

**PROGETTI DI “RICERCA CORRENTE 2019”**  
**RELAZIONE FINALE**

**N. identificativo progetto: IZS LT 07/19 RC**

**Progetto presentato da:**

**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE**  
**LAZIO E TOSCANA “M. ALEANDRI”**

**Area tematica: Sicurezza alimentare**

**Titolo del progetto: Studio delle varianti geniche della  $\beta$ -caseina e del profilo degli acidi grassi del latte bovino in allevamenti del Lazio e della Toscana**

Ricerca finanziata dal Ministero della Salute

**Responsabile Scientifico: dr. Carlo Boselli (subentrato alla dr.ssa Giuseppina Giacinti)**

## SINTESI

### **Studio delle varianti geniche della $\beta$ -caseina e del profilo degli acidi grassi del latte bovino in allevamenti del Lazio e della Toscana**

Parole chiave: latte bovino,  $\beta$ -caseina, acidi grassi

Le caseine sono le principali proteine presenti nel latte con importanza nutrizionale rilevante. La  $\beta$ -caseina del latte bovino ha 209 aminoacidi con 13 varianti, A1, A2, A3, A4, B, C, D, E, F, H1, H2, I e G a cui se ne aggiunge una quattordicesima recentemente isolata nel latte di bovine coreane. Le varianti più comuni sono la A1 e la A2. Le differenze amminoacidiche tra le diverse varianti di  $\beta$ -caseina sono alla base dell'idea di eventuali implicazioni biologiche correlate al consumo di latte bovino. Nella variante A1 in posizione 67 troviamo un residuo di istidina, sostituita da un residuo di prolina nella variante A2. Ciò può portare alla generazione di peptidi bioattivi, noti come  $\beta$ -casomorfine. Nel nostro studio sono state campionate complessivamente 1.019 vacche da latte allevate nelle regioni Lazio e Toscana. Da 719 bovine sono stati campionati altrettanti campioni di latte individuale, su cui sono state effettuate analisi qualitative, citologiche, reologiche, indagate le differenti frazioni proteiche ed eseguita la determinazione del genotipo di betacaseina; i campioni di 300 bovine sono stati testati con A1 Beta casein (A1) e A2 Beta casein (A2) Bovine, ELISA assay "biosensis®" per individuare i genotipi A1A1 e A2A2 ed A2A1. Sono stati individuati 12 differenti polimorfismi di cui 8 eterozigoti (A1A2, A2I, A1A3, BA2, BA1, A2A3, BA3, A1I) e 4 omozigoti (A2A2, A1A1, A3A3, BB, I). La razza Frisona ha mostrato maggiore variabilità rispetto alle razze Pezzata Rossa, Jersey e Chianina. Il genotipo prevalente è stato l'A2A2 (42,49%), seguito da A1A2 (32,82%) e da A1A1 (6,91%), che rappresentano oltre l'80% dei genotipi complessivi. Le varianti alleliche individuate sono state 5 rispetto alle 7 più frequenti riscontrate in Europa, dimostrando una limitata variabilità nella popolazione da noi studiata. Le frequenze alleliche rilevate nel nostro studio, risultano comparabili ai range di valori riportati in letteratura, ad eccezione della razza Chianina dove sono state solo parzialmente attese.

Le differenze nella composizione del latte fra i principali genotipi della  $\beta$ -caseina, sono state riscontrate solo per i tratti tecnologici (RCT). La risposta in termini di "tempo di coagulazione" è stata migliore per il caglio animale rispetto al vegetale (3,45% vs 12,07% dei campioni non coagulati sul totale). La risposta del genotipo A1A1 per il parametro RCT testato con caglio animale ed in modalità "predizione" è stata significativamente migliore ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,10$  rispettivamente) se confrontata con gli altri genotipi studiati. Relativamente all'utilizzo del caglio vegetale, nel nostro studio la risposta in termini di RCT è stata uniforme per tutte le varianti di  $\beta$ -caseina studiate, verosimilmente anche per effetto della minore specificità del caglio vegetale rispetto a quello animale,

nella fase primaria o enzimatica del processo di coagulazione. I risultati ottenuti con l'utilizzo del caglio vegetale (Galium, PRODOR), vanno considerati in ottica di future applicazioni circa la produzione di “formaggi e derivati del latte” prodotti con latte con  $\beta$ -caseina A2A2 mediante l'impiego di coagulanti vegetali, da destinare a consumatori che per scelte personali, etiche, religiose e di tendenza preferiscono tale format di prodotto. Gli acidi grassi non hanno mostrato relazioni significative con i genotipi di beta caseina studiati. Riteniamo pertanto che il contenuto di acidi grassi sia influenzato dall'alimentazione, e soprattutto dalla percentuale di foraggio verde somministrato con la razione e dal pascolamento. Relativamente alle frazioni proteiche il contenuto totale di alfa caseine, di beta caseina e di k-caseina è stato influenzato dal genotipo considerato. In particolare per la k-caseina la variante “a/e” è risultata in concentrazione significativamente maggiore nei genotipi A1A1 ed A2A1 mentre la variante “b” è risultata significativamente maggiore nei genotipi A2I e “altri minori”, influenzando anche le caratteristiche tecnologiche.

La valutazione del kit commerciale Elisa “biosensis®” per la determinazione distinta delle varianti fenotipiche A1 e A2 è stata eseguita su 300 bovine con fenotipo noto, allo stato attuale ha fornito risultati soddisfacenti sebbene il kit sia indicato per fornire una risposta di tipo quantitativo. Le performance ottenute, testando campioni di latte individuale, sono state migliori con il kit A1 rispetto al kit A2; necessitano inoltre prove ex-novo sul latte di massa bovino, conoscendo a monte le frequenze alleliche/prevalenze di A1 ed A2 nella mandria.

I risultati ottenuti in termini di predizione dallo spettro FTIR delle principali frazioni caseiniche del latte ed in particolare della beta caseina, anche se non utilizzabili allo stato attuale nelle analisi di routine ( $R^2 < 0,50$ ), dovranno essere migliorate soprattutto aumentando la numerosità campionaria.

Una riflessione conclusiva rispetto alla variante di  $\beta$ -caseina A2: le varianti con una prolina in posizione 67 come l'A2, A3, E, D, I, J, H, dovrebbero avere i medesimi effetti benefici sulla salute umana. Per fornire risultati più rapidi e con minore dispendio in termini di variabilità genetica, si potrebbero includere nei piani di selezione genetica anche animali (riproduttori) con l'allele “I”, attesa la prevalenza del 4% rilevata nel presente studio. La selezione dovrà tenere conto anche del linkage tra le varianti di  $\beta$ -caseina rispetto alle altre frazioni proteiche. Pertanto la selezione genetica va attuata in termini di aplotipi anziché di singole varianti di  $\beta$ -caseina in particolare con le  $\alpha$ -caseine e le k-caseine, atteso che determinati alleli alla base delle 2 frazioni proteiche creano una favorevole sinergia in grado di influenzare l'attitudine casearia.

## SUMMARY

### **Study of genetic variants of $\beta$ -casein and free fatty acid profile of bovine milk on farms in Lazio and Tuscany**

Key words: cow's milk, betacasein, fatty acid.

Caseins are the main proteins in milk with significant nutritional importance. Cows' milk  $\beta$ -casein has 209 amino acids with 13 variants, A1, A2, A3, A4, B, C, D, E, F, H1, H2, I and G to which is added a fourteenth variant recently isolated in the milk of Korean cows. The most common variants are A1 and A2. The amino acid differences between the different  $\beta$ -casein variants form the basis for the idea of possible biological implications related to cow's milk consumption. In the A1 variant at position 67, we find a histidine residue, which is replaced by a proline residue in the A2 variant. This may lead to the generation of bioactive peptides, known as  $\beta$ -casomorphins (opioid peptides). In our study, 1,019 dairy cows reared in the regions of Lazio and Tuscany were tested. Individual milk samples were taken from all the selected cows: the qualitative, cytological and rheological determination of the different protein fractions and of the betacasein genotype was carried out on the milk samples taken from 719 cows; while milk samples from the remaining 300 cows, were tested with "biosensis®" ELISA kits to detect the A1A1 and A2A2 and A2A1 genotypes. Twelve different polymorphisms were detected of which eight were heterozygous (A1A2, A2I, A1A3, BA2, BA1, A2A3, BA3, A1I) and five homozygous (A2A2, A1A1, A3A3, BB, II). The Friesian breed showed more variability than the Red Pied, Jersey and Chianina breeds. The prevailing genotype was A2A2 (42.49%), followed by A1A2 (32.82%) and A1A1 (6.91%), accounting for more than 80% of the total genotypes. Five allelic variants were identified compared with the seven most frequent found in Europe, demonstrating limited variability in our study population. The allelic frequencies detected in our study are comparable within the range of values reported in the literature, with the exception of the Chianina breed where they were only partially expected.

Differences in milk composition between the main prevailing  $\beta$ -casein genotypes were found only for technological traits (RCT). The response in terms of 'coagulation time' was better for animal than vegetable rennet (3.45% vs. 12.07% of non-coagulated samples out of the total). The response of the A1A1 genotype for the RCT parameter tested with animal rennet and in 'prediction' mode was significantly better when compared to the other genotypes studied. Concerning the use of vegetable rennet, in our study the response in terms of RCTs was the same for all  $\beta$ -casein variants studied, probably also due to the lower specificity of vegetable rennet compared to animal rennet in the primary or enzymatic phase of the coagulation process. The results obtained with the use of vegetable rennet (Galium, PRODOR), are to be considered with a view to future applications concerning the

production of 'cheeses and milk derivatives' produced with  $\beta$ -casein A2A2 milk through the use of vegetable coagulants, to be addressed to consumers who for personal, ethical, religious and trend choices prefer such a product format. Fatty acids did not show significant relationships with the studied  $\beta$ -casein genotypes. Therefore, we believe that fatty acid content was affected by feeding, and especially by the percentage of green fodder fed with the ration and by grazing. Regarding protein fractions, the total content of alpha casein, beta casein and kcasein was influenced by the genotype considered.

In particular for k-casein, the 'a/e' variant was found to be in significantly higher concentration in the A1A1 and A2A1 genotypes while the 'b' variant was significantly higher in the A2I and 'other minor' genotypes, also influencing the technological characteristics.

The evaluation of the commercial Elisa "biosensis®" kit for the separate determination of the phenotypic variants A1 and A2 was carried out on 300 cows with a known phenotype, and to date has provided satisfactory results, although the kit is indicated to provide a quantitative answer. The performance obtained, testing individual milk samples, was better with the A1 kit than with the A2 kit; ex-novo tests on bovine bulk milk are also required, knowing the allelic frequencies of A1 and A2 in the herd upstream.

The results obtained in terms of prediction from the FTIR spectrum of the main casein fractions of milk and in particular of beta casein, even if currently not usable in routine analyses ( $R^2 < 0.50$ ), will have to be improved especially by increasing the sample size.

One last thought with respect to the  $\beta$ -casein A2 variant: the variants with a proline in position 67 such as A2, A3, E, D, I, J, H, should have the same beneficial effects on human health. To provide faster results and with less expenditure in terms of genetic variability, genetic selection plans could also include (reproductive) animals with the "I" allele, given the 4% prevalence found in the present study.

Selection must also take into account the linkage between  $\beta$ -casein variants and other protein fractions. Therefore, genetic selection should be implemented in terms of haplotypes rather than individual  $\beta$ -casein variants, particularly with alpha-caseins and k-caseins, since certain alleles at the basis of the two protein fractions create a favorable synergy that can influence dairy aptitude.