



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PERUGIA  
SCIENZE BIOTECNOLOGICHE MEDICHE VETERINARIE E FORENSI

## Le biotecnologie in campo lattiero-caseario



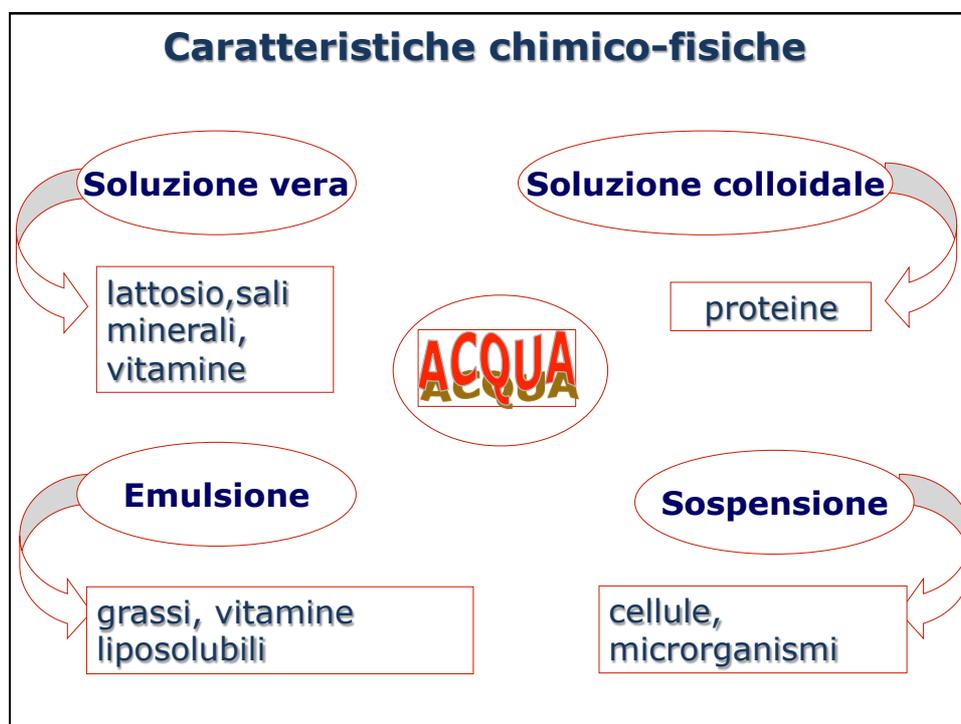
A cura di:  
Deborah Cruciani  
Rebecca Napolitano

# Il latte

Il latte è il prodotto della mungitura regolare, completa ed ininterrotta, di animali in buono stato di salute, di alimentazione e corretta lattazione

- 1° ALIMENTO DELLA VITA
- SODDISFA LE ESIGENZE NUTRIZIONALI
- MEZZO DI TRASMISSIONE DI ELEMENTI DI DIFESA DELL'ORGANISMO





### Colostro: primo liquido prodotto dalla mammella



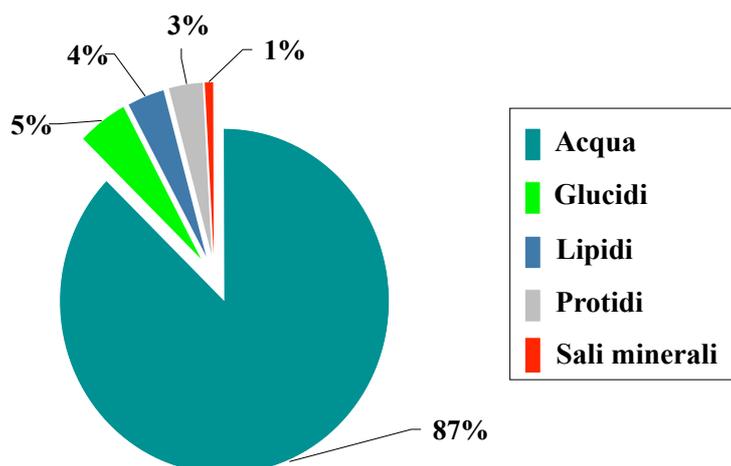
#### Principali differenze costitutive tra colostro e latte

	Colostro 1ª mungitura	Latte
Peso specifico	1,056	1,032
pH	6,32	6,5
Residuo secco %	23,9	12,9
Grasso	4,7	4,0
Proteine totali %	14,0	3,1
Lattosio %	2,7	4,9
Ceneri %	1,1	0,74



**LATTE  
MATURO**

## Componenti del latte



## Glucidi

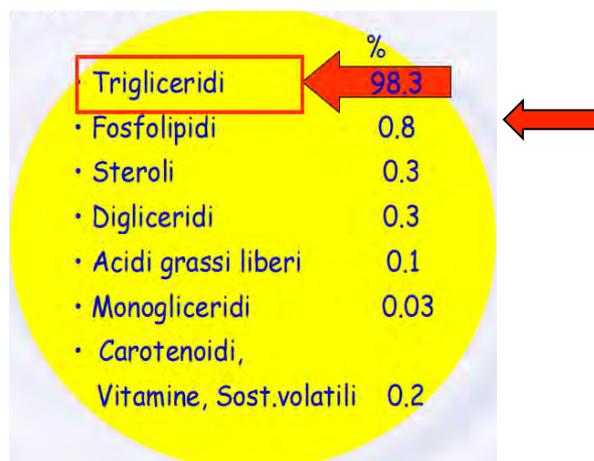
Lo zucchero presente in maggior quantità all'interno del latte è il

### lattosio

Costituito da una molecola di glucosio e una di galattosio con legame  $\beta$  tra il carbonio 1 del galattosio e il carbonio 4 del glucosio

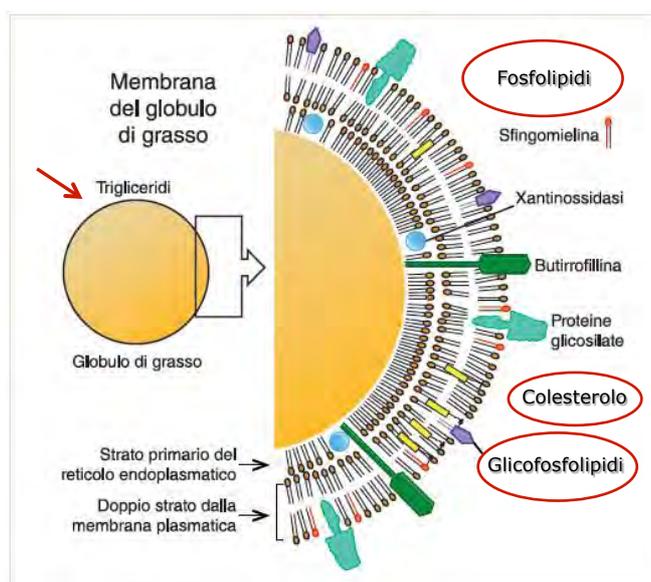


## Lipidi



\* Molto importante nella composizione degli acidi grassi del latte è l'alimentazione dell'animale

## Struttura globuli di grasso



## Proteine del latte



**Caseine (78%)**  
Responsabili del colore bianco  
del latte



**Proteine del siero (17%)**

Le proteine del latte sono importanti da un punto di vista  
nutrizionale ed hanno un'elevata digeribilità.

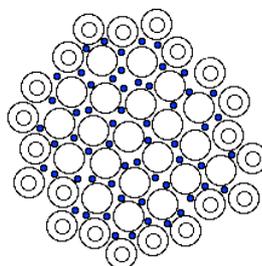
Il contenuto proteico del latte è pari a circa il 3,2 %

## Caseine

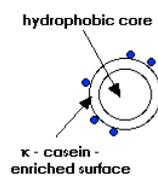
Le caseine (tranne la K)  
sono proteine idrofobiche,  
per cui in una soluzione  
acquosa come il latte si  
aggregano formando le  
submicelle, aventi forma  
sferica.

Queste ultime si aggregano  
tra loro a formare le  
micelle

Casein Micelle



Casein Submicelle



$\alpha$ s1,  $\alpha$ s2,  $\beta$ , K,  $\gamma$  e  $\lambda$

## Proteine Sieriche

Le siero proteine non sono aggregati proteici, ma si trovano nel latte come monomeri o polimeri che precipitano per riscaldamento e sono costituite da:

- $\alpha$ -lattalbumina
- $\beta$ -lattoglobulina
- Sieroalbumina
- Immunoglobuline
- Etc



## Enzimi del latte

Molto numerosi tra cui i più importanti:

- **Catalasi:** è un enzima ossidante che decompone l'acqua ossigenata con formazione di ossigeno molecolare; è molto abbondante nel colostro e nel latte mastitico
- **Lattoperossidasi:** è l'enzima più abbondante ed aumenta nei latti mastitici; viene inattivata a 80 °C per 30 secondi e la sua presenza in un latte pastorizzato è indice di trattamento a bassa temperatura
- **Lipasi:** catalizza la rottura dei legami esteri dei trigliceridi
- **Fosfatasi alcalina:** importante la sua termolabilità (72 °C per 16 secondi)

## Costituenti Biologici

All'interno del latte vi è anche la presenza di costituenti biologici quali :



### Cellule Somatiche

- Cellule Epiteliali
- Leucociti



### Microrganismi

- Lattici
- Proteolici
- Lieviti
- Patogeni

## Pretrattamenti

### BACTOFUGAZIONE

E' un processo fisico che sfrutta la forza centrifuga come mezzo di risanamento del latte.

L'effetto bactofugo a 75°C elimina circa il 99% dei microrganismi e delle spore



### MICROFILTRAZIONE

Le maglie filtranti presentano pori di diametro di circa 1,0µm, inferiori alle dimensioni della quasi totalità dei microrganismi e delle cellule somatiche presenti nel latte



### OMOGENIZZAZIONE

L'omogeneizzazione è un trattamento, puramente meccanico, che consiste nel far passare il latte a forte pressione attraverso fori strettissimi



# Pretrattamenti

Vengono fatti avendo come scopo

- L'eliminazione di eventuali impurità macroscopiche
- Ridurre il tenore in microrganismi
- Standardizzare il tenore di grasso
- Omogenizzare il prodotto

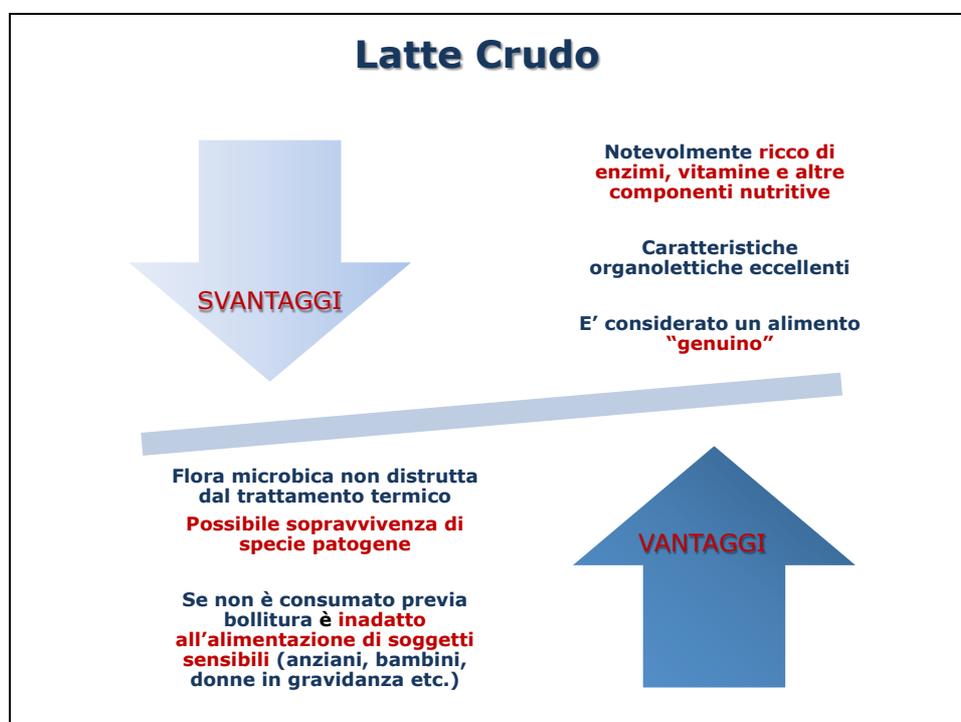
# Tipologie di latte alimentare in commercio



## Latte Alimentare: Crudo

Latte sottoposto a risanamento che può essere di due tipi:

- 1. Domestico**, ovvero la bollitura
- 2. Commerciale**, ovvero a base termica (pastorizzazione, sterilizzazione)



## **Trattamenti termici: Pastorizzazione**

Tre tipi di pastorizzazione

1. Bassa (63°C per 30 sec)
2. Alta (71,7° C per 15,5 sec)
3. A temperatura elevata (80° C per 10-20 sec)

## **Pastorizzazione**

**Latte Pastorizzato** (Intero, parzialmente scremato o scremato) ottenuto mediante trattamento ad una temperatura di 71,7 °C per 15 sec

**Latte fresco pastorizzato** prodotto da latte che perviene crudo allo stabilimento di confezionamento e sottoposto ad un solo trattamento termico entro le 48 ore dalla mungitura

**Latte fresco pastorizzato di «ALTA QUALITA'»** sieroproteine solubili non denaturate non inferiore al 15,50% delle proteine totali (Materia grassa non < a 3,5%)

## **Trattamenti termici: Sterilizzazione**

Due tipi di sterilizzazione

1. Metodo classico
2. Sistema UHT (Ultra high temperature)

## **Metodo Classico**

- *Buone caratteristiche di conservabilità*
- *Scadimento delle caratteristiche organolettiche e nutrizionali del prodotto.*
- *Modificazioni al colore e al gusto*
- *Apparente riduzione del contenuto in vitamine idrosolubili*

## Sistema UHT

- **Sterilizzazione ottenuta tra 140-150 °C per 1-5 secondi in flusso continuo**
- **Confezionamento del prodotto avviene in maniera asettica**

## Il processo UHT

**Metodo diretto**



**Metodo indiretto**





## Latti modificati in commercio

**Concentrato**  
**Alta digeribilità o HD**  
**Latte fortificato**  
**Latte probiotico**  
**Aromatizzato**  
**Etc...**

## Analisi del latte

Il controllo di qualità ha inizio ancor prima del processo produttivo vero e proprio attraverso la selezione dei fornitori di latte fresco in base a parametri già fissati per questa materia prima.

Per accertare la buona qualità igienica, la correttezza di confezione e l'elevato grado di purezza vengono eseguite le analisi seguenti:

- pH
- acidità titolabile
- densità
- materia grassa
- lattosio
- residuo secco magro
- materie proteiche
- attività fosfatase
- punto di congelamento



Tali analisi vengono precedute da un esame organolettico tendente a rilevare eventuali sapori, colori e odori anomali.

Le analisi eseguite sul latte hanno lo scopo di determinare la **freschezza** e quindi la maggiore o minore possibilità di utilizzazione alimentare diretta, la **genuinità** cioè l'assenza di adulterazioni e sofisticazioni e infine il **valore commerciale**, in base alla composizione, specie per la resa in burro e formaggio.

### Valori dei principali indici chimico-fisici del latte

freschezza	pH		6,5-6,7
	Acidità titolabile		6-8 °SH 14-18 °D 0,14-0,18 g/100 ml a. lattico
	Densità a 20°C	Latte intero Latte scremato Siero	1,030 -1,033 1,035 -1,036 1,025 -1,029
genuinità	Residuo secco magro (valori minimi di legge)	Latte intero Latte scremato	8,50 g/100g 8,70 g/100g
	Punto di congelamento (valori indicativi medi)		-0,530 -0,540 °C

**Valori discostanti di quelli indicati in tabella possono essere indice di frodi e quindi di modificazioni delle componenti del latte o possono essere indice dei così detti «latte patologici»**

# Mastite

## Che cos'è?

Principale patologia nell'allevamento della vacca da latte, caratterizzata dalla presenza di agenti patogeni (in particolare *Streptococcus agalactiae*) all'interno del tessuto ghiandolare mammario che porta alla alterazione delle componenti del latte

## E' possibile ridurre l'impatto della patologia?

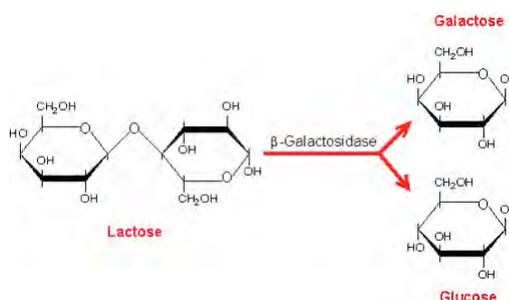
Sì, attraverso la prevenzione. Quindi tutte le pratiche igieniche e di buona gestione della mandria, che spaziano dal rispetto del benessere animale alla pulizia degli ambienti e delle attrezzature fino ad una adeguata formazione del personale che lavora a contatto con le bovine, sono essenziali per poter tendere a risultati soddisfacenti

## Terapie

Si ricorre alla somministrazione di antibiotici nei casi gravi con interessamento generale e/o febbre

# Intolleranza al lattosio

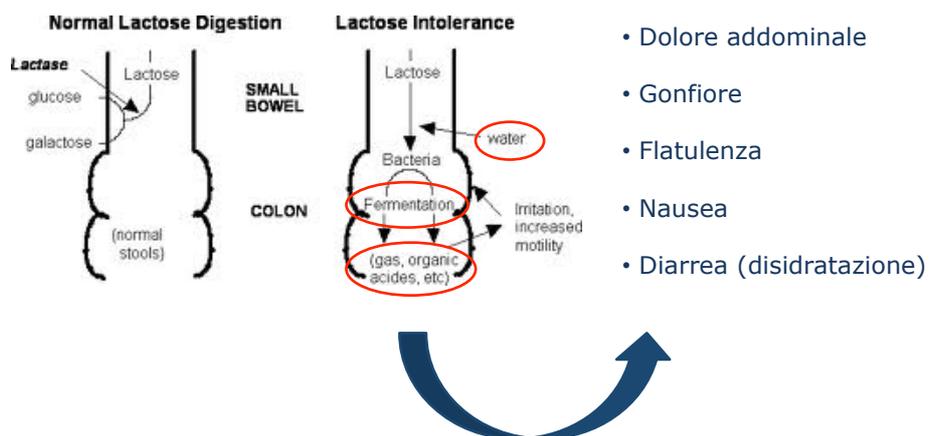
- ✓ Oltre il 70% della popolazione mondiale
- ✓ Deficit della  $\beta$ -galattosidasi



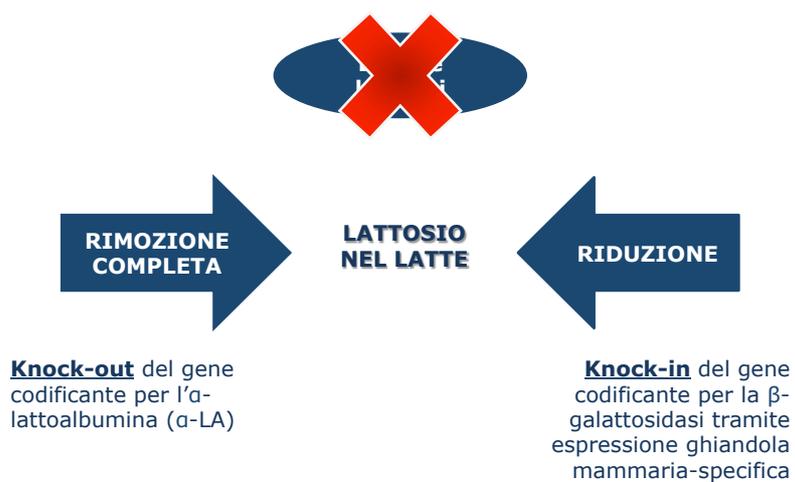
Il lattosio è responsabile della **regolazione osmotica della lattazione**: determina il volume di latte prodotto

Idrolisi enzimatica necessaria per l'assorbimento del lattosio

## Intolleranza al lattosio: sintomi



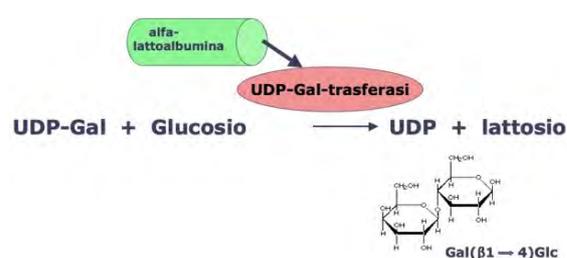
## Intolleranza al lattosio: strategie



## Principali applicazioni degli animali transgenici

- ❑ **PRODUZIONE DI OGM**
- ❑ **GENE PHARMING**
- ❑ **MODELLI DI PATOLOGIE UMANE**
- ❑ **XENOTRAPIANTI**

## Rimozione completa di lattosio: knock-out dell'α-LA



CONTENUTO DEL LATTE:

- **Lattosio (0)**
- **Proteine (88%)**
- **Grassi (60%)**

### LIMITI:

- Eccessivo contenuto di proteine e grassi
- Assenza totale di lattosio → Latte estremamente viscoso → Processo di mungitura difficile e doloroso per l'animale

Problematiche analoghe con la delezione del gene UDP-gal

## **Riduzione di lattosio: knock-in della $\beta$ -galattosidasi**

CONTENUTO DEL LATTE:

- **Lattosio (<50-80%)**
- Proteine (nella norma)
- Grassi (nella norma)

### **VANTAGGI:**

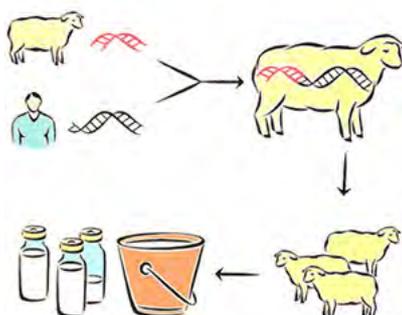
- Equilibrio nella fluidità del latte
- Equilibrio nell'apporto di sostanze nutritive con andamento simile nel latte transgenico e di controllo

Approccio più equilibrato nella gestione delle intolleranze:  
buon compromesso tra la produzione del latte e la soppressione della sintomatologia dell'intolleranza al lattosio

## **Principali applicazioni degli animali transgenici**

- PRODUZIONE DI OGM**
- GENE PHARMING**
- MODELLI DI PATOLOGIE UMANE**
- XENOTRAPIANTI**

## GENE PHARMING: produzione di farmaci



OVINI e BOVINI  
come bioreattori

Industria  
farmaceutica  
alternativa:

espressione del  
farmaco a livello  
di diversi fluidi  
biologici (siero,  
urina e latte) da  
cui i prodotti  
vengono poi  
purificati

## Perchè dal latte???

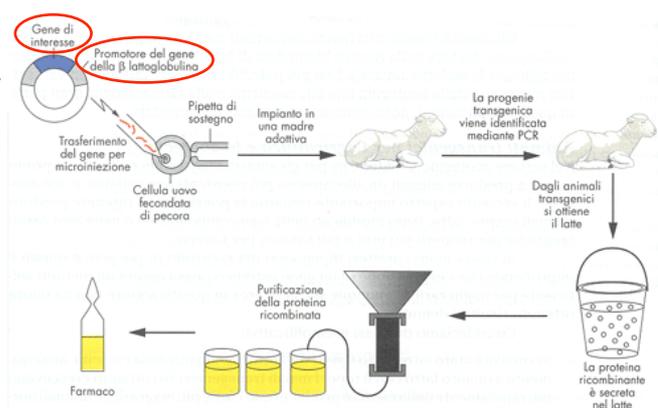


- ✓ **Fluido corporeo rinnovabile**
- ✓ **L'espressione della proteina esogena non condiziona i processi fisiologici dell'animale**
- ✓ **Eventuali modificazioni post-traduzionali vengono apportate al prodotto**
- ✓ **La purificazione della proteina risulta relativamente semplice**

## Transgenesi condizionale

Obiettivo: espressione del prodotto circoscritta al tessuto mammario

Realizzare un vettore di espressione in cui il gene codificante per la proteina terapeutica di interesse è fuso con un promotore tessuto-specifico



## Risultati:

- Prima antitrombina ricombinante  
- Profilassi del tromboembolismo venoso

Products	Companies	Production animal	Developmental stage
ATryn (recombinant human antithrombin III)	GTC Biotherapeutics	Goat	EU: EMEA approved US: Phase 3
C1 Esterase Inhibitor	Pharming	Rabbit	Phase 3 for HAE
MM-093 (AFP)	Merrimack and GTC Biotherapeutics	Goat	Phase 2 for RA
Alpha-Glucosidase	Pharming	Rabbit	Phase 2, on hold
HGH	BioSidas	Cow	Preclinical
Albumin	GTC Biotherapeutics	Cow	Preclinical
Fibrinogen	Pharming	Cow	Preclinical
Collagen	Pharming	Cow	Preclinical
Lactoferrin	Pharming	Cow	Preclinical
Alpha-1 Antitrypsin	GTC Biotherapeutics	Goat	Preclinical
Malaria vaccine	GTC Biotherapeutics	Goat	Preclinical
CD 137 (4-1BB) MAb	GTC Biotherapeutics	Goat	Preclinical

1 L di latte → 9 g di prodotto → 8 capre → **Immunizzazione di 20 milioni di persone**

## Transgenesi condizionale

### VANTAGGI

Il costo di produzione 3-30 volte inferiore rispetto alle tradizionali colture cellulari

### LIMITI

Basse % di ottenimento di animali transgenici

Elevata variabilità nell'espressione del farmaco durante la lattazione

## Frodi alimentari

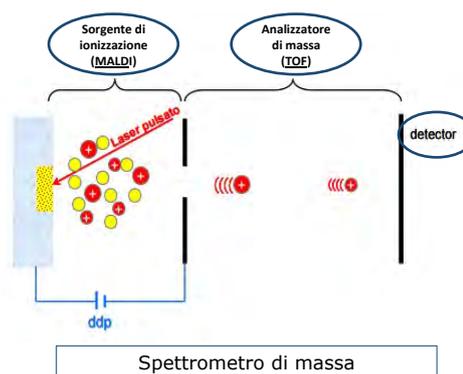


- ✓ Richieste crescenti del mercato
- ✓ Sete di risparmio dei produttori

LATTE VACCINO	LATTE OVINO
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Circa tre volte più conveniente del latte di bufala</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sapore più simile a quello del latte di bufala</li> <li>• Presenza solitamente non osservata (controlli mirati alla ricerca delle proteine del latte vaccino IEF, HPLC)</li> </ul>

## Tecnologia MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization)

1. Estrarre le proteine dal campione di partenza
2. Incorporare le molecole di analita in una matrice che assorbe la lunghezza d'onda di un laser pulsato e passa ad uno stato eccitato → L'energia viene utilizzata per generare ioni molecolari (**ionizzazione**)
3. Gli ioni generati accedono all'analizzatore dove vengono separati in base al **rapporto m/z** e convogliati al detector per essere rivelati

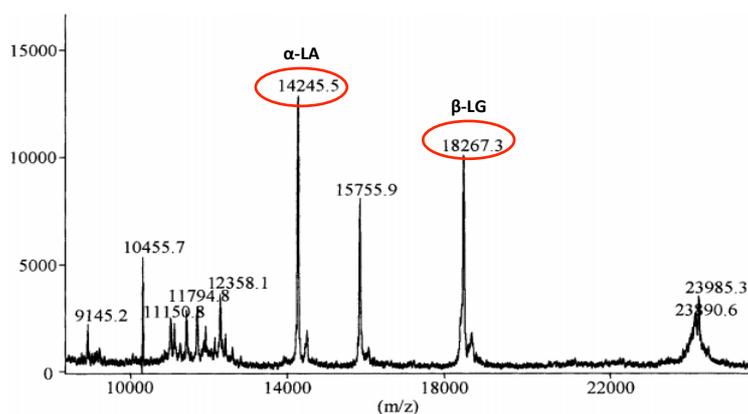


## Uno studio condotto dal CNR

Analisi dei seguenti campioni:

<b>Mozzarella di bufala</b>	<b>Mozzarella di bufala mista:</b> Latte di bufala + <u>Latte vaccino</u>	<b>Mozzarella di bufala mista:</b> Latte di bufala + <u>Latte ovino</u>
-----------------------------	--	--

## Spettro di massa della mozzarella di bufala:



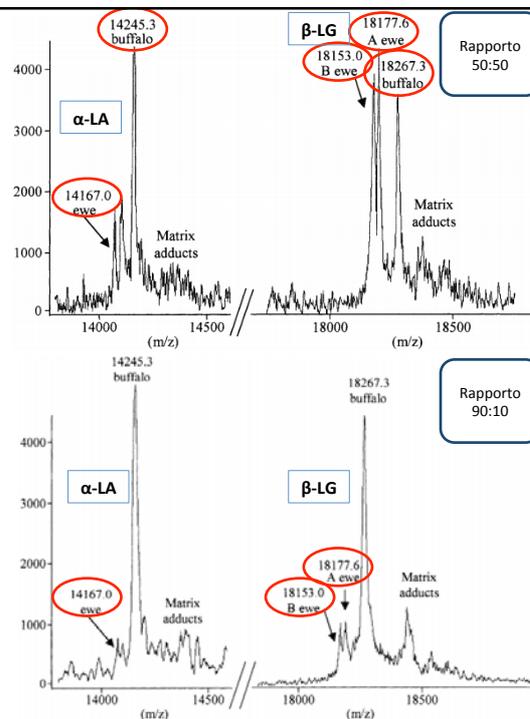
I pattern proteici di **α-lattoalbumina** e **β-lattoglobulina** vengono usati come marker molecolari per la valutazione delle possibili frodolenze.



- Le sieroproteine non si degradano completamente, nonostante i processi termici ed enzimatici coinvolti nella preparazione della mozzarella
- Le masse molecolari delle sieroproteine di bufala, vacca e pecora sono molto differenti
- La risoluzione nella regione di massa considerata (14-19 kDa) è abbastanza elevata

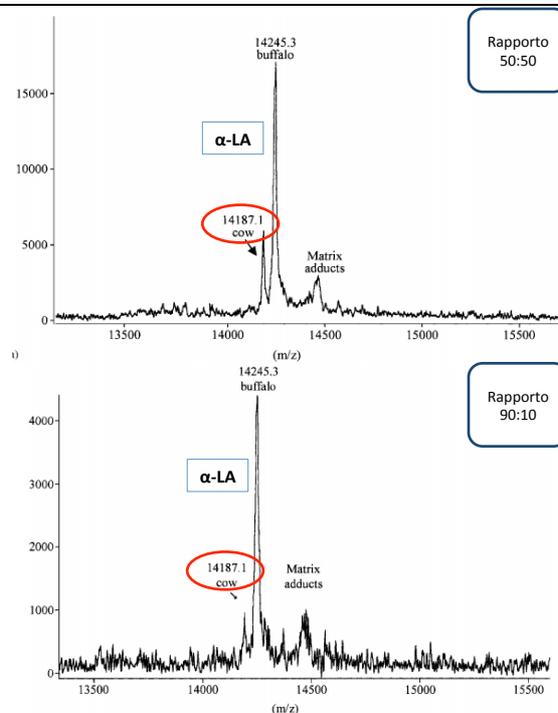
## Spettro di massa di mozzarella di bufala mista: latte di bufala e latte ovino

La differenza di massa tra le sieroproteine di bufala e pecora è di circa **78 Da** per la lattoalbumina e di circa **116 Da** per la lattoglobulina.



## Spettro di massa di mozzarella di bufala mista: latte di bufala e latte vaccino

La differenza di massa tra le sieroproteine di bufalo e vacca è di circa **58 Da** per la lattoalbumina e di circa **15 Da** per la lattoglobulina.



## **CONCLUSIONI**

**Lo sviluppo delle biotecnologie potrebbe essere:**

- **una soluzione alla prevenzione e al trattamento di disturbi dovuti al consumo di latte e/o derivati**
- **un'alternativa alla tradizionale industria farmaceutica**

**... Sempre nel rispetto di un equilibrio etico tra ricerca e benessere animale**