

PROGETTI DI “RICERCA CORRENTE 2022”
RELAZIONE FINALE

N. identificativo progetto: IZS LT 05/22 RC

Progetto presentato da:

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE

LAZIO E TOSCANA “M. ALEANDRI”

Area tematica: SICUREZZA ALIMENTARE

Titolo del progetto: Studio delle caratteristiche
bromatologiche e verifica in vitro degli effetti pro o anti
infiammatori del latte con isoforme A1 e A2 della β -caseina
finalizzato alla implementazione di un sistema di certificazione
del latte e dei derivati prodotti nella Regione Lazio.

Ricerca finanziata dal Ministero della Salute

Responsabile Scientifico: Giuseppina Giacinti

SINTESI

Studio delle caratteristiche bromatologiche e verifica in vitro degli effetti pro o antinfiammatori del latte con isoforme A1 e A2 della β -caseina finalizzato alla implementazione di un sistema di certificazione del latte e dei derivati prodotti nella Regione Lazio

Parole chiave: β -caseina, β -casomorfina7, latte bovino, colture cellulari, NACCP

La β -caseina rappresenta una delle principali frazioni proteiche del latte bovino e il polimorfismo A1/A2, pur derivando da una singola sostituzione amminoacidica in posizione 67, è in grado di influenzare in modo significativo alcune proprietà tecnologiche e qualitative del latte. I risultati disponibili in letteratura e le evidenze emerse nello studio confermano che il latte A2 tende a presentare caratteristiche di coagulazione meno favorevoli rispetto al latte A1, con tempi di coagulazione più lunghi e formazione di cagliate meno compatte. Tuttavia, l'analisi dei parametri bromatologici dei formaggi ottenuti, valutati a differenti tempi di shelf-life, non ha evidenziato differenze significative tra le due tipologie, suggerendo che i processi di caseificazione e maturazione sono in grado di compensare le differenze iniziali legate alla variante di β -caseina e di garantire una composizione chimico-fisica sostanzialmente sovrapponibile. Al contrario, l'analisi del profilo lipidico ha messo in evidenza differenze significative in specifiche frazioni di acidi grassi, in particolare nei polinsaturi, confermando che il polimorfismo della β -caseina influenza la microstruttura della matrice lipidica e la dinamica dei globuli di grasso. I dati longitudinali hanno mostrato un andamento differenziale del DHA durante la maturazione, con una lieve ma significativa riduzione nelle fasi iniziali nei formaggi derivati da latte A2, seguita da una fase di stabilizzazione, mentre nei formaggi da latte A1 il contenuto di DHA rimane sostanzialmente costante. Questo comportamento suggerisce una maggiore suscettibilità dei PUFA all'ossidazione o alla lipolisi nei prodotti A2, verosimilmente dovuta alla diversa organizzazione delle micelle caseiniche e alla dimensione dei globuli lipidici. Parallelamente, è emerso il potenziale ruolo del genotipo della β -caseina nella modulazione della produzione di peptidi bioattivi, in particolare della β -casomorfina-7, più frequentemente rilevata in concentrazioni elevate nei prodotti ottenuti da latte A1. Considerata la natura oppioide della BCM-7 e il suo possibile coinvolgimento nei meccanismi di modulazione della risposta immunitaria e della barriera intestinale, lo studio ha sviluppato e validato un modello in vitro di barriera intestinale basato su co-culture di cellule epiteliali (Caco-2/HT29) e cellule monocitiche (THP-1). Tale modello ha consentito di riprodurre un microambiente funzionalmente integrato, capace di evidenziare l'interazione tra comparto epiteliale e immunitario. I risultati dei saggi molecolari hanno dimostrato che la BCM-7 è in grado di attivare in modo selettivo pathways pro-infiammatori, prevalentemente a carico delle cellule immunitarie, con significativa up-regulation di geni chiave quali TNF- α , IFN- γ , IL-8 e COX-2. Tale risposta è risultata meno pronunciata nelle cellule epiteliali, ma fortemente amplificata nelle condizioni di co-cultura, a conferma del ruolo del cross-talk epitelio-immune. I test di permeabilità condotti con traccianti paracellulari hanno mostrato che, pur mantenendo una buona integrità strutturale, la barriera epiteliale esposta a BCM-7 manifesta un aumento lieve ma consistente della permeabilità, effetto attribuibile alla modulazione delle tight junctions indotta dai mediatori infiammatori. Nel complesso, i risultati indicano che il polimorfismo della β -caseina non determina variazioni sostanziali nella composizione dei macrocostituenti dei formaggi, ma influenza componenti qualitative quali il profilo degli acidi grassi e la potenziale produzione di peptidi bioattivi, con possibili implicazioni nutrizionali e funzionali. L'integrazione di tali evidenze nel modello NACCP supporta l'introduzione del profilo lipidico e della tracciabilità genetica tra i parametri critici di controllo, con l'obiettivo di garantire sicurezza, qualità e valorizzazione nutrizionale dei prodotti lattiero-caseari. Il modello in vitro sviluppato rappresenta infine uno strumento metodologicamente robusto e conforme ai principi delle 3R, utile per futuri approfondimenti sui meccanismi molecolari mediante i quali peptidi derivati dalle proteine alimentari possono influenzare la fisiologia e la patologia intestinale.

SUMMARY

Study of the bromatological characteristics and in vitro assessment of the pro- or anti-inflammatory effects of milk containing A1 and A2 β -casein isoforms, aimed at the implementation of a certification system for milk and dairy products produced in the Lazio Region.

Key words: β -casein, β -casomorphin-7, bovine milk, cell cultures, NACCP

β -casein represents one of the main protein fractions of bovine milk, and the A1/A2 polymorphism, although resulting from a single amino acid substitution at position 67, is able to significantly influence several technological and qualitative properties of milk. Evidence from the literature and the findings of the present study confirm that A2 milk tends to exhibit less favorable coagulation characteristics compared with A1 milk, including longer coagulation times and the formation of less compact curds. However, the analysis of the bromatological parameters of the resulting cheeses, evaluated at different shelf-life times, did not reveal significant differences between the two types, suggesting that cheesemaking and ripening processes are able to compensate for the initial differences related to the β -casein variant and to ensure a substantially comparable physicochemical composition. In contrast, lipid profile analysis revealed significant differences in specific fatty acid fractions, particularly polyunsaturated fatty acids (PUFAs), confirming that β -casein polymorphism influences the microstructure of the lipid matrix and the dynamics of fat globules. Longitudinal data showed a differential trend of DHA during ripening, with a slight but significant reduction during the early stages in cheeses derived from A2 milk, followed by a stabilization phase, whereas in cheeses from A1 milk the DHA content remained substantially constant. This behavior suggests a higher susceptibility of PUFAs to oxidation or lipolysis in A2 products, likely due to differences in the organization of casein micelles and the size of fat globules. In parallel, a potential role of the β -casein genotype emerged in modulating the production of bioactive peptides, particularly β -casomorphin-7, which has been more frequently detected at higher concentrations in products obtained from A1 milk. Considering the opioid nature of BCM-7 and its possible involvement in mechanisms modulating immune responses and intestinal barrier function, this study developed and validated an in vitro intestinal barrier model based on co-cultures of epithelial cells (Caco-2/HT29) and monocytic cells (THP-1). This model allowed the reproduction of a functionally integrated microenvironment capable of highlighting the interaction between epithelial and immune compartments. The results of molecular assays demonstrated that BCM-7 is able to selectively activate pro-inflammatory pathways, mainly in immune cells, with significant up-regulation of key genes such as TNF- α , IFN- γ , IL-8, and COX-2. This response was less pronounced in epithelial cells but strongly amplified under co-culture conditions, confirming the role of epithelial-immune cross-talk. Permeability tests performed with paracellular tracers showed that, while maintaining good structural integrity, the epithelial barrier exposed to BCM-7 exhibited a slight but consistent increase in permeability, an effect attributable to the modulation of tight junctions induced by inflammatory mediators. Overall, the results indicate that β -casein polymorphism does not lead to substantial variations in the macronutrient composition of cheeses, but rather affects qualitative components such as the fatty acid profile and the potential production of bioactive peptides, with possible nutritional and functional implications. The integration of these findings into the NACCP model supports the inclusion of lipid profile and genetic traceability among critical control parameters, with the aim of ensuring safety, quality, and nutritional valorization of dairy products. Finally, the in vitro model developed represents a methodologically robust tool, compliant with the principles of the 3Rs, and useful for future investigations into the molecular mechanisms through which peptides derived from dietary proteins may influence intestinal physiology and pathology.