

CHIMICA & SPETTROMETRIA DI MASSA



Vincenzo Cunsolo, Salvatore Foti,
Vera Muccilli, Rosaria Saletti
Dipartimento di Scienze Chimiche
Università di Catania
sfoti@unict.it

PROTEOMICA DEL LATTE EQUINO

Un'indagine sistematica del latte di asina, condotta mediante spettrometria di massa ESI e MALDI combinata con tecniche di separazione HPLC ed elettroforetiche, ha permesso di estendere la caratterizzazione del contenuto proteico di questo latte, di particolare interesse quale sostituto del latte vaccino nella dieta degli individui allergici.

Gli equini non sono tradizionalmente considerati produttori di latte per l'alimentazione umana. Tuttavia è noto fin dall'antichità che il latte equino possiede speciali proprietà cosmetiche e terapeutiche [1, 2], tanto che nella tradizione popolare è utilizzato nell'alimentazione dei neonati che soffrono di allergia al latte vaccino. Infatti, il latte vaccino, usato come sostituto del latte materno quando quest'ultimo non è disponibile o raccomandabile, rappresenta la principale causa di allergia nella popolazione infantile, interessando circa il 4% dei neonati nel primo anno di vita. Nella maggior parte dei casi l'allergia scompare gradualmente durante la crescita, ma nel 15% circa dei casi perdura per tutta la vita. La tradizione popolare che considera il latte equino un valido sostituto per l'alimentazione dei neonati allergici al latte vaccino negli anni recenti è stata confermata da studi clinici [3-9], i quali hanno mostrato che più dell'80% dei neonati allergici al latte vaccino non mostra allergia al latte di asina. Rimane tuttavia una percentuale di soggetti che è allergico sia al latte vaccino che a quello equino.

Le basi molecolari della ridotta allergia del latte di asina non sono note e, poiché la risposta allergica è certamente correlata alla composizione proteica, per poter comprendere questa relazione è necessaria una maggiore conoscenza delle proteine del latte di asina. Il latte è un sistema complesso nel quale sono presenti proteine, grassi, carboidrati e composti inorganici. Le proteine contenute nel latte vengono suddivise in proteine legate alle membrane dei globuli di grasso, proteine del siero, caseine e peptoni. Le proteine legate alle membrane dei globuli di grasso costituiscono circa l'1% del totale. I costituenti maggiori delle proteine del siero sono le β -lattoglobuline, l' α -lattoalbumina, il lisozima, la siero albumina e la lattoferrina. Nel siero sono anche contenuti i peptoni originati dalle caseine per azione di proteasi endogene. La frazione caseinica comprende le α_{S1} -, α_{S2} -, β - e κ -caseine.

Siero proteine

Fino agli anni recenti le conoscenze sul contenuto proteico del latte equino erano frammentarie. Le informazioni maggiori riguardavano

Il contributo è stato presentato al Convegno Massa 2012 della Divisione di Spettrometria di Massa della SCI; Palermo, 1-5 luglio 2012.

le proteine del siero per le quali erano state riportate le sequenze di una β -lattoglobulina I [10] e una β -lattoglobulina II [11, 12] nel latte di giumenta. Per il latte di asina erano state riportate due varianti genetiche di β -lattoglobulina I, denominate A e B [13, 14], e tre varianti genetiche di β -lattoglobulina II, denominate A, B e C [15, 16]. Nella variante A è presente una Cys aggiuntiva in sostituzione della Pro in posizione 110, che invece è presente nelle varianti B e C. Per l' α -lattoalbumina erano note tre varianti, denominate A, B e C, nel latte di giumenta [11, 17] ed una variante nel latte di asina [18]. Una sequenza di lattoferrina di giumenta era stata dedotta dal cDNA [19], ma non si conosceva nulla sulla lattoferrina del latte di asina. Erano state dedotte, sempre dal cDNA, le sequenze della siero albumina di giumenta [20] e di asina [21] ed infine erano state riportate una sequenza per il lisozima di giumenta [22] e le sequenze di due varianti genetiche di lisozima nel latte di asina [13, 16].

Allo scopo di estendere le conoscenze sulle proteine del siero nel latte di asina è stata studiata la frazione delle siero proteine di un campione di latte di asina di un singolo individuo appartenente alla razza Ragusana, raccolto a metà del periodo di allattamento. Dopo eliminazione per centrifugazione del grasso, la frazione caseinica è stata separata per precipitazione a pH 4,2 dalle siero proteine e le sue componenti proteiche sono state isolate mediante HPLC [23].

Le analisi delle frazioni HPLC effettuate mediante digestione enzimatica e HPLC/nESI-MSMS (Fig. 1) hanno permesso di individuare la presenza del lisozima variante B e della stessa proteina ossidata selettivamente alla Met 79, dell' α -lattoalbumina e dell' α -lattoalbumina ossidata selettivamente alla Met 90, nonché la presenza della variante B della β -lattoglobulina di tipo I e della variante B della β -lattoglobulina di tipo II.

Una proteina corrispondente ad una frazione cromatografica che dal digerito triptico mostrava essere una β -lattoglobulina di tipo II non presentava una massa molecolare corrispondente a nessuna delle varianti riportate. Questa proteina è stata sequenziata mediante metodi convenzionali di mass mapping e spettrometria di massa

tandem e si è potuto determinare che differisce dalla variante A per la sostituzione di una Pro al posto della Cys 110 e di un Asp al posto delle Gly162 [23]. Questa variante è stata denominata variante D.

La sequenza dedotta dal cDNA della siero albumina è stata verificata mediante idrolisi con tripsina e Glu-C della proteina isolata mediante HPLC ed analisi HPLC/nESI-MSMS dei digeriti. La sequenza è stata coperta interamente, ad eccezione di tre tripeptidi e del peptide N-terminale, ed è risultata coincidente con la sequenza dedotta dal cDNA, eccetto la sostituzione del residuo di Ile 497 con Val. La presenza della Val in posizione 497 è comune in quasi tutte le albumine del siero dei mammiferi. La differenza con la sequenza dedotta dal cDNA può essere dovuta ad una mutazione puntiforme nella sequenza del DNA o a un errore introdotto durante il processo di traduzione della sequenza del cDNA.

Una frazione cromatografica parzialmente separata dalla sieroalbumina era dovuta alla lattoferrina, per la quale non è nota la sequenza dedotta dal genoma.

Nella prima frazione cromatografica co-eluiscono due peptidi con M_r 1594 e 3044 Da. La sequenza del peptide con M_r 1594 Da, ottenuta mediante spettrometria di massa tandem, fu trovata corrispondente alla regione V¹⁷⁶APFPQPVPYPQR¹⁸⁹ della β -caseina di asina, mentre la sequenza del peptide con M_r 3043 Da, determinata allo stesso modo, risultava corrispondente alla sequenza C-terminale della β -caseina variante A di asina, Y¹⁹⁹QDPQLGLTGEFDPATQPIV PVHNPVIV²²⁶.

La presenza di questi peptidi nel siero può essere attribuita alla digestione della β -caseina da parte di proteasi endogene. È interessante notare che il peptide N-terminale identificato è omologo a un peptide con attività antimicrobica derivante dalla β -caseina umana. La sequenza dei primi sette amminoacidi di questo peptide presenta similarità di sequenza con il frammento 193-198 della β -caseina bovina, che presenta attività antiipertensiva.

Per quanto riguarda il frammento V¹⁷⁶APFPQPVPYPQR¹⁸⁹, in un recente lavoro è stato riportato che un peptide avente la stessa sequenza ma con due amminoacidi in meno (V¹⁷⁶APFPQPVPYP¹⁸⁵), che costituisce il peptide più abbondante nella miscela ottenuta dal latte di asina per digestione gastrointestinale simulata *in vitro* mediante pepsina e una miscela di enzimi pancreatici, presenta una potente attività antiipertensiva [24].

Frazione caseinica

La frazione caseinica, fino agli anni recenti, è stata ancor meno caratterizzata della frazione delle siero proteine. In particolare, sono state riportate le sequenze dedotte dal cDNA per le α_{s1} -, β - e κ -caseine di giumenta [25]. La successiva verifica diretta della sequenza dedotta dal cDNA per la β -caseina di giumenta ha evidenziato l'inserzione di un ottapeptide codificato dall'esone 5, che non era presente nella sequenza dedotta dal cDNA [26]. Riguardo le caseine di asina, sono state riportate le sequenze dedotte dal cDNA dell' α_{s2} -caseina [27] e della κ -caseina [28].

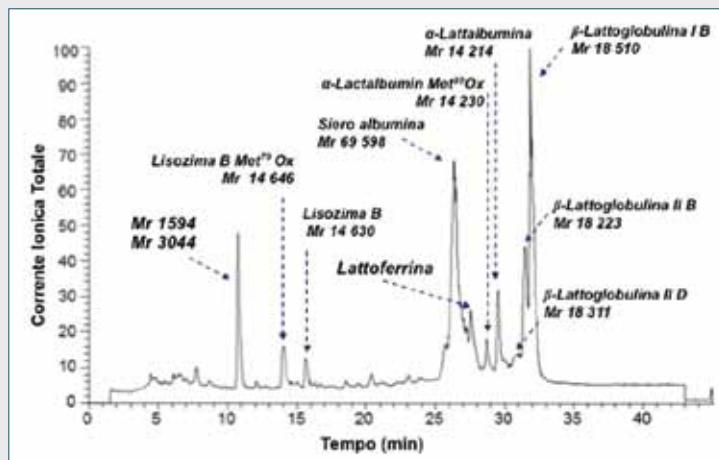


Fig. 1 - RP-HPLC/nESI-MS della frazione delle siero proteine di un campione di latte di asina di un singolo individuo di razza "Ragusana". Cromatogramma ricostruito mediante la corrente ionica totale (TIC)

CHIMICA & SPETTROMETRIA DI MASSA

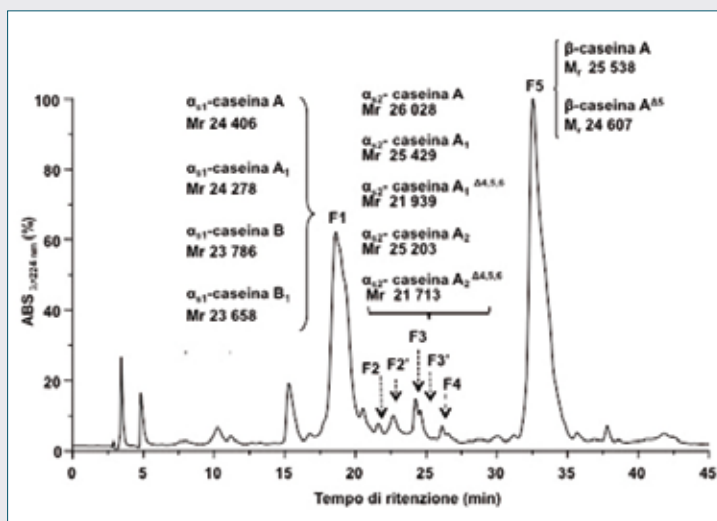


Fig. 2 - Profilo UV ($\lambda=224$ nm) del cromatogramma RP-HPLC della frazione caseinica defosforilata di un latte di asina di un singolo individuo di razza "Ragusana"

Sono state pertanto esaminate le componenti proteiche della frazione caseinica del campione di latte di un singolo individuo di razza Ragusana, separata per precipitazione a pH 4,2. In Fig. 2 è riportata la separazione mediante HPLC delle proteine della frazione caseinica dopo defosforilazione [29]. Lo spettro MALDI del picco HPLC più abbondante, corrispondente alla β -caseina (frazione 5), mostrava la co-eluzione di due componenti con massa molecolare di 24.607 e 25.538 Da. La determinazione della sequenza delle due proteine, effettuata mediante digestione enzimatica con tripsina e Glu-C delle proteine in miscela e analisi dei digeriti mediante HPLC/nESI-MSMS, ha mostrato che le due proteine differivano tra di loro per l'assenza di un ottapeptide nella sequenza più corta, analogamente alle corrispondenti β -caseine di giumenta. Entrambe le sequenze presentano inoltre nove sostituzioni puntiformi rispetto alle corrispondenti sequenze nella giumenta.

Il livello di fosforilazione delle β -caseine è stato determinato mediante HPLC-ESI MS della frazione caseinica non defosforilata. Lo spettro ESI deconvoluto della frazione nelle quali eluiscono le β -caseine mostrava la presenza di tre componenti corrispondenti alla catena più lunga con 5, 6 e 7 gruppi fosfato. Il segnale più intenso era dovuto alla forma con 7 gruppi fosfato. Poiché la sequenza della proteina presenta sette possibili siti di fosforilazione, si può concludere che nella isoforma predominante tutti i sette siti potenziali sono fosforilati. Questo risultato inoltre dimostra che le β -caseine di asina sono più fosforilate di quelle di giumenta, nelle quali l'isoforma predominante presenta cinque gruppi fosforici [26].

Nella frazione F1 del cromatogramma riportato in Fig. 2 coeluiscono le α_{s1} -caseine. Lo spettro MALDI mostrava che la frazione era costituita complessivamente da quattro proteine con M_r attorno a 24.000 Da [30]. Allo scopo di separare i componenti, la frazione è stata ulteriormente risolta mediante elettroforesi bidimensionale, che ha permesso di separare i quattro componenti in due spot contenenti ciascuna due proteine. La determinazione della sequenza mediante

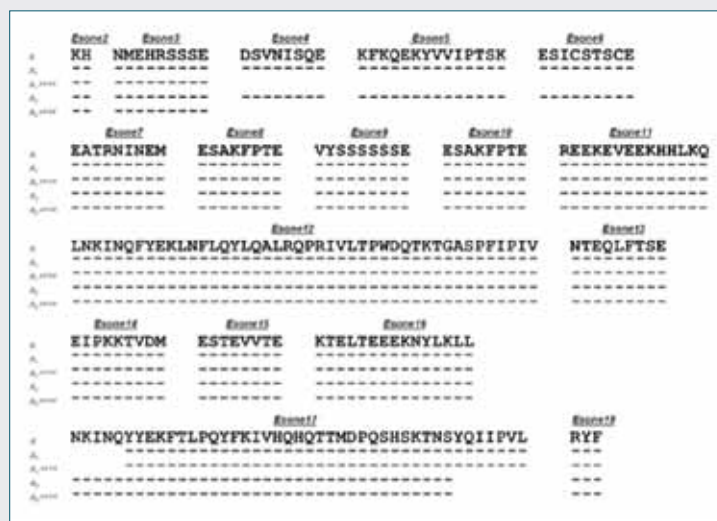


Fig. 3 - Sequenze delle caseine α_{s1} identificate nel latte di asina di un singolo individuo di razza "Ragusana"

digestione in-gel e analisi dei digeriti mediante HPLC/nESI-MSMS mostrava che le quattro isoforme differivano tra loro per l'assenza, in una, di un residuo di glutammina in posizione 88, corrispondente al primo amminoacido codificato dall'esone 11, e di tutto il pentapeptide codificato dall'esone 5. Nella seconda era presente il residuo di Gln 88 ma era assente il pentapeptide, nella terza era assente la Gln 88 ma era presente il pentapeptide, e nella quarta erano presenti sia la Gln88 che il pentapeptide. Inoltre, tutte le sequenze differivano da quella di giumenta per due sostituzioni puntiformi [29].

Una serie di frazioni, comprese tra quella delle α_{s1} -caseine e quella delle β -caseine, era dovuta alle α_{s2} -caseine, per le quali era nota una sequenza dedotta dal cDNA [26]. Questa proteina fu identificata nella frazione F4 in base alla massa molecolare, che coincideva esattamente con quella calcolata in base alla sequenza riportata, e ulteriormente confermata mediante Peptide Mass Fingerprint (PMF) [31]. I componenti presenti nelle frazioni F2, F2', F3 e F4', erano isoforme delle quali sono state determinate le sequenze. Rispetto alla α_{s2} -caseina nota, queste isoforme presentavano l'assenza di tratti di sequenza (Fig. 3). In particolare in una delle isoforme era assente il pentapeptide corrispondente alla parte iniziale dell'esone 17, nella seconda isoforma era assente tutta la sequenza codificata dagli esoni 4, 5 e 6 e il pentapeptide corrispondente alla parte iniziale dell'esone 17. In una delle altre due isoforme era assente un eptapeptide corrispondente alla parte terminale dell'esone 17 e nell'altra tutta la sequenza codificata dagli esoni 4, 5 e 6 e l'eptapeptide corrispondente alla parte terminale dell'esone 17 [30]. Questi risultati mostrano comunque che le caseine α_{s2} sono presenti nel latte di asina anche se in quantità molto basse.

Nel complesso, in tutte le classi di caseine del latte di asina esaminate si osserva la presenza di diverse isoforme, originata da eventi di splicing differenziali di interi esoni o splicing criptico di parte di un esone. Questa caratteristica, riscontrata anche nel latte di giumenta, sembra tipica del latte equino e riflette la complessa struttura di eso-

ni e introni del genoma che codifica le caseine, caratterizzato dalla presenza di numerosi esoni corti che favorisce lo splicing alternativo di tali esoni dal pre-mDNA.

Le componenti minoritarie

Le caseine e le circa 7 più abbondanti proteine del siero non rappresentano l'intero contenuto proteico presente nel latte. Assieme alle proteine più abbondanti sono presenti altre componenti in quantità minori o perfino in tracce. Un'analisi proteomica convenzionale permette di rivelare solo le proteine presenti in quantità superiori al limite di sensibilità delle tecniche d'analisi adottate, mentre quelle minori o in tracce possono non essere rilevate. Per poter rivelare il proteoma "nascosto" è necessario eliminare del tutto o parzialmente le componenti maggiori al fine di aumentare la concentrazione relativa delle proteine minoritarie.

Una tecnologia che si è rivelata particolarmente utile per lo studio del proteoma nascosto è quella basata sull'uso di esche esapeptidiche (librerie di leganti peptidici combinatoriali, CPLL) per catturare i componenti proteici e normalizzare la loro concentrazione. Il principale vantaggio di questa tecnologia è che non solo viene diminuita la concentrazione dei componenti più abbondanti, ma vengono anche concentrati i componenti minori con il risultato finale che le concentrazioni risultano "egualizzate".

Le esche esapeptidiche sono state utilizzate per identificare le proteine minoritarie presenti nel siero del latte di asina dopo precipitazione delle caseine, mediante cattura delle proteine a pH 4,0, 7,2 e 9,3 [32]. L'identificazione dei componenti, effettuata mediante separazione elettroforetica monodimensionale, digestione in-gel e analisi HPLC/nESI-MSMS, ha portato all'identificazione di 106 proteine, delle quali 18 corrispondevano alle proteine maggiori già note, mentre 88 sono state identificate per la prima volta nel latte di asina. A causa del basso numero di sequenze presenti nelle banche dati per l'asino, solo il 10% delle proteine identificate appartenevano al genoma di *Equus asinus*, mentre tutte le altre sono state identificate per omologia con proteine di specie correlate (71% *Equus caballus*, 7% *Homo sapiens*, 3% *Bos taurus*, 9% altri mammiferi). La lista delle proteine identificate è sicuramente incompleta a causa di vari fattori, quali la cattura non totale delle proteine minoritarie da parte delle esche esapeptidiche, l'identificazione non esaustiva delle proteine catturate, dovuta al basso numero di sequenze di *Equus asinus* presenti nelle banche dati e la mancata identificazione delle proteine a basso M_r . Tuttavia, essa rappresenta la lista più completa attualmente disponibile del contenuto proteico del latte di asina.

Variabilità della composizione del contenuto proteico

Poiché i profili delle caseine e delle siero proteine erano stati ottenuti a partire dal latte di un singolo individuo, la composizione determinata riflette il contenuto proteico del particolare latte studiato e non può essere considerata esaustiva della composizione tipica di

questo tipo di latte. Per avere informazioni su quanto fosse costante il profilo determinato è stata condotta un'indagine su 56 campioni di latte individuali, raccolti in Sicilia in allevamenti a Milo, Palermo e Catania, a metà del periodo di allattamento [33]. Le proteine presenti nei 56 campioni sono state separate mediante isoelettrofocalizzazione e le proteine corrispondenti a ciascuna banda elettroforetica individuate mediante digestione in-gel e spettrometria di massa MALDI. Il confronto dei profili elettroforetici mostrava che i campioni potevano essere raggruppati in quattro differenti gruppi. Il gruppo più abbondante era costituito da 36 campioni (corrispondenti al 63%). Il pattern di questi 36 campioni fu quindi preso come riferimento (pattern A). Un unico campione (2%) era caratterizzato dall'assenza di due bande nella frazione caseinica (pattern B), corrispondenti alla caseina α_{s1} , mentre 12 campioni (pari al 21%) presentavano l'assenza di bande sia nella frazione caseinica che in quella delle siero proteine (pattern C). Le bande assenti nella frazione caseinica erano corrispondenti alla caseina α_{s1} , mentre quelle assenti nella frazione delle siero proteine corrispondevano alle varianti B e C della β -lattoglobulina di tipo II. Questi campioni furono classificati come campioni difettivi. Un altro gruppo costituito da 5 campioni presentava invece una banda nella frazione caseinica che non era presente nel pattern di riferimento (pattern D).

L'identificazione della proteina corrispondente a questa banda ha permesso di evidenziare che in tali campioni è presente la β -lattoglobulina di tipo II variante D assieme alla variante C, mentre è assente la variante B. Nel complesso questi risultati, che allo stato attuale costituiscono gli unici dati sul polimorfismo del latte di asina, mostrano che tale latte presenta una rimarchevole eterogeneità. Infatti, una percentuale significativa di individui produce latte in cui è assente la β -lattoglobulina di tipo II mentre in un caso viene prodotto un latte in cui è assente la caseina α_{s1} . Questo polimorfismo meriterebbe di essere indagato dal punto di vista genetico perché, se confermato a livello di DNA, costituirebbe un indice di biodiversità di indubbio interesse, utilizzabile per le strategie di conservazione e di selezione, e permetterebbe di esplorare le possibilità di utilizzo del latte di asina di diversa composizione nella dietoterapia di soggetti allergici. Inoltre questi risultati mostrano che in tutti i campioni esaminati le caseine α_{s2} sono presenti in bassa quantità, tanto da non essere rivelabili nella separazione elettroforetica.

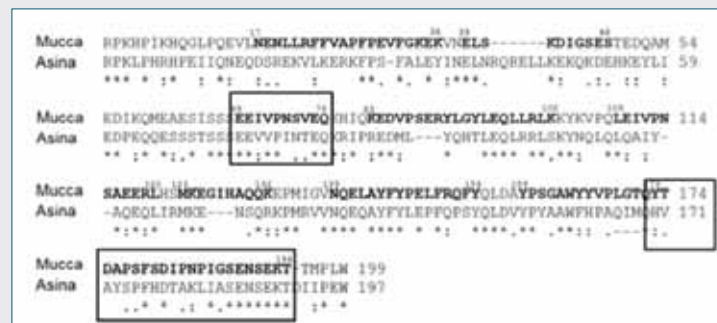


Fig. 4 - Allineamento delle sequenze delle caseine α_{s1} bovina e di asina

CHIMICA & SPETTROMETRIA DI MASSA



Struttura e allergenicità

Le caseine mostrano una marcata assenza di struttura secondaria e terziaria. Esse vengono infatti classificate come proteine reomorfe, in quanto possono adattare la loro conformazione ai cambiamenti delle condizioni dell'ambiente circostante, una caratteristica che può essere attribuita, almeno parzialmente, al contenuto relativamente alto di residui di prolina. Ciò le rende particolarmente suscettibili alla proteolisi e stabili al calore. A causa di questa assenza di rigidità, gli epitopi allergenici di queste proteine sono lineari piuttosto che conformazionali.

La caseina α_{s1} è considerata la proteina maggiormente allergenica tra le caseine di origine vaccina. A seguito di diversi studi, sono stati individuati in questa proteina sei epitopi allergenici maggiori e

tre minori. Tra questi, due sono considerati quelli che più contribuiscono all'instaurarsi di un'allergia permanente.

La conoscenza della sequenza delle caseine α_{s1} di asina permette il confronto con quelle bovine. L'allineamento delle due proteine omologhe mostra che esse hanno un basso grado di identità (41%) e similarità (57%) (Fig. 4). In particolare, si può osservare che le sequenze corrispondenti agli epitopi lineari della caseina α_{s1} vaccina e di asina presentano notevoli differenze. Si deve anche considerare che le caseine α_{s1} di capra e vaccina presentano l'87% di identità e il 93% di similarità e che è stato riscontrato che bambini che soffrono di allergia al latte vaccino sono anche allergici al latte di capra. Pertanto, la considerevole differenza nella struttura primaria delle caseine α_{s1} vaccina e di asina può spiegare la mancata allergenicità di questo latte rispetto al latte di capra per alcuni individui che sono allergici al latte vaccino.

Bibliografia

- [1] F. Adams (translator), *The Genuine Work of Hippocrates*, Vol. 1. Sydenham Society, 1843.
- [2] Pliny the Elder, *Naturalis Historia*. Vol. II, libro XXVIII, J. Bostock, H.T. Riley (translators), Ed. H.G. Bohn, 1893.
- [3] M.C. Curadi *et al.*, Proc. of the Associazione Scientifica Produzioni Animali, XIV congress, Firenze, Italy.
- [4] G. Iacono *et al.*, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 1992, **14**, 177.
- [5] L. Businco *et al.*, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2000, **105**, 1031.
- [6] A. Carroccio *et al.*, *Clin. Exp. Allergy*, 2000, **30**, 1597.
- [7] G. Monti *et al.*, *Ped. Allergy Immunol.*, 2007, **18**, 258.
- [8] D. Vita *et al.*, *Ped. Allergy and Immunology*, 2007, **18**, 594.
- [9] R. Tesse *et al.*, *Italian Journal of Pediatrics*, 2009, **35**, 19.
- [10] A. Conti *et al.*, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 1984, **365**, 1393.
- [11] S. Kaminogawa *et al.*, *Biochemistry International*, 1984, **9**, 539.
- [12] J. Godovac-Zimmermann *et al.*, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 1985, **366**, 601.
- [13] J. Godovac-Zimmermann *et al.*, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 1988, **369**, 171.
- [14] A.K. Sharma *et al.*, *J. Mol. Biology*, 1998, **289**, 303.
- [15] J. Godovac-Zimmermann *et al.*, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 1990, **371**, 871.
- [16] M. Herrouin *et al.*, *J. Protein Chem.*, 2000, **19**, 105.
- [17] A. Conti *et al.*, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 1985, **366**, 601.
- [18] M.G. Giuffrida *et al.*, *Biomol. Chem. Hoppe-Seyler*, 1992, **373**, 931.
- [19] A.K. Sharma *et al.*, *J. Mol. Biology*, 1998, **289**, 303.
- [20] J.X. Ho *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 1993, **215**, 205.
- [21] H. Li, Y. Tang, R. Pingfan, Direct submission in EBML/genebank/DDBJ databases (September 2004).
- [22] H.A. McKenzie, D.C. Shaw, *Biochem. Int.*, 1985, **10**, 23.
- [23] V. Cunsolo *et al.*, *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, 2007, **2**, 1438.
- [24] I.B. Bidasolo *et al.*, *International Dairy Journal*, 2012, **24**, 146.
- [25] T. Lenasi *et al.*, *J. Dairy Res.*, 2003, **70**, 29.
- [26] J-M. Girardet *et al.*, *Proteomics*, 2006, **6**, 3707.
- [27] L. Ramunno, Direct submission in EBML/genebank/DDBJ databases (December 2008).
- [28] S. Hobor *et al.*, Direct submission in EBML/genebank/DDBJ databases (February 2008).
- [29] V. Cunsolo *et al.*, *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, 2009, **23**, 1907.
- [30] V. Cunsolo *et al.*, *J. Mass Spectrom.*, 2009, **44**, 1742.
- [31] R. Saletti *et al.*, *J. Mass Spectrom.*, 2012, **47**, 1150.
- [32] V. Cunsolo *et al.*, *J. Proteomics*, 2011, **74**, 2083.
- [33] A. Criscione *et al.*, *Int. Dairy J.*, 2009, **19**(4), 190.

ABSTRACT

Equidae Milk Proteomics

A systematic investigation of donkey's milk, performed by ESI and MALDI mass spectrometry combined with HPLC and electrophoretic separation techniques, has resulted in an extended characterization of the protein profile of this milk, which is attracting increasing interest as substitute of bovine milk in the diet of allergic individual. Determination of the sequence of the most abundant caseins and whey proteins in donkey's milk opens the possibility to better elucidate its hypoallergenic properties at molecular level.