

ASPETTI DELLA PRODUZIONE DEI PICCOLI RUMINANTI CON IMPATTO SULLA SALUTE UMANA

Anna Maria CAROLI^{*}, Stefania CHESSA², Daniela RIGNANESE¹, Mina MARTINI³, Federica SALARI³, Iolanda ALTOMONTE³, Carmen CASOLI⁴, Mariano PAUSELLI⁴, Maria Luigia ALICATA⁵, Adriana BONANNO⁶, Giuseppina GARRO⁶, Rosalba MAURIELLO⁶, Lina CHIANESE⁶, Stefano SARTORE⁷, Roberto RASERO⁷, Paola SACCHI⁷

RIASSUNTO - Negli ultimi anni l'attenzione del consumatore si è sempre più orientata verso le caratteristiche nutrizionali degli alimenti. Queste proprietà sono di grande importanza anche per quanto riguarda le produzioni dei piccoli ruminanti. Il presente lavoro ha lo scopo di riassumere i principali risultati emersi dal progetto di ricerca "Aspetti della produzione dei piccoli ruminanti con particolare impatto sulla salute umana". Sono stati analizzati mediante i metodi descritti in letteratura: 1) i polimorfismi genetici dei biopeptidi del latte dei piccoli ruminanti; 2) le attività di alcuni enzimi della membrana del globulo di grasso e la frazione lipidica del latte ovino; 3) la qualità nutrizionale del latte e del formaggio ovino in relazione all'intensità di pascolamento; 4) le componenti bioattive di siero e scotta residui alla produzione dei formaggi ovi-caprini; 5) la resistenza genetica alle encefalopatie spongiformi trasmissibili e l'efficienza economica e biologica in razze ovine. I risultati ottenuti evidenziano, da svariati punti di vista, numerose potenzialità legate alle produzioni dei piccoli ruminanti e alle loro ricadute sulla salute umana.

Parole chiave: piccoli ruminanti, produzione, salute umana

SUMMARY – *Aspects of small ruminant production with particular impact on human health* – Dairy sheep and goat farming represents a useful tool to utilize those areas that are characterized by hard climatic and geopedological conditions, such as vast areas of the Italian territory. In such a context, both consumers and producers request constantly updated information concerning the main aspects affecting the global quality of products. The project "Aspects of small ruminant production with particular impact on human health" aims at studying some elements of small ruminants' production particularly actual for implications on human health. Five subjects were chosen: 1) the genetic polymorphisms of bioactive peptides from milk of small ruminants; 2) the health and nutritional aspects of the membrane and core of milk fat globules from ewe's milk; 3) the nutritional quality of milk and cheese as affected by grazing intensity; 4) the bioactive components recovery of rennet whey and "scotta" by-products from ovi-caprine cheese production; 5) the relationships between genetic resistance to transmissible spongiform encephalopathies potential risk for public health and economic and biological efficiency in sheep breeds. The obtained results as well as their potential impact on public health are discussed from different point of view. **Keywords:** small ruminants, animal productions, human health

* Corrispondenza ed estratti: caroli@med.unibs.it

¹ DSBB, Università degli Studi di Brescia. Viale Europa 11, 25123 Brescia.

² Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria – Consiglio Nazionale delle Ricerche. Via Bassini 15, 20133 Milano.

³ Dipartimento di Produzioni Animali, Università degli Studi di Pisa. Via delle Piagge 2, 56124 Pisa.

⁴ Dipartimento di Biologia Applicata, Università degli Studi di Perugia. Borgo XX Giugno 74, 06121 Perugia.

⁵ Dipartimento S.En.Fi.Mi.Zo., Università degli Studi di Palermo. Viale delle Scienze, 90128 Palermo.

⁶ DSA, Facoltà di Agraria, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Portici. Via Università 100, 80055 Portici (NA).

⁷ Dipartimento di Produzioni Animali, Università degli Studi di Torino. Via Leonardo da Vinci 44, 10095 Grugliasco (TO).

Negli ultimi anni l'attenzione del consumatore si è sempre più orientata verso le caratteristiche nutrizionali degli alimenti. Queste proprietà sono di grande importanza anche per quanto riguarda le produzioni dei piccoli ruminanti. Il progetto di ricerca "Aspetti della produzione dei piccoli ruminanti con particolare impatto sulla salute umana" (PReSAL) si è occupato di una serie di tematiche riguardanti la specie ovina e caprina in relazione ad alcuni elementi nutrizionali e salutistici delle loro produzioni. I risultati dell'intero progetto sono stati presentati alla comunità scientifica italiana in occasione del 2° Congresso Nazionale dell'Associazione Italiana dei Tecnici del Latte [1] e del XIX Convegno Nazionale della Società Italiana di Patologia e Allevamento degli Ovini e Caprini [2]. Il progetto si è concentrato, in particolare, su cinque tematiche:

1. *Peptidi bioattivi del latte dei piccoli ruminanti.* Le proteine del latte sono precursori di numerosi peptidi biologicamente attivi [3]. Le attività di ricerca su tali peptidi bioattivi si sono concentrate sulla specie bovina e sulla sequenza amminoacidica primaria senza considerare la variazione genetica ai loci lattoproteici. Si è inteso pertanto affrontare questa importante tematica dalle potenziali ricadute nutraceutiche anche per quanto riguarda il latte dei piccoli ruminanti.

2. *Aspetti salutistici e nutrizionali della membrana e del core del globulo di grasso del latte ovino.* I globuli di grasso del latte sono costituiti da un core di trigliceridi avvolti da una membrana di origine cellulare (MFGM) dalle elevate potenzialità nutraceutiche [4]. La MFGM contiene diversi enzimi per molti dei quali l'enzimologia è ben documentata, ma il ruolo fisiologico non è del tutto stato chiarito. Inoltre, solo pochi studi ne hanno valutato l'attività nei piccoli ruminanti. Allo scopo di migliorare la conoscenza riguardo ai globuli di grasso del latte ovino sono state valutate le variazioni, nel corso della lattazione, del contenuto delle prote-

ine di membrana (TMP) e delle attività di cinque enzimi della MFGM: xantina deidrogenasi (XDH), xantina ossidasi (XO), gamma-glutamitranspeptidasi (GGT), fosfatasi alcalina (AP) ed ecto 5' nucleotidasi (5'-N). Inoltre le attività enzimatiche saggiate e le TMP sono state correlate alla frazione lipidica del latte. Infine lo studio ha valutato la composizione acidica del core e della membrana del globulo di grasso.

3. *Qualità nutrizionale del latte ovino e del formaggio in relazione all'intensità di pascolamento.* L'utilizzo del pascolo può contribuire al miglioramento dell'immagine del prodotto ovino sul mercato e delle sue caratteristiche qualitative [5]. L'obiettivo della ricerca in oggetto è stato, in particolare, verificare il legame tra l'allevamento delle pecore da latte al pascolo, a diverse intensità di carico e su specie botaniche differenti, e la quantità e la qualità delle produzioni, con particolare riferimento ad aspetti significativamente importanti per la salute del consumatore.

4. *Recupero delle componenti bioattive di sieri e scotta residui della produzione dei formaggi ovi-caprini.* Il siero residuo dalla lavorazione del Pecorino viene generalmente utilizzato per la produzione della Ricotta di pecora. Nonostante il siero di caseificio sia ricco di componenti bioattive [6], solo una minima parte di questi sottoprodotti (siero e scotta) viene recuperata. Il progetto di ricerca ha inteso valorizzare il siero residuo alla lavorazione del Pecorino e del Caciocotta mediante il recupero dei componenti bioattivi che potranno essere impiegati nell'industria alimentare, farmaceutica o come integratori a seconda dell'effetto benefico che possono avere sulla salute umana.

5. *Resistenza genetica alle encefalopatie spongiformi trasmissibili ed efficienza economica e biologica in razze ovine.* La scrapie è un'encefalopatia spongiforme trasmissibile dei piccoli ruminanti [7]. Nella pecora sono noti sei alleli del gene del prione (PRNP); ARR è associato a resistenza alla scrapie, VRQ è associato a elevata suscettibilità.

Nelle razze in cui VRQ è raro ARQ è associato alla maggior suscettibilità. Nei piani di sorveglianza l'Unione Europea ha introdotto l'analisi di PRNP per la selezione di ovini resistenti. Tuttavia non si devono ignorare condizioni limitanti quali la ripartizione delle frequenze alleliche, la consanguineità e gli eventuali effetti negativi conseguenti all'azione selettiva. Allo scopo di valutare i programmi di selezione attualmente applicati, di ipotizzare alcuni scenari evolutivi e di identificare eventuali punti critici utili a minimizzare l'entità del processo dispersivo, sono state prese in considerazione due razze ovine autoctone del Piemonte.

Ciascuna tematica è stata affrontata da un'unità di ricerca (UR), a volte in collaborazione con altre università e centri di ricerca. I risultati ottenuti per ciascuna linea di ricerca saranno sintetizzati nelle prossime sezioni.

PEPTIDI BIOATTIVI DEL LATTE DEI PICCOLI RUMINANTI

Per quanto riguarda le ricerche condotte dall'UR Brescia, va innanzitutto sottolineato come le interazioni che si sono potute stabilire tra il progetto PRIN2007, il programma Vigoni (CRUI) e il Progetto SELMOL (MI-PAAF) (<http://www.selmol.eu/node>) siano state altamente proficue e abbiano portato a numerosi risultati presentati in occasione di diversi convegni nazionali e internazionali e riportati in una serie di pubblicazioni scientifiche. Di grande importanza è risultata, inoltre, la collaborazione con l'Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria del CNR. Verranno di seguito sintetizzate le principali acquisizioni ottenute dalla UR Brescia, riportando i riferimenti ai prodotti della ricerca già disponibili, che possono fornire ulteriori dettagli sulle diverse tematiche affrontate.

È stato effettuato uno studio *in silico* e *in vitro* per l'identificazione delle differenze a livello di peptidi bioattivi legate alle sequenze lattoproteiche dei piccoli ruminanti rispetto alla specie bovina, e all'eventuale

presenza di polimorfismo genetico [8-12].

In particolare, sono stati studiati i caseinofosfopetidi (CFP), peptidi che derivano dalle diverse frazioni della caseina (CN) e possiedono la capacità di legare e solubilizzare minerali come Ca^{2+} . Sono stati considerati 3, 2 e 3 CFP derivanti rispettivamente da α_{S1} -CN (*CSN1S1*), β -CN (*CSN2*) e α_{S2} -CN (*CSN1S2*). Dal confronto delle sequenze delle tre specie (bovina, ovina, caprina) sono state individuate un totale di 30 differenze tra le 3 specie e tra le 52 varianti genetiche considerate in base alla letteratura. Le differenze osservate coinvolgono scambi o delezioni di amminoacidi e la presenza di serina non fosforilata. E' stata messa in luce, in particolare, l'assenza di un importante CFP con 4 serine fosforilate nella variante F caprina. Si tratta di una variante associata a un contenuto debole di α_{S1} -CN e presente con una frequenza alquanto elevata nelle diverse razze caprine. La presenza di questa variante va quindi considerata non solo per gli effetti negativi sulla trasformazione casearia del latte ma anche per l'assenza di questo CFP [10, 12].

Allo scopo di individuare differenti effetti biologici, dovuti alla variabilità genetica nella sequenza amminoacidica, sono stati implementati modelli sperimentali *in vitro* per la valutazione delle attività biologiche inerenti il trasporto del calcio. E' stato analizzato l'effetto sulla mineralizzazione ossea, valutata mediante analisi *in vitro* su osteoblasti murini, di alcuni caseinofosfopetidi caratterizzati da differenze genetiche nella loro sequenza. I peptidi prescelti sono stati ottenuti mediante sintesi chimica e sono stati testati su linee cellulari osteoblastiche murine. I nostri risultati evidenziano che differenti peptidi possono avere un effetto differenziale sulla deposizione del calcio nella matrice extracellulare e che la variazione genetica è coinvolta in tale effetto [8, 9, 11].

La distribuzione dei più interessanti peptidi in alcune razze ovine e caprine e delle implicazioni selettive è stata valutata nelle razze caprine Buren [13] e Garfagnina [14]

e nella specie ovina [15] con particolare riferimento alle razze Massese, Garfagnina, Pomarancina e Zerasca [16, 17], Sarda, Comisana, Gentile di Puglia e Sopravissana [18].

Per quanto riguarda la specie caprina è stata condotta, in collaborazione con l'Università di Giessen (Germania), la caratterizzazione genetica ai loci caseinici della razza Buren, razza conosciuta anche come capra Boer, di origine sud-africana. Negli anni 1970 è stata importata in Germania dove rappresenta attualmente la terza razza dal punto di vista della consistenza numerica. È specializzata per la produzione di carne. La struttura lattoproteica della razza è stata paragonata a quella di razze da latte e a duplice attitudine, osservando un'interessante divergenza della capra Buren dalle altre razze. Ad esempio, l'aplotipo caseinico B-A-A-B (*CSN1S1-CSN2-CSN1S2-CSN3*), considerato ancestrale nella specie caprina, prevale nettamente nella capra Buren, con una frequenza superiore al 80% [13]. La variante F di α_{s1} -CN presenta una frequenza molto bassa (0,033), a indicare quindi nella razza una frequenza molto elevata (0,967) del CFP con 4 serine fosforilate.

In collaborazione con la UR Pisa è stato inoltre effettuato un ampio studio zootecnico sulla capra Garfagnina [19]. Si tratta di una razza autoctona italiana a rischio di estinzione, allevata in Toscana e per la quale è in corso un'opera di valorizzazione basata su alcuni prodotti tipici sia di latte che di carne. Per quanto riguarda la variabilità lattoproteica della razza, si è osservato come l'elevata frequenza degli alleli di α_{s1} -CN, associati ad un elevato livello di questa proteina, potrebbe facilitare la selezione a favore di queste varianti, più favorevoli dal punto di vista dell'attitudine del latte alla caseificazione. D'altra parte, la presenza di alleli associati a un contenuto nullo e debole rispettivamente di beta-CN e α_{s1} -CN, potrebbe essere sfruttata per la produzione di latte con particolari proprietà nutrizionali, ad esempio in caso di specifiche allergie di

pazienti verso α_{s1} -CN o beta-CN.

In uno studio condotto sull'idoneità del latte di capra per l'alimentazione di individui intolleranti al latte vaccino, sono stati analizzati per la loro allergenicità campioni individuali di latte caprino caratterizzati da differenti genotipi di α_{s1} -CN. È stata osservata una reazione inferiore a 2 campioni. Questo fatto suggerisce la possibilità di destinare il latte caprino prodotto da animali con particolari genotipi all'alimentazione di pazienti selezionati per la loro intolleranza a specifiche frazioni di caseina [20].

È stato, infine, messo a punto una *microarray* per l'analisi dei polimorfismi lattoproteici caprini, che permetterà un'analisi simultanea di numerosi Single Nucleotide Polymorphism (SNP), particolarmente utile per le diverse implicazioni selettive [21]. Il metodo, basato sulla combinazione di PCR multipla (mPCR), reazione di ligazione (LDR) e ibridazione su un array universale (UA), è stato messo a punto per analizzare, in una prima versione, un totale di 20 importanti SNP che caratterizzano le principali varianti genetiche delle caseine caprine.

Per quanto riguarda la specie ovina, è stata identificata a livello di beta-CN una mutazione silente nella tripletta che codifica per Gln₁₉₂ e una transversione C→A responsabile della sostituzione amminoacidica Leu₁₉₆→Ile₁₉₆ [17]. Una variante di α_{s2} -CN è stata inoltre caratterizzata identificando due mutazioni tra loro associate: una transversione C→G, responsabile della sostituzione amminoacidica Asn₂₀₀→Lys₂₀₀, e una transversione T→A a livello del 14° nucleotide del 16° esone [17]. In particolare, le mutazioni associate a scambi amminoacidici vanno attentamente considerate per il potenziale effetto sui peptidi bioattivi che da tali proteine possono avere origine e sugli epitopi responsabili di allergie con ripercussioni sulla salute umana [22]. L'analisi delle sequenze ha messo inoltre in luce numerosi polimorfismi sia negli esoni, sia nelle regioni introniche ad essi strettamente adiacenti. In particolare nella variante *CSN2*X* sono

state identificate diverse inserzioni/delezioni, e alcune delle mutazioni che la distinguono dalle varianti *CSN2*A* e *CSN2*G* sono le stesse che si riscontrano nel confronto fra la sequenze delle specie caprina ed ovina [19].

Si è infine collaborato, a corollario del progetto, a uno studio sulla differenziazione mioblastica e sulla deficienza di miostatina, proteina che ha il compito di regolare l'accrescimento della massa muscolare [23].

ASPETTI SALUTISTICI E NUTRIZIONALI DELLA MEMBRANA E DEL CORE DEL GLOBULO DI GRASSO DEL LATTE OVINO

La linea di ricerca è stata portata avanti dall'UR Pisa. L'obiettivo è stato quello di investigare le caratteristiche fisico-chimiche, nutrizionali e salutistiche del latte ovino, ponendo particolare attenzione alla frazione lipidica. Lo scopo è stato raggiunto sia tramite lo studio della valutazione fisica del grasso andando ad indagare la morfometria dei globuli, sia valutando la composizione acidica del latte *in toto*, quella del core e quella della membrana dei globuli di grasso. Inoltre, è stata dosata l'attività di alcuni enzimi di membrana al fine di studiare le relazioni che legano quest'ultimi alla materia grassa del latte.

Sono state individuate 14 pecore di razza Massese, provenienti da un unico allevamento, omogenee per ordine di parto (pluripare), fase di lattazione e dieta. Un prelievo di latte individuale, proveniente dalla mungitura del mattino è stato effettuato a 15 giorni dal parto. Da un unico allevamento sono state inoltre scelte 7 pecore pluripare di razza Massese che avevano partorito nell'arco di una settimana e stabulate 10 giorni prima del parto. Le pecore usufruivano della stessa razione alimentare e i campionamenti individuali di latte provenivano dalla mungitura del mattino secondo il seguente schema: momento 0 (12 ore dal parto), 3°, 6°, 10°, 15°, 20°, 30°, 45°, 60°, 90°, 120° giorno dal parto. In totale i campioni prelevati sono stati 91.

Il diametro dei globuli di grasso risulta

statisticamente maggiore nella fase colostrale, mentre il numero di globuli/mL tende a variare in maniera opposta al diametro. Il profilo acidico mostra un contenuto statisticamente minore di acidi grassi a corta catena nel colostro, in particolare C4:0, C6:0, C8:0, C10:0 aumentano nel corso della lattazione per poi diminuire a 120 giorni. Andamento opposto si registra per le lunghe catene ed in particolare per C20:4 e C22:6. Nel colostro sono presenti in minore quantità gli acidi grassi saturi (61,67%), mentre maggiore è il contenuto di monoinsaturi (36,16%). Il C12:0 tende ad aumentare nel corso della lattazione, mentre C14:0 e C16:0 mostrano i valori maggiori sia nel colostro che a 120 giorni; andamento inverso è stato registrato per il C18:0. Il contenuto di C18:1t9 e CLA c9,t11 mostra valori stabili durante l'arco della lattazione e tende ad aumentare in maniera significativa nell'ultima fase.

Nella membrana dei globuli di grasso non è presente l'acido butirrico (C4:0). Inoltre, per tutto il periodo di lattazione, il C8:0, il C20:3 omega 6, il C20:5, il C24:0 ed il C24:1 non subiscono modificazioni. Per quanto riguarda le corte catene, gli acidi grassi C6:0 e C10:0 mostrano un andamento inverso: il primo presenta valori massimi nel colostro e minimi nell'ultima fase di lattazione. Il contenuto di acidi grassi saturi è minore nella membrana dei globuli di grasso rinvenuti nel colostro (67,42 vs 72,88) rispetto alle fasi di lattazione successive. Il C12:0, C14:0, C16:0 e C18:0 presentano lo stesso andamento rilevato nella latte *in toto*. Il contenuto di C22:6 si presenta inferiore nel colostro (0,096 vs 0,163); di contro, l'acido arachidonico C20:4 ha un andamento opposto (0,191 vs 0,126)

Lo studio del profilo acidico del core mostra quantità maggiori di acidi grassi a corta catena rispetto alla membrana (10,95 vs 1,55). In particolare, il C4:0, il C6:0 e il C8:0 tendono ad avere il valore minimo nella fase colostrale e in quella finale; il C10:0, pur essendo presente in quantità minime

nel colostro, presenta andamento stabile a partire dal 45° giorno di lattazione. Gli acidi grassi C12:0, C14:0, C16:0 e C18:0 del core presentano lo stesso andamento rilevato sia nel latte *in toto* che nella membrana. Il CLA c9,t11 mostra i valori maggiori nella fase colostrale e a 120 giorni di lattazione (0,28-0,30). Come per la membrana anche nel core il C20:4 mostra i valori maggiori nel colostro e raggiunge il picco tra i 30 e i 45 giorni di lattazione. Il C22:6 presenta i valori maggiori nella prima settimana di lattazione.

Tutte le attività enzimatiche specifiche, eccetto quella della XDH, mostrano variazioni significative nel corso della lattazione. L'attività della GGT è risultata massima nei primi 20 giorni di lattazione come riportato anche in studi su latte bovino [24]. La XO ha mostrato un picco massimo di attività a 45 giorni *post partum*, mentre la 5'-N aumenta successivamente. L'attività della AP aumenta al progredire della lattazione. Le TMP sono risultate in quantità maggiore a 12 ore *post partum*. Sono state evidenziate relazioni positive tra attività della AP e il numero dei globuli e negative tra le attività di XO e XDH e le dimensioni dei globuli. Lo studio ha messo in luce relazioni significative tra attività enzimatiche e alcuni acidi grassi del latte [25].

A corollario della linea di ricerca, si è collaborato con la UR Brescia alla valutazione morfo-funzionale sulla popolazione caprina Garfagnina [14, 20] sulla quale è stata inoltre condotta una valutazione sanitaria [26].

QUALITÀ NUTRIZIONALE DEL LATTE OVINO E DEL FORMAGGIO IN RELAZIONE ALL'INTENSITÀ DI PASCOLAMENTO

La linea di ricerca è stata portata avanti dall'UR Perugia in collaborazione con l'Università di Palermo. Le sperimentazioni sono state effettuate su pecore di razza Comisana allevate al pascolo, differenziando le prove in base alle condizioni pedoclimatiche dell'Umbria e della Sicilia.

La prima prova condotta dalla UR Perugia ha considerato due gruppi di 8 pecore

pluripare di razza Comisana. Gli animali sono stati fatti pascolare su un appezzamento di 4,5 ha per un periodo di 4 settimane secondo due diverse strategie di pascolamento: continuo (EST) con un carico pari ad 8 capi per 1,5 ha e continuo intensivo (INT) con un carico di 1 capo/40 m²/d che prevedeva l'impiego di recinzioni elettrificate. La strategia di pascolamento non ha influenzato le performance produttive e le caratteristiche qualitative del latte fatta eccezione per il livello di urea, più elevato ($P < 0,01$) nel latte dei soggetti sottoposti ad una strategia di pascolamento estensivo. La composizione acidica della frazione lipidica del formaggio non mette in evidenza sostanziali differenze fra i due gruppi sperimentali.

La seconda sperimentazione è stata effettuata impiegando 20 pecore pluripare di razza Comisana omogenee per peso e lunghezza di lattazione. Gli animali sono stati ripartiti in 4 gruppi sperimentali corrispondenti ad altrettanti trattamenti alimentari. Il gruppo controllo era caratterizzato da una bassa percentuale lipidica ed un elevato contenuto in carboidrati non strutturali, gli altri gruppi ricevevano tre mangimi sperimentali costituiti da due fonti lipidiche: lino, sansa denocciolata essiccata miscelata ad erba medica disidratata (20%), ed un *mix* delle due fonti. Non si sono evidenziate differenze statisticamente significative fra i trattamenti alimentari per le caratteristiche del latte (composizione centesimale in lattosio, grasso, proteine totali, caseine, parametri lattodinamografici e cellule somatiche). La minore intensità di colore giallo evidenziata nel formaggio ottenuto da latte di animali che avevano consumato sansa come tale o miscelata con lino, evidenzierebbe la probabile attività antiossidante determinata dai polifenoli presenti in essa. Interessanti sono i risultati relativi alle variazioni riscontrabili nei parametri colorimetrici dei formaggi durante la conservazione in cella a 4 °C senza illuminazione, misurati su campioni presi nella porzione interna delle forme. Significativo è risultato l'effetto dell'intera-

zione tra trattamento alimentare e tempo di conservazione ($P < 0,05$).

Al fine di valutare il bilancio ossidativo del latte ovino, sia nella frazione idrosolubile che in quella liposolubile, è stata effettuata un'analisi su campioni di latte di pecore Comisane a inizio lattazione. Su tali campioni, frazionati come latte "intero", "scremato", "siero" e "siero deproteinato", sono stati determinati composizione centesimale, conta cellulare, capacità antiossidante, carbonili, sostanze che reagiscono con l'acido tiobarbiturico (TBARS), metaboliti reattivi dell'ossigeno, gruppi sulfidrilici, acido ascorbico, tenore in colesterolo e grado di protezione antiossidante (DAP) del colesterolo stesso. La metodica TAC (Total Antioxidant Capacity o Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) è risultata facilmente applicabile per la stima della capacità antiossidante del latte, sia nella frazione idrosolubile che in quella liposolubile, a patto di effettuare alcune manipolazioni preparative preliminari. La maggior parte della capacità antiossidante del latte è attribuibile alle proteine e, in particolare, alle caseine, sebbene virtualmente prive di gruppi sulfidrilici disponibili. Nel complesso, la dotazione di antiossidanti presenti nel latte di soggetti in buono stato sanitario è risultata sufficiente a limitare l'ossidazione della materia grassa e delle proteine [27, 28].

Nella prima prova sperimentale condotta dall'Università di Palermo sono state utilizzate 24 pecore Comisane suddivise in 3 gruppi omogenei, ciascuno dei quali ha utilizzato con pascolamento continuo uno di tre appezzamenti di 0,5 ha coltivati rispettivamente con un erbaio di avena (*Avena sativa*) e trifoglio alessandrino (*Trifolium alexandrinum*) in consociazione, un prato di sulla (*Hedysarum coronarium*) di secondo anno e un prato di cicoria (*Cichorium intybus*). La disponibilità di fitomassa è risultata inferiore per la cicoria rispetto alla consociazione e alla sulla (1242 vs 1911 e 2532 kg/ha SS). Il tempo dedicato dagli animali a pascolare, è stato inversamente proporzionale alla dispo-

nibilità di biomassa presente nei settori, quindi ha seguito un andamento decrescente passando dalla cicoria alla consociazione e alla sulla. Nel complesso si è rilevata una maggiore produzione di latte negli animali che pascolavano la cicoria rispetto alla consociazione (1243 vs 1003 g/d; $P \leq 0,01$), mentre valori intermedi sono risultati con la sulla (1136 g/d). Sono emerse maggiori produzioni di latte nel primo periodo di pascolamento (aprile), corrispondente ad una maggiore disponibilità del pascolo. La superiorità produttiva dei gruppi che pascolavano la cicoria e la sulla rispetto alla consociazione è risultata significativa nel primo periodo; nel secondo periodo (maggio), la cicoria ha consentito di contenere la riduzione della produzione di latte, più marcata per le altre specie foraggere. Le percentuali in grasso, proteina e caseina del latte hanno subito un effetto di diluizione che ne ha provocato la diminuzione all'aumento della quantità di latte prodotto. L'urea è risultata superiore, anche se con differenze non significative, nel latte delle pecore che pascolavano la sulla e la cicoria (39,1 e 40,6 vs 33,1 mg/dL), essendo tali specie più proteiche rispetto alla consociazione (14,1 e 14,2 vs 9,8 % SS), e nel primo periodo rispetto al secondo, quando gli animali pascolavano erbe più giovani. I parametri di attitudine alla coagulazione del latte non hanno mostrato differenze fra i gruppi sperimentali. I risultati emersi confermano la notevole produttività della sulla e il suo effetto positivo sulla produzione di latte. Sono state evidenziate, inoltre, le interessanti potenzialità della cicoria, ottima foraggera in grado di assicurare nel tempo una buona qualità dell'erba e di incrementare le performance produttive delle pecore da latte [29].

La seconda prova sperimentale condotta in Sicilia ha riguardato 32 pecore Comisane suddivise in 4 gruppi omogenei che sono stati assegnati ai seguenti trattamenti: pascolamento continuo su 0,5 ha di sulla; pascolamento continuo su 0,5 ha di consociazione avena-trifoglio alessandrino; pascolamento turnato su 0,5 ha di sulla; pascolamento

turnato su 0,5 ha di consociazione. Il pascolamento turnato ha determinato una maggiore produzione di foraggio rispetto al pascolamento continuo. Le pecore al pascolo continuo hanno dedicato un tempo maggiore ad alimentarsi rispetto a quelle al pascolo turnato (180 vs 161 min/d; $P < 0,05$), probabilmente a causa della minore quantità di erba che avevano a disposizione, ed hanno prodotto una maggiore quantità di latte (1070 vs 951 g/d; $P < 0,05$), indipendentemente dalla specie pascolata. I risultati ottenuti contribuiscono ad avvalorare la tesi secondo la quale il pascolamento turnato, sebbene consenta alle colture una maggiore possibilità di ricaccio che si traduce in una maggiore produzione di biomassa per unità di superficie, non sempre determina incrementi della produzione di latte degli animali, e questo a causa del minore valore nutritivo del foraggio utilizzato in fasi di sviluppo più avanzate [30].

Per entrambe le prove, è in fase di completamento la determinazione della composizione acidica del latte ovino prodotto nelle diverse tesi sperimentali; la definizione del profilo acidico del latte, e in particolare dei livelli di CLA, PUFA e acidi omega 3, fornirà utili elementi per valutare quanto la specie foraggera e la tecnica di pascolamento possano incidere sulle proprietà salutistiche dei prodotti lattiero caseari ovisini.

COMPONENTI BIOATTIVE DEL LATTE E DEI SIERI RESIDUI DALLA PRODUZIONE DEI FORMAGGI OVI-CAPRINI

Nel latte delle quattro specie ruminanti il 5% dell'azoto totale (NT) è azoto non proteico (NPN), costituito, oltre che da urea, da peptidi generati dall'azione di proteasi endogene sulle frazioni caseiniche. A tal riguardo uno studio condotto sul latte umano ha messo in evidenza la presenza di peptidi per la maggior parte derivanti dalla beta-CN, tra cui beta-casomorfine [31]. Anche nel latte bovino è stata evidenziata la presenza di peptidi derivanti dalla stessa frazione caseinica, tra cui il peptide beta-CN f(190-209),

precursore anti-ACE (Chianese, risultati personali).

Nella presente ricerca è stata determinata la quantità e la qualità dei peptidi presenti nel latte di capra in funzione degli alleli al locus α_{s1} -CN. Contrariamente al contenuto in NT, l'NPN estratto dal latte α_{s1} -CN FF è risultato più elevato rispetto al latte α_{s1} -CN AA e BB (0,060 % vs 0,036 e 0,049 rispettivamente). I peptidi originati dalla α_{s1} -CN AA e BB derivano da due zone della proteina, rispettivamente comprese tra i residui Leu₂₀-Ala₆₂ e Pro₁₆₈-Met₁₉₆, mentre la sola sequenza α_{s1} (46-62) è derivata dalla α_{s1} -CN FF. La α_{s2} -CN risulta più inerte all'azione delle proteasi endogene del latte dando origine a due sole specie peptidiche identiche per i quattro fenotipi considerati. Dalla beta-CN si origina il maggior numero di peptidi, in particolare dalla sequenza C-terminale (f 182-207). Nel caso del latte α_{s1} -CN FF sono stati trovati anche peptidi derivanti dalla beta-CN (f 123-143). Solo in questo latte sono stati trovati peptidi derivanti dalla sequenza C-terminale (CMP) della kappa-CN, più o meno glicosilati. Il *pattern* peptidico derivante dalla zona C-terminale di beta-CN è stato identificato anche in campioni di latte crudo ovino a partire dalla beta-CN (f 191-207).

Come proseguimento del precedente PRIN (prot. 2005075887_005), è stato valutato il livello quantitativo e la composizione peptidica dei sieri residui dalla lavorazione di due latti massali contenenti gli alleli "forti" (*siero 1*) o gli alleli "deboli" (*siero 2*) di α_{s1} -CN. Il contenuto di NT (%) in entrambi i campioni è risultato inferiore a quello riportato da Casper *et al* [32] (0,48 e 0,61 vs 0,77) per l'inglobamento delle sieroproteine nel coagulo caseoso [33], mentre il livello di NPN è risultato sempre maggiore (0,41 e 0,31 vs 0,05).

I peptidi identificati in entrambi i campioni derivano quasi esclusivamente dall'idrolisi delle caseine. In particolare nel *siero 1* sono stati identificati 16 peptidi con PM compreso tra 713 e 8566 Da, di cui 14 di

origine caseinica e due sieroproteica. Tra i peptidi di origine caseinica sei derivano dalla α_{s2} -CN, cinque dalla α_{s1} -CN, due dalla β -CN e uno dalla κ -CN. Tra questi sono stati trovati i tre peptidi fosforilati α_{s1} -CN f(84-154)1P, α_{s2} -CN f(57-71)2P, α_{s2} -CN f(127-161)2P *carrier* di calcio, influenzandone positivamente l'assorbimento [34]. È stato dimostrato che il legame tra calcio e fosfopeptidi porta alla formazione di un complesso con effetti anticariogenici [35, 36]. Tra i peptidi identificati vi sono precursori di bioattività come quella anti-ACE [α_{s2} -CN f(173-180), β -CN f(106-113)], oppioide α_{s1} -CNf(84-154), α_{s1} -CNf(91-104), α_{s1} -CNf(95-103)] e antimicrobica [α_{s1} -CN B f(84-154)]. I peptidi di origine sieroproteica derivano entrambi dalla alfatattoalbumina (LA) [f(60-78) e f(104-113)] di cui il secondo precursore del peptide anti-ACEf(104-108).

Nel *siero 2* sono stati identificati 36 peptidi con PM compreso tra 505 e 2749 Da, di cui 29 di origine caseinica. Tra questi, 15 provengono dall'idrolisi della α_{s2} -CN tra cui sei fosfopeptidi [α_{s2} -CN f(1-21)2P, α_{s2} -CN f(54-71)3P, α_{s2} -CN f(121-153)3P, α_{s2} -CN f(127-150)2P, α_{s2} -CN f(139-151)1P, α_{s2} -CN f(154-167)1P] e tre precursori anti-ACE [α_{s2} -CN f(172-194), f(175-182) e f(190-194)]. Dei sei peptidi originati dalla β -CN, tre derivano dalla regione N-terminale, di cui uno fosforilato [f(13-31)4P], due dalla porzione centrale della proteina [f(88-107), f(116-133)] e uno dalla regione C-terminale [f(192-200)], precursore anti-ACE. I peptidi identificati della κ -CN sono costituiti dal frammento κ -CN f(14-30) e dai suoi derivati f(19-25), f(18-24) e f(14-18). Dei quattro peptidi derivanti dalla α_{s1} -CN, tre si originano dalla regione N-terminale, α_{s1} -CN f(1-23); in particolare, derivano dal frammento che si forma per azione della chimosina sul legame Phe²³-Phe²⁴ della proteina durante la coagulazione del latte. I peptidi derivanti dalla α -LA sono costituiti dai frammenti f(104-117) e f(104-113), quest'ultimo presente anche nel *siero 1*, e dai

frammenti f(98-107) e f(6-26). A differenza del *siero 1*, nel *siero 2* sono stati rinvenuti anche frammenti della β -lattoglobulina (LG) come f(13-17), f(21-42) e f(78-101), quest'ultimo precursore "oppioide".

Il *siero* ovino, a differenza di quello caprino, rappresenta un'importante reflujo dell'industria lattiero-casearia sarda, produttrice della maggiore quantità di formaggio ovino in Italia, tra cui tre DOP (Pecorino Romano, Fiore Sardo e Pecorino Sardo). Il *siero* residuo alla trasformazione viene, per la maggior parte, trasformato in Ricotta producendo come reflujo da smaltire la scotta. Nel presente progetto di ricerca è stata determinata la composizione chimica e peptidica di un *siero* ovino residuo dalla lavorazione del formaggio Pecorino e della scotta derivante dalla sua trasformazione in Ricotta. In entrambi i casi il componente più abbondante è il lattosio, come era da attendersi, seguito dalle proteine (contenuto minore nella scotta per il processo di ricottazione).

Mediante spettrometria di massa, si è evidenziato un numero maggiore di peptidi nel *siero* ovino (n = 85) rispetto alla scotta (n = 56). La maggior parte dei peptidi deriva dalla β -CN tra cui molti bioattivi, sulla base della loro omologia di sequenza con noti biopeptidi bovini (oppioidi, immunomodulatori, *carriers* di minerali ed antipertensivi). Nella scotta, diversamente dal *siero*, sono presenti anche peptidi derivanti dalla β -LG. Questo risultato è da mettere in relazione al trattamento termico subito dal *siero* nel processo di produzione della Ricotta. È noto, infatti, che le sieroproteine, a differenza delle caseine, non sono suscettibili all'azione delle proteasi batteriche allo stato nativo ma solo in quello "destrutturato" in seguito al trattamento termico come durante la ricottazione.

Questi risultati indicano che sia il latte dei piccoli ruminanti che i *sieri* residui della lavorazione dei loro formaggi hanno una peculiare composizione peptidica caratterizzata da potenziali interessanti bioattività, che costituiscono un valore aggiunto ad entrambe le produzioni.

Il lavoro di ricerca portato avanti dall'UR Torino si proponeva due obiettivi: 1) analizzare le relazioni fra genotipo PRNP e alcune caratteristiche connesse ad aspetti produttivi negli ovini delle razze Biellese e Sambucana, 2) valutare l'evoluzione della variabilità complessiva delle razze considerate mediante l'analisi di alcuni loci microsatelliti associati e non al *locus* PRNP.

Per quanto concerne il primo obiettivo, è stato adottato l'approccio basato sull'analisi delle eventuali differenze fra i portatori di ARR e tutti gli altri soggetti. L'ipotesi nulla era quindi l'assenza di un effetto pleiotropico di PRNP o di una stretta associazione con un *economic trait locus* (ETL) di effetto relativamente ampio. Si sono considerati due greggi, uno di pecore Biellesi e uno di pecore Sambucane già tipizzate per il *locus* PRNP dal laboratorio di Genetica e neuropatologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, per un totale di 112 e 104 animali rispettivamente. Su ogni animale sono state rilevate le seguenti misure biometriche: altezza al garrese, lunghezza del tronco, dimensioni bisiliaca e bischiatica del bacino, circonferenza dello stinco. Sono quindi stati calcolati due indici somatici: l'indice di compattezza (altezza al garrese/lunghezza del tronco) e le proporzioni del bacino (larghezza bischiatica/ larghezza bisiliaca). Le misure dirette sono state rilevate su immagini ottenute da riprese effettuate con videocamera digitale in condizioni standardizzate (metodo VIA, *Video Image Analysis*). Un lavoro preliminare è stato realizzato per convalidare l'impiego del metodo VIA rispetto al classico bastone di Lydtin, che consente una misurazione diretta e fornisce quindi valori reali. I due metodi forniscono risultati altamente correlati (coefficiente di correlazione > 0,9). Il metodo VIA è sembrato comunque l'approccio in grado di offrire maggiore ripetibilità e affidabilità. I dati rilevati sono quindi stati

sottoposti all'analisi statistica considerando tre differenti ripartizioni dei campioni in base ai genotipi: ARR/ARR, ARR/nonARR, nonARR/nonARR; ARQ/ARQ, ARQ/nonARQ, nonARQ/nonARQ e ARR/ARR, ARR/ARQ, ARQ/ARQ. Il confronto fra animali che possedevano l'allele ARR e tutti gli altri non ha evidenziato differenze significative per nessuna delle misure rilevate: la "dose" di gene che una pecora ha ricevuto non sembra influenzare le sue caratteristiche morfologiche. I risultati ottenuti non evidenziano effetti maggiori né per l'allele ARR né per l'allele ARQ sulle caratteristiche morfologiche delle due razze: qualunque via si voglia adottare per la lotta alla *scrapie*, la selezione volta ad aumentare la frequenza dell'allele ARR non sembra in conflitto con gli obiettivi del miglioramento genetico per i caratteri di conformazione legati alla produzione della carne.

Per quanto concerne il secondo obiettivo sono stati scelti due gruppi di giovani maschi di razza Sambucana: 80 nati nel 2004, prima dell'avvio del programma selettivo e 67 nati dopo il 2005. La variabilità genetica è stata stimata mediante l'analisi di 15 *loci* microsatelliti distribuiti su cromosomi diversi da OAR13, su cui mappa PRNP; in tal modo si è inteso considerare il complesso del genoma esente da effetti diretti della selezione per la resistenza alla *scrapie*. I prodotti di PCR sono stati separati con analizzatore genetico. Il tasso di errore è stato determinato replicando a caso il 10% dei campioni. Informazioni sulla struttura demografica della razza, raccolte sia direttamente in 13 aziende (1362 animali) sia sul sito dell'Assonapa (<http://www.assonapa.com/>), hanno permesso di stimare l'intervallo tra generazioni e la grandezza effettiva della popolazione. L'eterozigosi residua dopo 50 anni di applicazione del piano selettivo è stata stimata come $H_t = H_0(1 - 1/2Ne)^t$, dove t è il numero di generazioni che si succedono in 50 anni, $H_0 = H$ ante 2005 e H_t l'eterozigosi prevista alla t -esima generazione. Un *locus* è stato eliminato perché non ha fornito prodotti di PCR

in gran parte dei campioni. Sui 14 loci restanti il tasso di errore è risultato inferiore all'1%. I due gruppi (ante e post 2005) non si sono differenziati in modo significativo per eterozigosi attesa secondo HW, numero di alleli e ricchezza allelica [37]. L'indice F_{st} è risultato eguale a 0,005 e non significativo: solo lo 0,5% della variabilità dipende dal fatto che sono stati confrontati due gruppi diversi di animali. Pertanto le differenze di frequenze alleliche sono da considerarsi casuali. I due gruppi si differenziano invece in modo significativo per le frequenze alleliche al locus PRNP ($F_{st}=0,073$, $P<0,001$) [38]. Ciò indica che la selezione per la resistenza alla *scrapie* sta ottenendo risposta. Le informazioni demografiche raccolte hanno permesso di stimare un intervallo tra generazioni di circa 5 anni ed una $N_e=645$ (2005). La perdita di eterozigosi che la popolazione potrebbe subire nei prossimi 50 anni in funzione di tale valore di N_e , costante nel tempo, è risultata pari circa al 1%, una previsione che deve essere interpretata con cautela: poiché non è stato possibile tenere conto della varianza della numerosità della progenie, l'approccio usato per calcolare N_e potrebbe aver sovrastimato la grandezza effettiva della popolazione e sottostimato la successiva perdita di eterozigosi.

I risultati evidenziano che la popolazione ha conservato la propria variabilità genetica nonostante la pressione selettiva alla quale è sottoposta. Una frequenza dell'allele ARR simile a quella riscontrata nella Sambucana prima dell'inizio del programma di selezione è quindi da considerarsi sufficiente per ottenere una risposta significativa senza eccessivi rischi per la conservazione della variabilità della popolazione. Ai fini della conservazione sarà comunque fondamentale evitare in futuro riduzioni di grandezza, reale ed effettiva.

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti evidenziano, da svariati punti di vista, numerose potenzialità legate alle produzioni dei piccoli

ruminanti e alle loro ricadute sulla salute pubblica. Tra le principali indicazioni emerse dal progetto, vanno sottolineate in particolare:

- la potenziale presenza di numerosi peptidi bioattivi nel latte dei piccoli ruminanti e la notevole variabilità che tali peptidi presentano per effetto del polimorfismo genetico lattoproteico;
- la variabilità delle attività enzimatiche della membrana del globulo di grasso del latte ovino nel corso della lattazione e le correlazioni con la dimensione e il numero dei globuli di grasso e con la componente acidica;
- la necessità di considerare attentamente le possibili relazioni tra qualità nutrizionale del latte ovino e del formaggio e tipologia di pascolamento nel definire le strategie di allevamento estensivo;
- la peculiare composizione peptidica del latte dei piccoli ruminanti e dei sieri residui dalla lavorazione casearia, con bioattività latente che potrebbe conferire valore aggiunto alle produzioni;
- l'assenza di conflitto tra la selezione volta ad aumentare la frequenza dell'allele PRNP*ARR e il miglioramento genetico per i caratteri di conformazione legati alla produzione della carne nell'ovino.

Perché l'allevamento dei piccoli ruminanti venga salvaguardato e valorizzato, occorre una sempre maggior attenzione alle esigenze del consumatore e, in particolare, al crescente interesse per gli aspetti salutistici e nutraceutici dei prodotti di origine animale. Il progetto PReSAL ha dimostrato l'importanza di un approccio integrato, non solo tra differenti competenze ma anche tra diverse esperienze di ricerca nazionali e internazionali, per rispondere efficacemente agli interessi e alle problematiche emergenti nel settore agroalimentare delle produzioni ovine e caprine.

Ringraziamenti:

Relazione presentata al 2° Congresso Lattie-

BIBLIOGRAFIA

- 1) Caroli A, Chessa S, Rignanese D, Martini M, Salari F, Altomonte I, Casoli C, Pauselli M, Alicata ML, Bonanno A, Garro G, Mauriello R, Chianese L, Sartore S, Rasero R, Sacchi P (2010) Produzione dei piccoli ruminanti e salute umana. 2° Congresso Lattiero-Casario “La ricerca scientifica e la valorizzazione del latte e dei derivati” 21 Settembre 2010 Torino
- 2) Caroli A, Chessa S, Rignanese D, Martini M, Salari F, Altomonte I, Casoli C, Pauselli M, Alicata ML, Bonanno A, Garro G, Mauriello R, Chianese L, Sacchi P (2010) Aspetti della produzione dei piccoli ruminanti con impatto sulla salute umana. *Large Animal Rev* 5(1) 64
- 3) Lorenzini EC, Chessa S, Chiatti F, Caroli A, Pagnacco G (2007) Peptidi bioattivi di latte e derivati. *Sci Tecn Latt-Cas* 58 113-156
- 4) Spitsberg VL (2005) Invited review: bovine milk fat globule membranes as a potential nutraceutical. *J Dairy Sci* 88 2289-2294
- 5) Morand-Fehr P, Fedele V, Decandia M, Le Frileux Y (2007) Influence of farming and feeding systems on composition and quality of goat and sheep milk. *Small Rum Res* 68 20-34
- 6) Chianese L, Caira S, Ferranti P, Laezza P, Malorni A, Mucchetti G, Garro G, Addeo F (1997) The oligopeptides of sweet and acid cheese whey. *Lait* 77 699-715
- 7) Prusiner SB (1991) Molecular biology of prion diseases. *Science* 252 1515-1522
- 8) Caroli A, Bulgari O, Chessa S, Cocchi D, Tulipano G (2009) *In vitro* evaluation of caseinophosphopeptides from different genetic variants on bone mineralization. *Ital J Anim Sci* 8(2) 42-44
- 9) Caroli AM, Bulgari O, Chessa S, Rignanese D, Cocchi D, Tulipano G (2009) Analysis *in silico* and *in vitro* of caseinophosphopeptides from different genetic variants. Joint ADSA-CSAS-ASAS Annual Meeting Montréal Canada 12-16 luglio
- 10) Chessa S, Bulgari O, Rignanese D, Tulipano G, Caroli A (2009) *In silico* analysis of caseinophosphopeptides in ruminants. *Ital J Anim Sci* 8(2) 455
- 11) Tulipano G, Chessa S, Bulgari O, Rignanese D, Cocchi D, Caroli AM (2009) Analysis *in silico* and *in vitro* of caseinophosphopeptides from different milk protein genetic variants. ADSA-ASAS-CSAS Joint Annual Meeting Montréal Québec Canada 12-16
- 12) Chessa S, Bulgari O, Rignanese D, Ceriotti G, Tulipano G, Caroli AM (2010) Analisi *in silico* di caseinofosfopeptidi (CFP) nei ruminanti. *Sci Tecn Latt-Cas* 61 47-56
- 13) Küpper J, Chessa S, Rignanese D, Caroli A, Erhardt G (2010) Divergence at the casein haplotypes in dairy and meat goat breeds. *J Dairy Res* 77 56-62
- 14) Rignanese D, Chessa S, Ceriotti G, Salari F, Martini M, Caroli A (2009) Casein genetic variation in the Garfagnina goat. *Atti XVII International Congress of Mediterranean Federation of health and Production of Ruminants: 27-30 Maggio Perugia* 143
- 15) Caroli AM, Chessa S (2010) Variazione genetica delle lattoproteine in razze ovine italiane: nuove conoscenze. *Sci Tecn Latt-Cas* 61 171-177
- 16) Chessa S, Rignanese D, Berbenni M, Martini M, Salari F, Ceriotti G, Caroli A (2009)

Characterization of new genetic polymorphisms within ovine caseins. *Ital J Anim Sci* 8(2) 192

- 17) Chessa S, Rignanese D, Berbenni M, Ceriotti G, Martini M, Pagnacco G, Caroli A (2010) New genetic polymorphisms within ovine beta- and alfa_{s2}-caseins. *Small Rum Res* 88 84-88
- 18) Chessa S, Rignanese D, Ceriotti G, Caroli A (2010) Analisi delle varianti genetiche di beta-caseina in razze ovine italiane. *Large Animal Rev* 5(1) 66
- 19) Martini M, Salari F, Altomonte I, Rignanese D, Chessa S, Gigliotti C, Caroli A (2010) The Garfagnina goat: a zootechnical overview of a dairy local population. *J Dairy Sci* 93 4659-4667
- 20) Ballabio C, Chessa S, Rignanese D, Gigliotti C, Pagnacco G, Terracciano L, Fiocchi A, Restani P, Caroli AM (2010) Goat milk allergenicity as a function of alphas1-casein genetic polymorphism. *J Dairy Sci* (in stampa)
- 21) Chessa S, Rignanese D, Raschetti M, Ceriotti G, Caroli A, Pagnacco G, Castiglioni B (2009) A microarray technology for SNP detection in goat milk protein genes. *Ital J Anim Sci* 8(2) 193
- 22) Caroli AM, Chessa S, Erhardt GJ (2010) Milk protein variants for animal breeding and human nutrition. 9th World Congress on Genetics applied to Livestock Production Leipzig (Germania) 1-6 Agosto
- 23) Rossi S, Stoppani E, Gobbo M, Caroli A, Fanzani A (2010) L6E9 myoblasts are deficient of myostatin and additional TGF-beta members are candidates to developmentally control their fiber formation. *J Biomed Biotech* doi:101155/2010/326909
- 24) Zanker IA, Hammon HM, Blum JM (2001) Activities of gamma-glutamyltransferase alkaline phosphatase and aspartate-aminotransferase in colostrums milk and blood plasma of calves fed first colostrums at 0-2 6-7 12-13 and 24-25 h after birth. *J Vet Med A* 48 179-185
- 25) Martini M, Salari F, Pesi R, Tozzi MG (2010) Relationship between activity of some fat globule membrane enzymes and the lipidic fraction in ewes' milk: Preliminary studies. *Int Dairy J* 20 61-64
- 26) Corrias F, Salari A, Dal Prà A, Ragona G, Lombardo A, Mari M, Altomonte I, Colombani G, Pedri P, Scotti B, Brajon G, Martini M (2010) La capra autoctona della Garfagnana: valutazione morfo- funzionale e sanitaria. *Large Animal Rev* 5(1) 69
- 27) Pauselli M, Bianchi L, Cestola E, Casoli C, Moscati L, Valiani A, Duranti E (2008) Conta cellulare e stato immunitario della pecora da latte in funzione della tecnica di allevamento. *Suppl Large Animal Rev* 14 213
- 28) Pauselli M, Moscati L, Nunzi C, Bianchi L, Cestola E, Duranti E, Casoli C (2009) Antioxidant activity and oxidative status of different fractions of sheep milk. *Atti XVII International Congress of Mediterranean Federation of Health and Production of Ruminants Perugia 27-30 Maggio* 218-219
- 29) Di Grigoli A, Di Miceli G, Todaro M, Genna V, Tornambè G, Alicata ML, Bonanno A (2010) Influenza della specie foraggera pascolata sulla produzione di latte ovino. *Large Animal Rev* 5(1) 76
- 30) Di Grigoli A, Di Miceli G, Todaro M, Bellina V, Mazza F, Alicata ML, Bonanno A (2010) Effetto della tecnica di pascolamento sulla produzione di latte ovino. *Large Animal Rev* 5(1) 75
- 31) Ferranti P, Traisci MV, Picariello G, Nasi A, Boschi V, Siervo M, Falconi C, Chianese L, Addeo F (2004) Casein proteolysis in human milk: tracing the pattern of casein breakdown and the formation of potential bioactive peptides. *J Dairy Res* 71 (1) 74-87

- 32) Casper JL, Wendorff WL, Thomas DL (1998) Seasonal changes in protein composition of whey from commercial manufacture of caprine and ovine specialty cheeses. *J Dairy Sci* 81 3117-3122
- 33) Garro G, Calabrese MG, Quarto M, De Pascale S, Petrucci L, Mauriello R, Chianese L (2008) Influenza del polimorfismo genetico al locus della alphas1-CN e della tecnologia di produzione sul profilo proteolitico ed aromatico del formaggio di capra Cacioricotta. *Sci Tecn Latt-Cas* 59 247-263
- 34) Meisel H (1998) Overview on milk protein-derived peptides. *Int Dairy J* 8 363-373
- 35) Reynolds EC, Cain CJ, Webber FL, Black CL, Riley PF, Johnson IH, Perich JW (1995) Anticariogenicity of calcium phosphate complex of tryptic casein phosphopeptides in the rat. *J Dental Res* 74 1272-1279
- 36) Ferrazzano GF, Cantile T, Ingenito A, Chianese L, Quarto M (2007) New strategies in dental caries prevention: experimental study on casein phosphopeptides. *Eur J Paed Dentistry* 8 (4) 183-187
- 37) Sartore S, Rasero R, Colussi S, Acutis PL, Peletto S, Soglia D, Maione S, Spalenza V, Sacchi P (2010) Impact of selection for scrapie resistance on genetic diversity of the Sambucana sheep breed (Piedmont Italy). 61st Annual Meeting EAAP 23-27 Agosto Heraclion Grecia
- 38) Sartore S, Rasero R, Colussi S, Acutis PL, Peletto S, Soglia D, Maione S, Spalenza V, Sacchi P (2010) Studio degli effetti della selezione per la resistenza alla Scrapie sulla variabilità genetica nella razza ovina Sambucana. *Large Animal Rev* 5(1) 103