Relazione di progetto finale

Dalla genomica ai minerali del latte: un migliore utilizzo delle proteine nel processo di caseificazione

ACRONIMO DEL PROGETTO:
GenetoCheese

Parma, 15/07/2022

Indice

1. Progetto 3
2. Descrizione del progetto 6
3. Relazione intermedia/finale del progetto 7
4. Obiettivi, benefici e criticità del progetto 28
5. Ostacoli occorsi ed azioni correttive messe in atto 33

1. Progetto

Dati generali

Titolo del progetto	**Dalla genomica ai minerali del latte: un migliore utilizzo delle proteine nel processo di caseificazione**
Acronimo del progetto	GenetoCheese
Area strategica di intervento[1]	Qualità, tipicità e sicurezza degli alimenti e stili di vita sani
Linea di attività[2]	Produzione di alimenti di qualità per tutti (food security)

[1]**note**

Inserire una delle 6 aree prioritarie previste dal capitolo 2 del Piano Strategico per l'Innovazione e la ricerca nel settore agricolo alimentare e forestale (2014-2020), ovvero:

Area 1 - Aumento sostenibile della produttività, della redditività e dell'efficienza delle risorse negli agro ecosistemi
Area 2 - Cambiamento climatico, biodiversità, funzionalità suoli e altri servizi ecologici e sociali dell'agricoltura
Area 3 - Coordinamento e integrazione dei processi di filiera e potenziamento del ruolo dell'agricoltura
Area 4 - Qualità, tipicità e sicurezza degli alimenti e stili di vita sani
Area 5 - Utilizzo sostenibile delle risorse biologiche a fini energetici ed industriali
Area 6 - Sviluppo e riorganizzazione del sistema della conoscenza per il settore agricolo, alimentare e forestale
Area 7 - Pesca e acquacoltura

[2] Inserire una delle seguenti linee di attività (previste dal Piano Strategico per l'Innovazione e la ricerca nel settore agricolo alimentare e forestale 2014-2020). La linea di attività da inserire dovrà corrispondere all'area strategica di intervento indicata nel precedente campo, ovvero per la:

Area 1 - Inserire una delle seguenti linee di attività:
- **a.** Scelte varietali, di razza, di destinazione d'uso, miglioramento genetico mediante l'utilizzo di biotecnologie sostenibili;
- **b.** Uso sostenibile dei nutrienti, dei prodotti fitosanitari e dei prodotti zooprofilattici, utilizzazione di microrganismi, insetti utili e molecole bioattive per la difesa delle piante;
- **c.** Ottimizzazione dei processi produttivi (tecnica colturale, alimentazione, benessere animale, pratiche di prevenzione, risparmio energetico, ecc.), anche mediante l'utilizzo di sistemi di supporto alle decisioni (telerilevamento, agricoltura e zootecnia di precisione, meccanizzazione integrale, robotica e altri sistemi automatici intelligenti, applicazione di principi e strumenti di intelligenza artificiale ecc.) e biotecnologie sostenibili;
- **d.** Soluzioni tecnologiche per il miglioramento degli impianti e delle strutture aziendali;
- **e.** Gestione efficiente della risorsa idrica e della qualità delle acque;
- **f.** Conservazione, conservabilità e condizionamento delle produzioni (riduzione degli sprechi, conservanti naturali ecc.);
- **g.** Strumenti e sistemi funzionali alla gestione aziendale (pianificazione, costi di produzione, diversificazione ecc.) e alla sua caratterizzazione (impronta ecologica).

Area 2 - Inserire una delle seguenti linee di attività:
- **a.** Strategie per la mitigazione e per lo studio dell'adattamento al cambiamento climatico;
- **b.** Valorizzazione delle varietà e razze locali e salvaguardia delle risorse genetiche;
- **c.** Tutela del fattore "suolo": conservazione, qualità, fertilità e salvaguardia della biodiversità microbica;
- **d.** Valorizzazione di alcuni servizi ecologici forniti dal settore primario: manutenzione e ripristini ambientali, verde urbano, agricoltore/selvicoltore custode, bonifica dei terreni inquinati ecc.;
- **e.** Valorizzazione del ruolo sociale dell'agricoltura: "agricoltura sociale", relazioni urbano – rurale, accettabilità sociale dell'attività agricola.

Area 3 - Inserire una delle seguenti linee di attività:
- **a.** Soluzioni organizzative, economiche e sociali alle difficoltà strutturali di integrazione orizzontale e verticale nei distretti e nelle filiere;
- **b.** Soluzioni tecnologiche per il miglioramento dei processi di filiera;
- **c.** Sviluppo di sistemi distributivi, commerciali, promozionali e di marketing.

Settore produttivo[3]	Zootecnico
Tipo di progetto	**Bando**
Riferimento del Bando/Affidamento diretto/Sportello	D.M. N. 27443 del 25/09/2018 - Selezione pubblica - progetti di ricerca fondo latte
Durata del progetto	24
Costo ammesso	261.274,99
Contributo concesso	258.661,35
Importo rendicontato	253.938,89

Soggetto proponente il progetto	Università degli Studi di Parma	**Natura giuridica** **Pubblico**
Rappresentante legale	Prof. Andrei Paolo – NDRPLA62R10G337G	

Coordinatore del progetto	Prof. Summer Andrea – SMMNDR65D29L746U

Numero di Unità Operative	2, due	
ELENCO DELLE UNITÀ OPERATIVE		
Unità Operativa n. 1 - Denominazione	SMV-UNIPR – Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie, Università degli Studi di Parma	**Natura giuridica** **Pubblico**
Unità Operativa n. 2 - Denominazione	DAFNAE-UNIPD – Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente, Università degli Studi di Padova	**Natura giuridica** **Pubblico**

Area 4 - Inserire una delle seguenti linee di attività:
- **a.** Produzione di alimenti di qualità per tutti (food security);
- **b.** Miglioramento, tutela e tracciabilità della qualità e della distintività e adeguamento dei relativi standard di certificazione;
- **c.** Tecniche sostenibili per la trasformazione, conservazione e confezionamento dei prodotti agroalimentari;
- **d.** Valorizzazione della relazione tra alimentazione e salute e della valenza nutraceutica dei prodotti agroalimentari.

Area 5 - Inserire una delle seguenti linee di attività:
- **a.** Sviluppo e razionalizzazione delle filiere di biomasse e di biocarburanti con adeguati requisiti di sostenibilità ambientale ed economica;
- **b.** Sviluppo di bioraffinerie per la produzione di materiali industriali e mezzi tecnici a partire da residui e scarti agricoli nell'ottica dell'adeguata remunerazione del settore agricolo.

Area 6 - Inserire una delle seguenti linee di attività:
- **a.** Nuovi strumenti di governance per il coordinamento e l'efficienza del sistema della conoscenza: analisi dei fabbisogni, pianificazione, monitoraggio, valutazione ecc.;
- **b.** Promozione del trasferimento dell'innovazione mediante servizi di supporto, formazione e consulenza alle imprese agricole, alimentari e forestali;
- **c.** Sviluppo di nuove modalità.

[3] Inserire uno degli 13 settori produttivi previsti dall'Allegato A del Piano Strategico per l'Innovazione e la ricerca nel settore agricolo alimentare e forestale (2014-2020), ovvero:
- **a)** Zootecnico;
- **b)** Orticolo;
- **c)** Cerealicolo;
- **d)** Viticolo;
- **e)** Frutticolo;
- **f)** Olivicolo;
- **g)** Biologico;
- **h)** Floricolo;
- **i)** Forestale;
- **j)** Innovazione sociale;
- **k)** Piante officinali;
- **l)** Risicolo;
- **m)** Pesca e acquacoltura.

Numero di partner esterni al progetto	[1, uno]	
ELENCO DELLE UNITÀ OPERATIVE		
Partner n. 1 - Denominazione	Associazione Nazionale Allevatori Razza Bruna (ANARB)	**Natura giuridica** **Pubblico**

2. Descrizione del progetto

Sintesi del progetto

Il progetto GenetoCheese rientra nell'azione di ricerca finalizzata al "miglioramento delle proteine del latte per una migliore caseificazione" e si pone l'obiettivo di studiare i componenti del latte essenziali per la caseificazione al fine di garantire l'ottimizzazione della produzione di formaggio. Nel nostro progetto, in particolar modo il ruolo delle proteine e dei minerali del latte è stato valutato al fine di creare nuovi indici genetici per il miglioramento delle caratteristiche casearie del latte. Il progetto ha previsto la sinergica collaborazione fra il Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie di Parma (UNIPR) e il Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse naturali e Ambiente di Padova (UNIPD), entrambe realtà che da anni sono impegnate nello studio della qualità del latte e del miglioramento genetico in zootecnia. Il gruppo operativo di GenetoCheese si avvale inoltre del supporto e collaborazione dell'Associazione Nazionale Allevatori Razza Bruna Italiana (ANARB), ente rappresentativo di una razza italiana da latte con spiccata attitudine casearia. ANARB ha infatti potuto agire come Advisory board e tramite fra gli allevatori e il progetto per l'intera durata del progetto.

Il progetto GenetoCheese si è inserito nell'articolato e critico contesto lattiero-caseario europeo, il quale si trova di fronte a molteplici sfide derivanti dai processi di consolidamento e internalizzazione dei mercati, nonché dalla oscillazione dei prezzi del latte dopo l'abolizione delle quote nel 2015. In questo complesso background, a fare le spese delle politiche comunitarie e/o nazionali sono spesso gli allevatori che assistono ad oscillazioni repentine del prezzo del latte e al continuo aumento dei costi di produzione. In Italia, il prezzo medio del latte è fra i più alti d'Europa, ma i costi di produzione non sono minimamente paragonabili e nettamente più elevati. Questo a causa del prezzo elevato del terreno (specialmente nelle pianure) e dei maggiori costi del lavoro a cui vanno aggiunti i pesanti oneri burocratici. I costi addirittura aumentano nel caso del latte destinato alla produzione di prodotti con certificazione DOP che, in Italia, rappresentano circa la metà dell'intera produzione. Data l'immediata applicabilità delle conoscenze che il progetto GenetoCheese ha ottenuto, gli addetti del settore potranno avere un beneficio diretto e tangibile nel breve-medio periodo. L'impatto dell'innovazione tecnologica sui produttori ricoprirà molteplici aspetti che spaziano da un miglioramento dei processi produttivi del settore-lattiero caseario ad una massimizzazione dei guadagni per gli allevatori. Questo perché, i risultati di GENETOCHEESE permetteranno di ottimizzare il piano di selezione per migliorare l'attitudine casearia delle bovine da latte massimizzando le potenzialità produttive degli allevatori. Lo studio degli aspetti qualitativi del latte, a garanzia di un miglior processo di caseificazione, avrà un'importante ricaduta economica anche sulla produzione di formaggio nel territorio nazionale. L'impatto economico non sarà però solo in termini di riduzione dei costi e aumento dell'efficienza produttiva, ma anche in termini di marketing, in quanto i prodotti che seguiranno i nuovi strumenti resi disponibili da GenetoCheese saranno in linea con il concetto di una zootecnia più sostenibile. I risultati attesi del progetto avranno quindi effetto sull'intero comparto lattiero-caseario, a partire dagli allevatori che potranno usufruire di nuovi indici genetici più efficienti per la caseificazione fino a società e ambiente che potranno beneficiare di un migliore utilizzo delle risorse con conseguente riduzione dell'impatto delle attività antropiche sull'ambiente.

Lo svolgimento del progetto GenetoCheese ha garantito il conseguimento dei seguenti risultati specifici:

a. caratterizzazione demografica e genomica di bovine di razza Bruna Italiana specializzate nella produzione di latte destinato alla trasformazione casearia, e identificazione dei segni genomici di selezione;

b. caratterizzazione delle frazioni proteiche del latte di razza Bruna Italiana, valutazione dell'impatto ambientale e genetico sulla variabilità fenotipica osservata e quantificazione della relazione tra frazioni proteiche e aspetti qualitativi del latte;

c. validazione del metodo TestKappa a livello di singolo animale;

d. caratterizzazione dei sali minerali del latte di razza Bruna Italiana, valutazione dell'impatto ambientale e genetico sulla variabilità fenotipica osservata e quantificazione della relazione tra sali minerali e aspetti qualitativi del latte;

e. studio del ruolo delle proteine ed interazione con i minerali del latte nel processo di coagulazione e di caseificazione;

f. predizione di nuovi fenotipi attraverso l'uso della spettroscopia all'infrarosso da utilizzare come misure indirette per la caratterizzazione delle proteine, dei minerali e degli aspetti caseari del latte;

g. individuazione di associazioni fra Quantitative Trait Loci (QTL) e i caratteri diretti ed indiretti relativi a proteine, minerali e aspetti caseari del latte tramite l'analisi su intero genoma (GWAS);

h. proposta di un nuovo indice genetico di selezione per il miglioramento dell'efficienza nel processo di caseificazione.

Sono proprio queste le tematiche affrontate dal gruppo del progetto GenetoCheese. Il progetto si è posto infatti l'obiettivo di utilizzare strumenti innovativi al fine di produrre nuova conoscenza scientifica e di proporre nuovi strumenti operativi utili al miglioramento genetico dell'attitudine del latte alla caseificazione integrando informazioni genomiche con quelle relative alle proteine e ai minerali del latte di razza Bruna italiana. Al fine di diffondere il più possibile l'innovazione prodotta, il gruppo si è impegnato nella divulgazione dei risultati sia nella comunità scientifica sia fra gli stakeholders (associazioni di razza, allevatori e consumatori finali). Nonostante questo progetto abbia cercato di risolvere un aspetto molto applicativo e con riscontri pratici per gli allevatori, si prevede anche la formazione di nuova conoscenza sullo stato dell'arte nel campo della genomica del latte. GenetoCheese si pone l'obiettivo di diffondere nel breve periodo 10 pubblicazioni di elevato impatto. Questi articoli saranno pubblicati in riviste internazionali in posizione Q1 per garantire una diffusione di successo nel settore disciplinare di appartenenza. La divulgazione a livello nazionale di GenetoCheese ha garantito quindi un beneficio tangibile alla comunità scientifica interessata alle nuove tecnologie e innovazioni nell'ambito della zootecnia e scienza applicata. La diffusione dell'innovazione promossa dal progetto è stata inoltre favorita fra agli allevatori in forma semplificata e con contenuti multimediali, anche attraverso l'uso canali YouTube e su pagina Facebook e Instagram, per consentire loro di accedere facilmente alla conoscenza e all'innovazione. Inoltre, la diffusione e il trasferimento dei risultati e delle innovazioni prodotte dalla ricerca saranno promosse dall'ausilio di riviste specializzate non scientifiche e in forma divulgativa.

3. Relazione intermedia/finale del progetto

SPAZIO RISERVATO AL COORDINATORE DEL PROGETTO

Relazione tecnico-scientifica (intermedia max 10 pagine – finale max 20 pagine)

Il progetto GenetoCheese rientra nell'azione di ricerca finalizzata al "miglioramento delle proteine del latte per una migliore caseificazione" riportata nell'articolo 2 del Prot. Uscita N.0027443 del 25/09/2018 e si è posto come obiettivo lo studio del background genetico delle interazioni fra le componenti proteiche e i minerali del latte e il loro ruolo nel processo di caseificazione. Qui di seguito sono riportate le attività svolte entro i diversi WP del progetto.

WP1. Coordinamento

T1. Monitoraggio tecnico scientifico

All'interno del WP1.T1, l'UP ha monitorato e verificato il corretto avanzamento del progetto rispetto al diagramma di Gantt, sviluppando particolari azioni correttive dove necessarie. Al fine di organizzare e programmare l'avanzamento del progetto si sono susseguite 20 riunioni, fra organizzative e operative, finalizzate ad un costante aggiornamento e trasferimento delle informazioni fra l'UP, UO e l'Advisory board. Le riunioni sono state organizzate in video conferenza, in modo tale da permettere la presenza contemporanea di tutte le parti coinvolte e garantire così un controllo costante dell'evoluzione delle attività in base agli obiettivi raggiunti e agli ostacoli intercorsi nel corso del progetto.

T2. Gestione burocratica e amministrativa

Nel WP1.T2, particolare attenzione è stata dedicata alla gestione amministrativa che ha incluso il monitoraggio della contabilità completa del progetto in base ai regolamenti e alle linee guida come indicati dal "Manuale Utente", approvato con il decreto ministeriale n. 27352 del 23 novembre 2016. L'attività di gestione amministrativa è stata svolta presso la sede dell'UP, sulla base delle procedure amministrative dell'ente di appartenenza. Per il monitoraggio da parte del coordinatore del progetto, è stata redatta una relazione intermedia e finale con dettagli relativi alle spese sostenute per le attività progettuali svolte dall'UP e dall'UO e alle spese di attività amministrative. Inoltre, il personale addetto alla gestione amministrativa delle attività svolte dall'UP si è occupato anche della gestione delle strutture interne dell'ente coinvolte nel progetto. In questo caso anche il personale a tempo indeterminato è stato coinvolto, occupandosi degli aspetti di gestione economico-finanziaria e di rendicontazione, delle risorse umane per la stipula di contratti di collaboratori, della gestione amministrativa della comunicazione e diffusione del progetto. Inoltre, nel primo anno del progetto GenetoCheese è stato allestito un laboratorio di qualità del latte e caseificazione presso il dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie dell'Università degli Studi di Parma, per garantire le molteplici attività analitiche e di ricerca previste per il WP5. La gestione amministrativa e di rendicontazione per l'allestimento ex novo del laboratorio è stata gestita nella sua interezza dall'UP. Allo stesso modo, il responsabile di riferimento appartenente all'UO si è occupato della gestione interna delle risorse in termini di: spazi fisici (laboratori e uffici del personale a tempo determinato), predisposizione degli strumenti utili per le attività previste dal WP3.T1 e T2 (manutenzione straordinaria funzionale allo svolgimento delle analisi, prenotazione dei macchinari per il tempo necessario previsto), controllo dei reagenti necessari alle analisi (standard a titolo noto, solventi per la preparazione dei campioni e per la parte analitica, materiale consumabile), protocolli di laboratorio da testare, perfezionare e mettere a punto, nonché la rendicontazione oraria relativa a queste attività. Per l'intera durata del progetto, il responsabile dell'UO ha messo in atto una serie di azioni svolte a coordinare le attività pratiche di laboratorio, il lavoro del personale a tempo determinato e le pratiche amministrative e burocratiche di pertinenza alla segreteria del dipartimento di appartenenza. In riferimento all'UP sono stati attivati i seguenti contratti: 1 assegno di ricerca con data di inizio 1 aprile 2020 e 1 borsa di studio con inizio il 16 luglio 2021. Il progetto ha coinvolto inoltre 4 studenti per la preparazione della Tesi di Laurea. In riferimento all'UO sono state messe in atto le procedure per l'attivazione di 1 assegno di ricerca con data di inizio 1 luglio 2020. Il progetto inoltre coinvolge attivamente studenti per il trasferimento di competenze professionali nell'ambito della chimica analitica applicata alla qualità degli alimenti, alla genetica nell'ambito zootecnico e per la preparazione del loro elaborato di Laurea.

WP2. Dalla genomica all'allevamento

WP2.T1 caratterizzazione demografica e genetica della razza Bruna Italiana

L'obiettivo principale del WP2.T1 è stato quello di ottimizzare la strategia di campionamento per i WP3, WP4 e WP5 tramite la caratterizzazione demografica e genomica della razza Bruna italiana. Grazie al supporto dell'Advisory Board è stato possibile analizzare i dati di pedigree di più di 2,500,000 capi. In particolare, dato l'obiettivo del WP2.T1 di selezionare gli animali per il campionamento, si è posta particolare attenzione all'analisi esplorativa di dati anagrafici forniti dall'Advisory Board di 54,110 vacche in produzione, con almeno un controllo funzionale nell'ultimo anno (dal 01/11/2018) in aziende attive. Questo ha permesso di individuare 1,000 bovine su cui effettuare il campionamento per i WP3, WP4 e WP5. Le condizioni valutate al fine di ottimizzare la scelta dei soggetti da campionare sono state le seguenti:

1) le 1,000 bovine da campionare dovevano essere allevate in almeno 50 allevamenti (in media 20 soggetti per allevamento) al fine di valutare possibili differenze dovute a tipologia di allevamento e/o ambientali;
2) ciascun allevamento doveva essere composto per almeno il 90% da animali di razza Bruna italiana;
3) l'allevamento doveva essere localizzato nel territorio della regione Emilia-Romagna, Lombardia e Toscana;
4) l'allevamento doveva produrre latte per particolari contesti produttivi: Parmigiano Reggiano, Grana Padano, Silter e formaggi freschi.

Il numero di soggetti totali in lattazione che rispecchiavano i criteri sopra citati sono risultati essere 11,750 provenienti da 806 allevamenti (Figura 1); Da questi, sono stati selezionati 1080 soggetti per lo svolgimento del campionamento. I 1080

soggetti campionati provenivano quindi da 3 regioni e 11 province, sui quali sono stati eseguiti più di 100 analisi fenotipiche relative al latte e al formaggio.

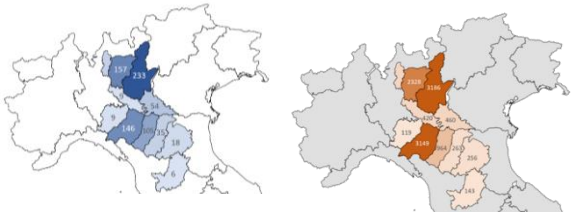


Figura 1. Rappresentazione grafica della distribuzione degli animali (in blu) e degli allevamenti (in arancione) per le regioni Emilia-Romagna, Lombardia e Toscana oggetto del campionamento.

Il disegno sperimentale ha determinato un campionamento di 12 mesi consecutivi, per un totale di 54 allevamenti campionati. In Tabella 1 è possibile osservare la frequenza dei campionamenti nelle quattro stagioni. Come si può evincere dalla Tabella 1, la frequenza dei soggetti per stagione è risultata ben bilanciata per permettere un'accurata valutazione dell'effetto stagione sui diversi fenotipi.

Tabella 1. Frequenze (numero bovine campionate) assolute e relative suddivise per le quattro stagioni.

Stagione	Frequenze, N	Frequenze, %
Inverno	180	16.7
Primavera	360	33.3
Estate	220	20.4
Autunno	320	29.6

WP2.T2 analisi e applicazioni genomiche

All'interno del WP2.T2 le informazioni genomiche e fenotipiche sono state analizzate simultaneamente per verificare la presenza di potenziali segni di selezione e identificare nuove regioni genomiche associate all'attitudine casearia del latte. Particolare attenzione è stata posta alla presenza di potenziali linee genetiche che sono state privilegiate nel tempo per la produzione di latte più adatto alla caseificazione tramite l'uso di caratteri indiretti. Questo tipo di analisi ha garantito una identificazione più dettagliata dei 1,000 soggetti selezionati per il campionamento, in quanto è stato possibile inserire la stima della variabilità genetica e il suo utilizzo nelle diverse realtà produttive.

Inoltre, per quanto riguarda il controllo della qualità del dato genomico e il successivo utilizzo nell'ambito degli studi di associazione genotipo-fenotipo (GWAS), è stata verificata l'assenza di stratificazione nel campione di animali analizzati nel progetto GenetoCheese. Un potenziale problema negli studi di popolazione è la presenza non identificata di una stratificazione di popolazione che può simulare un segnale di associazione spurio e di conseguenza portare a falsi positivi e/o alla non individuazione dei reali effetti. Quando casi e controlli (nel nostro caso, ad esempio, animali con bassi o alti valori di un certo fenotipo studiato) hanno frequenze alleliche diverse attribuibili a diversi background di popolazione, e non ad eventuali espressioni fenotipiche, allora si parla di stratificazione di popolazione. La stratificazione di popolazione è probabilmente la ragione più spesso citata della mancata riproducibilità dei risultati dei test di associazione. L'analisi delle componenti principali (PCA) rappresenta un approccio multivariato che permette di rilevare differenze in termini di strutture genetiche tra sottogruppi di individui. Se applicata a dataset con dati raccolti da individui provenienti da diverse realtà produttive che hanno determinato nel tempo delle sottopopolazioni da un punto di vista genetico, allora l'analisi è in grado di dare una interpretazione geografica ai dati, individuando graficamente in modo distinto i gruppi relativi alle sottopopolazioni. I soggetti sono caratterizzati in uno spazio vettoriale come punti distinti, in modo tale che gli individui geneticamente simili formino "nuvole" compatte (cluster), mentre gli individui geneticamente più dissimili si posizionino in regioni più distanti dello spazio. La presenza di cluster può aiutare a individuare sottopopolazioni di individui omogenei tra loro che possono essere considerati separatamente nelle analisi di associazione aumentandone il potere statistico. In Figura 2 è possibile notare come dalla PCA per gli animali campionati nel progetto e colorati in base all'allevamento di provenienza, non si evidenziano gruppi di animali che si discostano in cluster, bensì si evidenzia un campione particolarmente omogeneo.

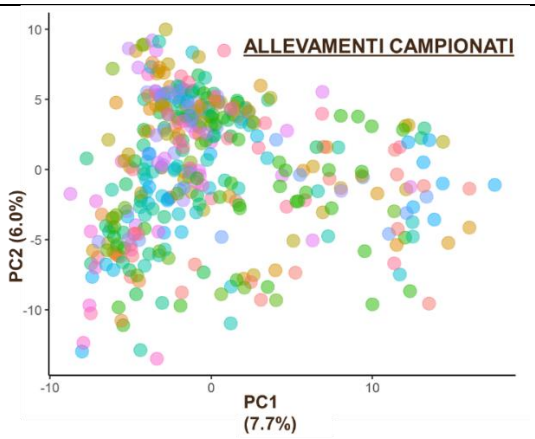


Figura 2. Grafico PCA per quanto riguarda la verifica di assenza di stratificazione

WP2.T3 identificazione di allevamenti di "sola bruna"

Per l'attività svolta all'interno del WP2.T3 è stata preparata una scheda per la raccolta di informazioni relative alla tipologia e alla gestione aziendale. Questa scheda è stata studiata ed elaborata presso l'UP e infine approvata dall'Advisory Board e dalla UO. Gli aspetti inseriti sono stati i seguenti: destinazione del latte, caratteristiche della mandria, numero di vacche in lattazione e il loro livello produttivo, la tipologia di stabulazione (fissa o libera), tipo di lettiera (permanente, con cuccette, coltivata), tipologia dell'impianto di raffrescamento (solo ventilazione o impianto di raffrescamento ad acqua e ventilazione), tipo di alimentazione (uso del carro unifeed, presenza di auto alimentatori). In Figura 3 è possibile trovare un esempio di parte della scheda per la raccolta di informazioni aziendali utilizzata in allevamento. Inoltre, sono state raccolte informazioni relativa all'altimetria e alla temperatura e umidità al giorno del campionamento.

UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICO-VETERINARIE

Campionamento GENEtoCHEESE

ALLEVAMENTO	
Codice AUA	
Destinazione latte	

ORGANIGRAMMA	
Conduzione familiare	☐ SI ☐ NO
Dipendenti	☐ SI ☐ NO

ALLEVAMENTO e STABULAZIONE	
Anno Costruzione allevamento	
Presenza altre razze	☐ SI ☐ NO se SI quale
Vacche in lattazione	Numero….....
Stabulazione	
☐ Cuccette ☐ Lettiera permanente ☐ Fissa	
Materiale lettiera cuccetta/lett.perm.	
Pascolo	☐ SI ☐ NO
Ventilazione e raffrescamento	☐ SI ☐ NO
☐ Nebulizzatori ☐ Doccette ☐ Ventole ☐ Elicotteri	
IMPIANTO DI MUNGITURA	
☐ Sala ☐ Lattodotto ☐ Portatile	
Tipologia:	
Numero poste/gruppi:	
ALIMENTAZIONE	
☐ Unifeed ☐ Tradizionale	
Autoalimentatori	☐ SI ☐ NO

Figura 3. Scheda per la raccolta di informazioni relative a ciascun allevamento oggetto di campionamento.

Attraverso le informazioni raccolte tramite questa scheda è stato quindi possibile classificare la tipologia aziendale scorporando la variabilità osservata dovuta al singolo allevamento e quella causata dalle strategie di allevamento adottate. Conseguentemente, è stato anche possibile valutare l'associazione (GxE) fra il genotipo e i fattori a livello di allevamento.

WP2.T4 elaborazione dati del WP2

Il WP2.T4 prevedeva l'elaborazione dei dati, la statistica descrittiva e il controllo della qualità dei dati (QC). È stato possibile rilevare che il 42.6% degli allevamenti campionati è risultato essere mono-razza e che la maggior parte di questi era situato ad una altitudine non superiore ai 300 m s.l.m. (70.4%) a identificare che la maggior parte degli allevamenti campionati si trovava in pianura. La dimensione aziendale invece, valutata in termini di capi in lattazione, è risultata ben bilanciata e ben rispecchiante il settore allevatoriale italiano, con più del 50% degli allevamenti avente una dimensione aziendale superiore ai 100 capi (Tabella 2).

Tabella 2. Frequenza relativa e assoluta della dimensione aziendale intesa come numero di vacche in lattazione.

Dimensione aziendale	Frequenze, N	Frequenze, %
<50	10	18.5
50-80	13	24.1
81-120	6	11.1
121-180	12	22.2
>180	13	24.1

La maggior parte delle aziende campionate ha presentato l'utilizzo della tecnica UNIFEED per l'alimentazione delle bovine in lattazione (68.5%) e solo il 31.5% presentanti un'alimentazione tradizionale. Soltanto nel 33.3% dei casi gli animali non avevano accesso ad aree esterne, e la stabulazione più frequente è risultata essere a cuccette (64.8%). La scelta degli animali da campionare per ogni allevamento è stata effettuata tramite l'utilizzo dell'ultimo controllo funzionale disponibile per l'azienda stessa. Questo ultimo passaggio è stato di fondamentale importanza per garantire un numero bilanciato di soggetti rispetto a due fattori relativi all'animale ovvero lo stadio di lattazione e l'ordine di parto (Tabella 3 e 4).

Tabella 3 Frequenza relativa e assoluta del numero di soggetti campionati, suddivisi lungo la lattazione (classi 60 giorni).

Stadio di lattazione	Frequenza (%)
0-60	12.9
61-120	20.7
121-180	17.9
181-240	14.6
241-300	14.4
>300	19.6

Tabella 4 Frequenza relativa e assoluta del numero di soggetti campionati, suddivisi in classi di ordine di parto.

Ordine di Parto	Frequenza (%)
1	28.0
2	24.8
3	23.1
≥4	24.2

Le informazioni sopra descritte sono state formalmente inserite in un database contenente per le 1080 bovine campionate le informazioni di pedigree, genomiche, aziendali e produttive (latte e formaggio). Qui di seguito è possibile trovare un elenco delle categorie di fenotipi raccolti per il latte e il formaggio:

- Latte:
  1) Composizione (grasso proteina, caseina lattosio, solidi totali, urea)
  2) Cellule somatiche totali e differenziali
  3) Acidi grassi (SFA, PUFA, MUFA, De Novo, Preformati, Misti, NEFA)
  4) Cloruri (titolazione)
  5) Minerali (Ca, P, K, Mg, Na, Cl, S)
  6) Frazioni proteiche (caseine e siero proteine)
  7) Test Kappa
  8) Corpi chetonici (BHB, acetone)
  9) Coagulazione
  10) Spettri FTIR
- Formaggio:
  11) Produzione giornaliera
  12) Resa casearia
  13) Recupero nutrienti dal latte al formaggio
  14) Grasso, proteina, solidi totali
  15) Minerali
  16) Calo di stagionatura
  17) Acidità
  18) Composizione
  19) Spettri NIR

All'interno del WP2.T4 è stato sviluppato anche il modello statistico per le successive elaborazioni svolte all'interno dei WP3, WP4 e WP5. Qui di seguito è possibile osservare il modello statistico utilizzato all'interno del progetto GenetoCheese:

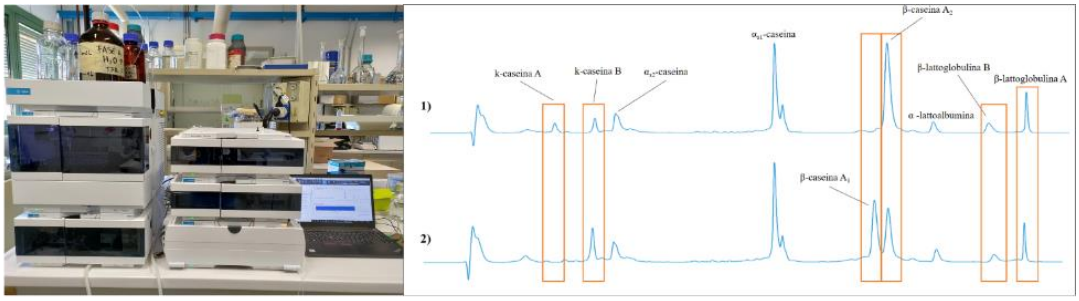
$$y_{ijklm} = \mu + \text{area di produzione}_i + \text{stagione}_j + \text{ordine di parto}_k + \text{stadio di lattazione}_l + \text{allevamento}_m(\text{area di produzione} \times \text{stagione})_{ij} + e_{ijklm}$$

Con area di produzione (5 livelli: Parmigiano Reggiano Collina-Montagna, Parmigiano Reggiano Pianura, Grana Padano, Silter e Formaggi Freschi), stagione (4 livelli: inverno, primavera, estate, autunno), ordine di parto (4 livelli: primipare, secondipare, terzipare e quattro o più parti), stadio di lattazione (6 livelli da 60 giorni), allevamento (54 livelli).

WP3. Dalla genomica alle proteine del latte

WP3.T1 campionamento e caratterizzazione delle proteine del latte;

Come descritto nel WP2, durante il campionamento presso gli allevamenti selezionati, è stata raccolta un'aliquota per la caratterizzazione delle proteine del latte. Le proteine sono uno dei componenti più preziosi del latte e ciò è dovuto principalmente alla vasta gamma di proprietà nutrizionali, nutraceutiche (es. attività antibatterica, antivirale, antimicotica e antiossidante) e tecnologiche di cui sono dotate. Circa l'80% delle proteine del latte appartengono alla famiglia delle caseine (CN), classificate come αS1-caseina (α_{S1}-CN), α_{S2}-caseina (α_{S2}-CN), β-caseina (β-CN) e k-caseina (k-CN), mentre il restante 20% è rappresentato dalle sieroproteine, principalmente β-lattoglobulina (β-LG) e α-lattoalbumina (α-LA). Le caseine sono principalmente coinvolte nel processo di caseificazione e, insieme al calcio, sono le principali responsabili delle proprietà di coagulazione del latte e della resa di caseificazione. Per la determinazione e la quantificazione delle diverse frazioni proteiche, tutti i campioni di latte individuale di bovine di razza Bruna raccolti nell'ambito del progetto sono stati analizzati presso il laboratorio del Dipartimento DAFNAE dell'Università degli Studi di Padova attraverso la cromatografia liquida ad alta pressione (RP-HPLC). I campioni di latte, conservati a -20°C, sono stati scongelati a temperatura ambiente, omogeneizzati e opportunamente preparati per l'iniezione cromatografica. Nello specifico, da ciascun campione è stata prelevata un'aliquota di 0.5 mL a cui è stata aggiunta una soluzione acquosa di cloridrato di guanidina (6M GdnHCl, 0.1 M bisTris buffer, 5.37 mM citrato di sodio e 19.5 mM ditiotreitolo) in rapporto 1:1 (v/v). Successivamente, ogni campione è stato vortexato per 10 secondi e incubato a temperatura ambiente per 1 ora per favorire la solubilizzazione delle proteine. I campioni sono stati poi centrifugati a 13,000×g per 10 minuti a temperatura ambiente per la separazione della fase lipidica. Dopo la centrifugazione, il surnatante è stato prelevato e diluito in apposite vial, in proporzione 1:3 (v/v) con una soluzione contenente cloridrato di guanidina 4.5 M in acqua, acetonitrile e acido trifluoroacetico (100:900:1). I campioni così preparati sono stati analizzati con il cromatografo Agilent 1260 Infinity II LC system (Agilent Technologies, Santa Clara, SA) (Figura 4a) secondo il metodo proposto da Bonfatti et al., (2008). Lo strumento rilascia un cromatogramma (Figura 4b), che permette di identificare anche le varianti genetiche delle proteine.



a) b)

Figura 4. Cromatografo Agilent 1260 Infinity II LC system (a) e cromatogrammi di due campioni di latte individuale e le relative varianti genetiche identificate (b).

Tra i campioni analizzati, il genotipo β-CN A_2A_2 è risultato essere quello più abbondante nella razza Bruna, con una frequenza del 62.20%. I campioni di latte hanno mostrato una frequenza inferiore di β-CN BA_2 (24.53%) e di β-CN A_1A_2 (8.01%) (Tabella 5). L'abbondanza del genotipo β-CN A_2A_2 riportata nel presente studio per la razza Bruna è in accordo con i risultati riportati in letteratura per la stessa razza (Zicarelli et al., 2021). Inoltre, studi recenti hanno dimostrato che il latte β-CN A_2A_2, rispetto alle altre varianti genetiche, è maggiormente assorbibile e digeribile a livello gastrointestinale ed è per questo motivo che si è cominciato a porre attenzione nei riguardi del genotipo omozigote A_2A_2 della β-caseina nei tori destinati alla riproduzione (Sebastiani et al., 2020).

Tabella 5. Frequenze genotipiche della β-caseina.

Genotipo β-caseina	Frequenza (%)
A_2A_2	62.20
BA_2	24.53
A_1A_2	8.01
BB	2.88
BA_1	1.75
A_1A_1	0.38
A_2I	0.25

Per quanto concerne invece la k-CN, il genotipo BB è il più rappresentato, con una frequenza del 72.25%. I campioni di latte hanno mostrato una frequenza inferiore di k-CN AB (23.00%) e di k-CN AA (4.75%) (Tabella 6). L'elevata presenza della variante B della k-CN è di notevole importanza, tenuto conto che questa variante induce condizioni chimico-fisiche

particolarmente favorevoli alla velocità di aggregazione delle micelle di paracaseina, attribuendo al latte una migliore attitudine casearia (De Marchi et al., 2008).

Tabella 6. Frequenze genotipiche della k-caseina.

Genotipo k-caseina	Frequenza (%)
BB	72.25
AB	23.00
AA	4.75

I dati raccolti sono stati poi analizzati utilizzando il modello statistico descritto nel WP2.T4.
Come mostrato in Tabella 7, il contenuto medio di proteina totale nei campioni di latte analizzati si è attestato su 35.94 mg/mL. Le frazioni di caseina più abbondanti sono la α-CN (13.79 mg/mL; come somma di α_{s1}-CN e α_{s2}-CN) e la β-CN (10.91 mg/mL), mentre la parte rimanente è rappresentata dalla k-CN con una media di 5,28 mg/mL. Il contenuto medio di sieroproteine si è attestato su 4.45 mg/mL per la β-LG e 1.51 mg/mL per la α-LA. Il coefficiente di variazione per le diverse frazioni proteiche è risultato compreso tra 13.84% (β-CN) e 25.71% (α_{s2}-CN). Si osserva che la α_{s2}-CN ha una variabilità più elevata rispetto a quella osservata per le altre frazioni, con un range di concentrazione che va da un minimo di 1.31 mg/mL ad un massimo di 7.39 mg/mL. Al contrario si rileva che la concentrazione di α-LA non varia molto all'interno dei campioni di latte analizzati, in quanto va da un minimo di 0.85 mg/mL ad un massimo di 2.31 mg/mL. L'indice caseinico, calcolato come rapporto tra la somma delle frazioni di caseina e la somma di tutte le frazioni proteiche del latte, è dell'83%.

Tabella 7. Statistiche descrittive[1] delle frazioni proteiche del latte.

Frazioni proteiche (mg/mL)	Media	DS	CV, %	Minimo	Massimo
Proteine totali	35.94	4.71	13.11	20.66	51.45
Caseine totali	29.98	4.22	14.08	17.78	43.31
β-caseina	10.91	1.51	13.84	6.53	16.02
α_{s1}-caseina	9.59	1.38	14.39	6.09	14.16
k-caseina	5.28	1.12	21.21	2.45	9.02
α_{s2}-caseina	4.20	1.08	25.71	1.31	7.39
Sieroproteine totali	5.96	1.13	18.96	2.52	9.30
β-lattoglobulina	4.45	1.06	23.82	1.60	7.53
α-lattoalbumina	1.51	0.25	16.56	0.85	2.31

[1] DS= deviazione standard; CV= coefficiente di variazione

In Tabella 8 sono riportati i risultati dell'analisi della varianza con i valori di F e le significatività.

Tabella 8. Risultati dell'analisi della varianza (valori di F e significatività) per le frazioni proteiche

Frazioni proteiche	Effetti fissi				Effetti casuali (%)
	Stagione di campionamento	Ordine di parto	Stadio di lattazione	Sistema aziendale	Allevamento
Caseine					
β-caseina	2.71	12.48***	36.41***	0.72	25,64
α_{s1}-caseina	3.62*	6.01***	30.59***	1.28	29.75
k-caseina	3.42*	2.01	7.08***	0.35	12.53
α_{s2}-caseina	10.56***	5.98***	27.25***	0.06	59.18
Sieroproteine					
β-lattoglobulina	0.28	3.39*	10.77***	0.55	16.70
α-lattoalbumina	6.58**	7.04***	6.24***	1.71	40.36

*** p<0.001; ** p<0.01; * p<0.05

L'ordine di parto e lo stadio di lattazione sono risultati significativi nello spiegare la variabilità del contenuto di tutte le frazioni proteiche del latte ($p < 0,05$), ad eccezione della k-CN per quanto concerne l'ordine di parto. La stagione di campionamento è risultata significativa nello spiegare la variabilità di α_{s1}-CN, k-CN, α_{s2}-CN e α-LA ($p < 0,05$), mentre il sistema aziendale non ha avuto un effetto rilevante sul contenuto di caseine e sieroproteine del latte. Circa il 60% della varianza fenotipica della α_{s2}-CN è stata spiegata dell'effetto casuale dell'allevamento entro sistema aziendale/stagione. Lo stesso effetto casuale ha spiegato una quota inferiore della varianza di β-CN (~26%), α_{s1}-CN (~30%) e α-LA (~40%), e una quota ancora più ridotta della variabilità di k-CN (~12%) e β-LG (~17%). La Figura 5 illustra le medie stimate del contenuto di caseine (a) e sieroproteine (b) durante la lattazione.
Si osserva una concentrazione di caseine e sieroproteine più bassa all'inizio della lattazione e un aumento lineare verso fine lattazione. Tale variazione è in accordo con autori precedenti, i quali sostengono che l'andamento delle frazioni proteiche nel corso della lattazione è opposto alla curva della produzione di latte (Mc Dermott et al., 2017; Franzoi et al., 2019). Per

quanto concerne l'ordine di parto, le frazioni proteiche hanno mostrato una quantità di proteina maggiore nelle vacche primipare e secondipare. Infine, relativamente alla stagione di campionamento, le caseine e la α-LA hanno seguito lo stesso andamento, con una diminuzione generale durante il periodo estivo. Tale andamento è stato correlato allo stress da caldo che interessa le vacche durante l'estate. Al contrario, la β-LG è aumentata durante il periodo estivo, probabilmente per il suo ruolo immunomodulatore.

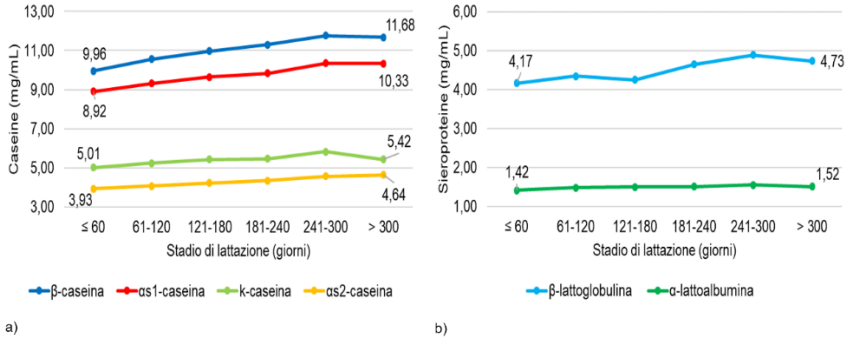


Figura 5. Effetto dello stadio di lattazione sul contenuto di caseine (a) e sieroproteine (b) del latte.

WP3.T2 Test Kappa

Nel WP3.T2 è stato testato l'utilizzo del TestKappa a livello di singolo animale. L'aliquota di latte (1 ml) è stata analizzata presso i laboratori dell'UO. Il TestKappa, normalmente utilizzato nel latte di massa, prevede la determinazione del contenuto di κ-caseina B presente nei campioni di latte [ProGnosis Biotech (Larissa, Greece)]. Questo metodo sfrutta la capacità di un anticorpo di legarsi ad una sequenza amminoacidica specifica della κ-caseina B. L'anticorpo si lega alla porzione che contiene le posizioni amminoacidiche 136 e 148 che differenziano la variante B dalla variante A. Si tratta di un test ELISA competitivo indiretto basato su una reazione colorimetrica: dall'intensità del colore sviluppato si misura la quantità di κ-caseina B contenuta nel campione di latte (Figura 6).

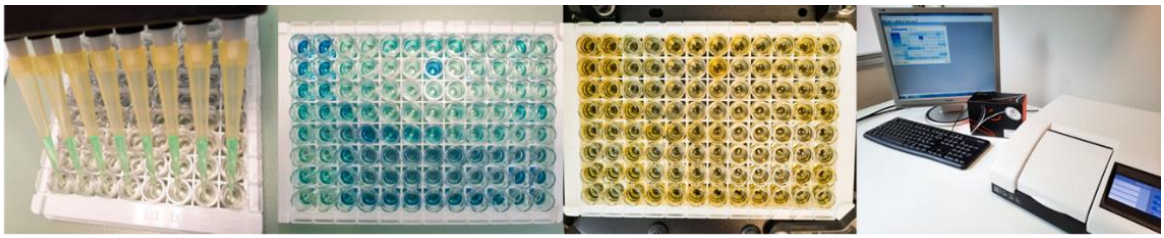


Figura 6. Test kappa- aggiunta della soluzione di individuazione della k Caseina B ai pozzetti (a); piastra ELISA dopo l'aggiunta del TMB (b); piastra ELISA dopo l'aggiunta della soluzione di stop (c); lettura della piastra a 450nm (d)

Le analisi sono state effettuate seguendo il protocollo fornito insieme ai kit di analisi e i risultati sono stati confrontati con i risultati derivanti dalle HPLC svolte nel WP3.T1.
In Tabella 9 sono riportare le statistiche descrittive del contenuto di k-CN B misurate con il test kappa raggruppate per varianti genetiche, come definite dall'analisi HPLC.

Tabella 9. Media e deviazione standard del contenuto di k-CN B da test kappa raggruppate per varianti genetiche

Variante genetica k-CN	Media (mg/ml)	DS
AA	0.00	0.00
AB	1.37	0.45
BB	5.74	1.94

Gli animali identificati dall'HPLC come aventi genotipo AA, hanno riportato nel test kappa una concentrazione pari a 0 di k-CN B, confermando la specificità del test.
È stata poi effettuata un'analisi della correlazione (Figura 7) fra i risultati ottenuti da HPLC e test kappa, che ha mostrato come il test ELISA sia un buon metodo per la quantificazione della variante beta della k-caseina, mostrando una correlazione dell'86%.

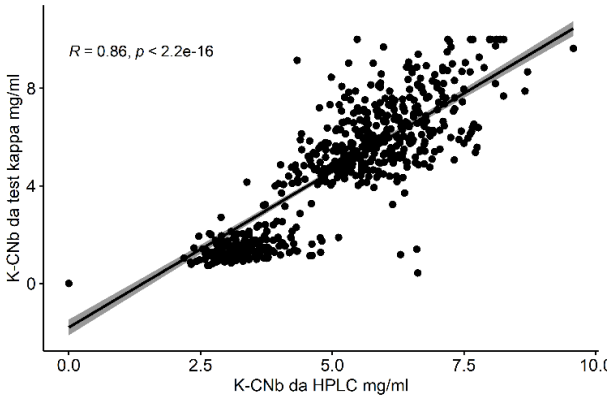


Figura 7. Correlazione fra risultati HPLC e test kappa

WP3.T3 la genomica delle proteine nel latte

Il WP3.T3 prevedeva lo studio del background genetico delle proteine nel latte. Per quanto riguarda l'ereditabilità, stimata attraverso un modello animale univariato nel software Asreml 4.1, è risultata alta per tutte le frazioni proteiche studiate. L'ereditabilità più bassa è risultata essere per le proteine totali con h^2 uguale a 0.33, mentre la più alta è risultata per la k-caseina, uguale a 0.54. Per quanto riguarda le correlazioni genetiche, sono state stimate attraverso un modello animale bivariato nel software Asreml 4.1. Le correlazioni genetiche ci danno un'indicazione di come uno o più geni possono influenzare più caratteri contemporaneamente, e in particolar modo se queste sono positive, indicano che un dato corredo genetico influenza positivamente due fenotipi (correlazione positiva); viceversa avremo una correlazione negativa se un dato corredo genetico influenza positivamente un carattere e negativamente l'altro. La maggior parte delle correlazioni genetiche sono risultate in linea con la letteratura. Interessante notare come la k-caseina sia positivamente correlata al recupero di proteina (+0.50) e quindi avremo che animali che hanno un latte più ricco di k-caseina sono geneticamente più predisposte ad un maggior recupero di proteina a livello di cagliata. Al contrario, avendo ottenuto una correlazione genetica negativa fra b-lattoglobulina e recupero di proteina (-0.75), avremo che vacche con un contenuto di b-lattoglobulina più alto sono geneticamente più predisposte ad un inferiore recupero di proteina.

Per quanto riguarda gli studi di associazione GWAS eseguiti attraverso il pacchetto in R StatGenGWAS, abbiamo ottenuto risultati particolarmente interessanti per la k-caseina e la β-lattoglobulina. Per quanto riguarda la k-caseina, come è possibile vedere graficamente nel Manhattan plot in Figura 8,12 marcatori sono risultati significativamente associati alla quantità di k-caseina presente nel latte (mg/l) situati su BTA6, uno sul BTA19 e uno sul BTA22.

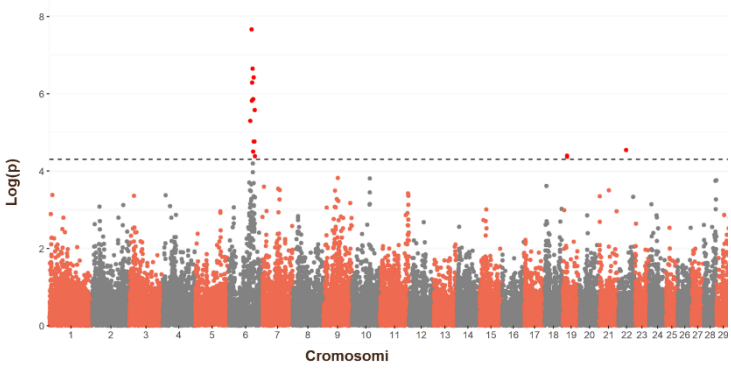


Figura 8. Manhattan plot per il carattere k-caseina

Per quanto riguarda la quantificazione dell'effetto l'effetto di un certo genotipo sull'altro per il marcatore più significativamente associato con la k-casiena, abbiamo ottenuto che animali omozigoti BB hanno un vantaggio sulla forma eterozigote AB che si quantifica in +30% di k-caseina nel latte (Figura 9). Questo risultato, da un punto di vista applicativo, potrebbe essere molto interessante in quanto l'aumento della k-caseina ha un effetto positivo sulla resa casearia giornaliera che abbiamo quantificato come +0.18 kg/d di formaggio prodotto.

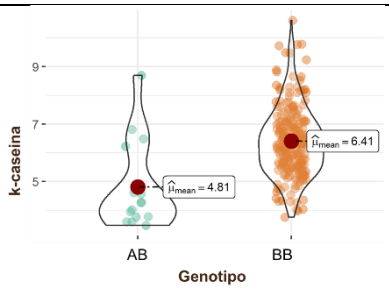


Figura 9. Effetto del genotipo per il marcatore maggiormente associato alla k-caseina

Per quanto riguarda la β-lattoglobulina, otto marcatori sono risultati significativamente associati i quali erano posizionati in soprattutto su BTA11 e uno su BTA12, come evidenziato nel Manhattan plot in Figura 10.

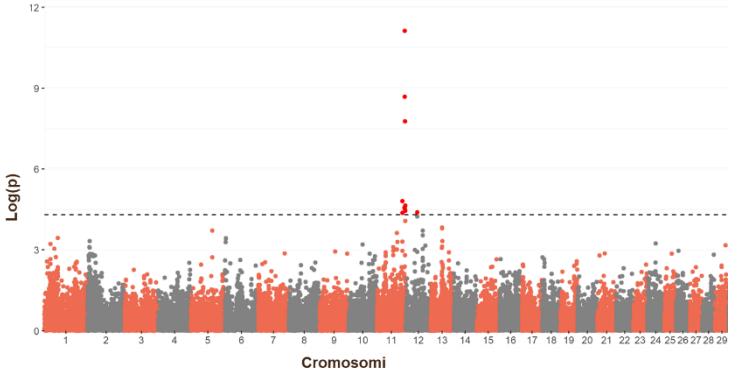


Figura 10. Manhattan plot per il carattere β-lattoglobulina

Per quanto riguarda la quantificazione dell'effetto di un certo genotipo sull'altro per il marcatore maggiormente associato alla β-lattoglobulina, abbiamo ottenuto che animali eterozigoti AB hanno in media una quantità di β-lattoglobulina superiore che si quantifica in +19% (Figura 11).

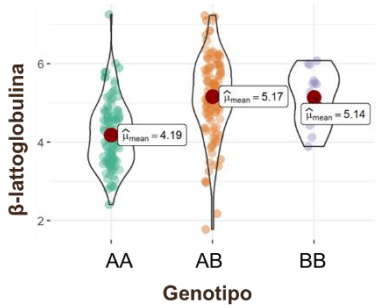


Figura 11. Effetto del genotipo per il marcatore maggiormente associato alla β-lattoglobulina

WP4. Dalla genomica ai minerali del latte

WP4.T1) campionamento e caratterizzazione dei minerali del latte

Come descritto nel WP2.T1, durante il campionamento presso gli allevamenti selezionati, è stata raccolta un'aliquota per l'analisi del contenuto di minerali del latte. Le analisi previste dal WP4.T1 sono state effettuate con la metodica della spettroscopia a fluorescenza a raggi X, utilizzando uno strumento XRF (Bruker, S6 Jaguar WDXRF). Questa tecnologia innovativa è già applicata nella filiera lattiero casearia per l'analisi dei minerali nei mangimi e nei foraggi e si basa sul fenomeno fisico chiamato effetto fotoelettrico, che si verifica quando una radiazione energetica colpisce la materia. Ogni atomo è composto di elettroni che, se irradiati, assorbono energia, passano a uno stato di eccitazione e riemettono energia sottoforma di radiazione fluorescente. Questo tipo di radiazione è unica per ciascun elemento e può quindi essere utilizzata per distinguere gli elementi minerali che compongono una determinata sostanza. Con questa tecnica è stato possibile identificare e quantificare 7 diversi minerali presenti nel latte: calcio (Ca), fosforo (P), potassio (K), magnesio (Mg), sodio (Na), cloro (Cl) e zolfo (S). Per l'analisi di ciascun campione, 3mL di latte sono stati aliquotati in delle apposite coppette e inserite nello strumento XRF, il quale può analizzare fino a 20 campioni alla volta.

Qui di seguito alcuni dei risultati ottenuti all'interno del WP4.T3 utilizzando i modelli statistici descritti nel WP2.T4.

In Tabella 10 sono riportate le statistiche descrittive per i minerali determinati: K, Ca, P, Cl, S, Na, e Mg.

Tabella 10. statistiche descrittive[1] del contenuto di minerali nel latte.

Carattere	Media (mg/L)	DS	Min	Max	CV%
K	1436	96.5	1148	1712	7
Ca	1378	128.7	1057	1783	9
P	1251	115.6	913	1603	9
Cl	984	129.3	663	1382	13
S	401	39.5	288	514	10
Na	400	95.9	152	682	24
Mg	117	19.5	65	177	17

[1] DS= deviazione standard; CV= coefficiente di variazione

I risultati sono in linea con quanto riportato in bibliografia (Stocco et al., 2019) e analizzato con i metodi di riferimento, confermando la validità dell'analisi XRF anche sulla matrice latte. Il minerale più abbondante risulta essere il potassio (1436 mg/L), seguito da calcio (1378 mg/L) e fosforo (1251 mg/L).
In Tabella 11 sono riportati i risultati dell'analisi della varianza con i valori di F e le significatività.

Tabella 11. Risultati dell'analisi della varianza (valori di F e significatività) per il contenuto di minerali nel latte.

		Effetti fissi (valori di F)				Effetti casuali (%)
	N	Stadio di lattazione	Ordine di Parto	Area di produzione	Stagione	Allevamento
K	1043	47.44***	37.38***	1.1	8.92***	10
Ca	1047	11.67***	2.13	1.49	3.88*	11
P	1040	9.00***	16.57***	0.47	5.93**	8
Cl	1012	11.16***	91.05***	1.89	4.51**	10
S	1051	87.56***	1.19	1.04	10.69***	12
Na	1041	33.09***	42.33***	0.56	2.48	23
Mg	1035	39.07***	4.83**	0.53	12.14***	48

*** p<0.001; ** p<0.01; * p<0.05

Gli effetti legati all'animale, stadio di lattazione e ordine di parto, sono quelli maggiormente significativi nel determinare la variabilità del contenuto dei minerali del latte. Se da un lato lo stadio di lattazione influisce su tutti i minerali presenti, l'ordine di parto, invece, non è risultato significativo su Ca e S.
Per quanto riguarda gli effetti legati all'ambiente, l'area di produzione non è risultata significativa su nessuno dei minerali analizzati, mentre la stagione influisce mediamente su tutti, ad eccezione dello zolfo.
È interessante notare come, l'effetto random dell'allevamento, sia molto importante per alcuni dei minerali analizzati, come ad esempio il magnesio, per cui quasi il 50% della variabilità di questo carattere è spiegata dal singolo allevamento.

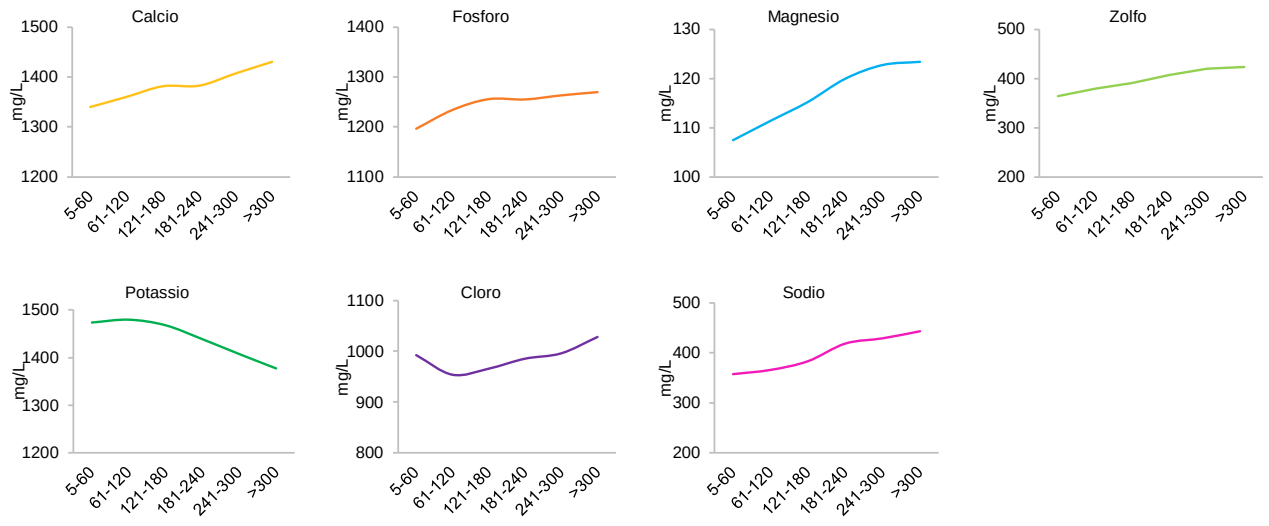


Figura 12. Variabilità del Ca, P, Mg, K, Cl Na, S nel latte per l'effetto stadio di lattazione.

Come mostrato in Figura 12, lungo il corso della lattazione quasi tutti i minerali aumentano in modo lineare manifestando un andamento opposto rispetto alla curva di produzione del latte. Questo risultato è dovuto principalmente ad un effetto di diluizione. Al diminuire della produzione di latte totale, si ha una concentrazione dei minerali al suo interno. Inoltre, Ca, P e Mg sono in associazione con la caseina che aumenta con il progredire della lattazione. Cloro e sodio aumentano anche in risposta al fisiologico aumento di cellule somatiche che si verifica con il progredire della lattazione, di conseguenza il potassio, in quanto responsabile del mantenimento della pressione osmotica del latte insieme a lattosio, sodio e cloro, diminuisce.

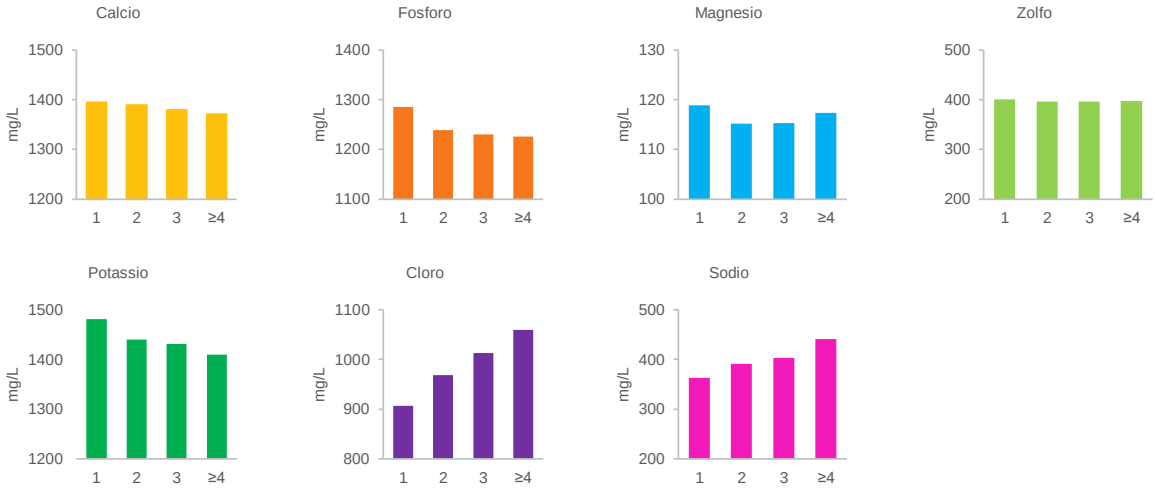


Figura 13. Variabilità del Ca, P, Mg, K, Cl Na, S nel latte per l'effetto ordine di parto.

L'ordine di parto è il secondo fattore ad influire in modo significativo sulla variabilità dei minerali del latte (Figura 13).
Il fosforo risulta essere il minerale maggiormente influenzato, con una riduzione di quasi il 5% passando dalle bovine primipare a quelle di 4 o più parti. L'ordine di parto non è risultato significativo sul calcio, sebbene questo mostri una tendenza a ridursi con l'avanzare dell'età delle bovine. Il magnesio risulta più alto nelle bovine primipare, confermando che animali più giovani producono un latte maggiormente ricco in sali minerali. Il cloro e il sodio hanno un andamento opposto: infatti, all'aumentare dell'ordine di parto aumentano le concentrazioni di questi minerali. Questo è dovuto all'aumento delle cellule somatiche con l'avanzare dell'età delle bovine. Contestualmente, al fine di ristabilire la giusta pressione osmotica del latte, il potassio decresce.
Fra gli effetti ambientali, la stagione è risultata l'unica statisticamente significativa nel definire la variabilità dei minerali presenti nel latte.
Come mostrato in Figura 14, nella stagione autunnale è possibile notare un rialzo di calcio, fosforo magnesio, zolfo e sodio, che potrebbe essere spiegato da un abbassamento delle temperature che riporta gli animali in uno stato di maggiore comfort termico. Di conseguenza le bovine sono in grado di produrre un latte più ricco da un punto di vista minerale.
L'altro risultato interessante è l'incremento del 5% del cloro in estate rispetto le stagioni più fredde. Questo risultato è correlato allo stress da caldo e al rialzo di cellule somatiche del latte caratteristico della stagione estiva.

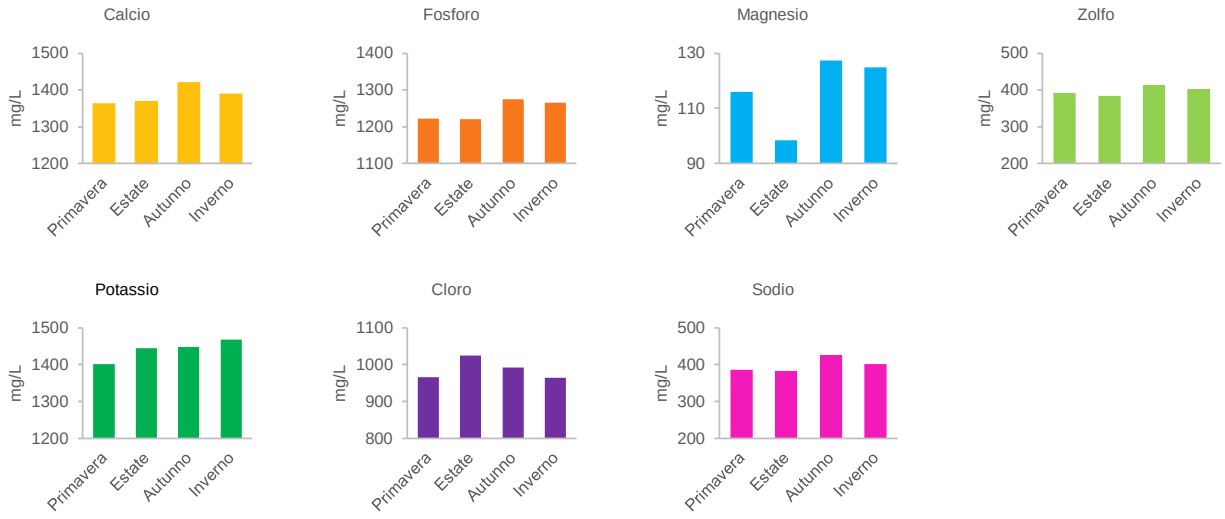


Figura 14. scarto quadratico medio di Ca, P, Mg, K, Cl Na, S per l'effetto stagione

WP4.T2 la genomica dei minerali del latte

Il WP4.T2 prevedeva lo studio del background genetico dei minerali nel latte. Per quanto riguarda l'ereditabilità, stimata attraverso un modello animale univariato nel software Asreml 4.1, essa è risultata medio-alta per tutti i minerali valutati in questo studio. Il minerale con la più bassa ereditabilità è risultato essere il potassio con h^2 uguale a 0.17, mentre il minerale con la più alta ereditabilità è risultato essere il sodio con h^2 di 0.41. La maggior parte delle correlazioni genetiche sono risultate in linea con la letteratura. Interessante notare come calcio e fosforo siano risultati positivamente correlati al recupero di proteina e quindi, da un punto di vista della selezione, possiamo dire che animali che hanno un latte più ricco di fosforo e calcio sono quelli che geneticamente potrebbero essere più predisposti ad un maggior recupero di proteina a livello di cagliata.

Per quanto riguarda gli studi di associazione GWAS eseguiti attraverso il pacchetto in R StatGenGWAS, abbiamo ottenuto risultati particolarmente interessanti per i minerali Calcio e Fosforo. Per quanto riguarda il Calcio, come è possibile vedere graficamente nel Manhattan plot in Figura 15, 3 marcatori sono risultati significativamente associati alla quantità di calcio presente nel latte (mg/l) uno situato su BTA5 e due su BTA19.

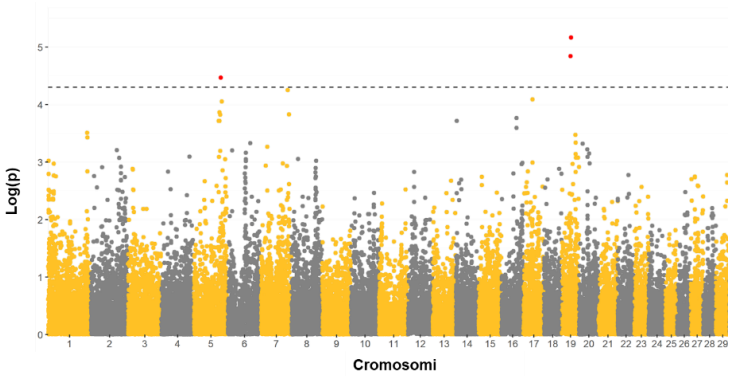


Figura 15. Manhattan plot per il carattere Calcio

Per quanto riguarda la quantificazione dell'effetto di un certo genotipo sull'altro per il marcatore maggiormente associato al calcio, abbiamo ottenuto che animali omozigoti BB hanno un vantaggio sulla forma omozigote AA che si quantifica in 4.7% in più di calcio nel latte (Figura 16). Questo risultato, da un punto di vista applicativo, potrebbe essere molto interessante in quanto l'aumento del calcio ha un effetto positivo sulla resa casearia.

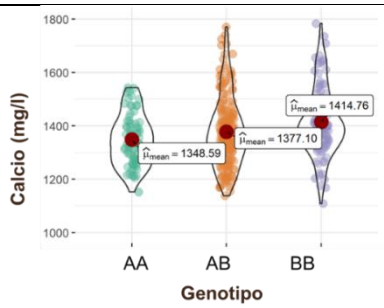


Figura 16. Effetto del genotipo per il marcatore maggiormente associato al calcio

Anche per quanto riguarda il fosforo, tre marcatori sono risultati significativamente associati i quali erano posizionati in cromosomi differenti (BTA1 e BTA10), come evidenziato nel Manhattan plot in Figura 17.

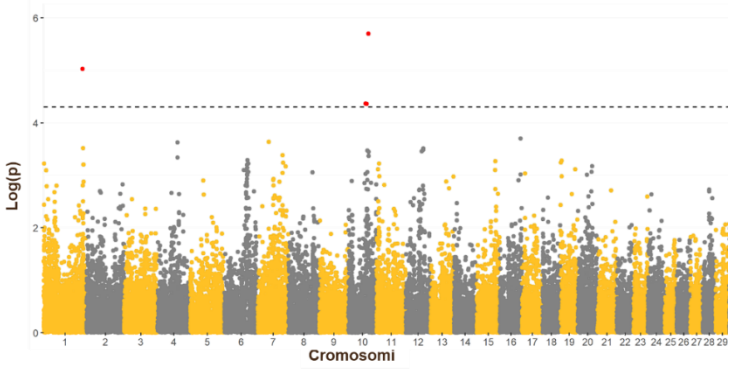


Figura 17. Manhattan plot per il carattere Fosforo

Nel caso del fosforo, la quantificazione dell'effetto del genotipo per il marcatore maggiormente associato (Figura 18), ha dimostrato che animali omozigoti AA producono un latte con una quantità di fosforo superiore rispetto ad animali BB per questo marcatore. In questo caso però è più difficile quantificare l'effetto sulla caseificazione in quanto non abbiamo un andamento lineare come nel caso del calcio ma piuttosto un optimum – ovvero un livello soglia oltre il quale il fosforo non incida più positivamente sulla caseificazione.

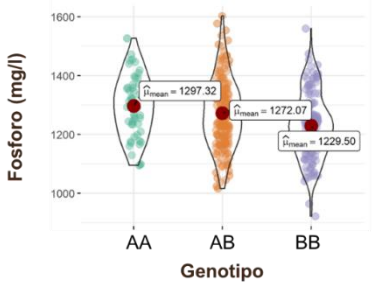
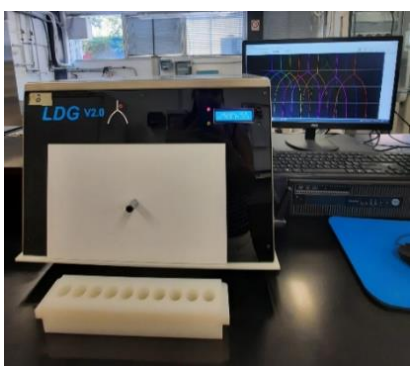


Figura 18. Effetto del genotipo per il marcatore maggiormente associato al fosforo

WP5. Miglioramento della composizione proteica per la caseificazione

WP5.T1) coagulazione e caseificazione

Il finanziamento del progetto GenetoCheese ha permesso l'allestimento ex novo di un laboratorio di qualità del latte e caseificazione presso il dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie dell'Università degli Studi di Parma. Per la valutazione dell'attitudine del latte alla coagulazione (durata 60 min) prevista dal WP5.T1 è stato acquistato un lattodinamografo meccanico (Lattodinamografo; Ma.Pe.System, Firenze, Italia). Questo strumento permette la registrazione di 3 caratteri tradizionali, quali i) tempo di coagulazione (RCT): rappresenta il tempo (minuti) che intercorre dall'aggiunta del caglio alla formazione del primo flocculo (gelificazione); ii) tempo di rassodamento (k_{20}): è dato dal tempo (minuti) trascorso dall'inizio della gelificazione al raggiungimento di un coagulo ad una consistenza standard, con un'ampiezza della forbice del tracciato lattodinamografico di 20 mm; iii) consistenza del coagulo (a_{30}): è la larghezza (mm) della forbice del tracciato dopo 30 minuti dall'inizio della coagulazione che esprime la consistenza della cagliata ad un tempo standard. La possibilità di estendere l'analisi a 60 minuti ha permesso la registrazione della consistenza puntuale del coagulo anche a 45 e a 60 minuti (Figura 19).



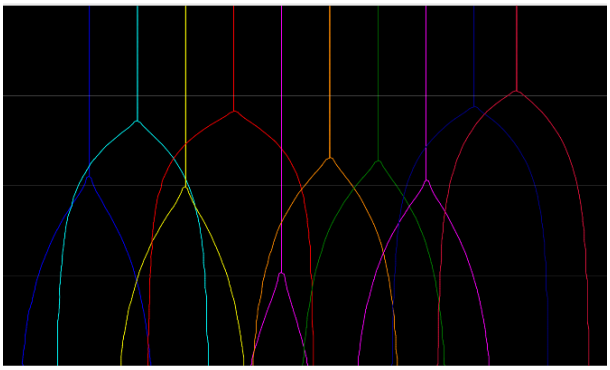


Figura 19. Lo strumento Lattodinamografo (a sinistra) e il tracciato della coagulazione dei campioni di latte.

Il Lattodinamografo registra la consistenza del coagulo ogni 7.5 secondi durante l'analisi. In questo modo, durante l'analisi a 60 minuti, per ciascun campione di latte sono stati raccolti 480 valori di consistenza. Tramite il seguente modello matematico bi-esponenziale

$$CF_t = CF_P \times (1-e^{-k_{CF} \times (t-RCT)})$$

che utilizza la misura di consistenza del coagulo ogni 7.5 secondi durante l'analisi (CF_t), sono stati stimati 6 caratteri. Questi sono: CF_P = il valore potenziale asintotico della consistenza del coagulo a tempo infinito (mm); k_{CF} = il tasso costante di consistenza del coagulo (%/min); RCT_{eq} = tempo di coagulazione stimato dal modello; CF_{max}= consistenza massima del coagulo (mm); t_{max} = intervallo di tempo (min) per il raggiungimento del a_{max} (Cipolat-Gotet et al., 2018).
Il parametro CF_P è indipendente dalla durata dell'analisi e dall'RCT (diversamente dall'a_{30}). Si assume che il parametro k_{CF} provochi un aumento del CF_t verso il CF_P. Durante le fasi iniziali di un'analisi lattodinamografica il CF_t aumenta fino ad un t_{max}, ovvero il momento in cui si ottiene la consistenza massima del coagulo dall'inizio dell'analisi. Il parametro CF_t raggiunge il valore massimo a CF_{max}. Successivamente, CF_t inizia a decrescere, tendendo verso un valore nullo, a causa dell'effetto della sineresi del coagulo che comporta l'espulsione del siero.
I dati raccolti nel WP5.T1 sono poi stati analizzati usando il modello statistico descritto nel WP2.T4, modificato includendo come effetti casuali anche l'animale, in quanto la misurazione è stata fatta in doppio, e il pendolo (unità di analisi del lattodinamografo).
Di seguito (Tabella 12) sono riportate le statistiche descrittive relative alle proprietà di coagulazione tradizionali e modellizzate delle 1080 bovine campionate. Le analisi sono state effettuate in doppio.

Tabella 12. Statistiche descrittive delle proprietà di coagulazione tradizionali e parametri modellizzati.

Carattere	N	Media	DS	Min	Max	CV, %
Proprietà di coagulazione tradizionali						
RCT, min	2060	21.13	5.81	5.30	40.08	28
k_{20}, min	2024	5.10	2.18	1.25	13.75	43
a_{30}, mm	1874	31.35	13.14	0.18	60.01	42
a_{45}, mm	2036	43.34	9.75	9.96	62.88	23
a_{60}, mm	2070	46.58	7.99	18.62	64.68	17
Parametri modellizzati						
RCT_{eq}, min	2058	21.28	5.93	9.26	40.46	28
k_{CF}, %/min	2056	10.47	3.35	0.51	19.91	32
CF_P, mm	2090	49.84	7.50	1.07	118.61	15
CF_{max}, mm	2058	49.79	7.40	22.38	65.58	15
t_{max}, min	2044	57.45	3.46	43.00	60.13	6

In tabella 13 sono riportati i risultati dell'analisi della varianza con i valori di F e le significatività.

Tabella 13. Analisi della varianza (valori di F e significatività) di coagulazione tradizionali e i parametri modellizzati.

		Effetti fissi (valori di F e significatività)				Effetti casuali (%)		
	N	Stadio di lattazione	Ordine di Parto	Area di produzione	Stagione	Allevamento	Animale	Pendolo
Proprietà di coagulazione tradizionali								
RCT, min	2060	12.38***	2.01	0.82	0.88	13	73	0
k_{20}, min	2024	3.93**	1.16	1.45	3.35*	6	81	2
a_{30}, mm	1874	4.09**	0.49	2.15	1.01	6	77	1
a_{45}, mm	2036	3.38**	0.48	1.8	2.64	8	72	2
a_{60}, mm	2070	2.67*	0.56	1.7	4.52**	8	57	4
Parametri modellizzati								
RCT_{eq}, min	2058	13.41***	2.32	0.98	0.8	13	75	0
k_{CF}, %/min	2056	5.45***	6.48***	0.86	3.23*	7	76	2
CF_P, mm	2090	4.42***	4.52**	1.72	2.13	8	34	4
CF_{max}, mm	2058	2.94**	1.35	1.01	6.31**	8	70	9
t_{max}, min	2044	1.43	0.76	1.09	1.92	4	15	3

*** p<0.001; ** p<0.01; * p<0.05

L'analisi statistica ha mostrato che l'effetto maggiormente significativo sulle proprietà di coagulazione classiche, ma anche sui parametri modellizzati, risulta essere lo stadio di lattazione. Ad eccezione dei caratteri CF_P e t_{max}, l'effetto casuale predominante risulta essere quello dell'animale, che spiega dal 50% all' 80% della variabilità osservata. Il CF_P e il t_{max} risultano essere i due caratteri la cui variabilità risulta meno influenzata dall'effetto dell'animale.
La Figura 20 mostra chiaramente che lo stadio di lattazione è molto importante per la determinazione del tempo di coagulazione e che il latte prodotto all'inizio della lattazione mostra un RCT inferiore rispetto al latte prodotto successivamente.

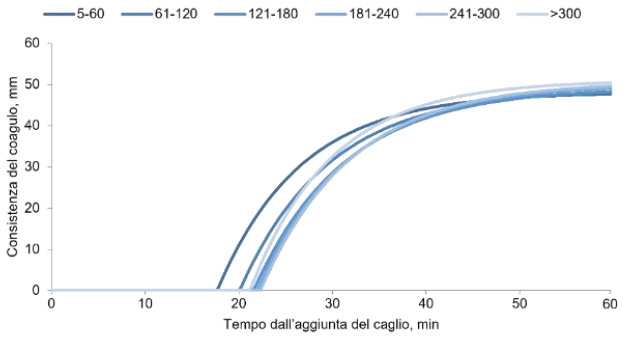


Figura 20. Andamento della coagulazione lungo la lattazione (classi da 60 giorni).

Per la caseificazione da 1,500 mL di latte prevista dal WP5.T1 è stata allestita una postazione di micro-caseificazione. L'attrezzatura necessaria per la micro-caseificazione comprende principalmente 4 bagnomaria ognuno dei quali provvisto di un termostato a immersione avente un display digitale per la regolazione della temperatura. Ciascun bagnomaria può ospitare 5 contenitori in acciaio inox (pozzetti) con capacità di 2,000 mL di latte (Figura 21). Ciascuna aliquota di latte (1,500 mL) è stata sottoposta ad un processo di caseificazione che simula tutte le fasi che avvengono normalmente in caseificio (Cipolat-Gotet et al., 2013). Di seguito viene riportata la metodica:

- Riempimento dei pozzetti con 1500 mL di latte;
- Peso del latte prima dell'inserimento nel bagnomaria;
- Posizionamento dei pozzetti nel bagnomaria, impostato ad una temperatura di 35°C;
- Misurazione di pH e temperatura dopo 15 min dall'inizio del riscaldamento;
- Dopo 20 min. di riscaldamento, aggiunta della cultura starter (ad una concentrazione di 50 Direct Culture Unit);
- Dopo 50 min. di riscaldamento, aggiunta della soluzione enzimatica (ad una concentrazione di 51 IMCU/L);
- Rilevamento manuale del RCT tramite cucchiaio da laboratorio e spostamento dei pozzetti in un secondo bagnomaria preriscaldato a 55°C per la cottura della cagliata;
- Taglio a scacchiera del coagulo 10 min. dopo il rilevamento del RCT;

- Scarico della cagliata all'interno di una formella posizionata all'interno di una vaschetta di acciaio inox, per raccogliere il siero di sgrondo, 10 min. dopo il taglio a scacchiera;
- Rivoltamento periodico della cagliata (2 min.) per 15 min. con misurazione del pH e della T° alla fine di questa fase;
- Taglio a croce della cagliata (a 20 min. dall'inizio della fase di riposo) e spostamento della stessa in una formella più piccola
- Sosta sotto siero per 10 min;
- Pesata di siero e cagliata dopo 30 min. dallo scarico;
- Prelievo del siero a 30 min. e analisi della composizione chimica, della temperatura e del pH;
- Pressatura dei formaggi per 30 min. con rivoltamento delle formelle ogni 10 min. con pesata a fine fase (peso post-pressatura);
- Immersione dei formaggi nella salamoia per 30 min. (soluzione satura, 20% NaCl) con pesata a fine fase (peso post-salamoia).
- Stagionatura di 2 mesi (15 °C; 85% UR). Durante la stagionatura tutti i formaggi sono stati pesati a 24h, 7d, 14d, 21d, 42d e 60d.

Per la fase di pressatura è stata acquistata una pressa pneumatica da laboratorio specifica per formaggi. Per la maturazione dei formaggi sperimentali prodotti è stato acquistato uno stagionatore (capacità 100 kg) in grado di contenere fino a 500 formaggi da circa 200 grammi ciascuno.

(a) (b) (c)

Figura 21. Bagnomaria con termostati (a) e pozzetti con i campioni di latte (b), e taglio della cagliata a scacchiera (c).

Grazie alla determinazione del peso dell'input (il latte) e degli output (cagliata e siero) del processo di caseificazione assieme all'analisi dei componenti di latte e siero, è stato possibile definire 3 caratteri di resa casearia: classica (CY_{CURD}), in sostanza secca (CY_{SOLIDS}) e in acqua (CY_{WATER}), ossia la ritenzione idrica della cagliata; e 4 caratteri che descrivono il recupero dei nutrienti del latte nella cagliata: grasso (REC_{FAT}), proteina ($REC_{PROTEIN}$), sostanza secca (REC_{SOLIDS}) ed energia (REC_{ENERGY}). Inoltre, avendo a disposizione la produzione giornaliera di latte è stato possibile stimare le rese giornaliere come resa totale (dCY_{CURD}), in sostanza secca (dCY_{SOLIDS}) e in acqua (dCY_{WATER}). I dati raccolti sono poi stati analizzati usando il modello statistico descritto nel WP2.T4. In tabella 14 sono riassunte le statistiche descrittive relative ai caratteri di resa casearia e di recupero di nutrienti nella cagliata.

Tabella 14. Statistiche descrittive relative ai caratteri di resa casearia e recupero di nutrienti dal latte alla cagliata.

	N	Media	Minimo	Massimo	CV
Rese, %					
CY_{CURD}		15.5	10.0	20.6	11
CY_{SOLIDS}		6.9	4.4	9.8	13
CY_{WATER}		8.6	5.5	11.6	12
Recupero dei nutrienti, %					
REC_{FAT}		85.1	68.0	93.7	6
$REC_{PROTEIN}$		77.9	71.4	84.2	3
REC_{SOLIDS}		52.6	41.2	63.7	7
REC_{ENERGY}		67.6	56.2	77.8	5
Recupero dei nutrienti, %					
dCY_{CURD}		3.9	0.5	7.5	30
dCY_{SOLIDS}		2.1	0.3	4.1	32
dCY_{WATER}		1.7	0.2	3.2	30

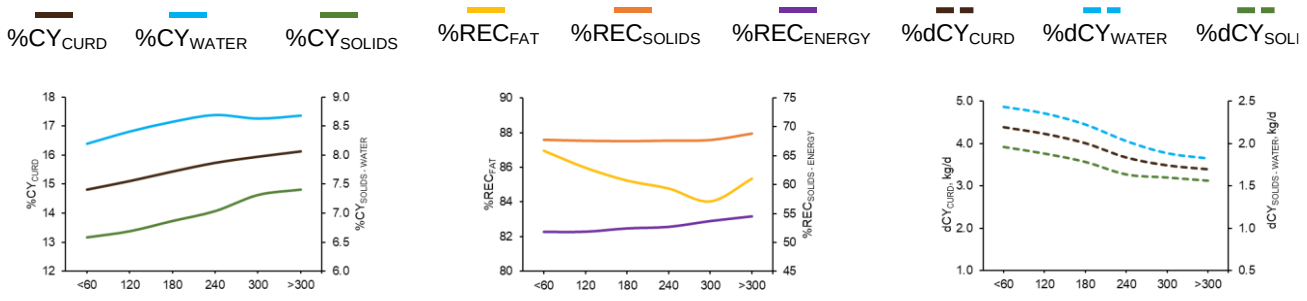
I risultati dell'analisi statistica sono mostrati in tabella 15. Anche per i caratteri di resa casearia e recupero dei nutrienti, i fattori legati all'animale risultano essere i più importanti. Lo stadio di lattazione ha un'elevata significatività statistica su tutti i caratteri analizzati, ad eccezione del recupero di proteina, mentre l'ordine di parto influisce si tutti i caratteri analizzati. Per quanto concerne gli effetti ambientali, invece, la stagione è determinante per la variabilità dei caratteri di resa classica, mentre non influisce sui caratteri di resa giornaliera, per cui l'effetto casuale dell'allevamento spiega circa il 40% della variabilità fenotipica osservata. Essendo questi ultimi caratteri legati alla produzione giornaliera, questo risultato era atteso. Anche per i caratteri di caseificazione, l'area di produzione non è risultata significativa (Tabella 15).

Tabella 15. Risultati dell'analisi della varianza (valori di F e significatività) per i caratteri di caseificazione.

		Fattori fissi (Valore di F e significatività)				Fattori casuali (%)
	N	Stadio di lattazione	Ordine di parto	Stagione	Area di produzione	Allevamento
Rese						
$\%CY_{CURD}$		44.0***	8.2***	17.4***	1.1	24
$\%CY_{SOLIDS}$		55.5***	5.4**	8.4***	1.3	17
$\%CY_{WATER}$		17.8***	11.2***	20.5***	1.4	51
Recuperi						
$\%REC_{FAT}$		15.4***	9.7***	1.8	0.8	7
$\%REC_{PROTEIN}$		0.9	29.4***	0.8	1.9	12
$\%REC_{SOLIDS}$		39.7***	4.1**	8.4***	1.2	17
$\%REC_{ENERGY}$		10.6***	6.0***	10.2***	1.1	11
Rese giornaliere, kg/d						
dCY_{CURD}		73.6***	34.2***	1.7	0.8	40
dCY_{SOLIDS}		53.1***	34.3***	1.2	0.9	36
dCY_{WATER}		85.8***	29.3***	2.1	0.8	40

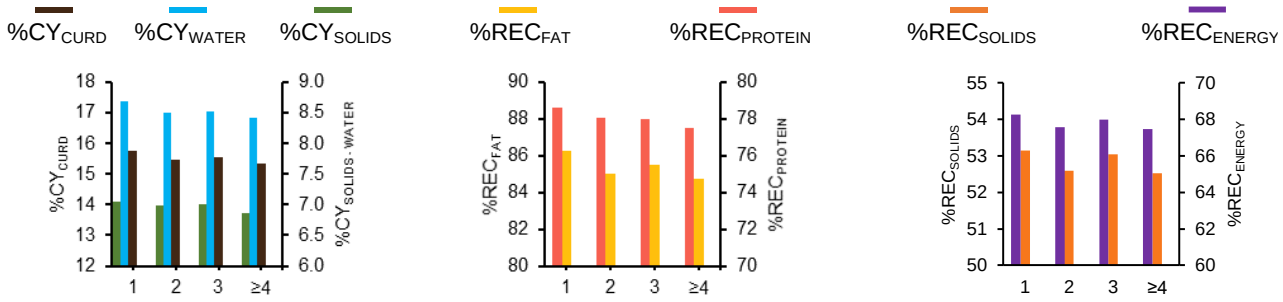
*** p<0.001; ** p<0.01; * p<0.05

In Figura 22 sono riportate le medie corrette dei caratteri di caseificazione lungo il corso della lattazione. I caratteri di resa classica $\%CY_{CURD}$, $\%CY_{SOLIDS}$ e $\%CY_{WATER}$ aumentano in modo lineare con il progredire della lattazione, così come i recuperi di solidi totali ed energia. Il REC_{FAT} subisce un brusco calo dovuto a una maggiore concentrazione del grasso nel latte che, per questo motivo, non riesce ad essere trattenuto nella cagliata dal reticolo caseinico. Come atteso, i caratteri di resa giornaliera, essendo legati alla produzione di latte, calano con il progredire della lattazione.



(a) (b) (c)

Figura 22. Variabilità dei caratteri di resa (a), recupero(b) e resa giornaliera (c) per l'effetto stadio di lattazione.



(a) (b) (c)

Figura 23. Scarto quadratico medio dei caratteri di resa (a), recupero di grasso e proteina(b) e recupero di solidi totali e energia (c) per l'effetto stadio di lattazione

Per quanto riguarda l'effetto ordine di parto è possibile notare dalla Figura 23 come le bovine primipare siano animali più efficienti sia per quanto riguarda i caratteri di resa, che per i caratteri di recupero dei nutrienti e di energia nella cagliata.
È bene ricordare che la stessa composizione del latte è fondamentale nello spiegare la variabilità dei caratteri di caseificazione. Per questo motivo nel WP5.T4 il modello è stato arricchito inserendo come effetti fissi anche la caseina, il calcio e il fosforo. In Tabella 16, sono riportati i risultati relativi all'analisi della varianza.
La caseina risulta di fondamentale importanza nel determinare la variabilità di tutti i fenotipi analizzati, ad eccezione del recupero di grasso. Il Calcio, in quanto responsabile della stabilità del reticolo caseinico in fase di coagulazione, è un fattore di grande rilievo per tutti i caratteri studiati. I risultati ottenuti mostrano che all'aumentare delle concentrazioni di calcio di 0.2 mg/L la resa totale aumenta dell'1%.

Tabella 16. Risultati dell'analisi della varianza (valori di F e significatività) per i caratteri di caseificazione

	Fattori fissi, Valore di F e significatività							Fattori casuali (%)
	N	Stadio di lattazione	Ordine di parto	Stagione	Area di Produzione	**Caseina**	**Calcio**	**Fosforo**	Allevamento
Rese									
%CY CURD		44.0***	8.2***	17.4***	1.1	**176.9*** **	**35.2*** **	**0.9**	24
%CY SOLIDS		55.5***	5.4**	8.4***	1.3	**134.9*** **	**72.7*** **	**2.4***	17
%CY WATER		17.8***	11.2***	20.5***	1.4	**101.9*** **	**3.6****	**4.8*** **	51
Recuperi									
%REC FAT		15.4***	9.7***	1.8	0.8	**0.7**	**36.3*** **	**2.4**	7
%REC PROTEIN		0.9	29.4***	0.8	1.9	**9.6*** **	**28.3*** **	**3.1***	12
%REC SOLIDS		39.7***	4.1**	8.4***	1.2	**65.3*** **	**92.6*** **	**3.8****	17
%REC ENERGY		10.6***	6.0***	10.2***	1.1	**22.7*** **	**46.1*** **	**4.1****	11

*** p<0.001; ** p<0.01; * p<0.05

WP5.T2 spettroscopia e uso di caratteri indiretti

Nel WP5.T2 sono stati utilizzati gli spettri FT-IR relativi ai campioni di latte stoccati durante il WP3.T1. Questi spettri sono stati raccolti per la predizione di tutti i caratteri relativi le caratteristiche qualitative del latte (proteine, minerali e altri

componenti del latte, acidità, proprietà di coagulazione) e del formaggio (resa casearia, recupero dei nutrienti nella cagliata, calo in peso del formaggio, aspetti qualitativi a fine stagionatura) misurati rispettivamente nel WP3, WP4 e WP5. Le predizioni ad oggi sviluppate sono in linea con la letteratura e quindi utilizzabili per futuri studi a livello di popolazione bovina.

WP5.T3 la genomica per una migliore caseificazione

Il WP5.T3 prevedeva lo studio del background genetico di caratteri qualitativi del formaggio.
Per quanto riguarda l'ereditabilità, stimata attraverso un modello animale univariato nel software Asreml 4.1, è risultata medio-alta per tutti i parametri di caseificazione analizzati in questo studio. Il carattere di caseificazione con la più bassa ereditabilità è risultato essere il recupero di cloro nella cagliata con h^2 uguale a 0.15, mentre quello con ereditabilità più alta è risultato essere il recupero di sodio con h^2 di 0.66. Per quanto riguarda le correlazioni genetiche, stimate attraverso un modello animale bivariato nel software Asreml 4.1, la maggior parte delle correlazioni genetiche sono risultate in linea con la letteratura, interessante notare come recupero della proteina e resa siano risultate positivamente correlate. Per quanto riguarda gli studi di associazione GWAS eseguiti attraverso il pacchetto in R StatGenGWAS, abbiamo ottenuto risultati particolarmente interessanti per i caratteri recupero di proteina e resa giornaliera espressa in kg/d. Per il recupero della proteina, è possibile vedere graficamente nel Manhattan plot in Figura 24, che 13 marcatori sono risultati significativamente associati (uno situato su BTA6 e due su BTA9 e 10 sul BTA11). Interessante notare che la stessa regione genomica situata su BTA11 è risultata significativamente associata per la beta-lattoglobulina, ad evidenziare che probabilmente uno o più geni influenzano in modo differente la beta-lattoglobulina e il recupero di proteina (correlazione genetica negativa -0.75).

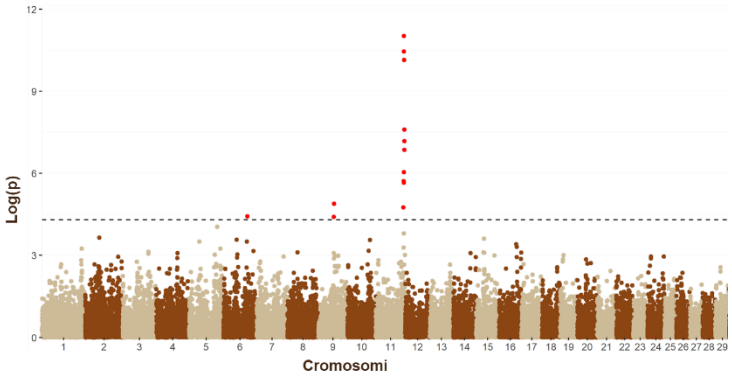


Figura 24. Manhattan plot per il carattere Recupero di Proteina

Nel caso del recupero di proteina, la quantificazione dell'effetto del genotipo per il marcatore maggiormente associato (Figura 25), ha dimostrato che animali omozigoti BB avranno un recupero di proteina superiore (che si quantifica in 3.0% in più) rispetto ad animali AA per questo marcatore situato su BTA11.

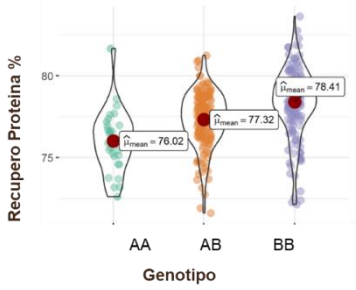


Figura 25. Effetto del genotipo per il marcatore maggiormente associato al recupero di proteina

Per quanto riguarda la Resa Giornaliera, come è possibile vedere graficamente nel Manhattan plot in Figura 26, 2 marcatori sono risultati significativamente associati, uno situato su BTA3 e uno su BTA21, a rimarcare ancora una volta la poligenica azione esistente per questi caratteri.

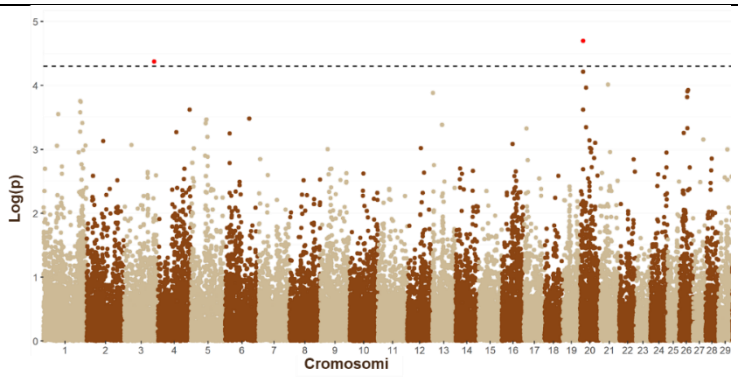


Figura 26. Manhattan plot per il carattere Resa Giornaliera

Nel caso della Resa Giornaliera, la quantificazione dell'effetto del genotipo per il marcatore maggiormente associato (Figura 27), ha dimostrato che animali omozigoti AA avranno una Resa Giornaliera superiore (che si quantifica in +0.64 kg/d in più) rispetto ad animali BB per questo marcatore situato su BTA21.

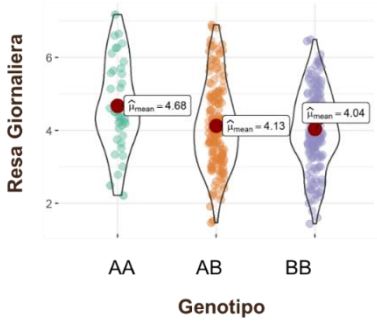


Figura 27. Effetto del genotipo per il marcatore maggiormente associato alla Resa Giornaliera

WP6. Piano di sfruttamento dei risultati, ricadute e divulgazione dei risultati

WP6.T1 - Informazione e divulgazione

Il WP6 aveva l'obiettivo di informare e promuovere la divulgazione del progetto GenetoCheese. In primo luogo, all'interno del WP6.T1, è stato sviluppato il logo del progetto che è possibile visualizzare in Figura 28.

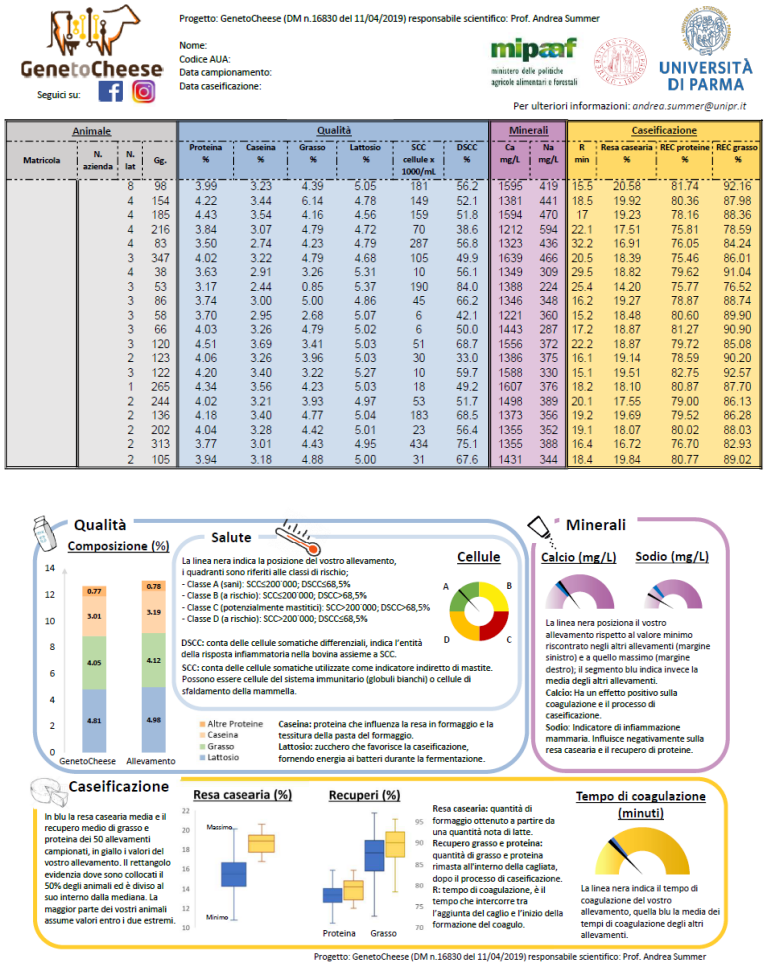
GenetoCheese

Figura 28. Logo del Progetto GenetoCheese.

Nell'ambito del WP6.T1, è stata poi realizzata una pagina WEB all'interno del sito di ateneo: https://smv.unipr.it/it/node/3214 così come due pagine social: @GenetoCheese su Facebook, 284 mi piace, 40 post, 79 fotografie e GenetoCheese su Instagram, 229 followers, 49 post. Inoltre, è stata realizzata una locandina contenete materiale divulgativo (disponibile pubblicamente al seguente link: https://smv.unipr.it/sites/st29/files/allegatiparagrafo/09-05-2020/brochure_GenetoCheese_copy2.pdf). Ogni allevatore ha ricevuto i seguenti gadget volti ad una ulteriore divulgazione del progetto:

- Cappellino e maglietta con Logo GenetoCheese
- Tazza con Logo GenetoCheese
- Penna con Logo GenetoCheese e penna con Logo Università degli Studi di Parma
- Libro Università di Parma - Un millennio di storia
- Borsina con Logo GenetoCheese

Grazie alla disponibilità degli allevatori, per l'80% degli allevamenti campionati è stato possibile condividere l'esperienza del campionamento con studenti iscritti ai corsi di laurea in Scienze Medico Veterinarie, i quali hanno potuto svolgere delle vere e proprie lezioni in campo. Inoltre, per ogni allevatore coinvolto nell'ambito del campionamento è stato prodotto e consegnato un report relativo a tutte le analisi qualitative del latte delle bovine campionate, con spiegazione dei risultati e confronto della propria mandria con la media degli allevamenti campionati all'interno del progetto (54 report prodotti). Un esempio del report prodotto può essere visualizzato in Figura 29. Inoltre, una pagina divulgativa del progetto è stata pubblicata nell'inserto di luglio di Stalle da Latte e altre sono in revisione presso riviste del settore.



Animale				Qualità						Minerali		Caseificazione			
Matricola	N. azienda	N. lat	Gg.	Proteina %	Caseina %	Grasso %	Lattosio %	SCC cellule x 1000/mL	DSCC %	Ca mg/L	Na mg/L	R min	Resa casearia %	REC proteine %	REC grasso %
	8	98		3.99	3.23	4.39	5.05	181	56.2	1595	419	15.5	20.58	81.74	92.16
	4	154		4.22	3.44	6.14	4.78	149	52.1	1381	441	18.5	19.92	80.36	87.98
	4	185		4.43	3.54	4.16	4.56	159	51.8	1594	470	17	19.23	78.16	88.36
	4	216		3.84	3.07	4.79	4.72	70	38.6	1212	594	22.1	17.51	75.81	78.59
	4	83		3.50	2.74	4.23	4.79	287	56.8	1323	436	32.2	16.91	76.05	84.24
	3	347		4.02	3.22	4.79	4.68	105	49.9	1639	466	20.5	18.39	75.46	86.01
	4	38		3.63	2.91	3.26	5.31	10	56.1	1349	309	29.5	18.82	79.62	91.04
	3	53		3.17	2.44	0.85	5.37	190	84.0	1388	224	25.4	14.20	75.77	76.52
	3	86		3.74	3.00	5.00	4.86	45	66.2	1346	348	16.2	19.27	78.87	88.74
	3	58		3.70	2.95	2.68	5.07	6	42.1	1221	360	15.2	18.48	80.60	89.90
	3	66		4.03	3.26	4.79	5.02	6	50.0	1443	287	17.2	18.87	81.27	90.90
	3	120		4.51	3.69	3.41	5.03	51	68.7	1556	372	22.2	18.87	79.72	85.08
	2	123		4.06	3.26	3.96	5.03	30	33.0	1386	375	16.1	19.14	78.59	90.20
	3	122		4.20	3.40	3.22	5.27	10	59.7	1588	330	15.1	19.51	82.75	92.57
	1	265		4.34	3.56	4.23	5.03	18	49.2	1607	376	18.2	18.10	80.87	87.70
	2	244		4.02	3.21	3.93	4.97	53	51.7	1498	389	20.1	17.55	79.00	86.13
	2	136		4.18	3.40	4.77	5.04	183	68.5	1373	356	19.2	19.69	79.52	86.28
	2	202		4.04	3.28	4.42	5.01	23	56.4	1355	352	19.1	18.07	80.02	88.03
	2	313		3.77	3.01	4.43	4.95	434	75.1	1355	388	16.4	16.72	76.70	82.93
	2	105		3.94	3.18	4.88	5.00	31	67.6	1431	344	18.4	19.84	80.77	89.02

Figura 29. Esempio di Report prodotto per i 54 allevatori coinvolti.

WP6.T2 - Diffusione dei risultati

All'interno del WP6.T2 è stato possibile, grazie alla collaborazione dell'Advisory board, la diffusione dei principali obiettivi, attività e risultati attesi del progetto tramite dirette Facebook e registrazioni sui canali ANARB "ANARB La razza Bruna italiana" YouTube https://youtu.be/NBkapCS7gK0) e sulla pagina Facebook: Associazione Nazionale Allevatori Razza Bruna Italiana – Anarb (https://www.facebook.com/watch/?v=968251180488316), raggiungendo più di 700 visualizzazioni. I due giorni di formazione per studenti universitari hanno permesso il coinvolgimento e interesse di n. 10 studenti che hanno svolto attività di tirocinio formativo o sviluppo della tesi di laurea in argomenti inerenti al progetto GenetoCheese. L'attività di massima diffusione dei risultati si è esplicata grazie all'organizzazione di una conferenza finale di fine progetto tenutasi il 21 giugno 2022 presso l'Abbazia di Valserena, Parma con n.2 moderatori (Prof. Andrea Summer e Prof. Mauro Penasa) e 6 presentazioni scientifiche in cui sono stati esposti i principali risultati ottenuti in ciascun WP da relatori dell'UO e dell'UP. L'evento ha attratto grande attenzione non solo da parte degli allevatori, ma anche da vari esponenti del mondo dell'industria lattiero casearia, superando il target prefissato dei 100 partecipanti.

I risultati verranno esposti con tre presentazioni orali ai congressi internazionali EAAP e ASD che si terranno rispettivamente a settembre 2022 in Portogallo e Croazia.

BIBLIOGRAFIA

Cipolat-Gotet, C., A. Cecchinato, M. De Marchi, and G. Bittante. 2013. Factors affecting variation of different measures of cheese yield and milk nutrient recovery from an individual model cheese-manufacturing process. J. Dairy Sci. 96:7952–7965.

Cipolat-Gotet, C., M. Pazzola, A. Ferragina, A. Cecchinato, M.L. Dettori, and G.M. Vacca. 2018. Technical note: Improving modeling of coagulation, curd firming, and syneresis of sheep milk. J. Dairy Sci. 101:5832–5837.

Bonfatti V, Grigoletto L, Cecchinato A, Gallo L & Carnier P. 2008. Validation of a new reversed-phase high-performance liquid chromatography method for separation and quantification of bovine milk protein genetic variants. Journal of Chromatography A., 1195, 101-106. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.04.075

De Marchi M, Bittante G, Dal Zotto R, Dalvit C & Cassandro M. 2008. Effect of Holstein Friesian and Brown Swiss breeds on quality of milk and cheese. Journal of Dairy Science, 91, 4092-4102. https://doi.org/10.3168/jds.2007-0788

Franzoi M, Niero G, Visentin G, Penasa M, Cassandro M & De Marchi M. 2019. Variation of detailed protein composition of cow milk predicted from a large database of mid-infrared spectra. Animals, 9, 176. https://doi.org/10.3390/ani9040176

McDermott A, De Marchi M, Berry D P, Visentin G, Fenelon M A, Lopez-Villalobos N & McParland S. 2017. Cow and environmental factors associated with protein fractions and free amino acids predicted using mid-infrared spectroscopy in bovine milk. Journal of Dairy Science, 100, 6272-6284. https://doi.org/10.3168/jds.2016-12410

Sebastiani C, Arcangeli C, Ciullo M, Torricelli M, Cinti G, Fisichella S & Biagetti M. 2020. Frequencies evaluation of β-casein gene polymorphisms in dairy cows reared in Central Italy. Animals, 10, 252. https://doi.org/10.3390/ani10020252

Zicarelli L, Napolano R, Campanile G, Zullo G, Zicarelli F, Neri D, Di Luccia A, Di Palo R & La Gatta B. 2021. Influence of milk protein polymorphism of Italian Brown and French Holstein cows on curd yield. International Dairy Journal, 120, 105083. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105083

SPAZIO RISERVATO ALL'ESPERTO (qualora designato)

Osservazioni alla relazione tecnico-scientifica

4. Obiettivi, benefici e criticità del progetto

SPAZIO RISERVATO AL COORDINATORE DEL PROGETTO				
Descrizione degli obiettivi del progetto				
Obiettivi generali	**Obiettivi specifici**	**Linee di attività in WP**	**Risultati attesi**	**Risultati raggiunti** *(Se il risultato atteso non è stato raggiunto specificare la motivazione nel campo note)*
a. Caratterizzazione demografica e genetica di bovine di razza Bruna Italiana e relazione con gli effetti ambientali	1. Caratterizzazione demografica della razza Bruna	· WP1 – Coordinamento. · WP2 – Dalla genomica all'allevamento. o WP2.T1 – caratterizzazione demografica e genetica della razza Bruna Italiana. o WP2.T4 – elaborazione dati. · WP6 - Piano di sfruttamento dei risultati, ricadute e divulgazione dei risultati.	·Caratterizzazione demografica e genetica della razza sulla base dei database forniti da ANARB per l'identificazione degli animali per il campionamento (mese 1 - mese 3). · Produzione di un database con informazioni di pedigree, genomiche e di produzione e qualità latte delle 1000 bovine selezionate per il campionamento (mese 1 - mese 3). · Logo e seminario di inizio attività (mese 1 – mese 2).	● Raggiunto
	2. Caratterizzazione genetica e genomica di bovine di razza Bruna Italiana	· WP1 – Coordinamento. · WP2 – Dalla genomica all'allevamento. o WP2.T2 - analisi e applicazioni genomiche. o WP2.T4 – elaborazione dati. WP6 - Piano di sfruttamento dei risultati, ricadute e divulgazione dei risultati.	· Descrizione di linee di sangue privilegiate per la caseificazione (con utilizzo di caratteri indiretti) tramite analisi di pedigree (mese 3 - mese 4). · Analisi dei dati genomici ad alta densità su tori per AI resi disponibili da ANARB per la valutazione dei segni di selezione genomica e relazioni con le caratteristiche qualitative del latte (mese 3 - mese 8).	● Raggiunto
	3. Relazione tra gli aspetti genomici delle bovine di razza Bruna e caratteristiche degli allevamenti	· WP1 – Coordinamento. · WP2 – Dalla genomica all'allevamento. o WP2.T3 – identificazione di allevamenti di "sola bruna". o WP2.T4 – elaborazione dati. · WP6 - Piano di sfruttamento	· Raccolta di informazioni (fattori ambientali e alimentari) relative ai 50 allevamenti selezionati per il campionamento del latte (mese 3 – mese 14). · Produzione di un database con informazioni di pedigree, genomiche e produttive delle 1000 bovine e le caratteristiche degli allevamenti oggetto di campionamento (mese 3 - mese 14). · Valutazione delle relazioni	● Raggiunto, articoli scientifici in fase di preparazione/sottomissione/revisione

		dei risultati, ricadute e divulgazione dei risultati	tra i fattori a livello di allevamento e la genomica delle bovine di razza Bruna (mese 14 – mese 20 ·I risultati del WP2 garantiranno la pubblicazione di 2 articoli scientifici in riviste internazionali Q1 (entro mese 24).	
b. Genomica delle proteine del latte	1. Caratterizzazione delle proteine nel latte di razza Bruna	· WP1 – Coordinamento. · WP3 – Dalla genomica alle proteine del latte. o WP3.T1 – campionamento e caratterizzazione delle proteine del latte o WP3.T4 – elaborazione dati. · WP6 - Piano di sfruttamento dei risultati, ricadute e divulgazione dei risultati.	· Caratterizzazione delle frazioni proteiche a livello di singola bovina di razza Bruna ed effetti animali non genetici (mese 3 – mese 19). · Studio della variabilità delle frazioni proteiche in relazione ai fattori relativi all'allevamento (mese 15 – mese 19). · Studio della variabilità delle frazioni proteiche in relazione alle caratteristiche qualitative del latte, tra cui le cellule somatiche differenziali (mese 16 – mese 20).	• Raggiunto
	2. Validazione dell'utilizzo del TestKappa a livello di singola bovina	· WP1 – Coordinamento. · WP3 – Dalla genomica alle proteine del latte. o WP3.T2 – TestKappa. o WP3.T4 – elaborazione dati. WP6 - Piano di sfruttamento dei risultati, ricadute e divulgazione dei risultati.	· TestKappa e relazione composizione e la quantificazione delle frazioni proteiche (mese 3 – mese 16) · Validazione del Test-Kappa: quantificazione delle frazioni proteiche tramite HPLC e utilizzo di informazioni genomiche (mese 14 -mese 18). · Valutazione dell'uso della spettrometria all'infrarosso come integrazione dell'analisi del TestKappa (mese 16 – mese 21).	• Raggiunto
	3. Genomica delle proteine del latte	· WP1 – Coordinamento. · WP3 – Dalla genomica alle proteine del latte. o WP3.T3 – la genomica delle proteine del latte. o WP3.T4 – elaborazione dati. WP6 - Piano di sfruttamento dei risultati, ricad	· Stima dei parametri genetici: ereditabilità dei singoli caratteri e correlazioni genetiche fra caratteri (mese 15 - mese 18) · Conferma dei QTL noti in bibliografia per le proteine del latte e ricerca di potenziali nuove associazioni genomiche (mese 16 – mese 22). · I risultati del WP3 garantiranno la pubblicazione di 3	• Raggiunto, articoli scientifici in fase di preparazione/sottomissione/revisione

			articoli scientifici in riviste internazionali Q1 (entro mese 24).	
c. Genomica dei minerali del latte	1. Caratterizzazione dei minerali nel latte di razza Bruna	· WP1 – Coordinamento. · WP4 – Dalla genomica ai minerali del latte. o WP4.T1 – campionamento e caratterizzazione dei minerali del latte. o WP4.T3 – elaborazione dati. · WP6 - Piano di sfruttamento dei risultati, ricadute e divulgazione dei risultati.	· Caratterizzazione dei seguenti minerali nel latte individuale di bovine di razza Bruna: calcio, fosforo e potassio. Variabilità e studio degli effetti animali non genetici (mese 3 - mese 16). · Studio della variabilità dei minerali in relazione ai fattori relativi all'allevamento (mese 15 – mese 18). · Studio della variabilità dei minerali in relazione alle caratteristiche qualitative del latte, tra cui le cellule somatiche differenziali (mese 16 – mese 19).	● Raggiunto
	2. Genomica dei minerali del latte	· WP1 – Coordinamento. · WP4 – Dalla genomica ai minerali del latte. o WP4.T2 – la genomica dei minerali del latte. o WP4 o WP4.T3 – elaborazione dati. · WP6 - Piano di sfruttamento dei risultati, ricadute e divulgazione dei risultati.	· Stima dei parametri genetici: ereditabilità dei singoli caratteri e correlazioni genetiche fra caratteri (mese 15 - mese 18) · Studio genomico di associazione (GWAS) fra polimorfismi genomici e i sali minerali (mese 16 – mese 22).	● Raggiunto
	3. Relazione tra le proteine e i minerali del latte	· WP1 – Coordinamento. · WP4 – Dalla genomica ai minerali del latte. WP4.T3 – elaborazione dati. · WP6 - Piano di sfruttamento dei risultati, ricadute e divulgazione dei risultati.	· Studio fenotipico delle relazioni tra relazioni tra le proteine e i minerali del latte (mese 16 -mese 22). · I risultati del WP4 garantiranno la pubblicazione di 2 articoli scientifici in riviste internazionali Q1 (entro mese 24).	● Raggiunto, articolo scientifico in fase di sottomissione
d. Caseificazione: dalle proteine e i minerali del latte alla resa casearia e qualità del formaggio	1. Coagulazione e relazioni con le proteine e i minerali del latte	· WP1 – Coordinamento. · WP5 – Miglioramento della composizione proteica per la caseificazione o WP5.T1 – coagulazione e caseificazione. o WP5.T4 – elaborazione dati.	· Caratterizzazione della coagulazione nel latte di razza Bruna a livello individuale. Studio di nuovi fenotipi e relazione con gli effetti animali non genetici e con i fattori relativi all'allevamento (mese 3 – mese 16). · Variabilità della coagulazione e studio degli effetti delle	● Raggiunto

		· WP6 - Piano di sfruttamento dei risultati, ricadute e divulgazione dei risultati.	proteine e dei minerali del latte (mese 15 - mese 19).	
	2. Caseificazione e relazioni con le proteine e i minerali del latte	· WP1 – Coordinamento. · WP5 – Miglioramento della composizione proteica per la caseificazione o WP5.T2 – spettroscopia e uso di caratteri indiretti. o WP5.T4 – elaborazione dati. WP6 - Piano di sfruttamento dei risultati, ricadute e divulgazione dei risultati.	· Caseificazione del latte a livello di singola bovina di razza Bruna e misura di nuovi fenotipi che descrivono le caratteristiche casearie del latte (mese 3 - mese 16). · Variabilità dei caratteri di caseificazione e relazione con gli effetti animali non genetici e con i fattori relativi all'allevamento (mese 15 – mese 19). · Studio dell'efficienza del processo di caseificazione e recupero delle proteine e dei minerali dal latte al formaggio (mese 18 - mese 21). · Creazione di un modello matematico predittivo per la resa casearia e gli altri caratteri relativi al processo di caseificazione a partire dalle proteine e sali minerali presenti nel latte (mese 20 - mese 22).	• Raggiunto
	3. Studio degli aspetti genomici nel miglioramento delle proteine e dei minerali per un processo di caseificazione efficiente	· WP1 – Coordinamento. · WP5 – Miglioramento della composizione proteica per la caseificazione o WP5.T3 – la genomica per una migliore caseificazione. o WP5.T4 – elaborazione dati. WP6 - Piano di sfruttamento dei risultati, ricadute e divulgazione dei risultati.	· Studio genomico di associazione fra polimorfismi genomici e caratteristiche casearie del latte per una migliore resa in formaggio (GWAS) (mese 18 - mese 22). · Report da consegnare a ciascun allevatore relativo a tutte le analisi qualitative del latte delle bovine campionate (entro mese 22). · Produzione di un opuscolo sui risultati del progetto per la conferenza finale (mese 24). · I risultati del WP5 garantiranno la pubblicazione di 3 articoli scientifici in riviste internazionali Q1 (entro mese 24).	• Raggiunto, articoli scientifici in fase di preparazione/sottomissione/revisione
NOTE				

SPAZIO RISERVATO ALL'ESPERTO (qualora designato)
Osservazioni al raggiungimento degli obiettivi del progetto

5. Ostacoli occorsi ed azioni correttive messe in atto

Descrivere gli ostacoli occorsi durante la realizzazione delle attività del progetto indicando la linea di attività interessata, l'Unità operativa coinvolta e le azioni che sono state attivate al fine di rimuovere gli ostacoli che impedivano la realizzazione degli obiettivi.

Numero WP	Unità operative coinvolte	Ostacolo	Azioni correttive
WP2	UO1	Assenza di informazioni genomiche di animali localizzati in aziende logisticamente adeguate al campionamento.	Sviluppo di un protocollo di selezione per la genotipizzazione ad hoc di animali localizzati nella Regione Emilia-Romagna, Lombardia e Toscana.
WP2	UP	I campionamenti aziendali sono stati interrotti a causa dell'emergenza COVID-19.	Il Coordinatore ha inoltrato richiesta di proroga (12 mesi) per poter raggiungere gli obiettivi previsti e iniziare nuovamente i campionamenti a fine emergenza.
WP3	UO	I campionamenti aziendali sono stati interrotti a causa dell'emergenza COVID-19. Di conseguenza i risultati ottenuti sono da considerarsi preliminari.	Assieme all'UP, anche l'UO concorda con la richiesta di proroga (12 mesi) per poter raggiungere gli obiettivi previsti e iniziare nuovamente i campionamenti a fine emergenza.
WP 5	UP	L'allestimento del laboratorio è stato rallentato dalle procedure di gara degli acquisti per le attrezzature previste dal progetto e dai ritardi nella consegna del materiale ordinato.	Entrambe le problematiche sono indipendenti dall'operato della UP, che ha potuto solamente affiancare l'amministrazione nello svolgimento delle pratiche e sollecitare i fornitori per la consegna del materiale e delle attrezzature ordinate.
WP 5	UP	L'allestimento del laboratorio è stato rallentato dalle visite tecniche ai locali e adeguamenti dei locali stessi agli standard di sicurezza, e dalle verifiche di idoneità tecnico professionale delle imprese appaltatrici alle quali sono stati affidati i lavori d'opera.	Le suddette problematiche sono indipendenti dall'operato della UP, che ha potuto solamente affiancare l'amministrazione nello svolgimento delle pratiche e i tecnici e responsabili delle imprese durante le visite di ispezione dei locali adibiti a laboratorio.
SPAZIO RISERVATO ALL'ESPERTO (qualora designato)			
Osservazioni alle azioni correttive messe in atto			

Timbro dell'Ente proponente il progetto *Firma leggibile del Coordinatore del progetto*

SPAZIO RISERVATO ALL'ESPERTO (qualora designato)
Valutazione complessiva del progetto

Luogo e Data *Firma leggibile dell'Esperto (qualora designato)*