

INFLUENZA DI DOSI CRESCENTI DI *ZEA MAYS* SUI RAPPORTI ISOTOPICI DI CARBONIO E AZOTO DI RAZIONI UNIFEED E LATTE

Colombari G^{1*}, Zapparoli GA¹, Araldi F¹, Migliorati L², Buttasi C³, Perini M⁴, Bontempo L⁴, Camin F⁴97-112

* *Corrispondenza ed estratti:* gianni.colombari@ersaf.lombardia.it

¹ ERSAF - Ente Regionale per i Servizi all'Agricoltura e alle Foreste - Struttura vigilanza e qualità dell'agroalimentare e supporto alla filiera lattiero-casearia. Via Pilla 25/b, 46100 Mantova.

² Centro di Ricerca per le Produzioni Foraggiere e Lattiero-Casearie - Sede distaccata di Cremona. Via Porcellasco 7, 26100 Cremona.

³ Consorzio Latterie Virgilio Società Agricola Cooperativa. Viale della Favorita 19, 46100 Mantova.

⁴ Fondazione E. Mach – Istituto Agrario di San Michele all'Adige, Centro Sperimentale, Dipartimento Qualità Agro-Alimentare. Via Mach 1, 38010 San Michele all'Adige (TN).

RIASSUNTO – In questo studio è stato valutato l'effetto sui rapporti isotopici $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ della somministrazione crescente di *Zea mays* (silomais e farina) a bovine da latte in due allevamenti della Valle del Po, prendendo in esame i singoli componenti la dieta dell'animale, l'unifeed somministrato e alcune frazioni del latte. Il mais ha presentato tenori di $\gamma^{13}\text{C}$ significativamente superiori a quelli dei foraggi, e tra questi la festuca ha mostrato tenori significativamente più alti di ^{13}C . I valori di $\gamma^{13}\text{C}$ dell'unifeed, della caseina e del grasso del latte sono risultati aumentare linearmente con la percentuale di mais nella dieta. Tra le componenti del latte, la caseina si è dimostrata la più adatta per la verifica della composizione della dieta animale. In base ai risultati ottenuti in questo lavoro, e ai dati della letteratura, si è evidenziato che ogni incremento del 10% in mais della dieta comporta un aumento del $\gamma^{13}\text{C}$ della caseina da 0,7 a 1‰ ed è stato suggerito un valore soglia massimo di -23,5‰ per i prodotti zootecnici da pascolo. Le diverse componenti della dieta animale hanno mostrato diverso tenore di ^{15}N , con soia, loiessa, medica ed orzo a minore tenore, mentre mais, festuca e cotone a maggior tenore di ^{15}N . Il $\gamma^{15}\text{N}$ di caseina e unifeed non è risultato variare con il contenuto di mais nella dieta. D'altra parte il $\gamma^{15}\text{N}$ della caseina ha permesso di differenziare il latte dei due allevamenti, in ragione della presenza di componenti foraggiere a diverso tenore di ^{15}N nelle due diete. I risultati ottenuti, insieme a quelli riportati in letteratura, potranno essere utilizzati per caratterizzare e quindi tutelare latte e derivati lattiero-caseari di origine protetta (DOP), con precise indicazioni circa la composizione della dieta animale (ad es., circa il contenuto di *Zea mays*) o prodotti con valore aggiunto quali quelli ottenuti da animali allevati al pascolo.

Parole chiave: rapporti tra isotopi stabili di carbonio e azoto, mais, dieta animale, latte

ABSTRACT – *Influence of increasing doses of Zea mays on isotopic carbon and nitrogen ratio of the unifeed diets and milk.* – The stable isotope ratios ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) of animal feed and milk were investigated, considering cows stabled in two farms of Po Valley and fed with diets made up of different kinds of forages and different amounts of maize. Maize was characterised by $\gamma^{13}\text{C}$ values significantly higher as compared to the forages, while considering the forages, *Festuca arudinacea* had significantly higher content of ^{13}C . The $\gamma^{13}\text{C}$ values of the overall diet and the $\gamma^{13}\text{C}$ of milk casein and lipids were shown to be significantly correlated with the percentage of maize in the animal diet. The $\gamma^{13}\text{C}$ value of casein was shown to be a suitable parameter for evaluating the amount of maize in the diet: each 10% increase in the maize content corresponded to a shift of 0.7‰ to 1.0‰ in $\gamma^{13}\text{C}$ of casein. A threshold value of -23.5‰ for $\gamma^{13}\text{C}$ in milk casein, above which it is not possible to exclude the presence of maize in the diet was suggested. Among the feed components, soybean, lolium, medicago and barley showed minor content of ^{15}N respect to maize, festuca and cotton. The $\gamma^{15}\text{N}$ values of the overall diet and casein were shown to be not influenced by the amount of maize in the feed. On the other hand, the $\gamma^{15}\text{N}$ values of casein seemed to differentiate the two farms, probably as a consequence of the presence of components with different ^{15}N content in the two rations. The results obtained could be useful for characterising dairy products produced by pastured animals or PDO cheeses with an established amount of maize in the diet.

Key words: stable isotope ratios of carbon, nitrogen, maize, animal diet, milk

EMERGENZA AFLATOSSINE 2003: CONTROLLO DEI FORMAGGI A LUNGA STAGIONATURA PRODOTTI IN EMILIA ROMAGNA

Menotta S^{1*}, Caprai E¹, Masselli M¹, Nocera L², Taus L², Massirio I², Fedrizzi G¹.....113-119

* *Corrispondenza ed estratti:* simonetta.menotta@bs.izs.it

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia ed Emilia Romagna - Reparto di Merceologia degli Alimenti di Origine Animale. Via P Fiorini 5, 40127 Bologna.

² Regione Emilia Romagna - Servizio Veterinario Igiene Alimenti. Via A Moro 21, 40100 Bologna.

RIASSUNTO – Nel 2003 il particolare andamento della stagione agronomica ha causato una forte contaminazione da aflatoxine nelle granaglie destinate all'uso umano e all'alimentazione zootecnica: ciò ha inevitabilmente portato ad un innalzamento dei residui di aflatoxina M1 nel latte causando una situazione di emergenza per la tutela della salute dei consumatori. Per affrontare tale emergenza la regione Emilia Romagna ha impostato un piano di controllo di tutte le aziende produttrici di latte e suoi derivati al fine di individuare situazioni a rischio. Nella regione oltre il 70% del latte è destinato alla caseificazione e l'autorità sanitaria pur permettendo la trasformazione del latte prodotto nei giorni successivi al riscontro di una positività, aveva posto in vincolo cautelativo i corrispondenti lotti di formaggio. In tal modo, in attesa di disposizioni, erano state sequestrate negli stabilimenti circa 8000 forme di formaggio a pasta dura in stagionatura, prodotte nel periodo compreso fra novembre 2003 e dicembre 2004. Nell'agosto 2004 il Ministero della Salute emanava una nota che stabiliva un limite provvisorio di 0,450 µg/kg per i formaggi a pasta dura a lunga stagionatura e che elencava i punti salienti del metodo analitico consigliato e delle modalità di campionamento. In tal modo si è potuto procedere alle fasi successive: per ogni unità produttiva posta in vincolo sono stati prelevati 3 campioni da sottoporre ad analisi secondo criteri stabiliti dai servizi veterinari della Regione. Nel periodo compreso tra dicembre 2004 e febbraio 2005 sono stati analizzati 378 campioni di formaggio appartenenti a 144 lotti. Il 4,8% dei campioni risultava superiore ai limiti provvisori previsti; il 9,3% presentava una concentrazione compresa tra 0,300 e 0,450 µg/kg, il 49,2% tra 0,100 e 0,300 µg/kg e il 36,8% inferiore a 0,100 µg/kg.

Parole chiave: LC-MS/MS, formaggio, aflatoxina M1

ABSTRACT - Emergency during year 2003: control of aflatoxin M1 levels in cheese samples produced in Emilia Romagna region. – During the summer 2003 the particular atmospheric conditions caused the proliferation of aflatoxins (B and G) in cereals and feed. The resulting massive contamination from aflatoxin M1 in cow milk and derivatives cried for a rapid and exhaustive analysis of all Emilia Romagna products. The Regional Authorities started a particular plan to improve the controls of regional cheeses produced between November 2003 and December 2004. In Emilia Romagna region the production of matured cheese is a very important reality, so it was necessary to analyse these products before the merchandising. An LC-MS/MS analytical method was developed and 378 cheese samples were analysed. These samples came from 144 batches of matured cheese that the veterinary authorities abducted because produced with suspected irregular milk. Totally the 95,2% of samples was regular with concentration of aflatoxin M1 lower than 0,45 µg/kg. Thirteen batches of cheese were irregulars: they had one or more cheese with residues of aflatoxin M1 more than 0,450 µg/kg.

Keywords: LC-MS/MS, cheese, aflatoxin M1

Menotta *et al* (2008) *Sci Tecn Latt-Cas*, 59 (2), 113-119

LA FRAZIONE MAGRA RICAVABILE DALLA CENTRIFUGAZIONE DI CREMA DI AFFIORAMENTO È LATTE MAGRO O SOTTOPRODOTTO?

Mucchetti G¹*121-132

* *Corrispondenza ed estratti:* germano.mucchetti@unipr.it

¹ Dipartimento di Ingegneria Industriale. Università degli Studi di Parma. Viale GP Usberti 181/A, 43100 Parma.

RIASSUNTO – Il mercato lattiero caseario nazionale è fortemente condizionato dal peso dei formaggi Grana Padano e Parmigiano-Reggiano che utilizzano per il loro ottenimento latte crudo parzialmente scremato per affioramento spontaneo della crema. La crema risultante è costituita da una frazione grassa e da una frazione magra con composizione uguale al latte magro, quando la crema è correttamente conservata. La burrificazione concentra la frazione grassa della crema e ne separa la frazione magra generando un sottoprodotto, il cosiddetto latticello. Il conferimento al burrificio di creme a basso tenore in grasso genera, quindi, una grande massa di un sottoprodotto di scarso valore, il latticello. La massa del latticello può tuttavia essere ridotta sottoponendo preliminarmente le creme dolci ad una semplice concentrazione, mediante separazione attraverso centrifugazione. Questa operazione può essere fatta dal caseificio o dal burrificio. Concentrando le creme al 75% di grasso si possono recuperare circa 70-75 kg di frazione magra per ogni 100 kg di crema d'affioramento; ciò vuol dire un recupero di disponibilità di oltre 100.000 ton di latte magro. Il significato economico di questa semplice operazione è evidente, ma affinché tale massa di frazione magra della crema possa restare nel circuito lattiero-caseario e non venga dirottata verso altri impieghi meno remunerativi, occorre *in primis* che le creme siano ottenute in modo corretto e funzionale all'utilizzo della frazione magra e quindi che a tale frazione, opportunamente ricavata, sia possibile riconoscere in modo certo la qualifica di latte. *Parole chiave:* latte, crema di affioramento, burrificazione, latticello, frazione magra

ABSTRACT – *The skim fraction obtained by the centrifugation of the naturally separated cream: skimmed milk or by-product?* - The national dairy market is strongly influenced by hard cooked cheeses: Grana Padano e Parmigiano-Reggiano. These cheeses were produced from raw milk partially skimmed by natural creaming. The resulted cream is constituted by fat and a skimmed fraction with the same composition of the partially skimmed milk by natural creaming. The butter making process concentrate the fat fraction and separate a skimmed fraction called traditional buttermilk. As a consequence, the butter making process from low fat cream give rise to a big mass of by-product with poor value, the traditional buttermilk. However, the preliminary concentration of low fat cream by centrifugation can reduce the mass of by-product. This operation can be performed at the cheese factory or at the butter factory. Concentration of low fat cream to 75% of fat permit to recover about 70-75 kg of skim fraction every 100 kg of naturally separated cream. In order to improve economic the value of the skim fraction it is important that this fraction is obtained in a proper manner and that it can be officially recognized as "milk". *Keywords:* milk, naturally separated cream, butter making, traditional buttermilk, skim fraction

VALUTAZIONE DEL FATTORE DI TRASFERIMENTO DI AFLATOSSINA M1 NEI FORMAGGI A PASTA DURA A LUNGA STAGIONATURA E STUDIO DELLA SUA DISTRIBUZIONE NELLA FORMA

Zarenghi L², Fedrizzi G¹, Masselli M¹, Caprai E¹, Ungari D², Gorreri M², Nocera L³, Menotta S^{1*}.....133-139

* *Corrispondenza ed estratti:* simonetta.menotta@bs.izs.it

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia ed Emilia Romagna - Reparto di Merceologia degli Alimenti di Origine Animale. Via P Fiorini 5, 40127 Bologna.

² Azienda USL di Parma - Servizio Veterinario. Via Vasari 13/A, 43100 Parma.

³ Regione Emilia Romagna - Servizio Veterinario Igiene Alimenti. Via A Moro 21, 40100 Bologna.

RIASSUNTO – La contaminazione da aflatoxina M1 del latte nel 2003 ha coinvolto anche la produzione dei formaggi, realtà molto importante per la regione Emilia Romagna. Tre forme di formaggio, di cui era nota la concentrazione del latte con cui erano state prodotte, sono state destinate ad un lavoro sperimentale. Ciascuna forma è stata idealmente suddivisa in quattro anelli concentrici a partire dall'interno: nucleo centrale, mezzo raggio, sottocrosta e crosta. Il materiale è stato omogeneizzato separatamente ed in ciascuna porzione è stata effettuata la determinazione dell'aflatoxina M1 e dell'umidità. Parte del formaggio è stato omogeneizzato *in toto* escludendo la crosta e sono state effettuate le stesse determinazioni. A seguito delle opportune valutazioni statistiche è stata verificata l'omogeneità di distribuzione dell'aflatoxina M1 all'interno del formaggio. Nella seconda fase del lavoro sono stati analizzati 29 campioni di formaggio prodotti con latte non conforme a concentrazione nota e provenienti da 13 caseifici diversi allo scopo di valutare sperimentalmente quale fosse la concentrazione dell'aflatoxina M1 durante la trasformazione del latte in formaggio (coefficiente di trasferimento). Le concentrazioni del latte di partenza erano comprese fra 0,055 e 0,280 µg/kg, quelle delle corrispondenti forme erano comprese fra 0,080 e 0,640 µg/kg. I coefficienti di trasferimento erano compresi fra 0,7 e 7,7. Dai risultati non è stato possibile individuare alcuna correlazione fra le concentrazioni del latte e quelle delle corrispondenti forme. Dal lavoro sperimentale si evince però che il 90,7% dei formaggi analizzati presentava un fattore di concentrazione minore o uguale a 5.

Parole chiave: omogeneità di distribuzione, fattore di trasferimento, formaggio aflatoxina M1

ABSTRACT – *Aflatoxin M1 concentration levels inside cheese samples and evaluation of its distribution between whey and cheese during the production.* – The contamination from aflatoxins (B and G) in cereals during 2003 caused a massive contamination from aflatoxin M1 in cow milk and consequently in milk derivatives. In Emilia Romagna region the production of matured cheese is a very important reality, so it was necessary to analyse these products before the merchandising. These kind of cheese has a long ripening time, its weight is about 30 kg and no informations were about the aflatoxin M1 distribution inside the cheese. As first step of the work the concentrations of aflatoxin M1 in different areas of cheese were analysed. Three different cheeses were subdivided in 4 parts each one from external to internal area (rind, sub-rind, medium area and centre). Each part was analysed separately and aflatoxin M1 concentration was evaluated. In the same time aflatoxin M1 was analysed from a portion of total cheese. By means of statistical evaluations it was possible to set the homogeneous distribution of aflatoxin M1 inside the cheese. The second aim of this work was to know how aflatoxin M1 was transferred from milk to cheese during the production phases and if it would be possible to evaluate which factors influence this aflatoxin M1 repartition. The cheeses product from milk with aflatoxin M1 concentration between 0,055 and 0,280 µg/kg had concentrations between 0,080 and 0,640 µg/kg. The calculated transfer factors were fro 0,7 to 7,7 but 90,7% were lower than 5. No one correlation was detected to explain these differences from cheese to cheese.

Keywords: aflatoxin M1, concentration distribution, cheese

RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI DI CEPPI STARTER E LATTOBACILLI DELLA MICROFLORA SECONDARIA IN GORGONZOLA

Callegari ML^{1*}, Antonucci A¹, Rebecchi A¹

* *Corrispondenza ed estratti*: tel. 0372-499141; fax 0372-499193; marialuisa.callegari@unicatt.it

¹ Centro Ricerche Biotecnologiche- Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore. Via Milano 24, 26100 Cremona.

RIASSUNTO – Nel presente lavoro è stata valutata la presenza di batteri lattici antibiotici resistenti (AR) in 12 Gorgonzola DOP. L'obiettivo dello studio era quello di determinare a livello fenotipico la resistenza dei batteri lattici all'eritromicina, alla tetraciclina e alla streptomina. I risultati ottenuti saranno utilizzati per una successiva indagine a livello genotipico delle determinanti genetiche presenti nei ceppi resistenti. I 12 Gorgonzola sono stati reperiti nella rete di distribuzione lombarda. Le analisi sono state ripetute due volte a distanza di tre mesi. Le conte di lattobacilli e streptococchi sono state ottenute utilizzando Rogosa Agar e M17 rispettivamente. Eritromicina, tetraciclina e streptomina, sono stati aggiunti ai terreni come selettori di crescita dei batteri AR. Gli isolati sono stati identificati sia a livello di specie che a livello di ceppo rispettivamente mediante PCR specie specifica o sequenza del 16SrDNA e RAPD-PCR. La sensibilità agli antibiotici dei lattobacilli e di *S. thermophilus* è stata determinata mediante microdiluizioni in liquido. Le conte dei lattobacilli su Rogosa addizionato di eritromicina variavano da 10⁴-10⁶ CFU/g, su Rogosa con tetraciclina tra 10³-10⁵ CFU/g mentre per i lattobacilli resistenti alla streptomina le conte ottenute variavano da 10²-10⁶ CFU/g. Su M17 addizionato con gli antibiotici considerati sono stati isolati ceppi di *S. thermophilus* e nel Gorgonzola 6 la conta raggiungeva 8 x 10⁶ CFU/g. Le specie più frequenti erano: *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. curvatus*, *L. sakei* e *L. rhamnosus*. La specie predominante era *L. plantarum* mentre *L. sakei* è stato isolato in tre campioni solo al primo prelievo e *L. rhamnosus* in un unico prodotto. In nessun campione sono stati isolati ceppi AR appartenenti alla specie *L. delbrueckii*. La maggior parte dei lattobacilli trovati erano resistenti alla tetraciclina e alla streptomina. Solo sei ceppi sul totale degli isolati erano resistenti alla eritromicina e per quattro di loro la MIC era > 8 µg/mL, mentre per i restanti due ceppi era 4 µg/mL. La maggior parte dei sette ceppi di *S. thermophilus* isolati era resistente alla streptomina e quattro di loro avevano una MIC elevata (≥256 µg/mL). La MIC per la tetraciclina era per quattro ceppi di *S. thermophilus* > 32 µg/mL, mentre per due di loro i valori di MIC erano pari a 8 µg/mL. Indagini ulteriori saranno eseguite per determinare la resistenza a livello genetico, come è suggerito da European Food Safety Authority (EFSA) per la valutazione della sicurezza degli starter ad uso industriale.

Parole chiave: Gorgonzola, batteri lattici, colture starter, antibiotico resistenza

ABSTRACT – *Antibiotic resistances of starter cultures and lactobacilli of the Gorgonzola cheese secondary microflora.* – The antibiotic resistances (AR) of lactic acid bacteria isolated from 12 Gorgonzola cheeses were investigated. The objective was to determine the antibiotic resistances at phenotypic level for erythromycin, tetracycline and streptomycin as a preliminary work for a future investigation of the genetic mechanism of these resistances. The 12 Gorgonzola cheeses were collected on the local market twice at three months interval in order to evaluate the AR lactic acid population in two different productions. Lactobacilli and streptococci were plated on Rogosa and M17 media, respectively. Erythromycin, tetracycline and streptomycin were added to these media in order to select AR strains. Isolates were identified at specie and strain level using specie specific PCR or 16SrDNA sequencing and RAPD-PCR respectively. Lactobacilli and *S. thermophilus* strains were assessed for antibiotic susceptibility using a broth microdilution method. Lactobacilli counts on Rogosa plus erythromycin ranged from 10⁴ to 10⁶ CFU/g, on Rogosa tetracycline from 10³ to 10⁵ CFU/g while on Rogosa streptomycin number of CFU/g ranged from 10² to 10⁶. Antibiotic resistant *S. thermophilus* strains were found and in the Gorgonzola 6 number of CFU/g reached 8 x 10⁶. The species found were: *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. curvatus*, *L. sakei* e *L. rhamnosus*. The more frequent AR specie was *L. plantarum* while *L. sakei* strains were isolated only in three Gorgonzola and *L. rhamnosus* only in one sample. No resistant *L. delbrueckii* strains were detected. The majority of the lactobacilli isolated were found to be resistant to the tetracycline and to the streptomycin. Only six of the total isolates were resistant to erythromycin for four of them MIC was > 8 µg/mL while the remaining two isolates MIC was 4 µg/mL. The majority of the seven *S. thermophilus* isolated strains were resistant to streptomycin and four of them showed an high MIC (≥256 µg/mL). Tetracycline MIC was ε 32 µg/mL for four *S. thermophilus* strains while two of these strains showed a erythromycin MIC of 8 µg/mL. Further investigations will have as objective the determination of antibiotic resistances at the genetic level, as is currently suggested by the European Food Safety Authority (EFSA) for the safety evaluation of the industrial starter strains.

Keywords: Gorgonzola cheese, lactic acid bacteria, culture starter, antibiotic resistance