

# ULTRA-HIGH TEMPERATURE (UHT) MILK STABILITY: ANALYSIS OF SEDIMENT, TOTAL PROTEASE ACTIVITY, TOTAL LIPASE ACTIVITY AND MILK PROTEIN VARIATION

Omar BULGARI<sup>1</sup>, Salvatore SAVINO<sup>1</sup>, Antonio FIERRO<sup>2</sup>, Carmen GIGLIOTTI<sup>1</sup>, Anna Maria CAROLI\*<sup>1</sup>...67-74

\* Corrispondenza ed estratti: [annamaria.caroli@unibs.it](mailto:annamaria.caroli@unibs.it)

<sup>1</sup> Dipartimento di Medicina Molecolare e Traslazionale, Università degli Studi. Viale Europa 11, 25123 Brescia

<sup>2</sup> Centrale del Latte. Via Lamarmora 189, 25124 Brescia

**SUMMARY** - Ultra-high temperature (UHT) milk tends to be unstable during storage. Two types of processes may occur: formation of sediment, a layer of proteinaceous material at the bottom of milk container, and gelation, resulting in the formation of a gel throughout the milk. Bovine milk is a biologically active product, which contains almost sixty endogenous enzymes. From the point of view of milk quality and shelf-life, proteases and lipases are the most important enzymes which deserve particular attention within the UHT process. The aim of this study was to evaluate the total protease activity (TPA) and total lipase activity (TLA) in different milk samples collected during UHT process and storage, and to evaluate the relations with sediment. Two types of UHT milk were collected: whole milk (WM), and partially skimmed milk (PSM). A total of 43 milk batches were analysed at different phases of the UHT process and storage. Colorimetric methods were used for the evaluation of TPA and TLA. Sediment was quantified by a gravimetric method. Data analysis indicates that total enzymatic activities are related with the formation of sediment, but other factors interact with TPA and TLA, making ineffective their use as predictors of milk protein aggregation and precipitation during UHT milk storage. The modification of milk protein profiles as a consequence of different proteolysis mechanisms was also considered. Two UHT batches which were associated with an excess of sediment at 5 months of storage showed a different isoelectrofocusing (IEF) pattern if compared to the other batches. In particular, a band corresponding to para-kappa-casein appeared clearly in milk after 1 month of storage. Thus, IEF profile could be a useful tool for predicting anomalously high sediment in UHT milk.

**Key words:** bovine milk, sediment, protease, lipase, milk protein pattern

**RIASSUNTO** - Stabilità del latte UHT: analisi del sedimento, delle attività proteasica totale, lipasica totale e del profilo lattoproteico - Il latte ultra-high temperature (UHT) tende ad essere instabile durante la conservazione. Possono verificarsi due tipi di processo: la formazione di sedimento, strato di materiale proteico sul fondo del contenitore del latte, e la gelificazione, che si estende a tutto il latte. Il latte bovino è un prodotto biologicamente attivo, che contiene numerosi enzimi endogeni. Dal punto di vista della qualità del latte e della sua conservabilità, le proteasi e le lipasi sono gli enzimi più importanti che meritano particolare attenzione nel processo UHT. Lo scopo di questo studio è stato quello di quantificare l'attività totale delle proteasi (TPA) e delle lipasi (TLA) in diversi campioni di latte raccolti durante il processo di produzione e di conservazione del latte UHT, nonché di valutare le relazioni tra tali attività e la formazione di sedimento.

Sono stati raccolti due tipi di latte UHT: latte intero (WM) e parzialmente scremato (PSM). Sono stati analizzati in totale di 43 lotti di latte in diverse fasi del processo UHT e di stoccaggio. La valutazione di TPA e TLA è stata effettuata mediante metodi colorimetrici. Il sedimento è stato quantificato mediante metodo gravimetrico.

L'analisi statistica dei dati ha evidenziato che le attività enzimatiche sono correlate con la formazione di sedimento, ma che altri fattori interagiscono con TPA e TLA, rendendo inefficace il loro uso come predittori dell'aggregazione e della precipitazione delle lattoproteine durante lo stoccaggio del latte UHT. È stata inoltre considerata la modificazione dei profili lattoproteici come conseguenza di differenti meccanismi di proteolisi. Due lotti UHT che presentavano un'eccessiva formazione di sedimento a 5 mesi di stoccaggio hanno mostrato un diverso profilo di isoelettrofocalizzazione (IEF) rispetto agli altri lotti. In particolare, la banda corrispondente alla para-kappa-caseina è apparsa chiaramente in entrambi i campioni di latte dopo 1 mese di shelf-life. Il profilo IEF potrebbe essere un utile strumento per la previsione della formazione di sedimenti anomali nel latte UHT.

**Parole chiave:** latte bovino, sedimento, proteasi, lipasi, profilo lattoproteico

## CARATTERIZZAZIONE DI COMPOSTI VOLATILI IN LATTE A SEGUITO DI SVILUPPO DI BATTERI PSICROTROFI

Marilù DECIMO\*<sup>1</sup>, María Concepción CABEZA <sup>2</sup>, Juan Antonio ORDÓÑEZ<sup>2</sup>, Milena BRASCA<sup>1</sup>.....75-83

\* Corrispondenza ed estratti: marilu.decimo@ispa.cnr.it

<sup>1</sup> Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, Consiglio Nazionale delle Ricerche. Via Celoria 2, 20133 Milano, Italia

<sup>2</sup> Dipartimento di Nutrizione, Bromatologia e Tecnologia degli Alimenti, Facoltà di Veterinaria. Università Complutense, 28040 Madrid, Spagna

**RIASSUNTO** - I batteri psicrotrofi rappresentano una delle principali cause di deterioramento dei prodotti lattiero-caseari. Tali microrganismi, infatti, seppure siano facilmente distrutti dai trattamenti termici, rilasciano enzimi termoresistenti quali proteasi, lipasi e lecitinasi in grado di influenzare *flavour*, colore e *texture* dei prodotti e, conseguentemente, la loro possibilità di conservazione. Lo studio ha valutato i composti organici volatili (VOCs) rilasciati in latte a seguito dello sviluppo di batteri psicrotrofi con attività lipo-proteolitica mediante microestrazione in fase solida (SPME) accoppiata alla gas cromatografia/spettrometria di massa (GC-MS). Cinque ceppi batterici appartenenti ai generi *Pseudo-monas* e *Serratia*, sono stati inoculati in latte UHT, conservati a 10°C per 20 giorni e analizzati a tempi stabiliti. L'analisi dei dati indica che allo sviluppo di ciascun microrganismo, durante la conservazione del latte, sono associabili profili cromatografici complessi e specifici. In particolare, sono stati identificati 56 VOCs appartenenti ad aldeidi, chetoni, acidi grassi, alcoli, composti solforati e idrocarburi. Generalmente, il numero di VOCs tendeva ad incrementare con il progredire del tempo di incubazione, sia nel latte controllo non inoculato, sia nei campioni di latte contaminati. Tra i VOCs rilevati, alcune molecole sono state individuate solo quando il latte era contaminato da uno specifico ceppo microbico. *P. fragi* ha prodotto il maggior numero di alcoli; *P. rhodesiae* è stata l'unica specie a produrre pentano-2,3-dione, eptano e 3-metilesano ed è stata associata ad un più alto numero di acidi grassi e chetoni insieme a *S. marcescens*. *P. mosselii* è stata la specie maggior produttrice di composti solforati. L'esano è stato rilasciato solo in campioni di latte contaminati con *P. fluorescens*, che ha mostrato la più scarsa produzione di composti volatili.

Parole chiave: latte, psicrotrofi, composti volatili, *off-flavor*, *Pseudomonas*, SPME/GC-MS

**ABSTRACT** - Production of volatile compounds in milk by psychrotrophic bacteria - Psychrotrophic bacteria play a leading role in spoilage of milk and dairy products because, although they are easily destroyed by the heating settings applied by the dairy industry, are able to synthesize thermostable extracellular enzymes (proteases, lipases and lecithinases). The activities of these enzymes lead to formation of off-odours/flavours, color defects, gelation of milk, loss of sensory quality and shortening of the shelf life. Five psychrotrophic strains belonging to *Pseudomonas* and *Serratia* genera were used to inoculate UHT milk samples. The VOCs production of the selected strains was evaluated by SPME gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) after incubation of the contaminated milk samples at 10°C up to 20 days. The results showed a complex and strain-dependent VOC profiles in milk samples during the storage time. Fifty-six VOCs belonging to 7 chemical groups (aldehydes, ketones, fatty acids, esters, alcohols, sulphur compounds and hydrocarbons) were identified. Generally, the VOCs tended to increase during the storage time both in the control and contaminated milk samples. Among the detected volatiles, some molecules were identified only when the milk was contaminated by a specific strain. *P. fragi* produced the greatest diversity of alcohols. *P. rhodesiae* was the only species producing pentane-2,3-dione, heptane and 3-methylhexane and the highest number of fatty acids and ketones together with *S. marcescens*. *P. mosselii* was the strongest sulphur compound-producing species. Hexane was released only by *P. fluorescens*, that provided the lowest development of VOCs.

Keywords: Milk, Psychrotrophs, Volatile compounds, Off-flavors, *Pseudomonas*, SPME/GC-MS

## CONFRONTO SULLA COMPOSIZIONE DEL BURRO ITALIANO, ESTERO E SPERIMENTALE

Elena GUERRA\*<sup>1</sup>, Alessandro GORI<sup>1</sup>, Maria Fiorenza CABONI<sup>1</sup>, Giuseppe LOSI<sup>1</sup>...85-95

\* Corrispondenza ed estratti: elena.guerra5@unibo.it, Tel: +39-(0)547-338117; fax: +39-(0)547-382348

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari(DISTAL), Alma Mater Studiorum - Università di Bologna. Piazza G Goidanich 60, 47521 Cesena (FC)

**RIASSUNTO** - Questo studio è volto ad indagare la composizione in acidi grassi di 42 campioni di burro commerciale prelevato dalla GDO, sia in Italia che all'estero, e di 12 campioni di burro sperimentale, prodotti nella provincia di Reggio Emilia, in zona di produzione del formaggio Parmigiano Reggiano, a partire da latte di bovine alimentate secondo dieta tradizionale integrata, in cui venivano addizionati 300 g capo/giorno di lino estruso. Dal confronto tra il burro commerciale e quello sperimentale si osserva un diverso contenuto di acidi grassi saturi (SFA) ed acidi grassi bioattivi (n3-PUFA, n6-PUFA, CLA), mentre, tra i campioni italiani ed esteri, le differenze non risultano significative. La presenza di una fonte di acidi grassi insaturi (lino estruso) nella dieta delle lattifere consente di modificare la composizione della fase grassa, con ricadute sugli aspetti nutrizionali e sensoriali del latte e dei derivati, con la possibilità per l'industria casearia legata al Parmigiano Reggiano di ottenere sottoprodotti più benefici per i consumatori e quindi con valore aggiunto rispetto agli standard industriali.

Parole chiave: acidi grassi bioattivi, PUFA, burro, fast gas-cromatografia

**ABSTRACT** - Butter composition: a comparative study between Italian and foreign commercial butters and experimental butter - In this research study, the fatty acid composition of 42 European commercial butters and 12 experimental butters produced in the Parmigiano- Reggiano cheese area, Reggio Emilia province, from milking cows fed with the traditional diet supplemented with 300 g/d of extruded linseed, were studied. Compared to European commercial butters, experimental samples showed a lower value of saturated fraction (SFA) replaced by a higher level of bioactive fatty acids (n3-PUFA, n6-PUFA, CLA), while no significant differences between Italian and European butters were observed. These FA contents probably may be related to the unsaturated-lipid supplementation to the diet of dairy cows. Therefore, this industrial research support the possibility for the Parmigiano- Reggiano cheese industry to obtain by-products that may be more beneficial to consumers and with greater added value respect to the industrial standards.

Keywords: bioactive fatty acids, PUFA, butter, fast gas-chromatography

Guerra *et al* (2015) *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 66 (3-4), 85-95

## DETERMINAZIONE DELLA FOSFATASI ALCALINA NEL LATTE: STABILITA' A LUNGO TERMINE DEI CAMPIONI

Elena BUFFOLI<sup>1</sup>, Monica GRAMAGLIA<sup>2</sup>, Anna Maria FERRINI<sup>3</sup>, Nicoletta MARTINELLI<sup>1</sup>, Giuseppe BOLZONI\*<sup>1</sup>  
...97-105

\* Corrispondenza ed estratti: giuseppe.bolzoni@izsler.it, Tel 0039 0302290541

<sup>1</sup> IZSLER - Centro di Referenza Nazionale Qualità Latte Bovina. Via Bianchi 9, 25125 Brescia

<sup>2</sup> IZSPLV - Laboratorio Centro Latte. Via Bologna 148, 10154 Torino

<sup>3</sup> Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio Nazionale di Riferimento per il latte e i prodotti a base di latte. Viale Regina Elena 299. 00161 Roma

**RIASSUNTO** - Con il presente lavoro si fornisce una indicazione circa la stabilità nel tempo dell'attività fosfataseica in campioni di latte crudo e pastorizzato conservati in congelatore a -18 °C. La conservazione è stata protratta per sei mesi, periodo considerato più che sufficiente a simulare le condizioni che si possono verificare nello svolgimento della procedura di revisione di analisi di campioni legali, non conformi, da parte del Laboratorio Nazionale di Riferimento dell' I.S.S. in applicazione della Legge 283/1962 e 441/1963, in tema di sicurezza alimentare. A partire dal 146° giorno, l'attività fosfataseica, eseguita con il metodo fluorimetrico (ISO 11816-1:2013), ha evidenziato un decremento statisticamente significativo, quantificabile tra il 10 e il 20%, rispetto al valore iniziale osservato sul latte refrigerato di partenza. Il calo è risultato più evidente nel latte crudo rispetto a quello pastorizzato. Sulla base dei risultati ottenuti, è stato possibile definire, prudenzialmente, come appropriato un limite massimo di conservazione in congelatore di 90 giorni per garantire risultati analitici affidabili in ambito di controllo ufficiale. Le nostre osservazioni dimostrano che, anche in caso di periodi di conservazione più prolungati, la parziale riduzione dell'attività fosfataseica permette di ottenere risultati analitici relativamente affidabili seppur con opportune interpretazioni in funzione del tipo di campione e dello scopo dell'analisi.

Parole chiave: latte, fosfatasi alcalina, conservazione campioni, latte congelato

**ABSTRACT** - Alkaline phosphatase determination in milk: long term stability of samples - The stability of alkaline phosphatase (ALP) activity in raw and pasteurized milk samples stored at -18 °C was tested over a period of six months to widely cover the maximum time allocated by the Italian Law n° 283/1962 (modified by law n. 441/1963) to National Reference Lab (Istituto Superiore di Sanità), in case of "revisione analisi" (confirmation of results by the NRL on legal samples in case of not compliance with food legislation). Scope of the study was to evaluate the correct extent of time to perform the ALP determination according to ISO 11816-1 in frozen milk samples. The ALP activity decrease in frozen milk samples resulted significant starting from day 146 and was quantified under 10-20% of the initial values (more evident in raw milk). On the basis of these results, a conservative storage limit of 90 days seems to be more appropriate for frozen milk samples stored for this determination in the frame of the official control. Nevertheless, our observations demonstrate that even more prolonged storage periods, regardless of the type of samples analyzed, produced only a partial decrease of ALP activity, allowing in any case the interpretation of the result.

Key words: milk, alkaline phosphatase, frozen milk

Buffoli *et al* (2015) *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 66 (3-4), 97-105

## LA TECNOLOGIA VIS-NIR ONLINE NEL CONTROLLO DEL CONTENUTO DI CROSTA NEL GRATTUGIATO DI PARMIGIANO REGGIANO

Valeria MUSI\*<sup>1</sup>, Andrea FILIPPI<sup>2</sup> ...107-110

\* Corrispondenza ed estratti: tel. 0522-4346999; Fax 0522-435142; v.musi@crpa.it

<sup>1</sup> Centro Ricerche Produzioni Animali, CRPA SpA. Viale Timavo 43/2, 42121 Reggio Emilia

<sup>2</sup> Hellma Italia srl. Via Gioacchino Murat 84, 20159 Milano (distributore accreditato degli spettrometri Zeiss sul territorio italiano)

**RIASSUNTO** - La sperimentazione aveva l'obiettivo di verificare la potenzialità della spettroscopia Vis-NIR online, una tecnica di misura rapida e non distruttiva, nel controllo della percentuale di crosta presente nel grattugiato di Parmigiano Reggiano (PR), al fine di garantire il rispetto del contenuto massimo di crosta (18%) previsto dal disciplinare. Sono stati sottoposti a scansione mediante spettroscopia Vis-NIR un totale di 101 campioni di Parmigiano Reggiano grattugiato contenenti percentuali di crosta variabili dallo 0 al 100%. Dalla elaborazione degli spettri campionati, sono emersi risultati molto confortanti, in quanto la correlazione in cross validazione era elevata (RSECV = 0,97) mentre l'errore medio era contenuto (SECV = 1,68). Si ritiene necessario infoltire la calibrazione con ulteriori campioni al fine di irrobustirla e migliorarla ulteriormente, tuttavia sembrano esserci i presupposti per considerare di trasferire i dati ottenuti in un'applicazione di controllo continuo per il monitoraggio direttamente nelle linee di produzione del grattugiato di PR.

Parole chiave: Parmigiano Reggiano, DOP, grattugiato, crosta, spettroscopia VIS-NIR

**ABSTRACT** - Vis-NIR technology for the control of rind content in grated Parmigiano Reggiano cheese - The experimentation intended to verify the potential of Vis-NIR online spectroscopy, a rapid and non-destructive measurement technique, for the control of the rind percentage in the grated Parmigiano Reggiano cheese, in order to ensure the respect of the maximum content of the rind (18%) required by the production regulations. A total of 101 samples of grated Parmigiano Reggiano cheese containing percentages of rind varying from 0 to 100% were analyzed with Vis-NIR spectroscopy. The elaboration of the collected spectra and of the wet chemistry has revealed results very comforting, because the correlation of the prediction curve in cross validation was high (RSECV = 0.97), while the average error appeared low (SECV = 1.68). It is recommended thicken the calibration with additional samples in order to strengthen and improve it further, however, seem to be the conditions for considering the transfer of data obtained in a control application for continuous monitoring directly in the production lines of the grated Parmigiano Reggiano cheese.

Keywords: Parmigiano Reggiano, PDO, grated cheese, rind, VIS-NIR spectroscopy

Musi e Filippi (2015) *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 66 (3-4), 107-110