi tra siero e cagliata.

Altro fattore che influenza la buona uscita dell'acidificazione della cagliata è la temperatura che dovrebbe mantenersi costante. L'estrazione della cagliata avviene di solito manualmente, dopo di che viene tagliata in fette. La cagliata deve presentarsi compatta e omogenea e con occhiature regolari, viene poi posta a spurgare e a maturare. La cagliata viene sottoposta ad un processo di stretching in acqua calda ($> 70^{\circ}\text{C}$). Nella pratica comune il casaro stabilisce il momento per l'inizio della filatura sulla base di un saggio empirico. Tale saggio consiste nel fondere in acqua calda circa 100 grammi di pasta che viene amalgamata con l'aiuto di un bastoncino. L'acqua in eccesso viene drenata e la pasta fusa viene adagiata sul bastoncino, in modo che per gravità tenda ad allungarsi. Con le mani si tende la pasta fusa e se essa si allunga di circa un metro, la pasta è giudicata pronta per la filatura che nella lavorazione tradizionale la pasta viene filata ancora manualmente.

La pasta viene tagliata in fette sottili e posta in un tino di legno nel quale viene fusa per aggiunta di acqua bollente. Successivamente con l'aiuto di un bastone di legno si solleva e si tira la pasta fusa fino ad ottenere un impasto omogeneo e lucido. L'acqua non incorporata

nell'impasto viene successivamente allontanata dal recipiente di filatura raccogliendola con una ciotola e filtrandola con un setaccio e maglie fini per recuperare i piccoli pezzi di pasta fusa. Molte aziende invece di praticare la filatura manuale adoperano una macchina chiamata "Tenditore" che si basa sul movimento di viti rotanti in direzioni opposte al fine di impastare allungare le cagliate maturate e riscaldate in una vasca scorrevole ad acqua calda. Confrontando le due diverse tecniche da 700 Kg di latte di bufala, si ottengono con l'allungamento manuale 163 Kg di mozzarella mentre con quello meccanico solo 138 Kg. Questo si verifica perché nell'operazione manuale sono sufficienti 161 Kg di acqua, mentre in quella meccanica occorrono 205 Kg. La differenza di resa tra le due operazioni è dovuta principalmente al grasso perso nell'acqua usata per sciogliere la cagliata (Addeo et al., 1996). Comunque la capacità della cagliata di filare dipende dalle variazioni di temperatura. La cagliata ha la massima capacità allungante verso i 68°C. A bassa temperatura, la cagliata sciolta, si rompe ad alte invece, la forza della cagliata è così lieve che il materiale non è capace di trasportare il suo stesso peso e perde di consistenza.

La formatura della mozzarella viene effettuata manualmente da due operatori di cui uno stacca (mozza) con il pollice e l'indice delle due mani dei pezzi di pasta filata da una massa globosa di circa 3-4Kg sostenuta da un altro operatore. Oltre alla forma tondeggiante, dal disciplinare della MBC sono ammesse altre forme tipiche della zona di produzione quali bocconcini, trecce, perline, ciliegine, nodini di peso variabile da 20 g a 800 g, in relazione alla forma.

Diversi caseifici hanno introdotto l'uso delle formatrici meccaniche con le quali vengono ottenute prevalentemente le pezzature più piccole (50-100 gr). Il prodotto appena formato, viene lasciato cadere in vasche contenenti acqua fredda. Successivamente ad una sosta variabile a seconda della pezzatura viene trasferito in salamoia. La salatura viene ottenuta immergendo il formaggio in soluzioni saline a diversa concentrazione, con un contenuto che varia dal 10 al 18%.

La durata dell'operazione varia da caseificio a caseificio ma in genere non supera le 10 ore per le pezzature di 400-500 gr. La tendenza attuale è di eliminare la fase di salagione per immersione in soluzioni saline, salando direttamente in pasta o effettuando la fiatura con acqua salata. La salatura tradizionale presenta infatti, alcuni inconvenienti che possono essere in parte risolti facendo avvenire la salagione in maniera diversa. Durante la permanenza del formaggio in salamoia, il sale penetra in esso per diffusione. La velocità con cui il sale passa

nel formaggio dipende dalla concentrazione salina della salamoia, dalla temperatura e dalle dimensioni della mozzarella.

Nel caseificio il processo è estremamente lento per cui al termine del periodo di immersione in salamoia la concentrazione di sale nel formaggio non è uniforme. Per ottenerle uniforme sono necessarie circa 72 ore. Una volta estratto il formaggio dalla salamoia e immerso nel liquido di governo, la concentrazione di sale tende a riequilibrarsi, dagli strati esterni, in cui la concentrazione è molto alta, il sale migra verso gli strati interni. Il liquido di governo è generalmente costituito da una soluzione acidula contenente il 2-3% di cloruro di sodio. Poiché la concentrazione di sale nelle zone superficiali è più alta di quella nel liquido di governo, si attiva un processo di migrazione del sale dal formaggio al liquido di governo., è quindi possibile che durante la conservazione del formaggio nel liquido di governo, il livello di sale si abbassi eccessivamente provocando lo sfaldamento del formaggio. Un altro inconveniente, che può verificarsi è l'eccessiva migrazione dell'acqua che per osmosi si muove dal formaggio alla soluzione salina. con conseguente perdita di resa ed aumento di consistenza.

Dopo la salagione, la mozzarella viene conservata nel liquido di governo, costituito da acqua di filatura a cui viene aggiunto sale e siero acido diluito. Nel periodo estivo, la composizione del liquido di governo viene modificata anche in funzione della destinazione del prodotto e del periodo di permanenza sul mercato. Per limitare le fermentazioni nel liquido di governo, nel caso in cui si prevedono periodi lunghi di giacenza, viene utilizzata acqua tamponata a pH sub-neutro, circa 1 litro per chilogrammo di formaggio

1.15 La Bufala Mediterranea Italiana ed il processo selettivo

Il Libro Genealogico della specie bufalina fu istituito con Decreto Ministeriale il 23 Giugno 1980 mentre l'Associazione Nazionale Allevatori Bufalini fu costituita l'anno precedente, nel 1979, e riconosciuta nel 1994 dal Ministero delle Politiche Agricole e Forestali. La gestione del Libro Genealogico, tuttavia è stata appannaggio dell'AIA fino all'anno 2000 quando, con il D.M. 20154 del 11 Febbraio 2000, Il Ministero delle politiche Agricole e Forestali ne trasferì la competenza direttamente all'ANASB. In quello stesso anno un altro decreto (D.M. 201992 del 5 Luglio 2000) molto importante ai fini della valorizzazione della Bufala italiana ne riconosceva la unicità di razza per tutti i soggetti iscritti al L.G. e da allora denominata Bufala Mediterranea Italiana.

Ad oggi il patrimonio nazionale bufalino censito ammonta a 355.390 capi distribuiti in 2.923 allevamenti (Dati AIA, 2007), con un numero medio di capi in allevamento pari a 56. L'area di produzione della mozzarella DOP, Campania Lazio e Puglia, detiene il primato sia in termini di aziende che di capi presenti sul territorio. Spicca la regione Campania tra le altre, con il 71,5% dei capi allevati sul totale nazionale e con il 56% circa delle aziende. In totale e l'area del DOP comprende circa il 90% dei capi allevati nell'80 % delle aziende.

La Lombardia, invece, è la regione fuori area D.O.P. che possiede il maggior numero di capi e di allevamenti, rispettivamente il 43% ed il 32% sul totale dell'area extra DOP (Tab. 8). Anche il numero di capi/allevamento è più elevato nelle 3 regioni del comprensorio DOP con una media di 133 a fronte dei circa 62 capi/allevamento calcolato in media sul totale dei capi allevati nelle altre regioni. Da segnalare il riscontro del dato medio di capi/allevamento della regione Sardegna, decisamente elevato rispetto a quelli riportati per le altre regioni extra DOP e il riscontro di realtà locali di aziende di elevata numerosità nelle varie regioni, quali Piemonte, Lombardia, Calabria e Sicilia.

La percentuale di capi sottoposti a controllo funzionale da parte dell'ANASB è pari al 12,5%, per un totale di 44.430 capi distribuiti in 290 aziende, ovvero circa il 10% del totale (dati ANASB 2007).

Nell'area del DOP sono dislocati l'80% dei capi controllati ANASB, suddivisi in un'analoga percentuale di aziende. Mentre la percentuale di capi controllati nelle regioni Lazio e Puglia risulta più elevata della media nazionale, spicca il dato in difetto registrato in Campania in cui il numero dei capi controllati è di solo 8.4%.

Tabella 8: Dati nazionali di allevamenti e capi bufalini controllati e non controllati.

REGIONI (31/10/2008)	capi	allevamenti	Numero medio di capi/allevamento	Capi controllati ANASB	Allevamenti controllati ANASB	% Capi cotrollati	% Allevamenti controllati	Numero medio di capi/allevamento controllati
Piemonte	2.709	47	58	879	2	32,4	4,3	439,5
Valle D'Aosta	0	0		0	0			
Lombardia	12.354	153	81	3.349	15	27,1	9,8	223,3
Trentino Alto Adige (BZ)	10	1	10	0	0			
Trentino Alto Adige (TN)	0	0		0				
Venezia	2.238	48	47	796	5	35,6	10,4	159,2
Friuli Venezia Giulia	1.546	25	62	531	5	34,3	20,0	106,2
Liguria	20	3	7	0	0		0,0	
Emilia Romagna	1.175	34	35	301	5	25,6	14,7	60,2
Toscana	1.125	23	49	221	3	19,6	13,0	73,7
Umbria	160	11	15	0	0		0,0	
Marche	656	30	22	139	2	21,2	6,7	69,5
Lazio	64.271	757	85	13.736	120	21,4	15,9	114,5
Abruzzo	54	6	9	0	0			
Molise	1.257	21	60	320	6	25,5	28,6	53,3
Campania	254.030	1.632	156	21.317	105	8,4	6,4	203,0
Puglia	8.607	67	128	1.989	12	23,1	17,9	165,8
Basilicata	2.107	21	100	283	4	13,4	19,0	70,8
Calabria	1.056	22	48	141	2	13,4	9,1	70,5
Sicilia	979	15	65	191	3	19,5	20,0	63,7
Sardegna	1.036	7	148	237	1	22,9	14,3	237,0
TOTALI	355.390	2.923	62	44.430	290	12,50	9,92	153,21

Fonte: Dati ANSAB 2008

Il numero dei capi sottoposto a controllo dall'ANASB è ancora al di sotto di quello registrato nel mondo bovino, se si considera ad esempio la razza Bruna, il cui libro genelogico è stato istituito nel 1991 e che ad oggi registra il 21% di vacche controllate sui capi in totale presenti in Italia. Tuttavia, dai dati della tabella 8 emerge che le aziende sottoposte a controllo sono quelle con una media di capi presenti consistentemente più alta rispetto alla media nazionale, e questo è vero in generale sull'intero territorio, a testimonianza di una realtà allevamento

ancora sotto molti aspetti multiforme e non sempre pronto a recepire innovazioni che una spinta maggiore alla selezione in genere richiede.

I piani di selezione della specie bufalina hanno come obiettivo la produzione di soggetti di buona mole, statura e peso, di costituzione robusta e di corretta morfologia, precoci per lo sviluppo e la produttività, fecondi e longevi, con attitudine alla produzione di latte non disgiunta dal rapporto proteine/grasso ed alla produzione di grasso (art.1, cap. I del Disciplinare ANASB: Norme e tecniche di selezione). L' A.I.A ha iniziato nel 1977 i controlli funzionali ufficiali per la specie; da allora gli allevatori hanno incrementato la produzione scartando i capi meno produttivi, migliorando il management e adottando la doppia mungitura. La produzione media nazionale è aumentata di circa 600 kg/lattazione fino ad arrivare alla attuale media produttiva riportata per i capi controllati per il 2007 di kg 2211 mentre e la percentuale di grasso e proteine è passata da 6,4% e 4,2 % riportato nel 1974 da Ferrara e Intriери rispettivamente a 8,18% e 4,66% rispettivamente (Fonte: A.N.A.S.B, 2007). L'obiettivo prioritario della selezione è quello di ottenere bufale che producano una maggiore quantità di mozzarella ed un latte con un resa elevata. Attualmente, gli indici genetici utilizzati per la bufala mediterranea italiana prendono in considerazione solo parametri esclusivamente produttivi. I dati di partenza per l'elaborazione sono quelli anagrafici estratti dalla Banca Dati Centrale dell'ANASB, e quelli di lattazione provenienti dalla Banca Dati AIA dei Controlli Funzionali.

Selezionare significa scegliere gli animali da utilizzare come genitori della futura progenie facendo in modo che essi abbiano un valore genetico superiore alla media della popolazione di riferimento, cosicché la media del valore genetico e delle produzioni della loro progenie risulti migliore della media della popolazione di partenza. L'indice genetico stima quello che non può essere direttamente misurato (il genotipo) a partire da un dato misurabile (il fenotipo: latte prodotto, kg di proteine, etc.). L'indice va interpretato come l'attitudine del soggetto a trasmettere potenzialità produttiva alla sua discendenza fornendo una previsione di quanto essa potrà risultare utile ai fini della selezione.

Per la bufala sono utilizzati indici genetici che sono il frutto di valutazioni effettuate con il metodo Blup-Animal Model, la metodologia più avanzata ed efficace nel campo della valutazione genetica animale, per i seguenti caratteri:

É Produzione di formaggio mozzarella in chilogrammi (PKM) Produzione di latte in chilogrammi;

ÉProduzione di grasso in chilogrammi;

ÉProduzione di grasso in percentuale;

ÉProduzione di proteine in chilogrammi;

ÉProduzione di proteine in percentuale.

Gli indici si basano su lattazioni chiuse e aperte la cui lunghezza va da 120 a 700 giorni. Tutte le produzioni sono state proiettate a 270 giorni di lunghezza eliminando quelle che presentavano un valore superiore ai 60 quintali. I valori di ereditabilità utilizzati per la stima del valore genetico degli animali variano tra 0.18 e 0.14, leggermente più bassi se paragonati a quelli utilizzati per la bovina da latte.

L'obiettivo primario della selezione, definito dalla competente Commissione Tecnica Centrale dell'ANASB, è l'aumento della produzione di mozzarella, unitamente al miglioramento sia della quantità sia della qualità del latte, e viene espresso nell'indice di selezione PKM.

Questo indice è stato stimato a partire dalla produzione dei chilogrammi di mozzarella nella singola lattazione, produzione ottenuta a partire dai chilogrammi di latte e della percentuale di grasso e proteine secondo l'algoritmo:

Mozzarella (kg.) = Latte (kg.) x	$3.5 \times (\% \text{ proteine}) + 1,23 (\% \text{ grasso}) \div 0.88$
	100

Studi (Zicarelli, 2004) hanno dimostrato che è possibile ritrovare nell'ambito della razza "Bufala Mediterranea Italiana" soggetti con una resa in coagulo che varia, a parità di composizione chimica del latte, di distanza dal parto e di dieta, tra il 22% e il 30% e di conseguenza un latte in cui il grammo di proteine fornisce rispettivamente 57 vs 53 g di coagulo.

La formula di calcolo del PKM, quindi, non sembra risultare altrettanto attendibile per il latte individuale. Confronti effettuati con la resa reale alla caseificazione hanno mostrato valori talvolta uguali ma spesso notevolmente superiori o talvolta inferiori a quella calcolata su base della suddetta formula.

Sarebbe, pertanto auspicabile una conferma più recente dell'algoritmo utilizzato per valutare la resa del latte poiché uno dei rischi potrebbe essere quello di selezionare le bufale in

funzione della composizione chimica del loro latte piuttosto che per la loro attitudine casearia.

Recentemente nei piani selettivi della Bufala Mediterranea Italiana è stata introdotta una nuova metodologia di valutazione morfologica che ha sostituito la vecchia basata su criteri di misurazione qualitativi piuttosto che quantitativi come l'attuale, che consentirà, a breve termine ed in analogia con quanto già accade per la specie bovina, di poter calcolare indici genetici per alcuni parametri morfologici direttamente o indirettamente coinvolti nella determinazione del merito economico del soggetto. Circa la metà dei parametri che entrano a far parte della nuova scheda di valutazione morfologica lineare costruita per la Bufala mediterranea Italiana sono atti a valutare dimensione e conformazione della ghiandola mammaria sia per permettere di ottenere strutture ghiandolari di dimensioni maggiori sia per poterla ottimizzare in funzione dei requisiti richiesti dalla tecnologia di mungitura meccanica. Gli studi riguardanti la struttura della mammella della bufala sono stati condotti negli ultimi tre anni soprattutto su soggetti di razza Murrah (Thomas et al., 2004; Thomas et al., 2005; Thomas et al., 2006) che è differente sia per morfologia che per livelli produttivi dalla razza italiana. Gli studi hanno dimostrato che la bufale Murrah hanno cisterne di piccole dimensioni, una lunghezza del canale del capezzolo maggiore di quello della bovina, e più lungo nei capezzoli posteriori rispetto agli anteriori. Il latte contenuto nella cisterna costituisce solo il 4,9% del latte totale ed il periodo di latenza media per l'inizio della secrezione di latte è di circa 25 secondi e correlato negativamente con la quantità di latte prodotto. L'unico studio espletato sulla razza Italiana riporta una dimensione per la cisterna variabile tra 75 e 220 cm³ ed un volume del parenchima ghiandolare variabile tra 3000 e 4000 cm³ (Borghese, 2007).

La struttura della mammella è in stretta relazione con il parametro mungibilità. La mungibilità viene definita come l'attitudine dell'animale a cedere in modo regolare, completo e rapido il latte secreto dalla ghiandola mammaria, in risposta all'applicazione di una corretta tecnica di mungitura (Frigo et al., 2008). Attualmente la mungibilità viene rilevata come parametro qualitativo alla colonna 31 della scheda di valutazione morfologica e definita come veloce, normale o lenta. La mungibilità per la bufala viene rilevata direttamente dal mungitore durante la normale routine di mungitura, senza l'ausilio di alcuna apparecchiatura. Nella specie bovina già da qualche anno, la mungibilità è, invece, entrata a far parte degli indici genetici di alcune razze, utilizzando una misurazione di tipo quantitativo.

1.16 La mungibilità

Una miglior mungibilità si traduce in tempi di mungitura più brevi con conseguenti minori costi di manodopera, minor utilizzo degli impianti a cui consegue una minor usura e un risparmio in termini energetici. Inoltre, la mungibilità ha un importante effetto anche su aspetti di tipo sanitario, che in ultima analisi si riflettono sulla longevità (Degano, 2005).

I fattori che possono influenzare la mungibilità possono essere intrinseci ed estrinseci

Fattori intrinseci dell'animale; possono essere ad esempio, la capacità di rilascio dell'ossitocina da parte dell'ipofisi e la forma dei capezzoli. Questo tipo di fattori sono suddivisibili in due componenti: quella genetica e quella ambientale (permanente o temporanea). La componente permanente fa parte delle caratteristiche intrinseche dell'animale e si manifesterà quindi per tutta la durata della sua carriera, mentre quella temporanea è maggiormente legata a fenomeni casuali come ad esempio una mastite in lattazione o stress temporanei;

Fattori estrinseci dell'animale come; le condizioni di allevamento, la funzionalità dell'impianto e l'operatività dei mungitori. È chiaro che una migliore mungibilità porti a tempi di mungitura minori e tempi di sollecitazione meccanica degli sfinteri papillari meno prolungati (Frigo et al., 2008)

Con dei moderni misuratori di flusso è possibile raccogliere molti dati che la semplice operazione di misurazione della durata di mungitura e quantità di latte prodotto non sono in grado di offrire. La possibilità di utilizzare dati prima non disponibili apre la strada a nuove conoscenze, si può pensare ad un concetto di mungibilità più ampio, che tenga cioè presenti le differenze tra animali, non solo in termini di durata di mungitura, ma per i diversi parametri della curva d'emissione del latte ed i loro legami con gli aspetti morfologici e produttivi (Bagnato et al., 2003a).

L'impiego dei lactocorder ha consentito di effettuare una serie di studi volti a stimare il valore dell'ereditabilità per alcuni parametri della curva di flusso. Santus e Bagnato (1998) hanno trovato valori di ereditabilità pari a 0,21 per la velocità massima di emissione e di 0,14 per la fase di plateau con una correlazione genetica tra loro di -0,65, il che indica che un elevato picco di flusso è seguito da una più rapida discesa, associazione estremamente favorevole e che consente di intravedere buone possibilità di implementare un piano di selezione per i parametri di mungitura. Sono state ricercate anche eventuali correlazioni tra parametri morfologici della mammella e le varie fasi dei diagrammi di flusso. Bagnato et al.,

(2003a,b) hanno messo in evidenza relazioni dirette tra flusso e/o le varie fasi della curva di mungitura e struttura della mammella espressi come punteggio lineare ed è stata trovata, inoltre, una correlazione tra punteggio complessivo nella valutazione morfologica dell'apparato mammario e flusso medio di emissione del latte. Inoltre è stata trovata relazione tra velocità di mungitura e caratteristiche microbiologiche del latte in termini di contenuto in cellule somatiche (Bagnato et al., 2003b).

1.17 Il flusso del latte alla mungitura

La mammella nei bovini è composta di quattro ghiandole funzionalmente separate, ciascuna dotata di un proprio tessuto secernente e di una propria cavità cisternale e capezzolo. Nell'intervallo tra due mungiture, il latte secreto si accumula negli alveoli e una quantità di latte man mano crescente si accumula nei dotti mammari e nella cisterna immediatamente dopo la mungitura (Bruckmaier, 1988; Peaker, e Blatchford. 1988).

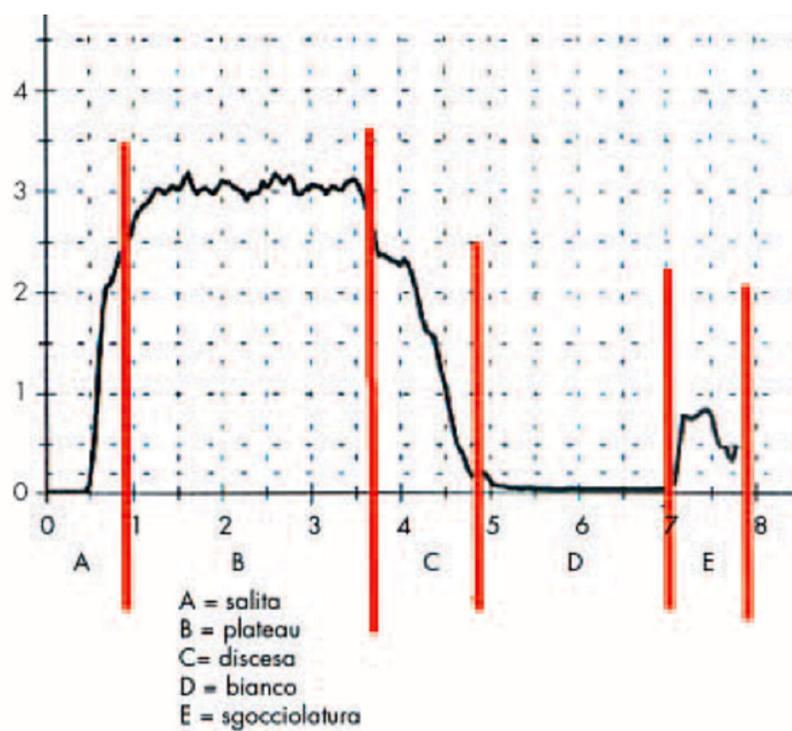
La quantità di latte accumulato aumenta con l'aumentare dell'intervallo tra le mungiture. Il latte contenuto nella mammella è diviso in due frazioni: quella cisternale e quella alveolare. La frazione cisternale è contenuta nel canale del capezzolo, nella cisterna della ghiandola e nel dotto lattifero principale. Questo latte può essere rimosso superando la barriera dello sfintere del capezzolo. La frazione alveolare è contenuta nei dotti secondari e negli alveoli. Questo latte è trattenuto da forze capillari ed è rimosso in seguito ad espulsione forzata nella cisterna con un meccanismo attivo definito emissione del latte. Durante il corso della lattazione, la frazione cisternale decresce, la frazione alveolare, comunque rappresenta la maggior parte del latte contenuto nella mammella, perciò sincronizzare l'eiezione del latte alveolare e la sua rimozione dalla mammella è essenziale ai fini di una mungitura rapida e completa.

Il processo di flusso del latte si divide essenzialmente in tre fasi: fase di aumento, fase di plateau con il massimo del flusso e fase finale, di diminuzione comprendente la fase di mungitura in bianco e di sgocciolatura (Fig. 1). In tutte le fasi il flusso di latte è influenzato da diversi fattori fisiologici ed anatomici.

La fase di salita caratterizza il processo di mungitura fino al raggiungimento del plateau. Essa viene determinata soprattutto dall'inizio di una stimolazione meccanica relativa all'inizio della mungitura. Con una prestimolazione più lunga (60-90 s) l'eiezione del latte all'inizio della mungitura è già cominciata ed aumenta rapidamente, passando poi immediatamente alla fase plateau, in cui si ottiene la maggior parte del latte. La distribuzione del latte nei quarti, ma anche la velocità di eiezione, svolgono un ruolo significativo nella durata della fase di plateau e nel suo passaggio alla fase di diminuzione. La fase di plateau è terminata appena i singoli quarti rilasciano il loro flusso di latte massimo.

La fase finale, comprende la fase di discesa, di mungitura in bianco e di sgocciolatura. Il passaggio dalla fase di discesa alla mungitura in bianco avviene quando il flusso raggiunge un valore minimo di 150-200 g/min

Figura 1: Curva di emissione del latte suddivisa nelle varie fasi



(Fonte: La Razza Bruna, n.1(2003))

1.18 Il lactocorder

Il LactoCorder è uno strumento adattabile a qualsiasi tipo d'impianto nato con lo scopo di migliorare la routine di mungitura che oltre a misurare la quantità di latte prodotto è in grado di registrare l'andamento del flusso durante tutta la mungitura (Cavalchini 2007).

Figura 2: Un lactocorder in sala di mungitura



Il lattoflussometro rileva il flusso di latte in uscita dalla mammella, a intervalli di tempo regolari di 2.8 secondi (valore che rappresenta la media di 4 intervalli di misura consecutivi di 0,7 secondi) fornendo sia il grafico della curva di emissione del latte (Fig. 1), che una serie di parametri numerico descrittivi della stessa. Tra le variabili si ricorda:

ÉTS: Durata della fase di salita, dalla prima emissione di latte a quando si registra un flusso superiore ai 0.5 kg/min.

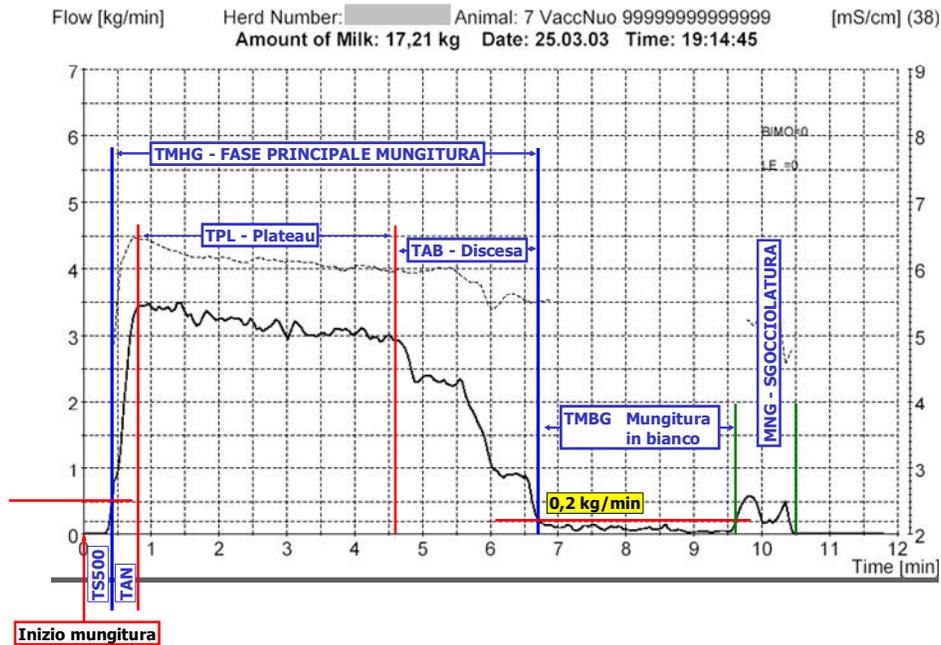
ÉFP: Flusso massimo raggiunto durante la misurazione e mantenuto alla meno per 9 secondi

ÉTPL: La durata della fase di plateau è il tempo che intercorre tra il momento in cui il flusso diventa costante e quando inizia a diminuire.

ÉTD: Durata della fase di discesa, dalla inizio della diminuzione del flusso a quando questo scende sotto i 0.5 kg/min.

ÉFM: Il flusso medio è il flusso medio di latte durante la fase principale di mungitura
 É DFP: La durata della fase principale di mungitura è il tempo che intercorre tra il superamento dei 0,5 Kg/min e la ridiscesa sotto tale soglia (Bagnato et al., 2003).
 Il tempo è misurato in minuti ed è visualizzato sull'asse delle ascisse, il flusso di latte (kg/min) sulle ordinate di sinistra mentre la conducibilità (mS/cm, millisiemens al centimetro) sulle ordinate di destra (Fig. 1).

Fig. 3: Curva tipica di emissione latte



Dai grafici di rilascio (Fig.2) del latte esiste una grande variabilità nella forma e, quindi, nella modalità, di rilascio del latte durante la mungitura. Alcuni animali rilasciano molto latte in tempi brevi, altri mostrano un rilascio del latte più costante e più limitato. In termini diversi, i primi hanno un flusso massimo molto elevato ed un tempo di plateau ridotto, mentre i secondi hanno un flusso massimo più contenuto ed un tempo di plateau più lungo.

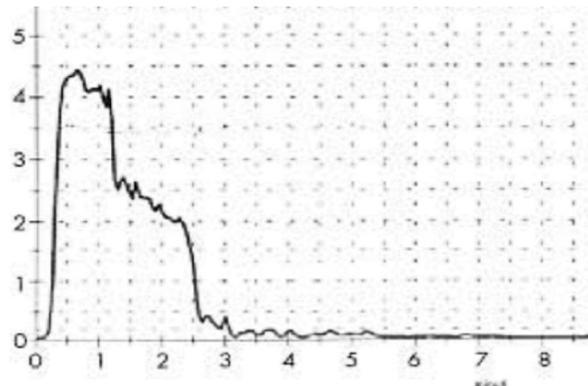
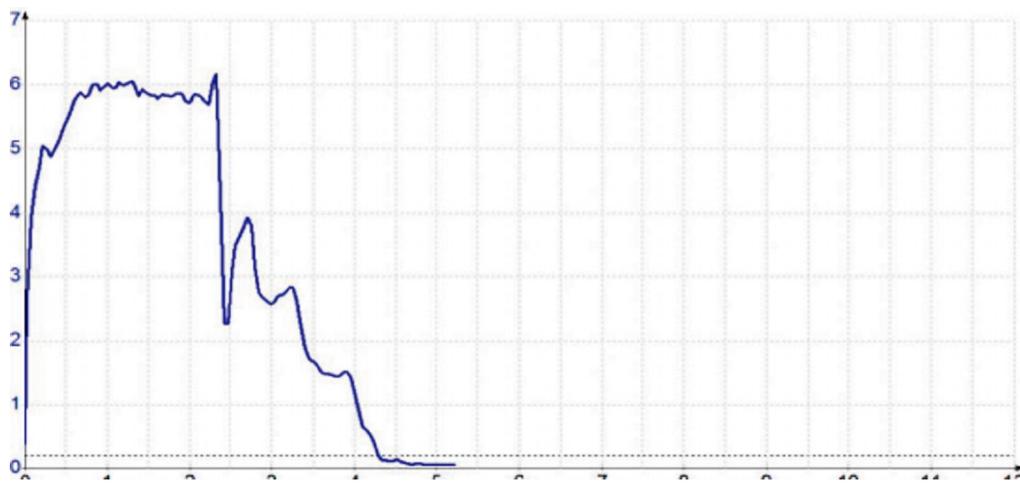


Figura 4: Curve di emissione differenti: a = FP alto e TPL breve;
b = FP basso e TPL lungo

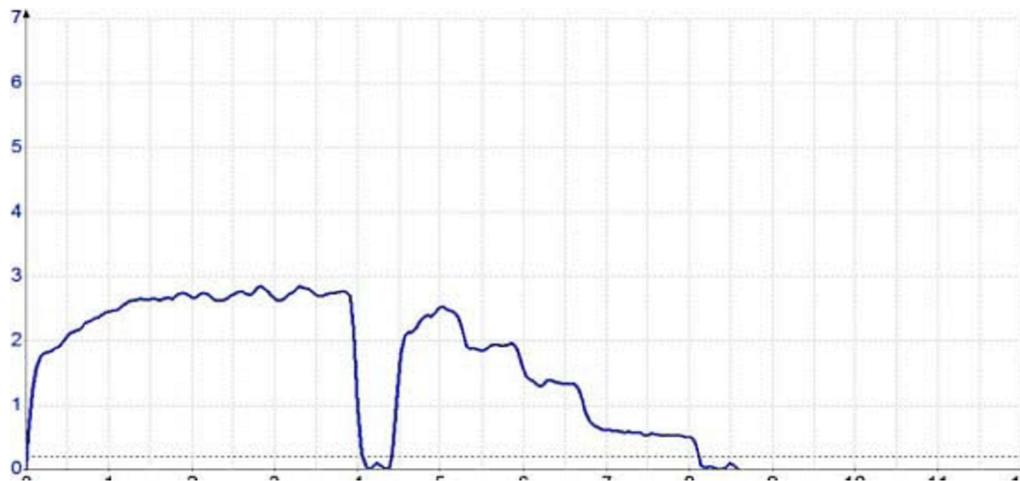
Dall'andamento delle curva di flusso inoltre è possibile notare le repentine fluttuazioni che sono spesso in vario modo collegate a flussi retroversi di latte e pertanto particolarmente insidiose, quali l'ingresso d'aria a 140 secondi con crollo del vuoto nel collettore e conseguente repentino calo del flusso (fig. 5) e caduta del gruppo (fig. 6) o situazioni di sovramungitura limitata a parte della mammella o a singoli quarti. Di norma la prima situazione è legata ad un posizionamento del gruppo che non permette una corretta distribuzione dei pesi sui quattro quarti, il che determina un più veloce svuotamento di alcuni rispetto ad altri. Ciò può avvenire tipicamente in alcuni impianti di mungitura a poste parallele nei quali il gruppo, ove non vengano prese opportune contromisure, tende a caricarsi più sui quarti anteriori rispetto ai posteriori. Lo sfasamento nello svuotamento può essere anche causato dalla diversa produzione dei quarti di norma legata a fenomeni mastitici pregressi. animali (Nocetti M. 2004).

Figura 5: Esempi di repentine fluttuazioni di flusso



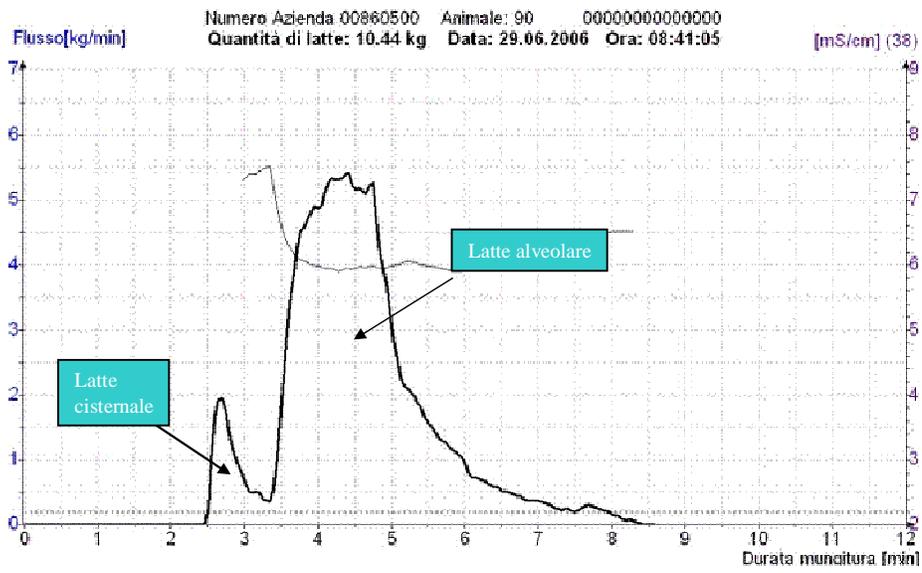
Fonte: Apa Modena

Figura 6: Esempio di caduta del gruppo



La bimodalità è una delle più frequenti anomalie delle curve di emissione del latte; essa consiste nella presenza di due picchi di emissione, dovuti all'eiezione ritardata del latte alveolare rispetto all'eiezione del latte della cisterna mammaria. La bimodalità è causata, in genere, da errori nella preparazione degli animali alla mungitura, per mancata tempestività dello stimolo tattile sui capezzoli che, tramite un riflesso neuroendocrino, consente l'eiezione del latte alveolare.

Figura 7: Curva di flusso bimodale



1.19 Bibliografia

- 1) Addeo F., Chobert, J.-M. e Ribadeau-Dumas B.,. Fractionation of whole casein on hydroxyapatite. Application to a study of buffalo α -casein. *Journal of Dairy Research* (1977); 44, 63-68.
- 2) Addeo F., Emaldi, G. e Masi, P., Tradition and innovation in the δ Mozzarella di Bufala Campana cheese δ production. *Proceedings of the International Symposium on Buffalo Products*, Wageningen Press, The Netherlands (1996); 23-40.
- 3) Addeo F., Moio L., Chianese L. e Nota G., Evaluation of bovine and water buffalo milk in mixtures of liquid milk and mozzarella cheese by gel isoelectric focusing. *Italian Journal Food Science*, (1989); 3 :71-80.
- 4) Addeo, F., Pelissier, J. P. e Chianese, L., *Journal of Dairy Resarch*, (1980); 47: 421-426.
- 5) Albd El-Salam M.H.Problem and opportunities in processing buffalo milk. XXIII International Dairy Congress. (1990); 1: 397-411
- 6) Altiero, V., Moio, L. e Addeo, F.. Previsione della resa in mozzarella sulla base del contenuto in grasso e proteine del latte di bufala. *Scienza e tecnica lattiero-casearia*, (1989); 40, 4: 425-433.
- 7) Annibaldi S., Ferri G., Mora R.. Nuovi orientamenti nella valutazione tecnica del latte: tipizzazione lattodinamografica. *Sci. Tecn. Latt.-cas.*, (1977); 28, 115-126.
- 8) Aschaffenburg R. Review of the progress of diary science. Section G. Genetic variants of milk proteins: Their breed distribution. *J. Dairy Res.* (1968); 35, 447-460.
- 9) Aschaffenburg R., Drewry J.. Occurrence of different betalactoglobulins on cow δ milk. *Nature* (1955); 176, 218-219.
- 10) Aschaffenburg R., Drewry J..Genetics of the β -Lg on cow δ milk. *Nature* (1957); 180, 376-378.
- 11) Bagnato A., Rossoni A., Ghiroldi S.,Curve d δ emissione del latte: nuove frontiere per la mungibilit δ La razza bruna (2003a); n. 2.
- 12) Bagnato A., Rossoni A., Maltecca C., Vigo D., Ghiroldi S Milk emission curves in different parities in Italian Brown Swiss cattle, *Italian J. Anim, Sci*, 2 (2003b); supp.1:46-48.

- 13) Bevilacqua C., Ferranti P., Garro G., Veltri C., Lagonigro R., Leroux C., Pietrola E., Addeo F., Pilla F., Chianese L., Martin P.. Interallelic recombination is probably responsible for the occurrence of a new alpha(s1)-casein variant found in the goat species. *Eur J Biochem.* Feb (2002); 269(4): 1293-303.
- 14) Brignon G, Ribadeau Dumas B, Mercier J-C, Pe´lissier JP, Das BC. Complete amino acid sequence of bovine alpha s2-casein. *FEBS Lett* (1977);76:274-69.
- 15) Bruckmaier R.M. Untersuchungen u¨ber Ocytocinfreisetzung, Intramamma¨rdruck und Milchabgabe beim Rind unter besonderer Beru¨cksichtigung des Laktationsstadiums sowie von Einflu¨ssen des adrenergen Systems, Agricultural Thesis, Technical Univ, Munich, Germany (1988).
- 16) Caroli A., Bolla P., Budelli E., Barbieri G., Leone P.. Effect of k-casein E allele on clotting aptitude of Italian Friesian milk. *Zoot. e Nutr. Anim.*, (2000); 26,127-130.
- 17) Cavalchini A.G. La mungitura, tecnologia, scelta e gestione degli impianti (2007); 156
- 18) Chianese L., Caira S., Iilla S., Pizzolongo F., et al. Primary structure of water buffalo alpha-lactalbumin variants A and B; *Dairy res.* (2004); 71:14-19.
- 19) Corradini C., *Chimica e tecnologia del latte, tecniche nuove*, (1995).
- 20) Cross K. J., Huq L. N., Palamara J. E., Perich J.W., Reynolds E. C. Physicochemical Characterization of Casein Phosphopeptide-Amorphous Calcium Phosphate Nanocomplexes; *J. Biol. Chem.*, (2005); Vol. 280, Issue 15, 15362-15369.
- 21) [Dayal S](#), [Bhattacharya TK](#), [Vohra V](#), [Kumar P](#), [Sharma A](#).. Genetic polymorphism of alpha-lactalbumin gene in riverine buffalo; DNA seq. (2005); 16: 173-179.
- 22) Degano L Un nuovo modello per la valutazione genetica per la mungibilita¨. *Pezzata rossa Marzo* (2005); 17-19.
- 23) Di Palo R. Chieli F. Aggiunta in diete per bufale di saponi di calcio di acidi grassi a lunga catena: effetti su produzione e composizione del latte. *Bubalus Bubalis* (1995); anno 1- n° 2.
- 24) Di Stasio L., Mariani P.. The role of protein polymorphism in the genetic improvement of milk production. *Zoot. Nutr. Anim.* (2000); 26: 69-90.
- 25) Dziuba J, Minkiewicz P. Influence of glycosylation on micelle stabilizing ability and biological properties of C-terminal fragments of cow's k-casein. *Int Dairy J* (1996); 6:1017-644.

- 26) Eigel WN. Identification of proteose-peptone component 5 as a plasmin-derived fragment of bovine κ -casein. *Int J Biochem* (1981); 13:1081-66.
- 27) Ferranti P., Scalone A., Caira S., Chianese L., Malorni A., Addeo F.. the primary structure of water buffalo α 1- and β -casein: identification of phosphorylation sites and characterization of a novel β -casein variant; *Journal of Protein Chemistry* (1998); vol.17,8:835-843.
- 28) Ferranti, P., Chianese, L. e Addeo F. The primary structure characteristics of the buffalo caseins and analytical applications for the α 1-Mozzarella di Bufala Campana cheese genuineness defense. *Proceedings of the International Symposium on Buffalo Products*, Wageningen Press, The Netherlands (1996); 187-191.
- 29) Ferrara B., Intrieri F.. Caratteristiche ed impiego del latte di bufala. *Zoot. Vet.*, (1974); 1-2:14-125.
- 30) Ferretti L., Leone P., Sgaramella V.. Long range restriction analysis of the bovine casein genes. *Nucleic Acid Res.*, (1990); 18, 6829-6833.
- 31) Formaggioni P., Summer A., Malacarne M., Mariani P. Milk protein polymorphism: detection and diffusion of the genetic variants in BOS genus Università degli Studi di Parma. *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria*, (1999); Vol. XIX
- 32) Frigo E., Pedron O. Così si valuta il flusso di latte dai quarti. *Informatore zootecnico*, dossier qualità latte (2008); 9:45-49
- 33) Ganguli N.C. Physico-chemical make-up of buffalo milk in the standardization of techniques of handling, processing and manufacture of products. *XIX International Dairy Congress* (1974); 2:358-374
- 34) Gaucheron F. The minerals of milk. *Rev. Reprod. Nutr. Dev.* (2005); 45: 473-483.
- 35) Ginger M. R., Murray G.R. Confronto tra gli aspetti delle caseine del latte. *Dossier : Qualità del latte*. ANARB (2002)
- 36) Guadagno G., Bufali e mozzarelle attraverso i secoli, Caserta, (1990).
- 37) Holt C, Sawyer L. Primary and predicted secondary structures of the caseins in relation to their biological functions. *Protein Eng* (1988); 2:251-69.
- 38) Kiddy C.A., Mc Canne R.E., Wilson R.L.. Production characteristics of cows of different milk protein genetic types. *Proceedings 18th International Dairy Congress* (1970); IE 486.
- 39) Klose J.. Genotype e phenotypes: Electrophoresis. (1999); 20: 643-652.

- 40) Le Graete Y., Brulè G. Équilibres minéraux du lait: influence du pH et de la force ionique. *Lait*, (1993); 73: 51-60.
- 41) Leone P., Scaltriti V., Sangalli S., Caroli A., Pagnacco G.. Polimorfismo della k-caseina nei bovini: identificazione dell'allele E in torelli di razza Bruna e Frisona Italiana. *Proceedings 4th National Congress Biodiversity, Alghero, Italy*, (1998); 8-11 September
- 42) Lucey J. A., Johnson M. E., Horne D. S. Invited Review: Perspectives on the Basis of the Rheology and Texture Properties of Cheese *J. Dairy Sci.* (2003); 86:2725-2743.
- 43) Mariani P. Polimorfismo delle proteine ed attitudine tecnologico-casearia del latte . La razza bruna italiana n. 1(1999).
- 44) Mariani P., Serventi P., Fossa E. 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* (1997); n. 2.
- 45) Mariani P., Summer A., Formaggioni P., Malacarne M..La qualità casearia del latte di differenti razze bovine. *La razza bruna* (2002); n. 1
- 46) Mariani P.. Presenza di una terza k-caseina nel latte di vacche di razza Bruna. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, (1983); 34: 174-181.
- 47) Marletta D., Avondo M..Qualità delle produzioni lattiero-casearie e polimorfismi delle proteine del latte: Il contributo delle tecniche di biologia molecolare. *Tecnica Agricola*. (1996); 1.
- 48) Martini M., Spinelli, S. Scolozzi, C. e Cecchi, F. Atti II Congresso nazionale sull'allevamento del Bufalo .28-30 Agosto, (2003); 147-151.
- 49) Matassino D., Barone C. M. A., Colatruglio P., Zullo A., Mascia M. Polimorfismo proteico e caratteristiche quanti-qualitative del latte di bovini allevati nel Molise. *Composizione chimica. Dossier: Qualità del latte ANARB* (2002).
- 50) McLean D.M., Graham E.R.B., Ponzoni R.W., McKenzie H.A. Effect of milk protein genetic variants of milk yield and composition. *J. Dairy Res.* (1984); 51, 531-546.
- 51) Mercier JC, Grosclaude F, Ribadeau-Dumas B. Structure primaire de la caséine s1 bovine. Séquence complète. *Eur J Biochem* (1971); 23:41-51.
- 52) Mercier J.C., Brignon G., Ribadeau-Dumas B. Structure primaire de la casein k-B bovine: Sequenze complete. *Europ. J. Biochim.* (1973); 35: 222-235.

- 53) Miranda G., Anglade P., Mahè M.F., Erhardt G., Biochemical characterization of the bovine genetic κ -casein C and E variants. *Anim. Genet.* (1993); 24, 27-31.
- 54) Mitra A., Schlee P., Krause I., Blush J., et al. Kappa-casein polymorphisms in Indian dairy cattle and buffalo. A new genetic variant in buffalo; *Anim. Biotechnol.* (1998); 9:81-97.
- 55) Mordenti A. Formigoni A. Alimentazione delle bovine e proteine nel latte. *Scie. Tecn. Latt. Cas.* (1986); 37, 3, 222-247.
- 56) Müller-Buschbaum P., Gebhardt R., Roth S. V., Metwalli E., Doster W. Effect of Calcium Concentration on the Structure of Casein Micelles in Thin Films. *Biophys J.* August 1(2007); 93(3): 9606968.
- 57) Nocetti M. Emissione del latte e sanità della mammella. *Ermesagricoltura* (2004); supp. 24
- 58) Ng-Kwai-Hang K.F., Hajes J.F., Moxley J.E.. Environmental influence on protein content and composition of bovine milk. *J. Dairy Sci.* (1982); 65: 1993-1998.
- 59) Pilla A.M., Moioli B.M. Factors affecting fat percentage and fat/protein ratio in buffalo milk. *Proceedings of the International Symposium. EAAP Publication* (1992); 62: 238-241. International Center for Agriculture, Doki (Cairo), Egypt.
- 60) Peaker, M., and D. R. Blatchford. Distribution of milk in the goat mammary gland and its relation to the rate and control of milk secretion. *J. Dairy Res.* (1988); 55:411-448
- 61) Petrilli P., Chianese L. e Addeo F.. Buffalo κ -casein: isolation and characterization. *Journal of Dairy Research* (1979); 46: 231-233.
- 62) Ramunno L., Cosenza G., Rando A., Illario R., Gallo D., Di Bernardino D., Masina P. The goat α 1-casein gene: gene structure and promoter analysis. *Gene.* Jun 9 (2004); 334: 105-111.
- 63) Ramunno L., Rando A., Pappalardo M., Fiorella A., Di Gregorio P., Capuano M., Masina P.. Molecular analyses on quantitative alleles at goat κ -Cn and cow κ 1-Cn loci. *XXIX Simp. Int. Zoot., Milano* (1994); 233-240.
- 64) Ribadeau-Dumas B, Brignon G, Grosclaude F, Mercier JC. Primary structure of bovine κ -casein: complete sequence. *Eur J Biochem* (1972); 25:505-614.

- 65) Richardson, T., Oh, S., Jimenez-Florez, R., Kumasinski, T. F., Brown, E. M., e Farrel, H. M. Jr., , *Advanced Dairy Chemistry - I Proteins* (Fox, P. F., ed.) (1992); Elsevier, London, 545-578.
- 66) Salvadori Del Prato O. *Trattato di Tecnologia Casearia*. Edagricole, (1998)
- 67) Santus E., Bagnato A. *The World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, Proc 6th (1998); 25:19-22;
- 68) Schmidt D. G. *Neth. Milk Dairy J.* (1980); 34, 42.
- 69) Schmidt D.G. in *Development in Dairy Chemistry*. Appl. Sc. Publishing. (1982); London.
- 70) Swaisgood HE. *Chemistry of the caseins*. In: Fox PF, editor. *Advanced Dairy Chemistry*. London: Elsevier, (1992); 636110
- 71) Takeuchi M, Tsuda E, Yoshikawa M, Sasaki R, Chiba H. Post-translational modification of κ -casein in the Golgi apparatus of mid-lactating mammary gland from rat and cow. *Agri Biol Chem* (1984); 48:2789697.
- 72) Vaiman D., Marcier D., Eggen a., et al. A genetic and physical map of bovine chromosome 11; *Mamm. Genome* (1994); 5: 553-556.
- 73) Vohra V, Kumar Bhattacharya T, Dayal S, Kumar P, Sharma A.. Genetic variants of beta-lactoglobulin gene and its association with milk composition traits in riverine buffalo; *Journal of Dairy res.* (2006); 73: 499-503.
- 74) Zicarelli L.. Buffalo milk: its proprieties, dairy yeld and mozzarella production. *Veterinary research communications* (2004); 28:127-135.

2. Scopo della tesi

L'attività di questi tre anni di ricerca ha avuto come scopo quello di analizzare alcuni fattori che potessero essere utilizzati per ottimizzare il processo selettivo della Bufala Mediterranea Italiana volto al miglioramento della produzione di latte.

La prima parte della sperimentazione è stata finalizzata ad un approccio conoscitivo alla valutazione della mungibilità, parametro importante di selezione, in quanto collegato strettamente, come anche sopra ampiamente riportato, all'ottimizzazione della gestione della sala di mungitura e di tutte le routine ad esso collegate. Il problema della mungibilità è particolarmente sentito nella specie bufalina dove tempi di mungitura differenti tra gli animali possono costituire un aggravio di spesa non trascurabile per l'allevatore, che vede allungarsi i tempi di mungitura, con maggior dispendio di energia ed aumento del fabbisogno di mano d'opera, in termini di ore lavorative richieste, e aumentare le spese farmaceutiche per un impiego troppo diffuso di ossitocina sugli animali in lattazione. Non è escluso, inoltre, che tempi di mungitura differenti e differenti curve di flusso possano risultare correlate anche alla quantità di latte prodotto. È sembrato, pertanto, opportuno intraprendere una indagine conoscitiva che potesse servire a caratterizzare le curve di flusso in bufale primipare e pluripare, in bufale con risposta allo stimolo di mungitura normale ed in quelle che, per ritardo di risposta, necessitavano della somministrazione di ossitocina. Le metodologie ed i risultati sono illustrati nell'esperimento A.

Sempre al fine di migliorare i criteri selettivi della Bufala Mediterranea Italiana, lo studio si è poi rivolto alla ricerca di eventuali differenze nelle caratteristiche chimico fisiche di campioni individuali di latte in rapporto ai diversi fattori che possono essere coinvolti nella resa alla caseificazione. Ad oggi infatti il valore genetico del singolo animale è attribuito soprattutto in base all'indice PKM, che si fonda, come illustrato nella nota introduttiva, sul calcolo della produzione in kg di mozzarella, utilizzando un algoritmo che include solo la % di grassi e proteine del latte. La verifica che esistono altri fattori in grado di incidere maggiormente sulla resa del latte potrebbe indurre a modificare l'algoritmo ottenendo una migliore risposta selettiva.

Nell'esperimento B sono stati, pertanto, valutati i contenuti in calcio e fosforo del latte, quantificate le loro frazioni e verificato i rapporti con resa alla caseificazione e qualità del coagulo, in termini di comportamento reologico.

Una ulteriore indagine, condotta sempre sul latte, è stata volta all'approfondimento della conoscenza sulle proteine del latte di bufala considerando che l'attitudine del latte alla caseificazione è in stretta dipendenza con la componente proteica.

Le discrepanze trovate tra i valori di resa alla caseificazione di soggetti (Zicarelli et al, 2001) hanno dimostrato che utilizzando la formula di Altiero et al (1989), che calcola la resa tenendo conto del tenore in grasso e proteine del latte, è possibile individuare bufale che a parità di resa calcolata, e quindi di tenore lipoproteico del latte, presentano una resa reale più elevata o più bassa e di conseguenza un latte in cui il punto di proteine fornisce rispettivamente 57 vs 53 g di coagulo.

Si è quindi ritenuto opportuno tracciare un profilo delle proteine del latte al fine di costruire una mappa di riferimento per la Bufala Mediterranea Italiana e di verificare l'esistenza di variazioni di tale mappa in campioni ad alta vs bassa resa alla caseificazione. A tal fine si è reso indispensabile l'utilizzo di tecniche di analisi proteomica mediante l'uso di SDS-PAGE e 2SDS-PAGE e Bio-analizer automatizzati. Metodologie e risultati di questa sperimentazione sono riportati nell'esperimento C.

3. ESPERIMENTO A

I lactocorder

3.1 Scopo della ricerca

La differente morfologia della mammella ed il più basso livello produttivo della bufala rispetto alla vacca lasciano intuire l'esistenza di alcune peculiarità nella mungitura di questa specie che risultano senz'altro acute da un atteggiamento comportamentale che è definibile senz'altro molto più vigile e reattivo di quello riscontrabile nella bovina. È stato riportato in precedenza come la mungitura nella bufala presenti ancora alcune difficoltà, principalmente connesse con l'elevata percentuale di ritardi nella calata del latte che determina il frequente ricorso alla somministrazione estemporanea di ossitocina.

Differenze specie specifiche si riscontrano rispetto alla curva di flusso della bovina da latte, sulla quale sono stati settati i parametri della maggior parte degli impianti di mungitura. L'ideale sarebbe riuscire ad identificare parametri idonei a valutare la curva di emissione del latte ottimale per la bufala mediterranea italiana, che abbia caratteristiche di velocità elevata e l'assenza di relazioni negative con la composizione chimico-microbiologica del latte prodotto. Tuttavia, ad oggi gli studi sulla bufala in questo campo non sono molto numerosi ed in massima parte le ricerche inerenti le curve di emissione del latte sono stati effettuati su bufale di razza Murrah (Thomas et al., 2004a; Thomas et al., 2004b; Thomas et al., 2005; Sandrucci et al., 2005; Bava et al., 2007).

Lo scopo di questo studio preliminare è stato, pertanto, quello di verificare i parametri del flusso di eiezione latte in due mandrie di bufale Mediterranee Italiane e di analizzarli in funzione dell'ordine di parto, della somministrazione di ossitocina e della tipologia di curva di emissione ottenuta.

3.2 Materiali e Metodi

La ricerca è stata svolta in due aziende di bufale da latte site in provincia di Salerno. Per la prova sono stati raccolti un totale di 330 profili individuali di flusso di latte rilevati mediante misuratori di flusso elettronici (Lactocorder®) applicati a ciascun gruppo di mungitura. Il rilievo è stato effettuato durante le due mungiture, del mattino e della sera. Nelle due aziende le sale di mungitura erano di differente tipologia: a spina di pesce ed a tandem.

Ciascun animale, in entrambe le aziende, prima della mungitura, eseguita dagli operatori abituali, è stata sottoposta al lavaggio della mammella, mediante getto d'acqua e manipolazione, al termine del quale veniva applicato il gruppo di mungitura. Le bufale che mostravano un ritardo nella eiezione del latte hanno ricevuto una iniezione i.m. di ossitocina per favorire la discesa del latte.

Per ogni bufala sono stati raccolti tutti i dati inerenti le curve di flusso registrati dai Lactocorder (Sandrucci et al., 2007). Dal database dell'AIA (2007) sono stati desunti i dati inerenti l'ordine di parto di ciascun animale, la data del parto relativa alla lattazione in corso, al fine di ricavare il valore della distanza dal parto al momento del controllo ed in un secondo momento sono stati raccolti anche i dati inerenti la produzione di latte standard ed effettiva ottenuta nella lattazione in corso al momento della prova.

Le curve di flusso sono state esaminate per ogni singolo soggetto e sono state divise in base al loro andamento in: normale, bimodale e "doppio". Le prime due curve sono state descritte anche per la bovina (Bruckmaier et al, 1998) mentre la definizione di "andamento doppio" è stato creato in questo studio in seguito al rilievo dell'esistenza di alcune curve che hanno un pattern analogo a quello bimodale, ma che il sistema non legge come tale in quanto il flusso di latte iniziale non scende al disotto dei 500 g latte/min. come avviene per quelle definite

bimodali. Pertanto, la fase di salita presenta comunque un punto di flesso, ma il flusso risulta meno discontinuo rispetto ad una curva bimodale.

I parametri inerenti la curva di eiezione del latte: tot di latte prodotto (kg), flusso massimo di latte (kg/min), lag fase (min), fase principale di mungitura (min), fase di salita (min), fase di plateau (min), fase di discesa (min), fase di overmilking (min), flusso medio di latte (kg/min), latte prodotto nei primi 3 min (kg), sono stati analizzati mediante ANOVA con un modello che ha incluso l'ordine di parto (primipare n° = 139, pluripare n° = 191), l'azienda (2 livelli), il trattamento con ossitocina (no n°= 27 si n° = 303), il tipo di curva di flusso (normale n°=244, bimodale n°= 47, doppio n°=39) e, come covariata, il numero dei giorni di lattazione.

I dati inerenti la produzione di latte sono stati analizzati utilizzando un modello che includeva gli stessi fattori principali ma senza covariata. Tutte le analisi sono state effettuate utilizzando il software SPSS 15.0 (2007). I dati espressi in percentuale sono stati analizzati utilizzando il test del Chi quadro.

3.3 Risultati

La distanza media dal parto è risultata in media di 205 gg con valori simili tra primipare e pluripare. Nelle pluripare la produzione media di latte per mungitura (tab. 1A) è stata di 4,39 kg, significativamente più alta ($P < 0,01$) che nelle primipare (3,76kg), in ambedue i casi compatibile con i valori riportati in letteratura per soggetti ad analoga distanza dal parto. Nessuna differenza è emersa tra gli ordini di parto per il flusso massimo e nella lag fase mentre la fase principale di mungitura è risultata significativamente ($P < 0,01$) più lunga nelle pluripare, con un'analoga fase di salita nei due gruppi, un lieve aumento della fase di plateau (0,74 min vs 0,92 min) ed una maggiore durata della fase di discesa nelle pluripare (1,81 min vs 2,16min; $P < 0,05$). Quest'ultimo dato è in accordo con quanto ritrovato da Sandrucci et al.(2005) nella bovina anche se con valori di durata decisamente differenti.

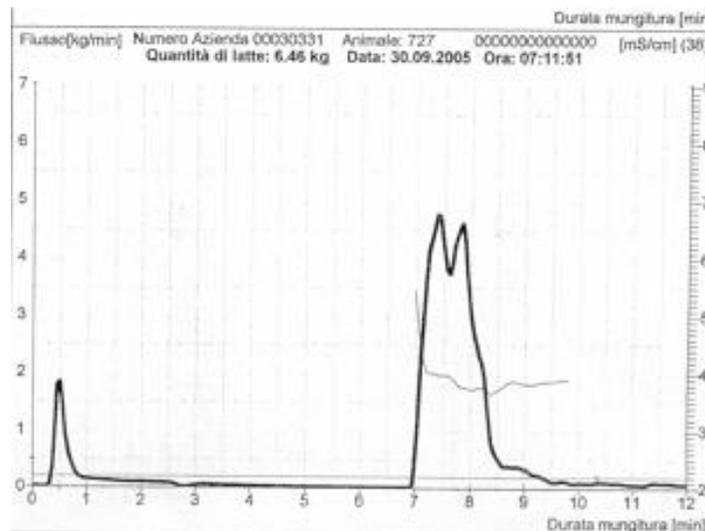
Il flusso medio di latte è risultato simile tra gli ordini di parto e pari a 0,88 kg/min per le primipare e 0,92 kg/min per le pluripare, valori più bassi di quelli ritrovati da Borghese et al. (2007) mediamente di circa 1,07 kg/min ma nettamente più elevati se confrontati con i dati di Thomas et al. (2006) per la bufala Murrah e pari a 0,26 kg/min.

La durata della fase di overmilking, invece, è stata più alta nelle primipare rispetto alle pluripare ($P < 0,01$).

Tab.1 A: Parametri di flusso per ordine di parto

	Primipare		Pluripare	
	Media	SE	Media	SE
Tot di latte prodotto (kg)	3,76 A	0,20	4,39 B	0,18
Flusso massimo di latte (kg/min)	1,84	0,09	1,97	0,08
Lag Fase (min)	1,15	0,13	1,19	0,11
Fase principale di mungitura (min)	4,25 A	0,21	4,73 B	0,18
Fase di salita (min)	1,70	0,12	1,66	0,11
Fase di plateau (min)	0,74	0,13	0,92	0,12
Fase di discesa (min)	1,81	0,17	2,16	0,15
Fase di overmilking (min)	5,93 A	0,40	4,77 B	0,35
Flusso medio di latte (kg/min)	0,88	0,05	0,92	0,04
Latte prodotto nei primi 3 min (kg)	2,41 a	0,17	2,74 b	0,15
Produzione standard (kg)	2485 A	46	2618 B	40

Il trattamento con ossitocina, non ha influenzato la produzione di latte e il flusso massimo di mungitura (Tab.2A), analogamente a quanto riportato da Bava et al. (2007). Come previsto, invece, la lag fase (Fig 1A) è risultata più alta nel gruppo trattato con ossitocina ($P < 0,01$).

Fig. 1B: Curva di soggetto trattato con ossitocina

Tab.2 A: Parametri di flusso in bufale trattate o non con ossitocina

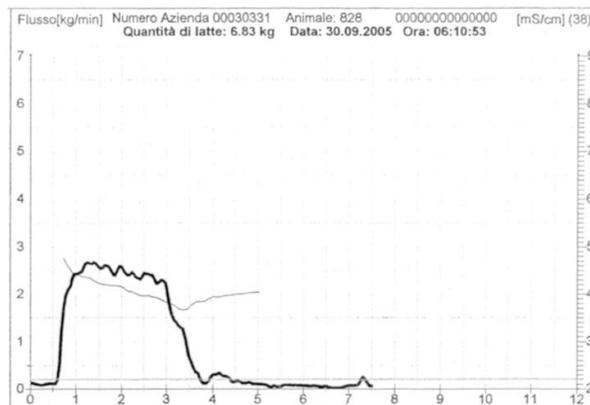
	Con ossitocina		Senza ossitocina	
	Media	SE	Media	SE
Tot di latte prodotto (kg)	3,98	0,29	4,16	0,12
Flusso massimo di latte (kg/min)	2,02	0,13	1,79	0,06
Lag Fase (min)	1,50 A	0,19	0,84 B	0,08
Fase principale di mungitura (min)	4,90 A	0,31	4,08 B	0,13
Fase di salita (min)	2,14 A	0,18	1,22 B	0,07
Fase di plateau (min)	0,60 a	0,19	1,06 b	0,08
Fase di discesa (min)	2,16 a	0,26	1,80 b	0,11
Fase di overmilking (min)	5,26	0,59	5,44	0,25
Flusso medio di latte (kg/min)	0,88	0,07	0,93	0,03
Latte prodotto nei primi 3 min (kg)	2,42	0,25	2,74	0,10
Produzione standard (kg)	2491	68	2611	28

Anche la fase principale di mungitura nel gruppo trattato, è risultata più elevata nei soggetti trattati e pari a 4,90 min vs 4,08 min del gruppo non trattato ($P < 0,01$). Tale aumento è risultato maggiormente influenzato dal netto allungarsi della fase di salita ($P < 0,01$) ed ad un più contenuto aumento di della fase di discesa ($P < 0,05$) mentre la fase di plateau è risultata più alta nei non trattati ($P < 0,05$). L'insieme di questi rilievi non trova riscontro in quanto riportato da Bava et al. (2007), che non hanno trovato nelle curve di mungitura di bufale trattate o meno con ossitocina alcuna differenza per questi parametri. Inoltre, a parità di stadio di lattazione e con una produzione di latte molto simile a quanto riscontrato nella nostra prova, i dati relativi alla fase di salita e di plateau risultano differenti da quanto riscontrato da altri autori (Bava et al., 2007) in bufale trattate o meno con ossitocina. Infatti, anche se la stimolazione degli animali in premungitura è stata simile nei due studi, nel nostro una più lunga fase di salita si è accompagnata ad un plateau della curva più breve di quello

riportato da Bava et al. (2007) mentre la fase di discesa è risultata sovrapponibile nei due studi.

Come descritto nei materiali e metodi, le curve di flusso sono state classificate in tre gruppi: normale, bimodale e doppio. La figura 2B mostra il profilo di curva di flusso normale, con andamento simile a quello della bovina, ma con valori medi dei vari parametri differenti come era da aspettarsi per la diversa produzione di latte tra le due specie. La produzione media di latte nelle bufale con curva normale è stata, infatti, di 3,58 kg nella bufala vs i 14,6 kg riportati da Sandrucci et al, (2005) nella bovina con valori del flusso massimo di 2,4 volte inferiori (1,62 kg/min vs 3,9 kg/min nella bufala e nella bovina rispettivamente) e una minor durata della fase di plateau di circa 2 volte (1,15 min vs 2,4 min nella bufala e nella bovina rispettivamente).

Fig.2A: Curva con profilo normale



La figura 3A rappresenta, invece, un tipo di curva bimodale caratterizzata dalla presenza di un doppio picco in cui il flusso tra i due picchi scende al di sotto dei 500 gr/min, cosa che non si verifica nel caso di profilo doppio in cui si ha solo un interruzione della fase di plateau (Figura 4A).

Fig. 3A: Curva con profilo bimodale

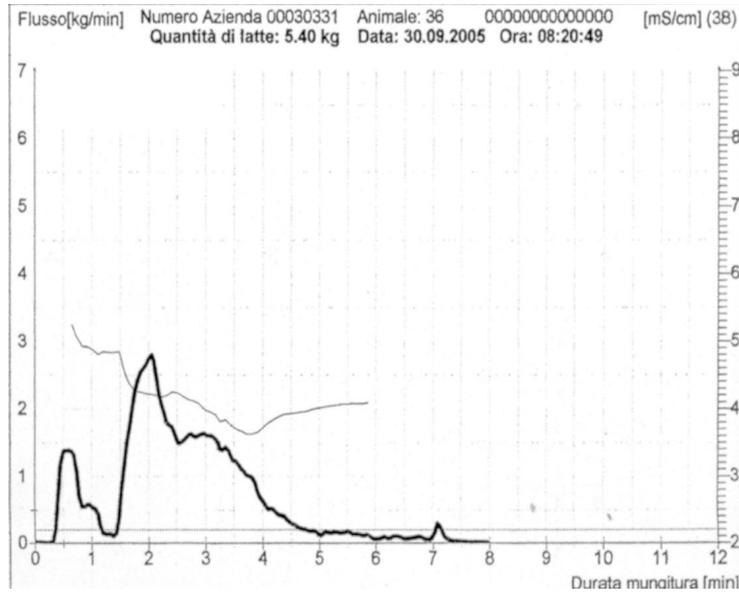
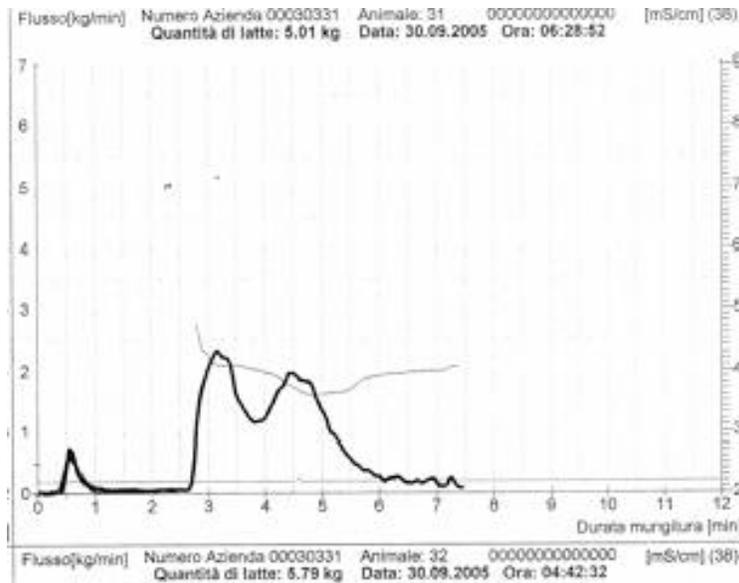


Fig. 4A: Curva con profilo doppio



La percentuale di curve con flusso bimodale è risultata pari a 13,7% valore simile a quanto riscontrato da Bava et al.(2007) in bufale ma inferiore a quanto riportato da Sandrucci et al, (2005) per la bovina. La percentuale di bimodalità è stata messa in relazione in questa specie

con le operazioni di pre-mungitura che influenzano il tempo del riflesso di eiezione del latte. Una preparazione pre-mungitura della mammella di 10-20 sec è ritenuta sufficiente a determinare un adeguata secrezione ossitocinica nella maggior parte delle bovine, indipendentemente dallo stadi di lattazione e dal livello produttivo (Cavalchini A. G., 2007). Prove sperimentali hanno verificato che un minuto di prestimolazione manuale produce ottimi risultati sull'eiezione del latte, sul picco di flusso, sul tempo di mungitura e sulla sgocciolatura. (Thomas et al. 2006), Inoltre nello studio di Tanc> in et al. (2006) si riporta la possibilità che operazioni di pre-mungitura possano influire sulla durata della fase di discesa. La percentuale di curve con flusso doppio è stata pari al 12,4%; se considerassimo anche queste curve come una sorta di bimodalità meno evidente e, quindi, non segnalata dal sistema, la percentuale totale di bimodalità corretta nella bufala risulterebbe aumentata al 26,1%, valore sovrapponibile a quella riportata per la bovina (Sandrucci et al, 2007).

Una maggiore percentuale di profili doppi, rispetto ai normali e bimodali è stata trovata, inoltre, nelle bufale trattate con ossitocina (rispettivamente 18,1% vs 8,1% e 7,5%; $P < 0,05$) e nelle pluripare vs primipare (16,5% vs 8,4,6% ; $P = 0,06$).

La produzione di latte e il flusso massimo sono risultati più elevati nei i soggetti con curve ad andamento bimodale e doppio rispetto alle bufale con curva di flusso normale a parità di giorni di lattazione (Tab, 3B), in contrasto con quanto registrato nella bovina (Sandrucci et al, 2005), in cui i soggetti con curva bimodale sono risultati i meno produttivi.

Tab, 3B: Parametri esaminati secondi i diversi diagrammi di flusso

	Normale		Bimodale		Doppia	
	<i>Media</i>	<i>SE</i>	<i>Media</i>	<i>SE</i>	<i>Media</i>	<i>SE</i>
Tot di latte prodotto (kg)	3,58 Aa	0,16	4,38 Bc	0,26	4,25c	0,25
Flusso massimo di latte (kg/min)	1,62 A	0,08	2,12 B	0,12	1,96 B	0,12
Lag Time (min)	1,24 Aa	0,11	1,18 b	0,17	1,09B	0,17
Fase principale di mungitura (min)	3,64 Aa	0,17	4,27Ab	0,27	5,56 B	0,27
Fase di salita (min)	0,73 A	0,10	1,85 B	0,16	2,47 C	0,16
Fase di plateau (min)	1,15 Aa	0,11	0,75 b	0,17	0,58 Bb	0,17
Fase di discesa (min)	1,76 A	0,14	1,67 A	0,23	2,51 B	0,22
Fase di overmilking (min)	4,81	0,33	5,42	0,53	5,81	0,52
Flusso medio di latte (kg/min)	0,96 A	0,04	1,01 A	0,07	0,73 B	0,06
Latte prodotto nei primi 3 min (Kg)	2,85 A	0,14	3,10 A	0,22	1,79 B	0,22
Produzione standard (kg)	2511 a	38	2479 a	60	2664 b	49

La lag fase è risultata più lunga ($P < 0,01$) nel gruppo normale rispetto agli altri due (Tab, 3B) in accordo con quanto trovato per la bovina (Sandrucci et al, 2007) nella quale un aumento della lag fase è legato alla diminuzione della percentuale di bi modalità. Le curve di flusso doppie hanno mostrato la più elevata durata della fase principale di mungitura (Tab, 3B) sia paragonate alle normali che alle bimodali ($P < 0,01$); anche queste ultime, comunque, hanno mostrato una fase principale di mungitura più lunga di quelle normali sia pur con differenze più lievi ($P < 0,05$). Nelle curve bimodali la fase di salita è risultata più lunga vs le curve normali ($P < 0,01$); la fase di plateau è stata, invece, più lunga per le curve normali ($P < 0,05$) mentre la fase di discesa è stata sovrapponibile tra i due patterns. Anche le curve doppie hanno mostrato una fase di plateau più corta vs le normali ($P < 0,01$) ma anche

rispetto a quella delle curve bimodali ($P < 0,05$). Inoltre, le curve doppie hanno mostrato valori delle fasi di salita e di discesa estremamente lunghi e differenti da ambedue gli altri tipi di curva ($P < 0,01$).

Il flusso medio di latte è risultato più basso nel gruppo con curve doppie con, in conseguenza, una minore produzione di latte nei primi 3 minuti di mungitura. I risultati ottenuti sono simili a quanto già trovato da Bava et al, (2007) per le curve bimodali.

L'analisi dei dati relativi alle produzioni di latte standard ha mostrato differenze tra la primipare e pluripare, con produzioni superiori in queste ultime, come era da attendersi, mentre nessuna differenza è emersa per i soggetti trattati con ossitocina vs i non trattati, anche se la differenza tra i gruppi è stata di circa 130kg. Le bufale con curva doppia sono risultati significativamente più produttivi sia rispetto a quelli con curva normale sia se confrontati con quelli con curve bimodali ($P < 0,05$). Non è emersa alcuna differenza tra le produzioni di latte delle bufale classificate con curva normale vs quella bimodale.

3.4 Conclusioni

Dai risultati ottenuti non sono emerse particolari differenze di flusso tra primipare e pluripare se non una maggior durata del tempo di discesa che allunga la fase principale di mungitura e che potrebbe essere legato ad un maggior sviluppo dei quarti posteriori nelle pluripare che impiegano maggior tempo a svuotarsi. La maggior durata della fase di overmilking nelle primipare andrebbe ulteriormente verificata in quanto è noto che essa è legata ad errori nella routine di mungitura ed è causa rischio per la salute della mammella (Natzke et al., 1978), anche se non è stata ritrovata una effettiva correlazione tra la durata della fase di overmilking e il contenuto in cellule somatiche (Wellnitz et al., 1999). Questo dato è stato confermato anche da Tanc> in V. (2007), sebbene una riduzione della fase di overmilking e della fase di discesa sembrano essere essenziali per una buona pratica di mungitura. Sarebbe quindi opportuno cercare di ridurla al fine di evitare danni alla mammella in soggetti giovani, all'inizio della carriera riproduttiva che potrebbero influire sulle produzioni future.

I soggetti trattati con ossitocina allungano i tempi di mungitura a causa di una più lunga fase di latenza unita ad una fase di salita e di discesa più lunga a fronte di una ridotta fase di plateau. Si potrebbe ipotizzare che la somministrazione esogena di ossitocina determini una alterazione del flusso di latte per un innalzamento più lento dei livelli dell'ormone nel sangue ed una sua più lenta decrescita.

La percentuale di bimodalità in questo studio è risultata inferiore a quella riscontrata per la bovina. Considerando che le operazioni di premungitura non sono state differenti da quelle che vengono routinariamente effettuate per la bovina, si potrebbe ipotizzare una maggiore sensibilità della mammella delle bufale nel fornire una risposta più efficace nella secrezione

di ossitocina. Resta da chiarire se le curve definite a flusso doppio siano una variazione delle curve bimodali oppure un profilo diverso legato ad un assetto produttivo differente.

L'analisi della relazione tra curve a doppio profilo e produzione di latte/lattazione è stato solo un primo tentativo di verificare l'esistenza di differenti pattern secretori in soggetti della stessa specie che potessero essere legati a differenze anche produttive.

L'alta frequenza di questo profilo anche nelle pluripare e non solo nel gruppo trattato con ossitocina potrebbe indicare che essi siano legati ad un più lento aumento dei livelli di questo ormone in bufale con grande capacità mammaria e potenzialmente più produttive. Infatti la maggiore capacità della mammella sarebbe in grado di garantire nella fase precoce della mungitura maggiori quantità di latte cisternale prima dell'inizio della fase di eiezione alveolare, permettendo al flusso di latte di non scendere mai al di sotto di 0,5kg diversamente da quanto accade nei profili bimodali. Il riscontro della differente produzione per lattazione in soggetti che presentano tali flussi è del tutto preliminare e richiede sicuramente un'analisi più approfondita. Un approccio futuro sicuramente più valido potrebbe essere quello dello studio della ripetibilità per i tipi di pattern e per i singoli parametri della curva, al fine di verificare l'esistenza di una reale relazione tra mungibilità e i vari aspetti della produzione/lattazione utile ai fini selettivi della specie.

3.5 Bibliografia

1. Bava L., Sandrucci A., Tamburini A., Zucali M., Milk flow traits of buffalo cows in intensive farming system, *Italian J. Anim. Sci.*, (2007); 6 (Suppl.1): 500-502.
2. Borghese A., Rasmussen M., Thomas C.S., Milking management of dairy (2007).
3. Bruckmaier R.M., Blum J.W. Oxytocin release and milk removal in ruminants, *J. Dairy Sci.*, (1998); 81:939-949.
4. Cavalchini A.G. La mungitura, tecnologia, scelta e gestione degli impianti (2007);156
5. Natzke, R. P., P. A. Oltenacu, and G. H. Schmidt.. Change in udder health with overmilking. *J. Dairy Sci.* (1978); 61:2336238.
6. Sandrucci A., Tamburini A., Bava L., Zanini L. Milking procedures, milk flow curves and somatic cell count in dairy cows, *Italian J. Anim. Sci.*, (2005); 4 (Suppl. 2): 215-217.
7. Sandrucci A., Tamburini A., Bava L., Zucali M. Factors affecting milk flow traits in dairy cows: results of field study, *J. Dairy Sci.*, (2007); 90:1159-1167.
8. SPSS 15.0. User's Guide, Version 15.0., SPSS Inc. Chicago IL, USA (2007).
9. Tancig in V, Ipema B, Hogewerf P, Macuhová J. Sources of variation in milk flow characteristics at udder and quarter levels. *J Dairy Sci.* (2006); Mar; 89(3):978-88.
10. Tancig in V., Ipema H. A., Hogewerf P. Interaction of Somatic Cell Count and Quarter Milk Flow Patterns *J. Dairy Sci.* (2007); 90: 222362228
11. Thomas C.S., Milking management of dairy buffaloes, Ph.D. Diss. Swedish Univ., Agric. Sci., Uppsala Sweden (2004a).
12. Thomas C.S., Bruckmaier R.M., Ostensson K., Svennersten-Sjaunja K., Effect of different milking routines on milking-related release of the hormones oxytocin, prolactin and cortisol, and on milk yield and milking performance in Murrah Buffaloes, *J. Dairy Res.*, (2005); 72:10-8.
13. Thomas C.S., Svennersten-Sjaunja K., Bhosrekar R., Bruckmaier R.M., Mammary cisternal size, cisternal milk and milk ejection in Murrah buffaloes. *J. Dairy Res.*, (2004b); 71:162-168.
14. Wellnitz, O., Bruckmaier R. M., Blum J. W.. Milk ejection and milk removal of single quarters in high yielding dairy cows. *Milchwissenschaft* (1999); 54:3036306.

4. ESPERIMENTO B

I minerali del latte di bufala

4.1 Scopo della ricerca

La destinazione finale del latte ha un ruolo preponderante nell'economia del comparto bufalino e di riflesso anche nei piani di selezione della specie. Come precedentemente ricordato, gli indici attualmente utilizzati nel calcolo del merito genetico per la specie si basano sia sulla produzione quanti-qualitativa del latte, sia sul PKM ovvero, la quantità di mozzarella ottenuta da un kg di latte, stimato in base a produzione, % di grasso e proteine. Questo studio lascia vuole verificare la possibile esistenza di altri fattori che, al di fuori della mera composizione in grasso e proteine, possano influire sulla resa al caseificio. È noto come importanti differenze nei tempi di coagulazione e nelle caratteristiche reologiche della cagliata del latte di altre specie di ruminanti di interesse zootecnico derivino da variazioni in composizione del latte legate sia a fattori esterni all'animale sia a fattori intrinseci.

Scopo di questa sperimentazione è stato, pertanto, valutare il contenuto dei principali minerali del latte, calcio e fosforo, direttamente coinvolti nel processo di caseificazione, di quantificarne le loro frazioni e di verificarne gli eventuali rapporti con resa alla caseificazione e qualità del coagulo.

4.2 Materiali e metodi

Prelievo dei campioni

Sono stati prelevati dalla mungitura completa del mattino 70 campioni di latte individuale da bufale pluripare ad una distanza media dal parto di 156 ± 46 giorni, appartenenti a tre allevamenti, uno sito in provincia di Caserta e due nel Salernitano. Ogni campione è stato suddiviso in tre aliquote: di cui una di un litro è stata utilizzata per determinare la resa in coagulo (Intrieri et al 1964) a fresco (al momento della formazione del coagulo) e dopo 28 ore.

La seconda aliquota è stata utilizzata per valutare le caratteristiche chimico-fisiche: pH, tenore in grasso, lattosio, proteine grezze, caseina, sostanza secca residua, ceneri ed urea (ASPA 1995) nonché i parametri lattodinamografici (K_{20} A_{30} , $\bar{\sigma}$) (Formagraph). Sono stati, inoltre, determinati i contenuti in cellule somatiche (SSC), tramite contatore Fossomatic, e in flora aerobica mesofila (TAMF) con il metodo della diluizione.

La terza aliquota è stata utilizzata per la determinazione del fosforo totale e solubile, calcio totale, solubile e ionico. Il calcio colloidale è stato ottenuto per differenza.

Resa reale

Per la resa reale si è prelevato un litro di latte, secondo quanto suggerito da Intrieri et al.(1964) che è stato portato alla temperatura di 42° C circa. Sono stati aggiunti 5 ml di caglio liquido (titolo 1:10000) ottenendo la coagulazione quasi istantanea. La cagliata ottenuta è stata sottoposta, quindi, alla rottura a croce e quando dalle fenditure cominciava a separarsi il siero liquido, è stata rotta in cubetti di circa 2 mm di lato e si è allontanato il siero stesso dalla pasta mediante setaccio, senza far agire sulla cagliata alcuna forza. A questo punto si è effettuata una spremitura a mano della cagliata avendo cura di sospendere l'operazione appena il siero separato assumeva aspetto bianco-lattiginoso. La pasta così ottenuta è stata pesata e conservata in frigo per 24 ore. Trascorso tale intervallo, si è allontanato il restante siero che si era separato e si è ripesata la cagliata. È stata poi determinata la sostanza secca del coagulo, mediante essiccazione in stufa a 105° C.

Parametri lattodinamografici

Per la determinazione dei parametri di coagulazione del latte è stato utilizzato il lattodinamografo (Formagraph Foss Electric). Aliquote di 10 cc di campioni di latte sono stati posti in cavità ricavate in un blocco di alluminio, termostatati a 37°C, addizionati a caglio e posti in modulo di registrazione su un ripiano anch'esso termostatato. Tramite un sistema meccanico ed ottico è stata impressa su una carta fotosensibile la traccia del movimento dei 10 pendoli immersi nei campioni di latte.

Preparazione delle ceneri cloridriche

Aliquote di 20 gr di latte sono state incenerite, previa parziale coagulazione con acido acetico al 10%, in muffola a 530° per 6 ore. Le ceneri sono state riprese con acido cloridrico (2N) e trasferite per semplice versamento in becker da 100 ml. I becker sono stati posti in un bagno termostatato di sabbia al fine di portare a secco i campioni. Dopo raffreddamento sono stati aggiunti 20 ml di acido cloridrico (2N), portati ad ebollizione e successivamente travasati in matracci da 100 ml. Le ceneri così ottenute sono state diluite con H₂O mq e 5% di cloruro di lantanio.

Determinazione delle concentrazioni di Calcio totale

Lo spettrofotometro ad assorbimento atomico (Anon 1982) a fiamma Aria-Acetilene è stato utilizzato per determinare, la concentrazione di Calcio dalle ceneri cloridriche sia del latte tal quale che del siero.

Determinazione delle concentrazioni di Fosforo totale

La determinazione del fosforo è stata effettuata tramite metodo colorimetrico (NMKL, 1993). Dai campioni è stata rimossa la componente organica tramite incenerimento. Il residuo inorganico acido-solubile è stato usato per la reazione colorimetrica basata sulla formazione di un complesso $[(\text{MoO}_2 \cdot 4\text{MoO}_3)_2 \cdot \text{H}_3\text{PO}_4]$ tra il fosforo e il sodio molibdato in presenza di acido ascorbico come agente riducente. L'intensità del colore blu è misurata spettrofotometricamente a 823 ± 1 nm.

Determinazione del Calcio e Fosforo solubili

Per lo studio è stato necessario determinare, oltre che le concentrazioni totali di fosforo e calcio nel latte, anche le quantità presenti in fase dispersa (colloidale) e in fase acquosa (solubile).

Per determinare la fase acquosa abbiamo estratto il siero utilizzando il metodo dell'ultrafiltrazione (ASPA, 1995). Questo procedimento prevede una sgrassatura iniziale del campione mediante centrifugazione e l'aggiunta di 0,15 ml di caglio dializzato ogni 30 ml di latte. Il latte è stato riscaldato a 30°C fino alla formazione del coagulo solido e fatto raffreddare per un'ora a 20°C. Il siero è stato recuperato tramite filtrazione su carta filtro Whatman n.1, sottoponendolo quindi al medesimo trattamento utilizzato per i campioni tal quale.

Analisi statistica

I dati sono stati elaborati utilizzando l'analisi della correlazione e della regressione multipla con metodo stepwise, questa ultima utilizzata per stabilire eventuali relazioni tra resa reale, a fresco e dopo 24 ore, e resa in sostanza secca, utilizzate come variabili dipendenti in funzione: del contenuto delle varie frazioni del calcio e fosforo del latte, espressi in percentuale del totale, del rapporto Ca/P e Ca/caseina (g/g), della distanza dal parto, del contenuto in cellule somatiche del latte, del contenuto in proteina, grasso e caseina. Tutte le regressioni sono state calcolate a parità di carica microbica del latte.

Analoghe regressioni sono state calcolate impiegando i parametri reologici del latte quali variabili dipendenti. Tutti i dati sono stati elaborati utilizzando il software statistico SPSS 15.0 (2005).

4.3 Risultati

I valori dei componenti chimici del latte oggetto di studio, sono risultati sovrapponibili a quelli della composizione media riportata per il latte di bufala (tabella 1B).

Tabella 1B: Media, sd, minimo (Min) e massimo (Max) dei valori dei componenti chimici, cellule somatiche (SSC) e flora aerobica mesofilica totale(TAMF) nel latte di bufala.

	Grasso%	Proteine%	Caseine %	pH	SSC (log ₁₀)	TAMF(log ₁₀)	
Media	8,71	4,71	3,86	0,83	6,58	4,98	5,41
Sd	1,38	0,26	0,29	0,04	0,07	0,37	0,74
Min	5,00	3,94	2,79	0,71	6,44	4,20	1,66
Max	13,00	5,37	4,51	0,91	6,78	5,73	6,30

Il contenuto medio di calcio e fosforo, suddiviso nelle varie componenti, è riportato in tabella 2B. In media il contenuto del calcio totale è stato di 170 mg·dl⁻¹, leggermente inferiore da quanto ritrovato da Ferrara e Intrieri, (1974), ma simili ai valori riportati da Kon and Cowie (1971). Il calcio micellare per unità di caseina è risultato pari a 30.0±5.1 mg·dl⁻¹ ovvero 0,75±0.12 mM in termini di concentrazione molare, leggermente inferiore a quanto ritrovato nel latte di bovina (Gaucheron F., 2005). Il contenuto totale di P è risultato leggermente superiore rispetto ai dati di Ferrara e Intrieri (1974) a causa di un aumento della frazione solubile. Per quanto attiene ai valori ottenuti dal rapporto Ca/P, sono risultati simili a quelli riportati per la bovina di razza Modenese ma più bassi di quelli riscontrati nella razza Frisona (Summer et al. 2002).

L'analisi della correlazione non ha evidenziato alcun rapporto tra concentrazione del Ca e P, sia totale sia delle varie frazioni, con la distanza dal parto.

La resa a fresco è risultata in media pari a 261,7 ± 25,4 gr·l⁻¹, riducendosi a 252,8 ± 38,1 gr·l⁻¹ dopo 24 ore con un calo resa di circa il 3,4%. La resa a fresco è risultata influenzata dall'analisi di regressione (R²=0,89) sia dal contenuto in fosforo solubile sia dalla percentuale di calcio micellare, nonché dal tenore in grasso e proteine e dai livelli ematici di urea, così come si evince dalla seguente equazione di regressione:

Resa a fresco = -130,0 + 60,8 (proteine %) + 6,5 (grasso %) + 0,31 (P solubile mg·dl⁻¹) + 0,56 (Ca micellare %) + 0,15 (urea mg·dl⁻¹).

Tabella 2B: Media, sd, minimo (Min) e massimo (Max) valori delle differenti frazioni di calcio e fosforo nel latte di bufala.

	Ca tot mg·dl ⁻¹	Ca solubile mg·dl ⁻¹	Ca micellare mg·dl ⁻¹	P tot mg·dl ⁻¹	P solubile mg·dl ⁻¹	P micellare mg·dl ⁻¹	Rapporto Ca/P totale
Media	170,57	55,21	115,36	145,34	56,87	88,47	1,21
Sd	14,41	10,88	17,79	26,87	12,92	20,35	0,20
Min	150,04	38,36	74,07	104,00	30,00	50,00	0,85
Max	205,91	96,93	166,45	196,73	87,23	128,86	1,62

Anche per la resa a 24 ore è stato riscontrata un influenza della componente minerale relativa però al solo contenuto in fosforo ($R^2=0,93$). Infatti l'equazione di regressione è risultata essere:

Resa dopo 28h = $356,70 + 56,22$ (proteine %) + $5,04$ (grasso %) + $0,22$ (P totale mg·dl⁻¹) - $1,10$ (urea mg·dl⁻¹) - $59,88$ (pH).

La sostanza secca del coagulo è risultata essere influenzata positivamente della qualità del latte e alla distanza dal parto e negativamente dal pH e dal contenuto in fosforo ($R^2=0,85$) come di seguito riportato:

Sostanza secca del coagulo = $161,42 + 20,09$ (proteine %) + $4,79$ (grasso %) - $0,11$ (P totale mg·dl⁻¹) + $0,04$ (giorni di lattazione) - $25,70$ (pH).

L'effetto positivo sulla resa dovuto ad un elevato contenuto in grasso e proteine è stato riscontrato in molti studi, così come anche quello legato ad un più alto contenuto di calcio micellare (Mariani et al., 1997; Mariani and Battistotti 1999). Il dato da sottolineare invece è quello ottenuto dal P che, sembrerebbe avere maggiore rilevanza rispetto al Ca nel variare i valori di resa probabilmente in relazione alla capacità di idratazione delle micelle nella cagliata. Infatti, mentre un maggior contenuto in P totale sembra migliorare la resa a 24 ore, un suo aumento determina anche una riduzione della percentuale di SS del coagulo, lasciando ipotizzare che esso agisca migliorando la capacità di ritenzione idrica del coagulo.

I parametri reologici medi sono risultati i seguenti:

$R = 14,20 \pm 3,82$;

$K_{20} = 1,73 \pm 0,97$;

$A_{30} = 46,01 \pm 8,81$;

differenti dai valori ritrovati per la bovina (Mariani et al., 1997; Summer et al., 2002; Summer et al., 2004) in quanto il tempo dell'intera fase di coagulazione è risultato inferiore mentre la resistenza alla trazione del caglio è risultato notevolmente più elevata nella bufala.

La durata della fase enzimatica R è influenzata positivamente dal pH del latte, dalle proteine e dal grasso ma negativamente dal rapporto calcio/fosforo. L'importanza del pH sul tempo di coagulazione è un dato ormai noto (Mariani e Battistotti 1999); un basso rapporto di calcio/fosforo, specialmente dovuto a un basso valore di calcio micellare e di calcio solubile (Mariani and Battistotti, 1999) è risultato importante per la formazione della cagliata con delle implicazioni anche in una differente resistenza del coagulo. L'influenza del rapporto Ca/P sul valore di R è confermato anche in studi passati. Tuttavia, i nostri dati sembrano mostrare una maggiore influenza, rispetto a quanto riportato in letteratura, dell'aumento del contenuto in P piuttosto che della diminuzione in Ca del latte sui valori di R.

Il tempo K_{20} , ovvero il tempo di formazione del coagulo, è risultato essere influenzato dal bilancio minerale nel latte ($R^2=0.46$) con una relazione positiva con il tenore in calcio micellare ed una negativa con il tenore in fosforo solubile. È da rilevare che tale parametro è risultato notevolmente inferiore a quello riportato per il latte di vacche di razze differenti (Summer et al., 2002; Summer et al 2004) ma in accordo con quanto trovato per il latte di bufala (Addeo et al, 1995; Esposito et al., 1997).

Questo dato presumibilmente potrebbe essere giustificato da una più elevata velocità di aggregazione delle micelle con alti contenuti di caseina (Fossa et al., 1994) come si verifica nel latte di bufala; oppure dall'alto contenuto in questo latte di k-caseina così come riportato da Addeo et al. (1995).

Dall'analisi di regressione, il A_{30} ($R^2=0.50$) è risultato essere influenzato positivamente dalla percentuale di P micellare, dal contenuto in Ca e in P solubile mentre è risultato influenzato negativamente dal pH del latte e dal rapporto grasso/proteine. L'aumento del Ca e P solubile è stato visto migliorare l'elasticità del coagulo anche per il latte di vacca mentre un alto rapporto grassi/proteine è stato riscontrato responsabile di una migliore elasticità della cagliata soprattutto per il latte di bufala piuttosto che per quello di vacca (Addeo et al., 1995). I nostri dati sembrano invece dimostrare che un aumento del contenuto in grassi non correlato ad una ottimale

quantità di proteine, potrebbe portare alla formazione di una cagliata strutturalmente difettosa.

L'analisi della correlazione effettuata per valutare le relazioni intercorrenti tra i parametri della coagulazione, ha mostrato che sia per t_0 innesco della reazione enzimatica che per la formazione della cagliata, tempi elevati si accompagnano a valori di A30 inferiori ($r = -0,38$ and $r = -0,72$ rispettivamente per R e K_{20} $P < 0,01$). Inoltre, elevati valori di R determinano rese in coagulo maggiori, con coefficienti di correlazione pari a 0,43 ($P < 0,05$) per la resa a fresco e a 0,28; ($P < 0,05$) per la resa dopo 28h.

4.4 Conclusioni

I risultati di questo studio hanno mostrato che la relazione tra resa e sali minerali del latte è risultata in accordo con quanto riscontrato per la specie bovina anche se il ruolo del P sembra avere avuto un peso maggiore di quello del contenuto in Ca nel determinismo della resa. Un aumento del fosforo nel latte ha prolungato il tempo di coagulazione R determinando un aumento della resa a fresco a causa della formazione di un reticolo più ricco d'acqua. Contenuti più elevati in P hanno, inoltre, ridotto il tempo di formazione del coagulo K20 con un miglioramento dell'elasticità della cagliata. In ogni caso, ambedue i minerali hanno svolto un ruolo fondamentale nel processo di coagulazione, con un maggior peso ascrivibile alla componente solubile di entrambi.

4.5 Bibliografia

1. Addeo F., Emaldi G.C, Masi P. Tradizione e innovazione nella produzione della *Mozzarella di bufala Campana* *Bubalus Bubalis*. (1995); III: 46-62.
2. Altiero V.; Moio L., Addeo F. Previsione della resa in mozzarella sulla base del contenuto in grasso e proteine del latte di bufala. *Scienza e tecnica lattiero casearia*. (1989); 40(6), 425-433.
3. ASPA. Analisi del latte delle principali specie di interesse zootecnico. Centro Stampa Università di Perugia, Italia (1995).
4. Esposito L., Di Palo R., De Barros Pinto H.M., Ricci G., Zicarelli L. Variations in lactodynamometric characteristics of Mediterranean Buffalo milk from individual animals. *Proc. 5th World Buffalo Congress*, (1997); 225-230.
5. Ferrara B., Intrieri F. Caratteristiche ed impiego del latte di bufala. *Zoot. Vet.*, (1974);1-2:14-125.
6. Fossa E., Pecorari M., Sandri S., Tosi F., Mariani P.. The role of milk casein content in the parmigiano-reggiano cheese production: chemical composition, rennet coagulation properties and dairy technological behaviour of milk. *Scienza e tecnica lattiero casearia* (1994); 45,(6):519-535.
7. Gaucheron F. The minerals of milk. *Rev. Reprod. Nutr. Dev.* (2005); 45: 473-483.
8. Intrieri F., Minieri L.; De Franciscis G.. *Atti Soc. It. Sci. Vet.*, (1964); 18.
9. Kon S.K., Cowie A.T., *Milk vol 2°*, Acad. Press, New York (1971).
10. Mariani P. Battistotti B. Milk quality for cheesemaking. *Proc. XIII A.S.P.A. Congress*, (1999); 499-516.
11. Mariani P., Serventi P., Fossa E. 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* (1997); 2:8-14.
12. SPSS 12.0., *User's Guide*, Version 12.0., SPSS Inc. Chicago IL,USA (2004).
13. Summer A., Malacarne M., Martuzzi F., Mariani P. Structural and functional characteristics of Modenese cow milk in Parmigiano-Reggiano cheese production. *Ann. Fac. Medic.Vet. di Parma*, (2002); XXII :163-174.
14. Summer A., Pecorari M., Fossa E., Malacarne M., Formaggioni P., Franceschi P., Mariani P. Frazioni proteiche, caratteristiche di coagulazione presamica e

resa in formaggio Parmigiano-Reggiano del latte delle vacche di razza Bruna Italiana. Proc. 7^a Conferenza Mondiale Allevatori Razza Bruna, (2004); 77-82.

5. ESPERIMENTO C

Proteine del latte di bufala

5.1 Scopo della ricerca

Considerato che l'attitudine del latte alla caseificazione è in stretta dipendenza con la composizione chimica ed in particolare con la componente proteica, si è ritenuto opportuno verificare l'esistenza di variazioni individuali tra latte di bufala a differente resa casearia. A tale scopo, si è ritenuto interessante tracciare un profilo delle proteine al fine di costruire una mappa di riferimento per il latte di bufala in campioni a differente resa alla caseificazione. Lo studio si è incentrato soprattutto sulle caseine ed in particolar modo sulle k caseine. Gli alleli della k-caseina, giocano un importante ruolo nel determinare la quantità relativa delle diverse frazioni caseiniche nel latte con significative conseguenze sulla composizione delle micelle (Di Stasio et al., 2000). Inoltre la k-caseina, riveste un ruolo fondamentale nella formazione della micella producendo effetti sull'attitudine alla coagulazione del latte (Formaggioni 1999; Mariani 1999; Caroli et al., 2000).

Considerando che il latte presenta una matrice molto complessa, si è reso necessario per lo studio, l'utilizzo di tecniche di proteomica.

5.2 Materiali e Metodi

Preparazione dei campioni di latte per l'analisi in gel elettroforesi

Sulla base dei risultati ottenuti dalle prove di caseificazione, è stato possibile suddividere gli animali in 2 gruppi ad alta e bassa resa, a parità di composizione chimica del latte. In ciascun gruppo sono stati scelti 4 soggetti, rispettivamente tra i plus varianti e minus varianti. I campioni di latte sono stati centrifugati a 10000 rpm per 10 minuti, per determinare la separazione della frazione lipidica, che è stata allontanata. Aliquote di 40 μ l di latte scremato sono state miscelate in 600 μ l di Urea chaps (Sigma-Aldrich) e conservate a -20 $^{\circ}$ C.

Elettroforesi in gel di Poliacrilammide - Sodio Dodicil Solfato.(SDS-PAGE)

L' SDS-PAGE è stata eseguita in accordo con la procedura descritta da Laemmli (1970), in un apparato verticale per lastre di gel (modello Mini-PROTEAN - Biorad), utilizzando un gel omogeneo verticale al 12.5% acrilammide.

A 5 μ l di ciascun campione, preparato come precedentemente descritto, sono stati aggiunti 5 μ l di sample buffer (Tris 0.5 M portato a pH 6.8 con HCl concentrato; SDS 10%; glicerolo e Blu bromofenolo) e 15 μ l di H₂O, bolliti per 5 min e caricati sul gel. L'elettroforesi è stata condotta a 60V costanti per 30 minuti e poi a 120V costanti fino al termine della corsa. Un marker (ProSieve Color Protein Markers, Cambrex; kDa 181-10) è stato utilizzato per identificare il peso molecolare delle proteine. Il gel è stato colorato per 3 ore con Blue Comassie e decolorato overnight. Le bande corrispondenti alle proteine di maggior interesse sono state tagliate e trattate come da protocollo successivamente descritto per la spettrofotometria di massa.

Trattamento delle bande per analisi in massa

Le bande messe in evidenza sono state tagliate e messe a decolorare con una soluzione 1:1 di 25 mM di Ammonio Bicarbonato e di Acetonitrile (ACN). La soluzione decolorante è stata eliminata e sono stati aggiunti 25 μ l di una soluzione contenente 10 mM di ditioneitrato (DTT, Sigma-Aldrich) in 25 mM di Ammonio Bicarbonato incubato per 1 h 56 $^{\circ}$ C. Il surnatante è stato rimosso e sono stati aggiunti 25 μ l di soluzione contenente 55 mM Iodoacetamide (Sigma-Aldrich) in 25 mM di Ammonio Bicarbonato, lasciato al buio per 45 minuti a temperatura ambiente. Il surnatante è stato rimosso e si è proceduto a lavare le bande con una soluzione 25 mM di Ammonio Bicarbonato. Il gel è stato disidratato con 100 μ l di ACN. Al gel disidratato sono stati aggiunti 30 μ l di una soluzione di tripsina (0.1 μ g/ μ l, Sigma-Aldrich) diluita 8 volte in ammonio bicarbonato 25 mM. I campioni sono stati messi ad incubare per tutta la notte a 37 $^{\circ}$ C.

Il surnatante di ciascun campione è stato recuperato e riunito al successivo lavaggio con una soluzione 1.1 di ACN, acqua e acido formico allo 0,1%. La soluzione così ottenuta è stata portata a secco sotto vuoto (Savant sc 100 A Thermo) ed il campione ripreso in 35 μ L di una soluzione di ACN al 10% in acqua e acido formico. I campioni così ottenuti sono analizzati in HPLC-massa ESI-TRAP (Agilent mod 1100 SL)

Analisi e purificazione delle proteine

Le sequenze peptidiche sono state analizzate tramite LC-MS/MS attrezzato con una colonna Zorbax SB-C18 5 μ m 150 x 0.5 mm.

L'identificazione delle proteine è stata resa possibile utilizzando il mass spectrometry protein sequence database, usando il motore di ricerca Mascot (Matrix science, UK), un sistema predittivo di attribuzione dei punteggi basato sulla probabilità statistica.

Elettroforesi bidimensionale

Per avere una maggiore separazione delle proteine, sia per punto isoelettrico che per peso molecolare è stata effettuata su alcuni campioni la separazione tramite elettroforesi bidimensionale. A tale scopo a 320 μ L di ciascun campione di latte, preparato come precedentemente descritto, è stato aggiunto ditiotreitolo (DTT, Sigma-aldrich) ad una concentrazione finale di 65 mM, IPG (anfoline carrier) biolyte pH 4-7 (Bio-Rad) e alcune gocce di soluzione satura di Blu di bromofenolo. Per la corsa elettroforetica di prima dimensione i campioni sono stati caricati su un gel utilizzando delle strip (ReadyStrip IPG) da 17 cm con pH 4-7 a gradiente lineare e sottoposte a focalizzazione isoelettrica.

Le strip sono state reidratate per 12 ore a 50 V, 20 °C, quindi l'elettroforesi è stata effettuata in Protean IEF cell (Bio-Rad) in tre step: 1°) 250 V per 15 minuti ; 2°) da 250 a 10000V per 3 ore in voltaggio lineare ; 3°) da 10000 a 60000 fino alla fine della focalizzazione (limite di corrente nel gel 50 μ A). Dopo la corsa elettroforetica i ponti di disolfuro delle proteine sono stati ridotti mediante una soluzione contenente Tris 50 mM a pH 8.8, 6 M Urea, glicerolo al 30%, SDS al 2%, ditiotreitolo al 1% e blu di bromofenolo per 20 minuti. Al termine dei 20 minuti la soluzione è stata rimossa per essere sostituita da una composta da: Tris 50 mM a pH 8.8, Urea 6 M, glicerolo al 30%, SDS al 2%, iodacetamide al 2,5% e blu di bromofenolo per 20 minuti, permettendo così l'alchilazione degli SH liberi.

Per la corsa elettroforetica di seconda dimensione è stata utilizzata Protean II xi 2-D Electrophoresis Cell (Bio-Rad). Le strip equilibrate sono state caricate su gel al 12.5% (20 x 20

cm x 1,5 mm) e l'elettroforesi condotta a 1W per gel per 2 ore e poi a 5W per gel fino al termine della corsa.

La colorazione del gel è stata effettuata con Blue Comassie per 3 ore quindi si è effettuata la decolorazione overnight.

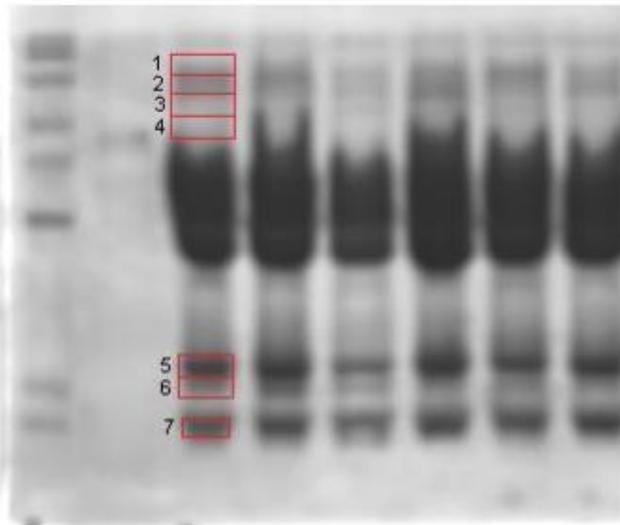
I gel bidimensionali e monodimensionali sono stati acquisiti mediante scanner Fluor-s (Bio-Rad) ed elaborati mediante appropriati software (Melanie II - Bio-Rad).

5.3 Risultati e conclusioni

In figura 1C è riportata il risultato della SDS-PAGE. In ogni colonna, relativa a ciascun campione, si sono evidenziate le bande corrispondenti alle principali proteine del latte, identificate secondo il peso molecolare, in accordo con il marker di riferimento. Le proteine identificate sono state: α_1 - α_2 -, β -caseina, γ -lattoglobulina e α -lattoalbumina; mentre non è stato possibile individuare le κ -caseine a causa di una non ottimale separazione proprio nella fascia corrispondente al loro peso molecolare (circa 19102 kDa).

L'analisi di massa effettuata su ciascuna banda non ha evidenziato differenze tra i campioni ad alta e bassa resa confermando quanto emerso anche ad una prima analisi visiva.

Fig 1C: SDS-PAGE delle proteine del latte bufalino scremato



In tabella 1C sono riportate le proteine identificate con l'analisi di massa. I risultati mostrano le α_1 - α_2 -caseine, ritrovate in più di una spot, ad un peso molecolare di circa 24000 kDa e, quindi, evidenziate nella parte superiore del gel. Anche le γ -lattoglobuline sono risultate presenti in più di una spot, con un peso molecolare di circa 18000 kDa. Per contro, un'unica spot è risultata corrispondente alla β -caseina, con circa 23000 kDa, così come anche l' α -lattoalbumina, presente nella parte inferiore del gel corrispondente al peso molecolare di circa 14000 kDa.

Tabella 1C: identificazione delle spot tramite analisi ESI-TRAP della SDS-PAGE (fig.1D) di latte di bufalo scremato

Spot	Proteina	Specie	KDa Mr
1	alfas2- caseina	B.bubalis	26315
2	alfas1- caseina	B.bubalis	24440
3	alfas1- caseina	B.bubalis	24440
4	beta- caseina	B.bubalis	23582
5	beta-lattoglobulina	B.bubalis	18541
6	beta- lattoglobulina	B.bubalis	18241
7	beta-lattoglobulina	B.bubalis	18241
8	alfa-lattoalbumina	B.bubalis	14244

L'elettroforesi bidimensionale ha permesso di individuare globalmente circa 35 spot proteiche sul gel, di cui 28 sono state identificate (fig. 2Ca e 2Cb). Le 6 spot dominanti sono state identificate come α_1 -, α_2 -, β - e k-caseina, -lattoalbumina, -lattoglobulina. Sono state osservate anche piccole spot identificate come prodotti della degradazione della caseina e proteine associate a funzioni di trasporto quali l'albumina.

Fig2Ca: Gel 2D di latte di bufala scremato

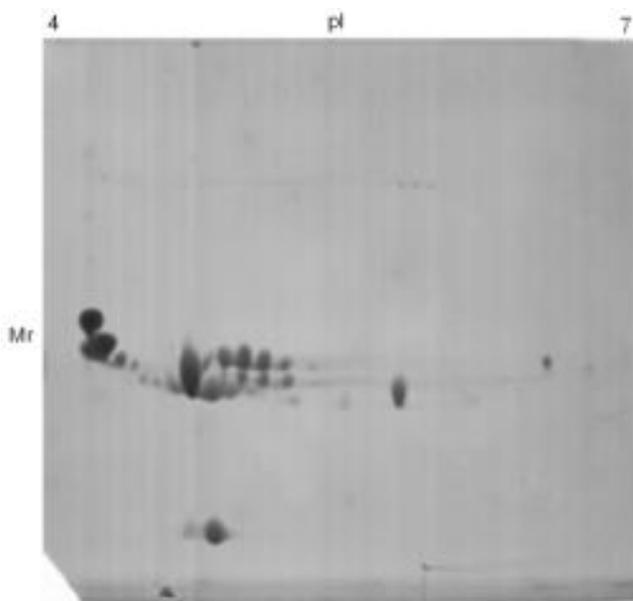
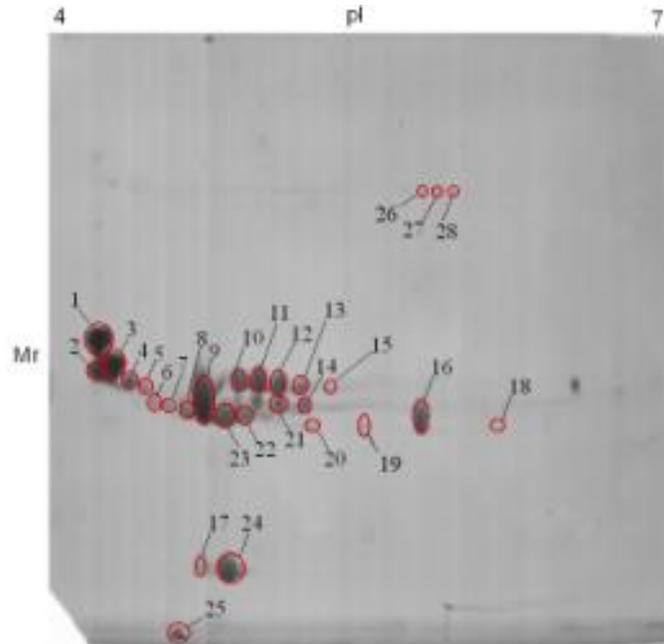


Fig2Cb: Gel 2D di latte di bufala scremato con spot analizzate evidenziate.



L'elettroforesi bidimensionale era stata inizialmente eseguita, utilizzando strip a gradiente non lineare con range di pH 3-10 come suggerito da protocollo già presente in letteratura per la specie bovina (D'Auria et al. 2007), ottenendo una separazione non ottimale delle proteine.

L'impiego di strip con range di pH 4-7 a gradiente lineare ha permesso di ottenere una migliore migrazione proteica con maggiore separazione delle spot (sovrapponibile a quanto ottenuto da D'Ambrosio et al., (2008a), consentendoci di evincere ed assegnare le frazioni caseiniche trovate a specifici glicofosfopeptidi (D'Ambrosio et al., 2008b).

In tabella 2C sono riportate le spot di maggiore interesse, per ognuna delle quali è specificata la proteina identificata, il relativo peso molecolare e punto isoelettrico, la specie di appartenenza, la sequenza peptidica e lo score, ovvero la percentuale di attendibilità con la quale le proteine sono state identificate.

Tabella2C: identificazione delle spot tramite analisi ESI-TRAP della mappa proteomica 2D (fg.3C) di latte di bufalo scremato.

	N.	Proteine	Specie	p.I.	Mr	Score
	1	s1- caseina	B.Bubalis	4,80	24440	80
Sequenza Proteica Peptidi identificati	<p>1 MKLLILTCLV AVALARPKQP IKHQGLPQGV LNENLLRFFV APFPEVFGKE</p> <p>51 KVNELSTDIG SESTEDQAME DIKQMEAESI SSSEEIVPIS VEQKHIQKED</p> <p>101 VPSEYLGYL EQLLRLKKN VPQLEIVPNL AEEQLHSMKE GIHAQQKEPM</p> <p>151 IGVNQELAYF YPQFRQFYQ LDAYPSGAWY YVPLGTQYPD APSFSDIPNP</p> <p>201 IGSENSEKTT MPLW</p>					
	2	s1- caseina	B.bubalis	4,80	24440	71
Sequenza Proteica Peptidi identificati	<p>1 MKLLILTCLV AVALARPKQP IKHQGLPQGV LNENLLRFFV APFPEVFGKE</p> <p>51 KVNELSTDIG SESTEDQAME DIKQMEAESI SSSEEIVPIS VEQKHIQKED</p> <p>101 VPSEYLGYL EQLLRLKKN VPQLEIVPNL AEEQLHSMKE GIHAQQKEPM 151 IGVNQELAYF YPQFRQFYQ LDAYPSGAWY YVPLGTQYPD APSFSDIPNP</p> <p>201 IGSENSEKTT MPLW</p>					
	3	s1- caseina	B.bubalis	4,85	24368	43
Sequenza Proteica Peptidi identificati	<p>1 MKLLILTCLV AVALARPKQP IKHQGLPQGV LNENLLRFFV APFPEVFGKE</p> <p>51 KVNELSTDIG SESTEDQAME DIKQMEAESI SSSEEIVPIS VEQKHIQKED</p> <p>101 VPSEYLGYL EQLLRLKKN VPQLEIVPNL AEEQLHSMKE GIHAQQKEPM</p> <p>151 IGVNQELAYF YPQFRQFYQ LDAYPSGAWY YVPLGTQYPD APSFSDIPNP</p> <p>201 IGSENSGKTT MPLW</p>					
	4	s1- caseina	B.bubalis	4,85	25508	82

Sequenza Proteica Peptidi identificati	1 MKFFIFTCLL AVALAKHTME HVSSSEESII SQETYKQEK MAIHPSKENL 51 CSTFCKEVIR NANEEYSIG SSSEESAEVA TEEVK ITVDD KHYQKALNEI 101 NQFYQK FPQY LQYLYQGPIV LNPWDQVERN AVPITPTLNR EQLSTSEENS 151 KKTVDMESTE VITKKT LTE EDKNRLNFLK KISQHYQ KFT WPQYLKTVYQ 201 YQKAMKPWTQ PK TNVIPYVR YL					
	5	s1- caseina	B.bubalis	4,85	27204	75
Sequenza Proteica Peptidi identificati	1 MKFFIFTCLL AVALAKHTME HVSSSEESII SQETYKQEK MAIHPSKENL 51 CSTFCKEVIR NANEEYSIG SSSEESAEVA TEEVK ITVDD KHYQKALNEI 101 NQFYQK FPQY LQYLYQGPIV LNPWDQVERN AVPITPTLNR EQLSTSEENS 151 KKTVDMESTE VITKKT LTE EDKNRLNFLK KISQHYQ KFT WPQYLKTVYQ 201 YQKAMKPWTQ PKTNVIPYVR YL					
	6	s1- caseina	B.bubalis	4,85	26971	86
Sequenza Proteica Peptidi identificati	1 MKFFIFTCLL AVALAKHTME HVSSSEESII SQETYKQEK MAIHPSKENL 51 CSTFC KEVIR NANEEYSIG SSSEESAEVA TEEVK ITVDD KHYQKALNEI 101 NQFYQK FPQY LQYLYQGPIV LNPWDQVERN AVPITPTLNR EQLSTSEENS 151 KKTVDMESTE VITKKT LTE EDKNRLNFLK KISQHYQ KFT WPQYLKTVYQ 201 YQKAMKPWTQ PK TNVIPYVR YL					
	7	s1- caseina	B.bubalis	4,85	23918	88
Sequenza Proteica Peptidi identificati	1 MKFFIFTCLL AVALAKHTME HVSSSEESII SQETYKQEK MAIHPSKENL 51 CSTFCKEVIR NANEEYSIG SSSEESAEVA TEEVK ITVDD KHYQKALNEI 101 NQFYQK FPQY LQYLYQGPIV LNPWDQVERN AVPITPTLNR EQLSTSEENS 151 KKTVDMESTE VITKKT LTE EDKNRLNFLK KISQHYQ KFT WPQYLKTVYQ 201 YQKAMKPWTQ PK TNVIPYVR YL					
	8	- caseina	B. bubalis	5,13	25197	49

Sequenza	1 MKVLILACLV ALALARELEE LNVPGEIVES LSSSEESITH					
Proteica	INKKIEKFQS					
Peptidi identificati	51 EEQQMEDEL QDKIHPFAQT QSLVYPPFGP IPKSLPQNIP PLTQTPVVVP 101 PFLQPEIMGV SKVKEAMAPK HK EMPFPK YP VEPFTESQSL TLTVDVENLHL 151 PLLLQSWMH QPPQPLPPTV MFPPQSVLSL SQSKVLPVPQ K AVPYPQR DM 201 PIQAFLLYQE PVLGPVRGPF PIIV					
	9	- caseina	B. bubalis	5,26	1857	42
Sequenza	1 DELQDK NHPF AQTQSLVYPF PGPIPK SLPQ NIPPLTQTPV					
Proteica	VVPFLQPEI					
Peptidi identificati	51 MGVSKV KEAM APK HKEMPPF KYPVEPFES QSLTLTDVEN LHLPLLLQS 101 WMHQPPQLP PTVMFPPQSV LSLSQSK VLP VPQKAVPYPQ RDM PIQAFLL 151 YQEPVLPVR GPFPII					
	10	s2- caseina	B. bubalis	6,54	262853	53
Sequenza	1 MKFFIFTCLL AVALAKHTME HVSSSEESII SQETYKQEK					
Proteica	MAIHPSKENL					
Peptidi identificati	51 CSTFCKEVIR NANEEYSIG SSSEESAEVA TEEVKITVDD KHYQ KALNEI 101 NQFYQK FPQY LQYLYQGPIV LNPWDQVKRN AVPIPTLNR EQLSTSEENS 151 KKTVDMESTE VITKTKLTE EDKNRLNFLK KISQHYQKFT WPQYLKTVYQ 201 YQKAMKPWTQ PKTKVIPYVR YL					
	11	s2- caseina	B. bubalis	7,16	26283	61
Sequenza	1 MKFFIFTCLL AVALAKHTME HVSSSEESII SQETYKQEK					
Proteica	MAIHPSKENL					
Peptidi identificati	51 CSTFCKEVIR NANEEYSIG SSSEESAEVA TEEVK ITVDD KHYQKALNEI 101 NQFYQK FPQY LQYLYQGPIV LNPWDQVKRN AVPIPTLNR EQLSTSEENS 151 KKTVDMESTE VITKTK LTE EDKNRLNFLK KISQHYQKFT WPQYLKTVYQ 201 YQKAMKPWTQ PKTKVIPYVR YL					
	12	s2- caseina	B. bubalis	7,16	24798	53
Sequenza	1 ALAKHTMEHV SSSEESIISQ ETYKQEKMA IHPSK ENLCS					
Proteica	TFCKE VIRNA					
Peptidi identificati	51 NEEYSIGSS SEESAEVATE EVKITVDDKH YQ KALNEINQ FYQK FPQYLQ 101 YLYQGPIVLN PWDQVKRNAV PITPTLNREQ LSTSEENSKK TVDMESTEVI 151 TKKTK LTEED KNRLNFLK KI SQHYQK FTWP QYLKTVYQYQ					

	KAMKPWTQPK 201 TNVIPYVRYL					
	13	s2- caseina	B. bubalis	7,17	26270	78
Sequenza Proteica Peptidi identificati	1 MKFFIFTCLL AVALAKHTME HVSSSEESII SQETYKQEK MAIHPSKENL 51 CSTFCKEVIR NANEEYSIG SSSESAEVA TEEVKITVDD KHYQKALNEI 101 NQFYQKFPQY LQYLYQGPIV LNPWDQVERN AVPITPTLNR EQLSTSEENS 151 KKTVDMESTE VITKKT LTE EDKNRLNFLK KISQHYQKFT WPQYLKTVYQ 201 YQKAMKPWTQ PKTNVIPYVR YL					
	14	s2- caseina	B. bubalis	7,17	26283	89
Sequenza Proteica Peptidi identificati	1 MKFFIFTCLL AVALAKHTME HVSSSEESII SQETYKQEK MAIHPSKENL 51 CSTFCKEVIR NANEEYSIG SSSESAEVA TEEVKITVDD KHYQKALNEI 101 NQFYQKFPQY LQYLYQGPIV LNPWDQVKRN AVPITPTLNR EQLSTSEENS 151 KKTVDMESTE VITKKT LTE EDKNRLNFLK KISQHYQKFT WPQYLKTVYQ 201 YQKAMKPWTQ PKTKVIPYVR YL					
	15	s2- caseina	B. bubalis	7,17	24798	91
Sequenza Proteica Peptidi identificati	1 ALAKHTMEHV SSSEESIISQ ETYKQEK NMA IHPSKENLCS TFCKEVIRNA 51 NEEYSIGSS SEESA VATE EVK ITVDD KH YQKALNEINQ FYQKFPQYLQ 101 YLYQGPIVLN PWDQVKR NAV PITPTLNREQ LSTSEENSKK TVDMESTEVI 151 TTKTKL TEED KNRLNFLK KI SQHYQKFTWP QYLKTVYQYQ KAMKPWTQPK 201 TNVIPYVRYL					
	16	k- caseina	B. bubalis	6,84	24498	83
Sequenza Proteica Peptidi identificati	1 MMKSFFLVVT ILALTLPLFG AQEQNQEQPI RCEKEER FFN DKIAKYIPIQ 51 YVLSRYPYSG LNYYQQK PVA LINNQFLPYP YYAKPAAVRS PAQILQWQVL 101 PNTVPAK SCQ AQPTTMTRHP HPHLSFMAIP P KNQDKTEI PTINTIVSVE					

	151 PTSTPTTEAI ENTVATLEAS SEVIESVPET NTAQVTSTVV					
	17	-lattoalbumina	B. bubalis	4,70	14691	78
Sequenza Proteica Peptidi identificati	1 MMSFVSLLLV GILFHATQAE QLT KEVFR E LKDLKGYGGV SLPEWVCTTF 51 HTSGYDTQAI VQNNNSTEYG LQINNKIWC KDDQNPSSN ICNISCDKFL 101 DDDLTDIMC VK KILDK VGI NYWLAHK ALC SEKLDQWLCE KL					
	18	k- caseina	B. bubalis	6,84	21384	68
Sequenza Proteica Peptidi identificati	1 MMKSFFLVVT ILALTLPLFG AQEQNQEQPI RCEKEER FFN DKIAKYPIQ 51 YVLSR YPSYG LNYYQQKPA LINNQFLPYP YYAKPAAVRS PAQLQWQVL 101 PNTVPAK SCQ AQPTMTRHP HPHLSFMAIP PCKNQDKTEI PTINTIVSVE 151 PTSTPTTEAI ENTVATLEAS SEVIESVPET NTAQVTSTVV					
	19	k- caseina	B. bubalis	6,84	21498	62
Sequenza Proteica Peptidi identificati	1 MMKSFFLVVT ILALTLPLFG AQEQNQEQPI RCEKEER FFN DKIAKYPIQ 51 YVLSR YPSYG LNYYQQKPA LINNQFLPYP YYAKPAAVRS PAQLQWQVL 101 PNTVPAK SCQ AQPTMTR HP HPHLSFMAIP PCKNQDKTEI PTINTIVSVE 151 PTSTPTTEAI ENTVATLEAS SEVIESVPET NTAQVTSTVV					
	20	k- caseina	B. bubalis	6,84	19320	79
Sequenza Proteica Peptidi identificati	1 ZZZNZZPIC CEKDER FFDD KIAKYPIQY VLSR YPSYGL NYYQQRPVAl 51 INNQFLPYPY YAKPAAVRS AQLQWQVLP NTPAKSCQD QPTTLARHPH 101 PHLSFMAIPP KKNQDKTEIP AINTIASAEP TVHSTPTTEA IVNTVDNPEA 151 SSESASASE TANTAQTSTE V					
	21	s2- caseina	B. bubalis	4,86	26283	82
Sequenza Proteica Peptidi identificati	1 MKFFIFTCLL AVALAKHTME HVSSEESII SQETYKQEK N MAIHP SKENL 51 CSTFC KEVIR NANEEYSIG SSSEESA EV A TEEVK ITVDD KHYQKALNEI 101 NQFYQ KFPQY LQYLYQGPIV LNPWDQVKRN AVPIPTLNR EQLSTSEENS					

	151	KKTVDMESTE VITKKT LTE EDKNRLNFLK KISQHYQKFT WPQYLK TVYQ 201 YQKAMKPWTQ PK TKVIPYVR YL				
	22	s2- caseina	B. bubalis	7,17	26283	61
Sequenza Proteica Peptidi identificati		1 MKFFIFTCLL AVALAKHTME HVSSSEESII SQETYKQEK MAIHPSKENL 51 CSTFCKE VIR NANEBEYSIG SSSEESAEVA TEEVK ITVDD KHYQKALNEI 101 NQFYQK FPQY LQYLYQGPIV LNPWDQVKRN AVPITPTLNR EQLSTSEENS 151 KKTVDMESTE VITKKT LTE EDKNRLNFLK KISQHYQKFT WPQYLKTVYQ 201 YQKAMKPWTQ PK TKVIPYVR YL				
	23	s2- caseina	B. bubalis	6,54	26270	60
Sequenza Proteica Peptidi identificati		1 MKFFIFTCLL AVALAKHTME HVSSSEESII SQETYKQEK MAIHPSKENL 51 CSTFCKE VIR NANEBEYSIG SSSEESAEVA TEEVK ITVDD KHYQKALNEI 101 NQFYQK FPQY LQYLYQGPIV LNPWDQVERN AVPITPTLNR EQLSTSEENS 151 KKTVDMESTE VITKKT LTE EDKNRLNFLK KISQHYQKFT WPQYLKTVYQ 201 YQKAMKPWTQ PK TNVIPYVR YL				
	24	-lattoglobulina	B. bubalis	4,83	18255	72
Sequenza Proteica Peptidi identificati		1 IIVTQTM GL DIQK VAGTWY SLAMAASDIS LLDAQSAPLR VYVEELKPTP 51 EGDLEILLQK WENGECAQ KK IIAE TKIPA VFKIDALNEN KVLVLDTDYK 101 KYLLFCMENS AEPEQSLACQ CLVR TPEVDD EALEKFDKAL KALPMHIRLS 151 FNPTQLEEQC HV				
	25	-lattoalbumina	B. bubalis	4,83	16692	63
Sequenza Proteica Peptidi identificati		1 EQLTKCEVFR ELKDLKDYGG VSLPEWVCTT FHTSGYDTQA IVQNNDSTEY 51 GLFQINNKIW CKDDQNPSS NICNISCDKF LDDDLTDDIM CVK KILDK VG 101 INYWLAHK KAL CSEKLDQWLC EKL				
	26	Albumina sierica	B. bubalis	5,78	71221	79

Sequenza Proteica Peptidi identificati	1 MKWVTFISLL LLFSSAYSRG VFRRDTHKSE IAHRFKDLGE					
	EQFKGLVLIA					
	51 FSQYLQQCPF DEHVKLVNEL TEFAKTCVAD ESHAGCEKSL					
	HTLFGDELCK					
	101 VASLRETYGD MADCCEKQEP ERNECFLSHK DDSPDLPKLK					
	PDPNTLCDEF					
	151 KADEKKFWGK YLYEIARRHP YFYAPELLYY ANKYNGVFQD					
	CCQAEDKGAC					
	201 LLPKIETMRE KVLASSARQR LRCASIQKFG ERAKAWVA					
	RLSQKFPKAE					
	251 FVEVTKLVTD LTKVHKECCH GDLLECADDR ADLAKYICDN					
	QDTISSKLKE					
	301 CCDKPLEKS HCIAEVEKDA IPENLPLTA DFAEDKDVCK					
NYQEAKDAFL						
351 GSFLYEYSRR HPEYAVSVLL RLAK EYEATL EECCA KDDPH						
ACYSTVFDKL						
401 KHLVDEPQNL IK QNCDQFEK LGEYGFQNAL IVRYTR KVPQ						
VSTPTLVEVS						
451 R SLGKVGTRC CTKPESERMP CTEDYLSLIL NRLCVLHEKT						
PVSEKVTKCC						
501 TESLVNRRPC FSALTPDETY VPKAFDEKLF TFHADICTLP						
DTEKQIKKQT						
551 ALVELLKHKP KATEEQLKTV MENFVAFVDK CCAADDKEAC						
FAVEGPKLVV						
601 STQATALA						
	27	Albumina sierica	B. bubalis	5,78	71221	65
Sequenza Proteica Peptidi identificati	1 MKWVTFISLL LLFSSAYSRG VFRRDTHKSE IAHRFKDLGE					
	EQFKGLVLIA					
	51 FSQYLQQCPF DEHVKLVNEL TEFAKTCVAD ESHAGCEKSL					
	HTLFGDELCK					
	101 VASLRETYGD MADCCEKQEP ERNECFLSHK DDSPDLPKLK					
	PDPNTLCDEF					
	151 KADEKKFWGK YLYEIARRHP YFYAPELLYY ANKYNGVFQD					
	CCQAEDKGAC					
	201 LLPKIETMRE KVLASSARQR LRCASIQKFG ERAKAWVA					
	RLSQKFPKAE					
	251 FVEVTKLVTD LTKVHKECCH GDLLECADDR ADLAKYICDN					
	QDTISSKLKE					
	301 CCDKPLEKS HCIAEVEKDA IPENLPLTA DFAEDKDVCK					
NYQEAKDAFL						
351 GSFLYEYSRR HPEYAVSVLL RLAK EYEATL EECCA KDDPH						

	ACYSTVFDKL 401 KHLVDEPQNL IKQNCdqFEK LGEYGFQNAL IVRYTRKVPQ VSTPTLVEVS 451 RSLGKVGTRC CTKPESERMP CTEDYLSLIL NRLCVLHEKT PVSEKVTKCC 501 TESLVNRRPC FSALTPDETY VPKAFDEKLF TFHADICTLP DTEKQIKKQT 551 ALVELLKHKP KATEEQLKTV MENFVAFVDK CCAADDKEAC FAVEGPKLVV 601 STQTALA					
	28	Albumina sierica	B. bubalis	5,78	71221	76
Sequenza Proteica Peptidi identificati	1 LLFSSAYSRG VFRRDTHKSE IAHRFKDLGE EQFKGLVLIA 51 FSQYLQQCPF DEHVKLVNEL TEFAKTCVAD ESHAGCEKSL HTLFGDELCK 101 VASLRETYGD MADCCEKQEP ERNECFLSHK DDSPDLPKLLK PDPNTLCDEF 151 KADEKKFWGK YLYEIARRHP YFYAPELLYY ANKYNGVFQD CCQAEDKGAC 201 LLPKIETMRE KVLASSARQR LRCASIQKFG ERALKAWSVA RLSQKFPKAE 251 FVEVTKLVTD LTKVHKECCH GDLLECADDR ADLAKYICDN QDTISSKLKE 301 CCDKPLLEKS HCIAEVEKDA IPENLPPLTA DFAEDKDVCK NYQEAKDAFL 351 GSFLYEYSRR HPEYAVSVLL RLAKYEATL EECCAADDPH ACYSTVFDKL 401 KHLVDEPQNL IKQNCdqFEK LGEYGFQNAL IVRYTRKVPQ VSTPTLVEVS 451 RSLGKVGTRC CTKPESERMP CTEDYLSLIL NRLCVLHEKT PVSEKVTKCC 501 TESLVNRRPC FSALTPDETY VPKAFDEKLF TFHADICTLP DTEKQIKKQT 551 ALVELLKHKP KATEEQLKTV MENFVAFVDK CCAADDKEAC FAVEGPKLVV 601 STQTALA					

Nel confronto tra le 2D di campioni a bassa e alta resa le maggiori differenze visibili si sono riscontrate nell'intensità delle spot corrispondenti alle k-caseine (fig4C).

Al fine di quantificare in via del tutto preliminare l'esistenza reale di una differenza tra i campioni, è stata misurata l'area e l'intensità delle 4 spot corrispondenti alle k-caseine: 20, 19, 16, 18 come

riportate in fig. 2C utilizzando il software Melanie II (Bio-Rad). Il prodotto dell'area per l'intensità delle varie spot nei 4 campioni è riportata in figura 5C. I campioni 2 e 4, ambedue ad alta resa, hanno mostrato valori più elevati in corrispondenza della spot 16 e valori più bassi nelle spot 19 e 20. Se si confronta il gel riportato in figura 2B con quanto trovato da D'Ambrosio et al., (2008) è possibile evincere che le spot identificate come n.16 corrispondono alla k-caseina con un unico sito di fosforilazione, mentre le spot 19 e 20 identificano le k-caseine maggiormente fosforilate e glicosilate. Resta da definire, ed ulteriori prove sono tuttora in corso, per definire se questi differenti profili siano ripetibili su un maggior numero di campioni con analoghe differenze di resa e se ciò si accompagni a modificazioni riscontrabili a livello genico.

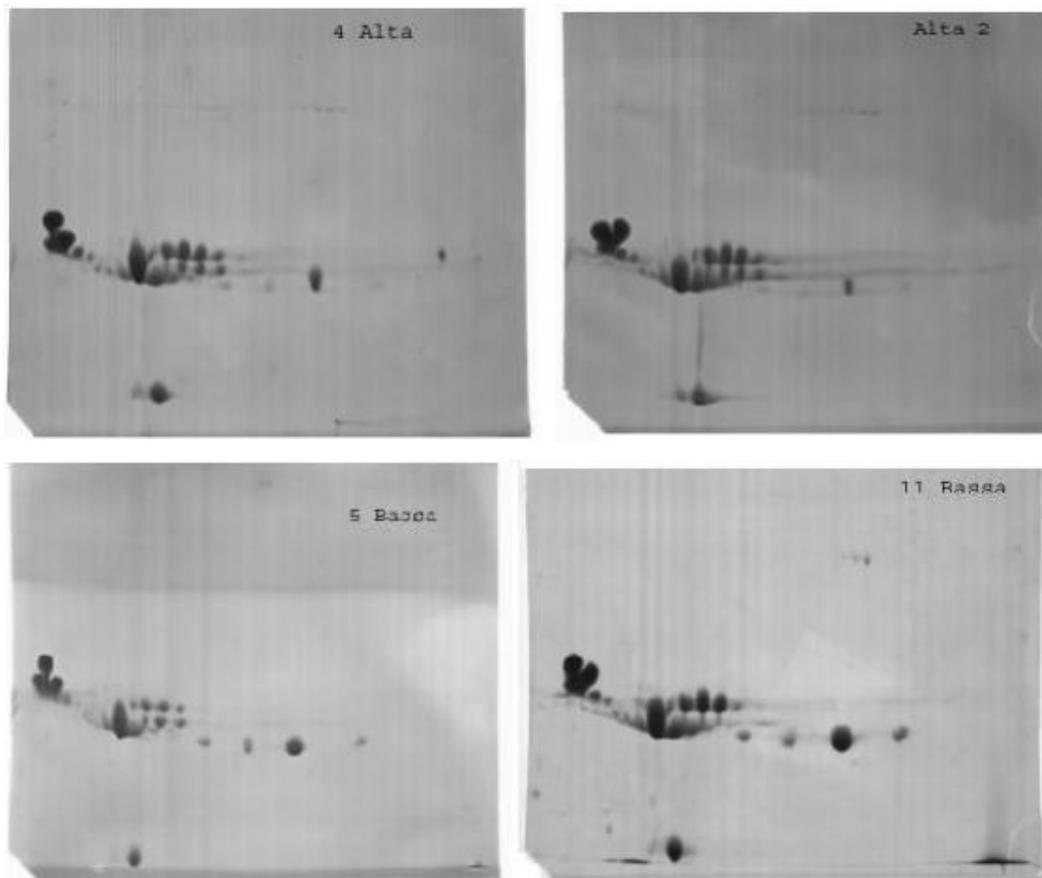


Fig.4C: 2D di quattro campioni di latte scremato bufalino, di cui 2 (2,4) ad alta resa e 2 (5,11) a bassa resa.

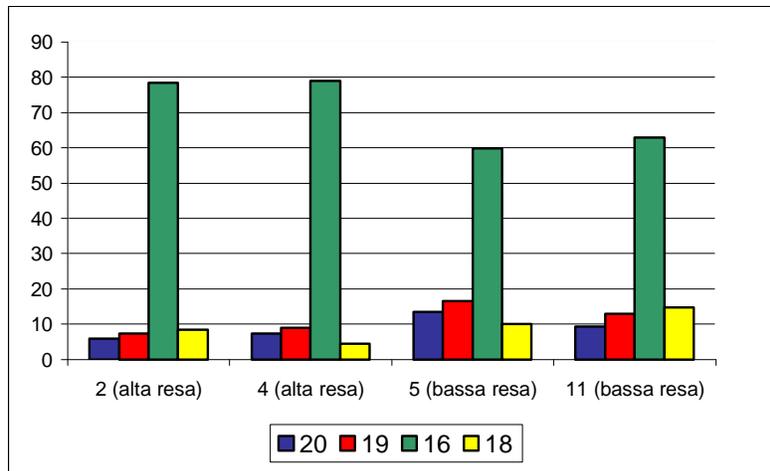


Fig.5C: Intensità delle spot 20, 19, 16, 18 nei quattro campioni di latte, di cui 2 (2,4) ad alta resa e 2 (5,11) a bassa resa.

5.4 Bibliografia

1. Caroli A., Bolla P., Budelli E., Barbieri G., Leone P.. Effect of k-casein E allele on clotting aptitude of Italian Friesian milk. *Zoot. e Nutr. Anim.*, (2000) 26,127-130.
2. Døambrosio C., Arena S., Salzano A., Tenzone G., Ledda L., Scalonì A. A proteomic characterization of water buffalo milk fractions describing PTM of major species and the identification of minor components involved in nutrient delivery and defense against pathogens. *Proteomics* (2008a),8: 3657-3666.
3. Døambrosio C., Arena S., Salzano A., Tenzone G., Ledda L., Scalonì A. A proteomic characterization of water buffalo milk fractions describing PTM of major species and the identification of minor components involved in nutrient delivery and defense against pathogens. Supporting information. (2008b)
4. DøAuria E., Agostani C., Giovannini M., Riva E., ZetterstroR., Fortin R., Greppi G., Ionizzi L., Roncada P.. Proteomic evaluation of milk from different mammalian species as a substitute for breast milk. *Acta Paediatrica* (2005); 94: 1708-1713.
5. Di Stasio L., Mariani P.. The role of protein polymorphism in the genetic improvement of milk production. *Zoot. Nutr. Anim.* (2000) 26: 69-90.
6. Formaggioni P., Summer A., Malacarne M., Mariani P. Università degli Studi di Parma. *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria*, (1999)Vol. XIX.
7. Laemmli, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (1986); 227 (5259):680-5.
8. Mariani P. Polimorfismo delle proteine ed attitudine tecnologico-casearia del latte . *La razza bruna italiana* n. 1(1999).

Ringraziamenti

La prima persona da ringraziare è la Prof.ssa Rossella Di Palo, non solo per aver guidato il mio percorso formativo con esperienza e bravura, ma soprattutto per essere più volte andata al di là dei compiti del docente guidaö mostrando affetto e disponibilità e divenendo così un punto di riferimento nella mia vita.

Grazie all'esperienza fatta al dipartimento di biochimica delle proteine del I Policlinico ho incontrato molte persone meravigliose, ma la mia attenzione va in particolar modo, al Prof. Alfonso Giovane, un uomo d'altri tempi, che con disponibilità, bravura e gentilezza è riuscito a farmi appassionare alla biochimica e alla Dott.ssa Lara Milone ormai mia cara amica.

Non posso poi non ringraziare tutti miei colleghi di dottorato, in particolar modo, Marco per aver condiviso stress, litigate e tante tante risateí e ancora tutti, ma proprio tutti i docenti del dipartimento del DISCIZIA ricordando con affetto il Prof. Giuseppe Campanile e la Prof.ssa Fulvia Bovera per avermi iniziato all'ancora misterioso mondo dello spettrofotometroö.

Ringrazio ancora tutte le persone straordinarie dell'area amministrativa, per aver sopportato le mie continue incursioni per le più svariate richieste e per essere capaci di farmi sorridere anche nelle giornate piovose. Ringrazio ancora i dottori: Roberto Napolano per le mie continue richieste dati e per la sua sempre enorme disponibilità, Anna Balestrieri e Monica Marchiello per le lunghe chiacchierate.

Un ringraziamento particolare va necessariamente ai miei meravigliosi genitori, ai miei fratelli, alle mie fantastiche amiche, in particolar modo Iolanda più che amica, sorella e al mio amore Pierpaolo.