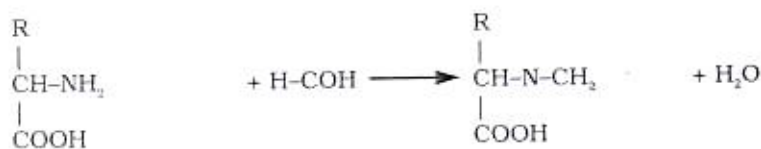


Il metodo Steinegger per la determinazione delle proteine del latte

Il metodo è fondato sulla reazione di Schiff-Sørensen tra l'aldeide formica ed i gruppi amminici delle proteine. L'aldeide formica (H-COH) reagendo con il gruppo amminico (H-N-H) delle sostanze proteiche, lo converte in derivato metileno, in modo che la funzione basica viene soppressa ed i carbossili rimasti liberi danno una reazione acida al mezzo, secondo il seguente schema:



Per l'esecuzione si procede come segue: determinata l'acidità del latte con il metodo Soxhlet-Enkel (NaOH N/4; indicatore fenolftaleina) su 50 ml di latte preventivamente agitato per eliminare l'anidride carbonica ed a temperatura ambiente, ottenendo una colorazione rosa permanente, si aggiungono allo stesso campione di latte 5 ml di aldeide formica commerciale (soluzione al 40% di aldeide formica, normalmente detta «formalina») neutralizzata con soda quartnormale e fenolftaleine fino ad una colorazione lievemente rosea. L'aggiunta della formalina al latte neutralizzato fa scomparire la colorazione rosea per la reazione di Schiff-Sørensen descritta, il latte torna pertanto nuovamente acido e quindi bianco. Si titola nuovamente il campione aggiunto di formalina con NaOH N/4 fino al riapparire del colore rosa permanente. I millilitri di NaOH occorsi in questa seconda titolazione danno il numero di aldeide. Il numero di aldeide, moltiplicato per due, dà il numero di aldeide su 100 ml, il quale, moltiplicato per 0,375, dà la percentuale di caseina del campione di latte. Per ottenere la percentuale delle proteine totali occorre moltiplicare il numero di aldeide per cento per 0,485.

striali, etc. L'idrolisi enzimatica di alcune proteine del latte si dimostra interessante per distruggere o ridurre quelle proteine del latte causa di allergia nella composizione di alimenti a base di latte destinati ai bambini allergici alle proteine del latte.

Esistono, come accennato, varianti genetiche delle diverse proteine, ed anche delle frazioni caseiniche del latte delle maggiori specie lattifere. In particolare nel latte vaccino si sono riscontrate varianti delle caseine α , β e κ . Alcune varianti genetiche di quest'ultima (la variante kB), associata al latte di alcune razze, come la Reggiana ed alcuni ceppi di razza Bruna Alpina, determinano, rispetto ad altre varianti, la presenza di micelle caseiniche più piccole e più numerose del normale, conferendo al latte maggiore attitudine alla caseificazione, specie per formaggi duri (46) (Tab. 3.32).

3.7.1 Proteine del latte

Nel latte le sostanze azotate presenti, la cui distribuzione è riportata (Tab. 3.33) assommano al 3-3,4%, e sono:

- proteine dializzabili (caseina e sieroproteine) - ca. 95%;
- sostanze azotate non proteiche non dializzabili (urea, nucleotidi, amminoacidi liberi, etc.) - ca. 5%.

Le proteine del latte, pur essendo accomunate dalla loro natura proteica formano un gruppo di sostanze che differiscono fra loro nella composizione chimica

e in molte proprietà e che tuttavia non si lasciano separare in individui chimici ben definiti. In ordine storico il primo frazionamento avvenne fra proteine coagulabili per azione degli acidi o del caglio e proteine non coagulabili con tali mezzi: alle prime fu dato il nome di *caseina* (da *caseus* = formaggio), alle altre il nome di *albumine*, che oggi vengono più propriamente identificate come *sieroproteine*. I mezzi impiegati per la separazione dei principali gruppi di proteine del latte sono, oltre all'acidificazione a pH 4,6, il riscaldamento, il trattamento con acido tricloroacetico al 12%, la dissalazione per saturazione con solfato ammonico e solfato di magnesio. Con questi mezzi le sostanze azotate del latte vengono frazionate nei seguenti gruppi: caseina, lattealbumine, latteglobuline, proteoso-peptoni e sostanze azotate non proteiche (o NPN).

La caseina (o meglio le caseine) è, sia per peso che per importanza, la principale proteina del latte. La caseina è una glico-fosfo-proteina, ricca di zolfo ed altamente nutritiva. È una proteina ad elevatissimo valore biologico contenendo praticamente tutti gli amminoacidi essenziali. La caseina di latte umano è comunque più ricca di zolfo, di cistina e di glucidi della caseina vaccina.

Già dal 1940, si era riconosciuto che la caseina del latte non era costituita da una singola proteina, ma da distinti gruppi simili di proteine identificabili, con diversa velocità elettroforetica e denominate α caseina, β caseina, κ caseina e γ caseina (quest'ultima considerata oggi essere un frammento della caseina β). Una delle proprietà più importanti delle ca-

seine è di polimerizzare e formare complessi con un'altra specie di caseina. Per elettroforesi su poliacrilammide a pH distanti dal punto isoelettrico, le caseine si separano in tre frazioni: la α è quella che

migra più velocemente, la β è quella intermedia, la γ è la più lenta. Conducendo l'elettroforesi in presenza di agenti dissocianti, si possono ottenere altre frazioni: la κ e la λ (Tab. 3.34).

Tab. 3.32 - Frazioni e varianti genetiche del latte di vacca, bufala, pecora e capra (47)

Super famiglia	Proteine famiglia	Specie o varianti genetiche			
		vacca	bufala	pecora	capra
CN	α - CN	A B C D E	3X	IX	2X
		A B C D	2X	IX	2X
	β - CN	A' A'' B C D ^o E	IX	2X	2X
		A' A'' A' B	-	-	-
	γ - CN	A' A'' B	-	-	-
		A B	-	-	-
	κ - CN	A B C	IX	A B	IX
		LA	α - LA	A B C ^o	IX
LG	β - LG	A B C D D ^r E F G	IX	A B	6S B
SA	SA	A	-	-	-

Tab. 3 - Valori medio di azoto totale, azoto proteico e azoto non proteico (NPN) nel latte di vacca, capra e pecora

Specie	Vacca		Capra		Pecora	
	azoto totale (N) (%)	azoto proteico (N-P) (%)	azoto totale (N) (%)	azoto proteico (N-P) (%)	azoto totale (N) (%)	azoto proteico (N-P) (%)
Caseina	77,8	82,0	75,6	82,7	78,5	82,4
Sieroproteine	17,0	18,0	15,7	17,3	16,8	17,6
N.P.N.	5,2	-	8,7	-	4,7	-

* Nel latte di capra la percentuale di azoto non proteico (NPN) è più elevata rispetto al latte bovino

Tab. 4 - Composizione delle frazioni caseiniche nei latticini e nel latte di vacca, pecora e capra (56)

	Bovine	Ovine	Bovine	Caprine
α_{s1} - caseina				
α_{s2} - caseina B				
α_{s3} - caseina				
α_{s4} - caseina				
α_{s5} - caseina				
β - caseina B				
β_1 - caseina				
β_2 - caseina				
κ - caseina				
κ - caseina				

Nel latte vaccino le frazioni caseiniche predette sono presenti nell'ordine di:

Composizione media delle micelle di caseina in g / 100 g di latte vaccino (56)

α_{s1}	33	Calcio	2,9
α_{s2}	11	Magnesio	0,2
β	33	Fosfato Inorganico	4,3
k	11	Citrato	0,5
γ	4		
Totale caseine	92	Totale minerali	8,0

Nei lattici di specie diverse la caseina α_s presenta velocità elettroforetiche caratteristiche e questa proprietà permette di differenziarli. La frazione β presenta invece una velocità elettroforetica assai simile per i diversi lattici. Questo metodo permette di scoprire, nel latte e nei latticini, l'uso fraudolento di lattici di

specie diverse, evidenziato dal tracciato elettroforetico, nel quale compaiono diverse bande per la caseina α_s (48).

Le caseine sono costituite da aggregati etero-proteici fosforilati presenti nel latte allo stato micellare che può essere separato per acidificazione, ultracentrifugazione e coagulazione enzimatica. La caseina nativa è quella precipitata per ultracentrifugazione. La caseina isoelettrica viene detta demineralizzata, perché perde il calcio e fosforo che la accompagnano nel latte. La cagliata enzimatica è costituita da fosfocaseinato di calcio.

Tutte le frazioni caseiniche sono fosforilate, hanno cioè fosforo organico (acido fosforico esterificato con la serina) che nella caseina è presente nella misura del ca. 2%. Quasi tutti gli zuccheri presenti nella caseina (1% della caseina) sono contenuti nella caseina k. È questa frazione che subisce l'azione enzimatica del caglio: è cioè il substrato specifico del caglio nella coagulazione enzimatica. La caseina costituisce il 74-78% del totale proteico del latte.

	α_1	α_2	β	γ	κ
Proporzione media %	36	10	34	13	3
Massa molecolare	23.600	25.250	24.000	19.000 (pept.)	21.000
Numero di residui di amminoacidi	199	207	209	169	181
Fosforo % (atomi/mole)	1,10 (8)	1,23-1,60 (10-13)	0,56 (5)	0,20 (1)	0,16 (1)
Glucidi %	0	0	0	5	0
Cisteina, residui/mole	0	2	0	2	0
Prolina	17	10	35	20	34
Sensibilità al calcio	++	+++	+	0	-
Sensibilità alla chimosina**	+	-	+	+++	-
Varianti genetiche	A, B, C, D	A, B, D	A, A ₂ , A ₃ , B, C, E	A, B	A, A ₂ , A ₃ , B
Idrofobicità (in kj)	4,89	4,64	5,66	5,30	-
Gruppi acidi (Asp+Glu+Px2)	48	49-55	31	18	16
Gruppi basici* (Lys+Arg+His)	25	33	20	17	16

* Dati per le varianti α_1 , β , α_2 , A, B, A₂, A₃ e γ .

** Reazione lenta impercettibile al momento della coagulazione ordinaria.

3.7.2 Caseina

La caseina α_1 è una fosfoproteina, composta da una singola catena polipeptidica derivante da 199 amminoacidi e da 8 gruppi fosfatici legati in forma di esteri monofosfatici ad altrettanti residui della serina. La caseina α_1 presenta numerose varianti, dette s1, s2, s3, con numero diverso di gruppi fosfatici legati ad amminoacidi diversi. Gli amminoacidi terminali della caseina α_1 sono l'arginina (NH₂) e il triptofano (COOH) e nella sua catena amminoacidica mancano la cisteina e la cistina. La caseina α_1 è sensibile al Ca⁺⁺ (insolubile in presenza di Ca⁺⁺ = 0,03 M); in un ampio intervallo di temperatura si lega al Ca formando grossi aggregati che flocculano. Il monomero della caseina α_1 ha un peso molecolare di 23.616 Daltons, punto isoelettrico a 20 °C a pH 4,4, carica netta totale a pH 6,6 pari a -20,9 e coefficiente di idrofobicità in Kj/res = 4,9 (3).

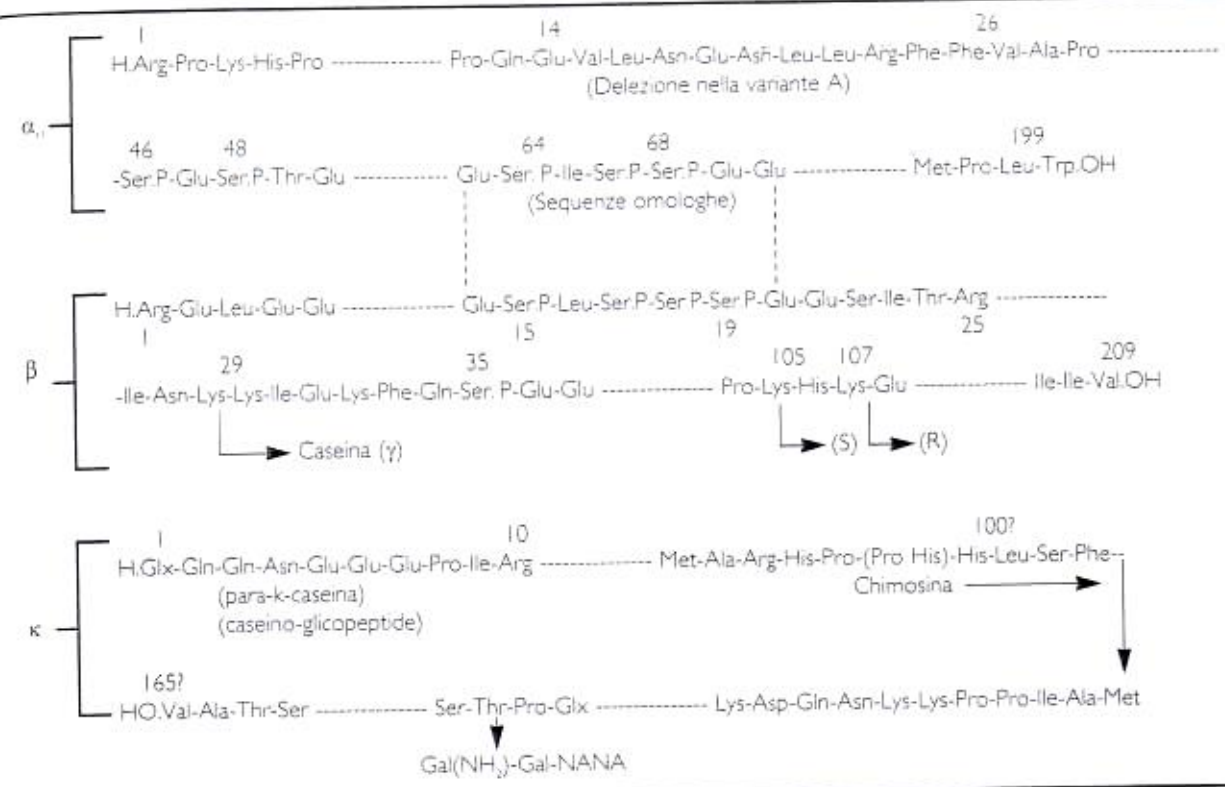
La caseina β è una fosfoproteina composta da una singola catena polipeptidica derivante da 209 amminoacidi e da 5 gruppi fosfatici legati alla serina. In una variante i gruppi fosfatici sono solamente 4. Gli amminoacidi terminali della β caseina sono l'argini-

na (NH₂) e la valina (COOH). Anche la caseina β è priva di cistina e cisteina. La caseina β è meno sensibile al calcio della α_1 . Il monomero della caseina β ha un peso molecolare di 23.982 Daltons, punto isoelettrico a 20 °C a pH 4,9, carica netta totale a pH 6,6 pari a -13,2 e un coefficiente di idrofobicità pari a 5,7. La β caseina è la caseina più idrofobica (3).

La k caseina, alla quale si attribuisce il compito di stabilizzare le micelle di caseina presenti nel latte, è una fosfo-glicoproteina, composta da una singola catena polipeptidica derivante da 169 amminoacidi, da un solo gruppo fosforico legato alla serina e da un numero variabile (normalmente 5) di gruppi glucidici. Il legame 105-106 (fenilalanina-metionina) della catena polipeptidica della caseina k è particolarmente sensibile all'azione della chimosina: la sua rottura dà inizio alla coagulazione del latte e dà luogo alla formazione di due tronconi polipeptidici chiamati *para k caseina* e *caseinoglicopeptide*. Quest'ultimo riunisce tutti i gruppi glucidici (fortemente idrofili) della k caseina. Il suo distacco fa perdere alla k caseina la funzione di colloidale protettore delle micelle caseiniche, e lo stato di idratazione delle micelle decresce notevolmente, permettendo interazioni reciproche tra i gruppi idrofobi che portano alla coagulazione del latte. La k caseina è insensibile al calcio, rimanendo solubile in presenza di Ca a tutte le temperature. Il monomero di k caseina ha peso molecolare pari a 19.023 Daltons, punto isoelettrico a 20 °C a pH 3,7, carica netta totale a pH 6,6 pari a -3,0 e coefficiente di idrofobicità pari a 5,1. La caseina γ è stata identificata come troncone terminale (troncone dall'amminoacido dal 29 al 209) della β caseina. (49) Nelle tabelle 3.36, 3.37, 3.38 sono riportate le sequenze amminoacidiche principali delle tre caseine.

Solubilità delle caseine in presenza di Calcio 0,03 M (50)

	a 0-4 °C	a 20-25 °C
Caseina α_1	insolubile	insolubile
Caseina α_2	insolubile	insolubile
Caseina β	solubile	insolubile
Caseina k	solubile	solubile



Sequenza	pH 7				K-B	
	Carica	Idrofobicità	Carica	Idrofobicità	Carica	Idrofobicità (log/rea)
1-20	+2,8	4,9	-9,6	3,5	-3	3,1
21-40	+1,0	6,3	-1,3	3,6	+3	7,6
41-60	-6,7	2,7	-2,5	4,3	+1	7,0
61-80	-10,2	3,0	0	6,8	+2	5,75
81-100	-1,0	5,3	0	6,3	+2	3,7
101-120	+1,7	5,8	+2,4	6,7	+1,5	5,9
121-140	+0,9	3,5	-2,6	5,1	-3	4,1
141-160	-2,0	7,1	+0,8	5,9	-5,7	4,6
161-180	-1,0	5,4	+1,0	5,9	-1	3,3
181-200	-3,0 (181-199)	4,8	0	6,4	(161-169)	
201-209			0	8,3		
Totale	-17,5	4,9	-11,8	5,7	-3,2	5,1

(1) Stime secondo Bigelow
 (2) pH 7

A. aspartico (g)	15 (8)	18 (14)	9 (5)	11 (7)	7 (3)
Treonina	5	15	9	14	8
Senna (e)	16 (8)	17 (10-13)	16 (5)	13 (2)	11 (1)
Acido glutammico (f)	39 (14)	40 (15)	39 (22)	27 (17)	32 (22)
Prolina	17	10	34	20	33
Glicina	9	2	5	2	4
Alanina	9	8	5	15	5
1/2 Cistina	0	2	0	2	0
Valina	11	14	19	11	17
Metionina	5	4	6	2	6
Isoleucina	11	11	10	13	7
Leucina	17	13	22	9	19
Tirosina	10	12	4	8	4
Fenilalanina	8	6	9	4	9
Triptofano	2	2	1	1	1
Lisina	14	24	11	9	10
Istidina	5	3	5	3	5
Arginina	6	6	4	5	2
Totale	199	207	209	169	181

a) Variante B. Mercier et al. (1971); b) Variante A. Bignon et al. (1977); c) Variante A. Ripadeau-Dumas et al. (1972); d) Variante A. Jollès et al. (1972); e) (-); f) fosfoacido; g) (-); asparagina.

le caratteristiche di composizione in aminoacidi e le sequenze di idrofobicità. L'accentramento dei gruppi idrofobici o idrofilici in parti determinate della catena polipeptidica che costituisce le caseine, fa sì che le molecole presentino dei siti idrofobici o idrofilici determinati: ad esempio la β caseina presenta le due estremità della catena idrofobiche e la parte centrale molto idrofila, mentre la κ caseina è divisa distintamente in due parti, una fortemente idrofila e l'altra fortemente idrofoba. Questo ha notevole rilevanza nell'aggregazione delle molecole caseiniche in sub-micelle e micelle e nella coagulazione del latte. A titolo puramente esemplificativo, le tre caseine si possono quindi rappresentare come segue:



3.7.2.1 Micelle caseiniche

Le caseine non sono presenti nel latte allo stato di molecole libere, ma allo stato di aggregati molecolari, cioè di proteine a struttura quaternaria. La caseina micellare del latte si trova in questo in dispersione colloidale sotto forma di micelle con diametro medio variante da 30 a 300 μ . Il numero di micelle caseiniche nel latte è estremamente elevato, pari a ca. 10^{14} /ml, presentando quindi un'altissima superficie di reazione (4 m^2 /ml di latte) e risultando molto sensibile alle variazioni del mezzo. Il peso molecolare apparente è molto elevato (10^7 - 10^9) e la distanza media delle particelle l'una dall'altra è dell'ordine del loro diametro (51).

Le micelle hanno un aspetto poroso e spugnoso, derivante da una precisa disposizione spaziale, ed al loro interno penetra il siero. Le micelle derivano dall'aggregazione dei monomeri caseinici, uniti da ponti idrogeno, a formare delle submicelle, senza formazione di una struttura stabile. La stabilità delle strutture viene raggiunta con l'intervento del Ca e dei fosfati che si legano ai gruppi R-COO⁻ ed agli R-NH₃⁺. I complessi così formati si uniscono con l'intervento di Ca e P che formano ponti di apatite (legando la caseina β alla caseina α , o legando tra

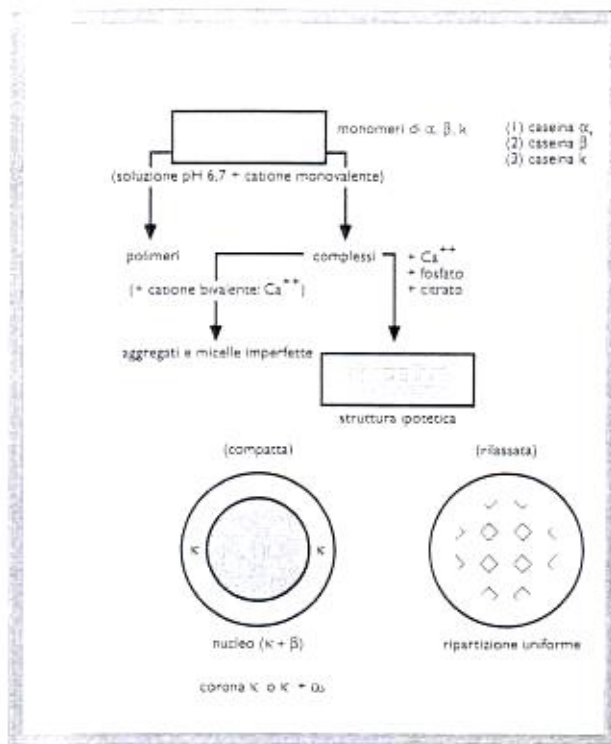


Fig. 3.41 - Schema della costruzione delle micelle (da Alais C, Scienze del Latte, Tecniche Nuove, ridisegnato).

loro due caseine α , che sono molto sensibili al calcio) fino a formare una micella composta da migliaia di unità nelle quali la caseina κ , più idrofila, si dispone all'esterno assumendo la funzione di colloide protettore. Lo schema della figura 3.41 indica un modello teorico di aggregazione delle micelle nel latte.

Il Ca e il P colloidal e inorganici (legati alla caseina i primi da legami organici, i secondi da legami salini) sono in equilibrio nel latte con le forme dei due elementi in soluzione nel siero.

Tale equilibrio è influenzato dal pH e dalla temperatura ed è instabile. Variando le condizioni del mezzo può portare alla disgregazione delle micelle caseiniche: se si diluisce il latte o si sequestra il Ca in soluzione, le micelle si disgregano, diminuiscono di diametro, riducendosi a sub-micelle.

Le micelle caseiniche, come le lipoproteine ed i fosfolipidi, trattengono acqua attraverso gli zuccheri della caseina κ che avvolge la micella, rendendo l'emulsione delle micelle caseiniche nel plasma latteo, stabile. Tuttavia, considerato l'elevato numero delle micelle e la loro distanza, occorre un elevatissimo grado di idratazione (l'idratazione effettiva delle micelle di caseina è pari a $3,7 \text{ g} \times \text{g}$ di caseina, il che vuol dire che in un latte al 3% di caseina, pari a 30 g/l, ben 110 grammi di acqua costituiscono acqua di

idratazione delle proteine) per permettere alle micelle di restare in dispersione e non interagire. Questa idratazione si ha solo quando le micelle si trovano in un mezzo con pH distante dal loro punto isoelettrico (50).

Quindi per mantenere le micelle caseiniche in dispersione, sono necessari sia pH appropriato del latte sia zuccheri idrofili all'esterno della micella: quando una soltanto delle due condizioni viene a mancare, lo stato di idratazione non è più sufficiente e le micelle interagiscono flocculando o coagulando. La coagulazione enzimatica toglie alla κ caseina i gruppi idrofili (zuccheri), per cui le micelle si destabilizzano; l'acidificazione al punto isoelettrico demineralizza le micelle, facendo passare in soluzione Ca e P inorganici e le micelle caseiniche si disgregano in particelle elementari che, perso lo stato di idratazione, interagiscono nuovamente determinando la flocculazione. È interessante notare che a bassa temperatura ($0 - 5^\circ\text{C}$), la caseina non floccula per acidificazione, né coagula per effetto enzimatico, ma si osserva solo un aumento di viscosità del latte: a questa temperatura infatti non si ha sufficiente interazione delle particelle elementari per permettere la formazione dei grossi aggregati che flocculano. Le micelle hanno una carica minerale relativamente alta: tra il 7 e l'8% sul secco, costituita per il 90% da fosfato di Ca. La caseina umana è più ricca in zolfo, cistina e glucidi della caseina di vacca: ciò viene considerato come una delle cause della superiorità del latte materno nell'alimentazione degli infanti. La struttura spaziale delle micelle caseiniche non è ancora perfettamente nota: malgrado gli innumerevoli lavori mancano ancora dati sperimentali che permettano di assegnare una struttura precisa alle micelle di fosfocaseinato di calcio.

Secondo la teoria di Rose (1965) (53) le micelle derivano dalla aggregazione lineare di monomeri β -caseinici legati dal fosforo che combina calcio e magnesio a formare quello che l'autore definisce «back bone» = spina dorsale, della submicella (Fig. 3.42a). Successivamente le molecole di α_1 caseina si attaccano alla catena di β caseina sistemando le loro estremità idrofobiche nei punti di unione della catena, attaccati ai siti idrofobici della β caseina. I sali di Ca formano dei ponti con gli esteri fosforici dell' α_1 e β caseine. La κ caseina si associa al sistema esponendo la sua parte fortemente idrofilica all'esterno formando delle «rosette» (Fig. 3.42b). Queste catene si ripiegano a formare dei globuli, o submicelle, nelle quali la κ caseina attacca le sue estremità idrofiliche ai siti esterni esposti sulla superficie di queste micelle primarie, dirigendoli verso l'esterno acquoso. Dalla successiva associazione di sub-micelle primarie, con l'ausilio di sali di Ca e P, si formano le grandi micelle caseiniche stabili (Figg. 3.42c, 3.42d).

Secondo la concezione di Ribadeau-Dumas (1970)

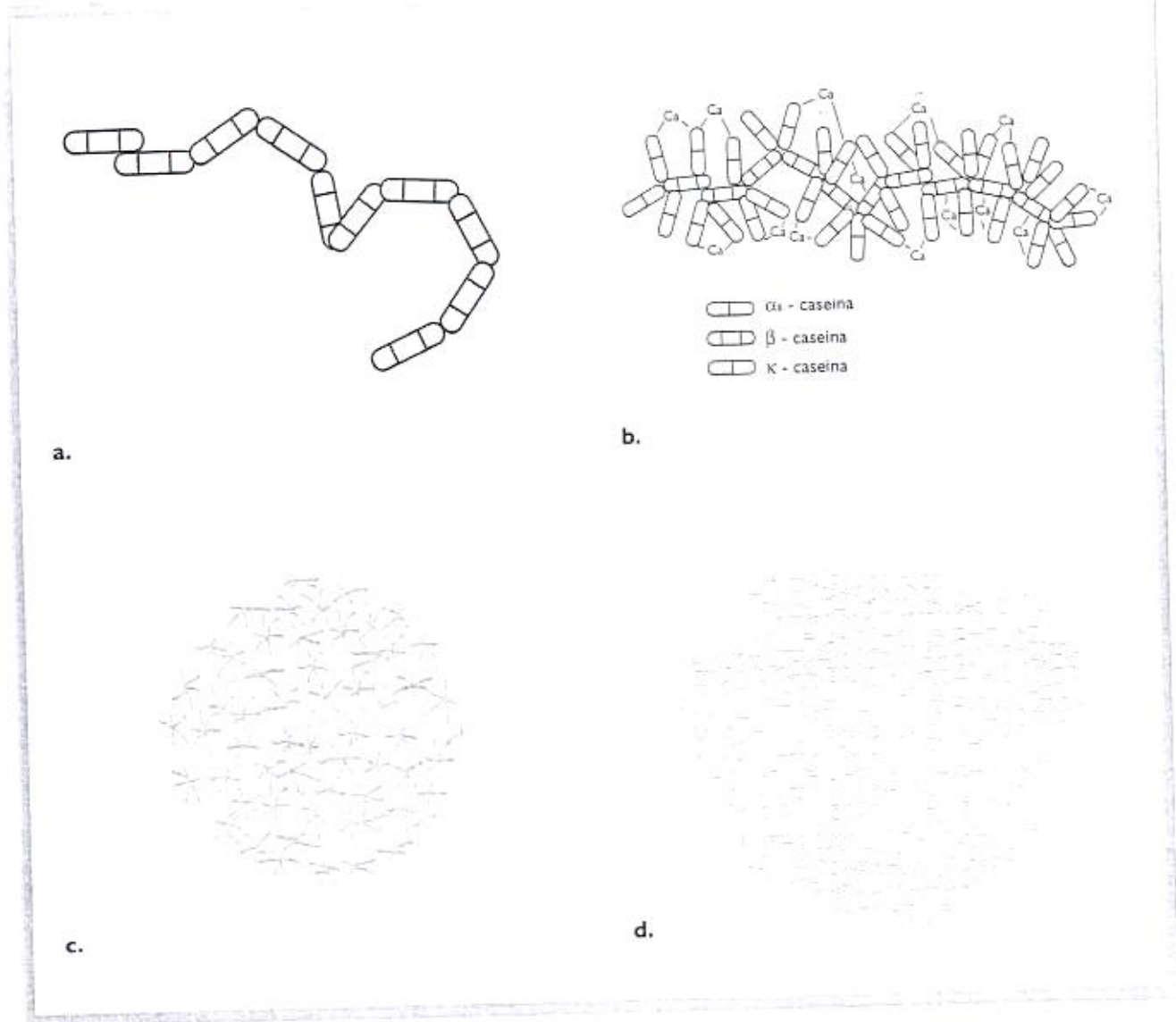


Fig. 3.42 - Formazione della micella di caseina secondo Rose (da Rose D. J. Dairy Sci., 48, 139, 1965 e α -Laval, Dairy Handbook, α Laval, ridisegnato: spiegazione a pag. 117 del testo).

(54), la facilità di penetrazione all'interno delle micelle di caseina delle peptidasi ad alto peso molecolare (ad es. la chimosina) non consente di optare per una struttura globulare chiusa, ma piuttosto per una struttura porosa. Secondo questo autore la struttura è determinata da trimeri formati da caseina α , β e κ nei quali la κ caseina forma il nodo di un insieme tridimensionale nel quale la forma generale tende a divenire sferica mano a mano che la micella ingrandisce (Figg. 3.43, 3.44). Il modello attualmente più soddisfacente sarebbe quello proposto da Schmidt (1982) (55, 56), secondo il quale le submicelle sarebbero formate da un nucleo idrofo-

bo 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 α , e β . La caseina κ , che possiede una parte molto polare, occuperebbe un posto speciale, esterno, in questo strato, formando così una specie di calotta esterna protettiva (Figg. 3.45, 3.46).

Secondo Walstra, infine (57) la κ caseina si disporrebbe all'esterno delle micelle, formando una fitta rete di «peli», costituiti dalla parte idrofilica della κ caseina, protesi verso l'esterno e circondanti le micelle in modo da impedire, con la loro presenza, l'e-

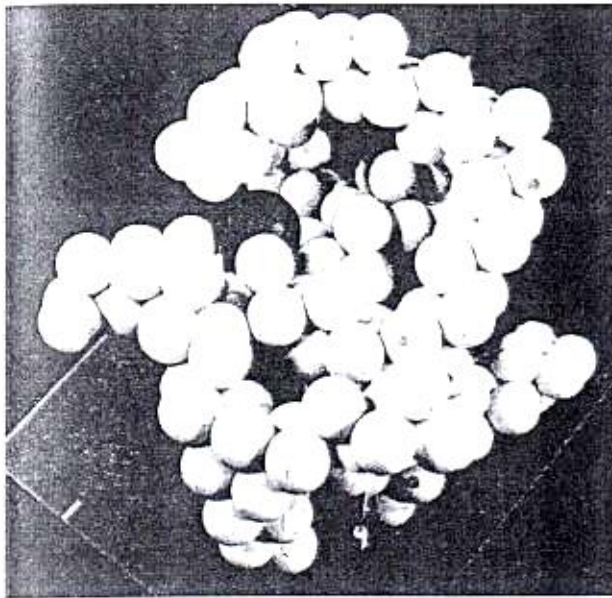


Fig. 3.43 - Modello di una frazione della micella di caseina (da Ribadeau-Dumas B., J. Dairy Res., 37, 269, 1970)

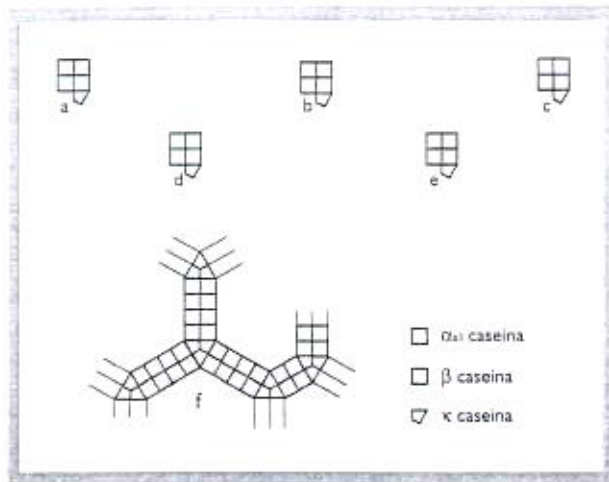
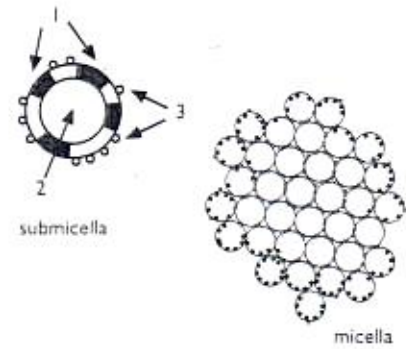


Fig. 3.44 - Modello di struttura della micella di caseina nativa secondo Ribadeau-Dumas e Garnier. In a, b, c, d, e: diversi copolimeri di κ , α , β caseine. In f: catena di copolimeri legati ai 3 siti dei trimeri di κ caseina (da Ribadeau-Dumas B., J. Dairy Res., 37, 269, 1970, ndisegnato).

ventuale contatto fra le micelle stesse, mantenendole in sospensione.

Nella coagulazione presamica del latte, i «peli», si staccerebbero dalla κ caseina, rendendo possibile il contatto, e quindi l'aggregazione, tra le micelle stesse. Il legame tra le submicelle risulterebbe da una



1. Molecole di κ caseina
2. Nocciolo idrofobico o ponti di $Ca_9(PO_4)_6$
3. Gruppi PO_4^-

Fig. 3.45 - Struttura e legami delle micelle caseiniche secondo Schmidt (da Schmidt D.G., in Development in Dairy Chemistry, Appl. Sc., Publishing, London, ndisegnato).

interazione elettrostatica tra gruppi esteri fosforici delle caseine ed il fosfato di calcio a formare dei ponti di apatite (Fig. 3.47).

Le micelle caseiniche sono particelle assai stabili per forma e volume, quando il pH e la temperatura del latte non variano. La pastorizzazione e l'ebollizione del latte non le modificano sensibilmente, mentre l'omogeneizzazione provoca deformazioni abbinate alla formazione di complessi protidi-lipidi. Il riscaldamento ad alte temperature ($> 125^\circ C$) ne modifica la struttura, così come la presenza di ioni minerali a concentrazione elevata. Il sale ad una concentrazione relativamente debole (circa 0,2 M) distrugge le micelle e precipita parzialmente la caseina a temperatura ambiente. L'abbassamento della temperatura modifica la struttura delle micelle agendo principalmente sull'equilibrio dei sali di Ca e P. L'acidificazione del latte vicina al punto isoelettrico provoca la distruzione delle micelle. Gli effetti dell'acidificazione e del calore si sommano: alle temperature di sterilizzazione è sufficiente l'abbassamento del pH di qualche decimo di grado perché il latte flocculi. L'elevazione della temperatura e del pH così come l'aumento del tenore di calcio ionico accrescono il tasso di calcio e di fosfato nella micella, e quindi la sua dimensione. Effetto opposto si ottiene per abbassamento della temperatura, acidificazione o addizione di acqua, di sale, di citrati o di altri agenti chelanti. La stabilità delle micelle caseiniche al calore aumenta con l'aumentare del tenore in κ caseina, con la diminuzione del fosfato di calcio colloidale e con il diametro più piccolo delle micelle.

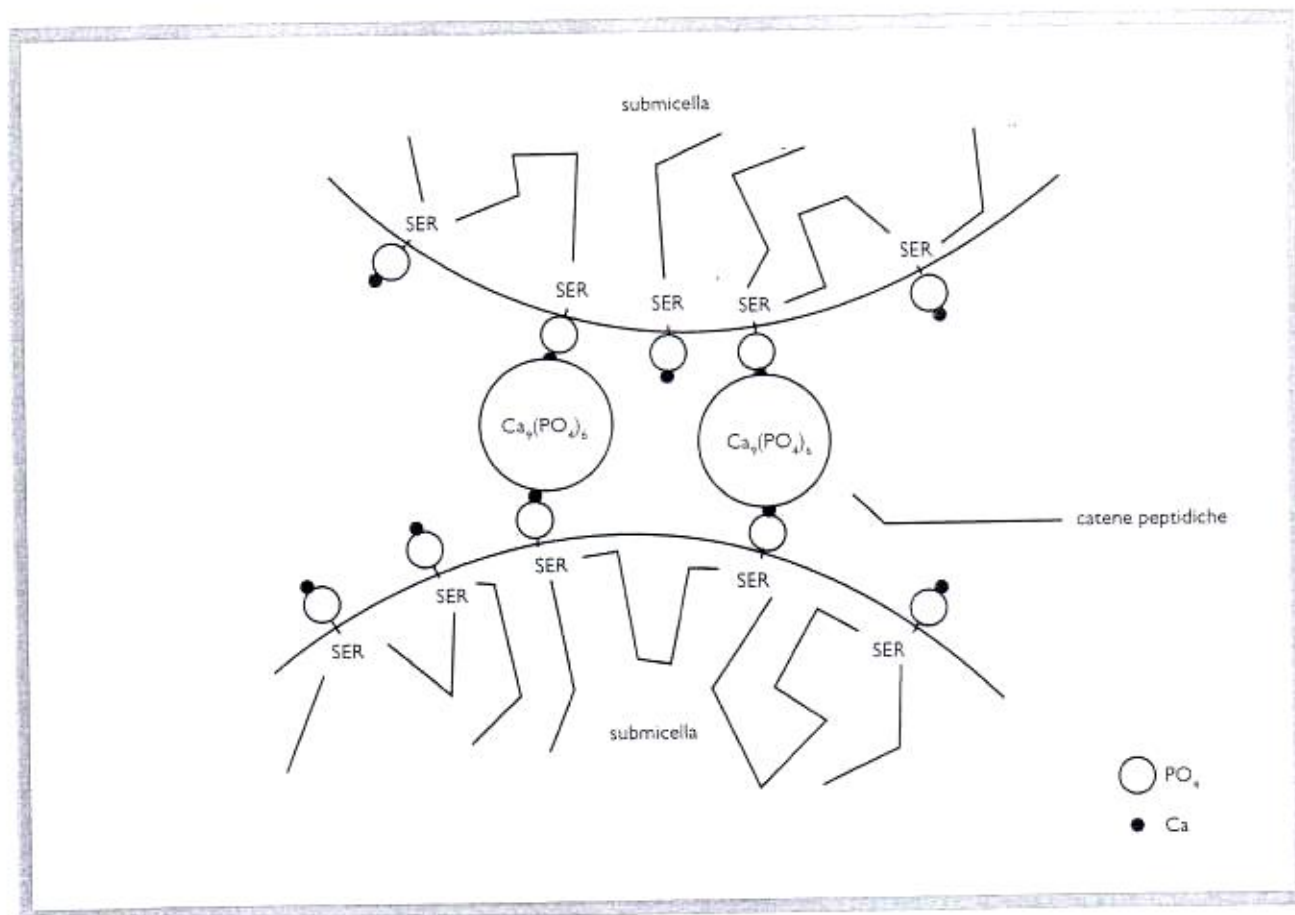


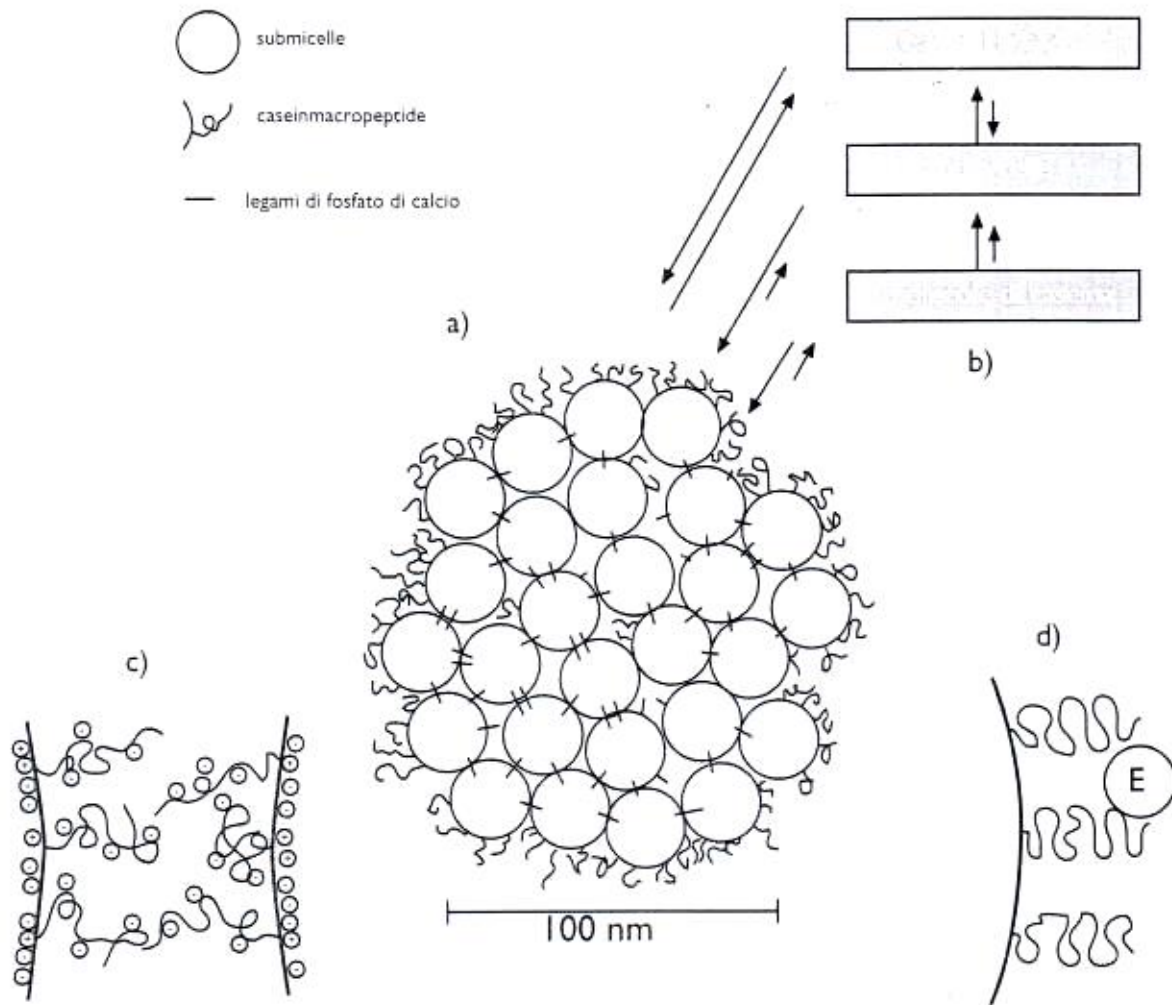
Fig. 3.46 - Schema di unione di due sub-micelle da parte del fosfato di calcio (Schmidt D.G. in *Development in Dairy Chemistry*, Appl. Sc. Publishing, ridisegnato).

Per azione del calore però si hanno una serie di interazioni tra le micelle, di natura idrofobica e con il calcio e le sieroproteine che modificano sensibilmente le proprietà gelificanti e coagulanti delle caseine. Il latte bollito non coagula affatto.

Le caseine, (come del resto le sieroproteine di latte concentrate per UF), presentano spiccate proprietà emulsionanti, avendo la capacità di ridurre la tensione interfacciale tra i componenti idrofili e idrofobi di due fasi (es. acqua-grassi) di un'emulsione, e vengono perciò utilmente impiegate come emulsionanti nella preparazione di alimenti. Tra le proteine del latte, le migliori proprietà emulsionanti appartengono ai caseinati di sodio a valori di pH relativamente alti. Le caseine sono dotate quindi di una notevole proprietà schiumogena che, a sua volta, è influenzata dalla solubilità delle proteine: se questa è bassa, la schiuma è instabile, mentre se è elevata la schiuma è più compatta, formata da bolle più piccole. La massima capacità schiumogena delle caseine si realizza a valori di pH prossimi al punto isoelettrico (57).

3.7.3 Sieroproteine e frazioni azotate non proteiche

Le proteine del siero formano una frazione complessa che rappresenta il 17% circa delle sostanze azotate del latte di vacca (caseina 25 g/l ca.; sieroproteine 7,0 g/l ca.) e vengono anche denominate *proteine solubili*. Quando si passa al latte dei non ruminanti il rapporto proteine solubili/caseine, che non è che di 0,2 nel latte vaccino, si accresce, diventando pari a 2 nel latte muliebre (3). 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 sieroproteine dalla caseina è il loro minor peso molecolare (ca. 150.000) che fa sì che queste proteine non precipitino al punto isoelettrico (pH ca. 6,0). Le sieroproteine non sono infatti degli aggregati proteici, come le caseine, ma sono presenti nel latte come monomeri o polimeri



- (a) le sub-unità sferiche con i filamenti (caseinmacropeptide) relativi al segmento C-terminale di k-caseina ed i legami costituiti da Ca-fosfato colloidale;
 (b) gli equilibri che si realizzano con la fase solubile (siero);
 (c) la configurazione delle cariche superficiali sulla micella;
 (d) la possibile interazione dell'enzima con i filamenti di k-caseina.

Fig. 3.47 - Modello di micella caseinica in cui sono schematizzati vari elementi e processi (riprodotto da Walstra P. et Al., *Dairy Chemistry and Physics*, Wiley Pub., N.Y., ridisegnato).

che precipitano per riscaldamento intenso o per salatura, ma non per azione enzimatica. Le sieroproteine non contengono fosforo. Le sieroproteine sono proteine semplici, solubili in acqua pura (albumine) o in soluzioni saline molto diluite (globuline), ricche di amminoacidi solforati e facilmente coagulabili con il calore (Tab. 3.39). Le sieroproteine si dividono (su 100) in:

- albumine	70% ca.
- globuline	15% "
- proteoso-Peptoni	10% "
- metalloproteine et al.	5% "

I proteoso-peptoni non hanno la dimensione molecolare caratteristica di una proteina (PM > 10.000).

Composto	PM	Solubilità			Origine
		Acido	Alcalino	Neutro	
Proteoso peptone (PP)	19	sol.	insol.	sol.	sol.
Globuline (G)	13	insol.	sol.	insol.	insol.
Albumine (A)	68	sol.	sol.	insol.	insol.
		Costituenti elettroforetici (1)		Mobilità	Origine
		N			
G	13,0	1 euglobuline		-1,7	sanguigna
G		2 pseudoglobuline		-2,4	sanguigna
PP	4,6	3 composto III		-2,8	(?)
A	19,7	4 α -lattalbumina		-3,6	mammaria
PP	8,6	5 composto V		-4,5	(?)
A	43,7	6 β -lattoglobulina		-4,9	mammaria
A	4,7	7 sieralbumina		-6,5	sanguigna
PP	5,7	8 composto VIII		-7,8	(?)

(1) Da Larson et Rolien (1955); mobilità a pH 8,5; forza ionica 0,1

ma non sono neppure assimilabili all'azoto non proteico. Ad un componente dei proteoso-peptoni, il *sigma proteoso*, ed alla sua interazione con la caseina, si deve la formazione della «pelle» che affiora nel latte bollito.

Le metalloproteine comprendono la lattoferrina, la transferrina, la ceruloplasmina, importanti nella fissazione dei metalli pesanti. A questo gruppo è associabile una proteina non caratterizzata, denominata «fattore bifidus» identificata come fattore di crescita del *Bifidobacterium bifidus* e *B. infantis* e importante nel latte di donna (3).

Le albumine sono costituite da:

- β lattoglobulina	- PM 18.000	45%
- α -lattoalbumina	- PM 14.000	15%
- albumina del siero di sangue	- PM 70.000	10%

Le globuline sono formate da:

- euglobuline	- PM 150.000	7,5%
- pseudoglobuline	- PM 150.000	7,5%

Le globuline comprendono le *immunoglobuline* (anticorpi) e sono particolarmente abbondanti nel colostro dove sono in percentuale molto maggiore delle albumine. Le globuline, dato il loro elevato PM hanno scarsa velocità elettroforetica e sono le prime a destabilizzarsi e precipitare a seguito dei fenomeni che alterano la stabilità del siero, quali l'aggiunta di

sali o il riscaldamento. Dopo le globuline precipitano le albumine dal siero di sangue, poi le β lattoglobuline, poi le α lattoalbumine. Le α lattoalbumine e le β lattoglobuline sono di sintesi mammaria, mentre l'albumina del siero di sangue e le globuline e immunoglobuline sono filtrate direttamente dal sangue.

Le sieroproteine sono ricche di ponti S-S: con il riscaldamento, per rottura dei ponti disolfuro, si formano gruppi SH che creano un ambiente riducente, con riscaldamento spinto si ha un distacco dei gruppi SH con formazione di H₂S che impartisce un tipico odore di cotto. Un'altra reazione che si verifica con il riscaldamento del latte consiste in un'interazione fra la k caseina e la β lattoglobulina, mediante formazione di ponti disolfuro. Questa interazione ostacola l'azione del caglio sulla k caseina ed è uno dei motivi per cui latt sottoposti a riscaldamento coagulano meno bene dei latt crudi. Il latte sterilizzato o bollito non coagula affatto.

Le sieroproteine non partecipano al fenomeno della coagulazione presamica e vengono normalmente perse con il siero. Per aumentare le rese casearie si sono individuati diversi metodi per il recupero delle sieroproteine ai fini caseari, tra i quali l'ultrafiltrazione, e processi vari, di cui sarà detto successivamente. Un riscaldamento anche parziale del latte (pastorizzazione) pur presentando degli ostacoli alla coagulazione del latte cui si è accennato e che meglio verranno esposti parlando della coagulazione presamica, permette però un recupero parziale nel formaggio di parte delle sieroproteine, altrimenti

Tab. 3.40 - Sostanze azotate non proteiche in latte di vacca e pecora (%) (47)

	Vacca (%)	Pecora (%)	Uova (%)	Latte umano (%)	Latte di capra (%)
Proteosa - Peptoni	0,55 (10)	0,64 (10)	1,78 (9)	3,50 (22)	1,59 (17)
Globuline (immuno)	0,55 (10)	1,01 (20)	11,80 (56)	1,98 (13)	1,78 (19)
β -Lattoglobulina	2,70 (50)	1,78 (34)	4,46 (21)	2,55 (16)	3,19 (33)
α -Lattalbumina + altre albumine	1,60 (30)	1,72 (34)	3,00 (14)	7,71 (49)	3,06 (32)
Totale	5,40	5,15	21,04	15,74	9,62

perse, con aumento di resa, anche perché le sieroproteine imprigionate nel reticolo caseinico della cagliata trattengono molta acqua.

Le proteine del siero, come le caseine, presentano ottime proprietà emulsionanti e schiumogene, massime a pH compresi tra 4 e 5.

Le sostanze azotate non proteiche (NPN) del latte nei ruminanti non rappresentano che una debole parte del totale azotato; dal 5 al 7% in media, mentre nel latte umano sono una delle più importanti frazioni (15-25%) benché in valore assoluto la quantità sia vicina a quella del latte vaccino (media 1,6 g/l). La sostanza più abbondante di questa frazione è l'urea (0,25 g/l nel latte di vacca), seguita dalla creatina, dalla creatinina, dall'ammoniaca. Il latte contiene poi alcuni aminoacidi liberi, tra cui la «taurina», aminoacido solforato che sarebbe essenziale per i neonati umani.

Nel latte mastitico il livello di sieroproteine e azoto non proteico tende ad aumentare (Tab. 3.40). Nella tabella 3.41 è riportato il contenuto in NPN dei lattici di vacca e pecora.

Tab. 3.41 - Sostanze azotate non proteiche in latte di vacca e pecora (%) (47)

Sostanze azotate non proteiche	Latte	
	vacca	pecora
Urea	32,94	44,79
Aminoacidi	22,18	15,66
Creatinina	1,0	1,69
Creatina	2,35	2,41
Azoto ammonico	0,67	0,99
Acido unco	0,44	2,10
Indeterminate	40,42	32,34

3.7.4 Produzione industriale di caseina e caseinati

Un cenno merita la fabbricazione industriale della caseina e dei caseinati, che in Italia è stata attualmente abbandonata, ma che ha rappresentato anche

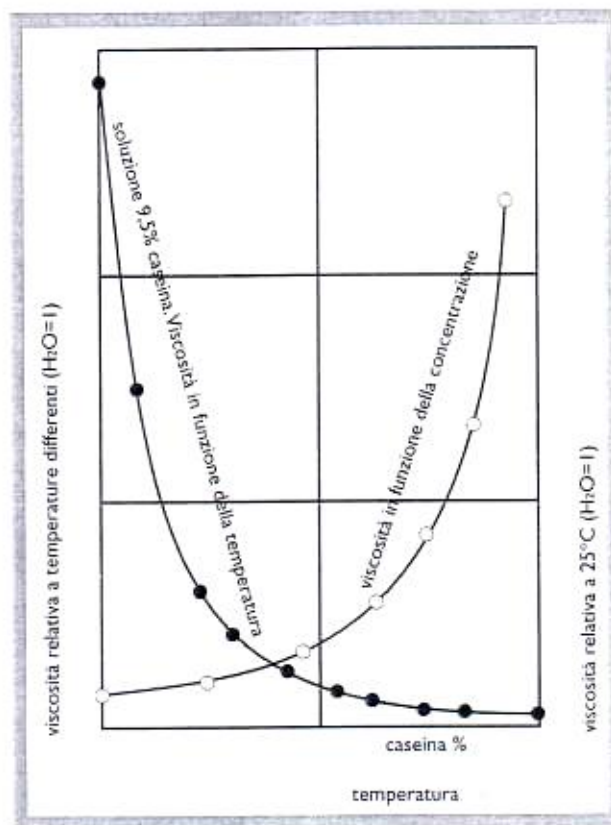


Fig. 3.48 - Viscosità delle soluzioni di caseina (da Chick H, et Al., Casein and its industrial applications, Reinhold, ridisegnato).