

FORMULAZIONE DI UN NUOVO PRODOTTO FUNZIONALE DA LATTE DI CAPRA

Massimo PES*¹, Margherita ADDIS¹, Giacomo LAI¹, Myriam FIORI¹, Antonio PABA¹, Roberta COMUNIAN¹, Stefano FURESI¹, Antonio PIRISI¹.....5-22

* Corrispondenza ed estratti: tel. +39 079 2842389, fax +39 079 389450, e-mail: mpes@agrisricerca.it

¹ Agris Sardegna - Servizio prodotti di origine animale. Località Bonassai S.S. 291, km 18,600, 07040 Olmedo (SS)

RIASSUNTO - L'obiettivo del lavoro è stato quello di realizzare un prodotto a partire da latte di capra, arricchito in elementi nutrizionali a valenza funzionale, con l'aggiunta di batteri probiotici. Il processo di fabbricazione studiato prevede l'utilizzo di latte fortificato, ottenuto miscelando in quantità predefinite: latte di capra intero, latte di capra scremato e/o crema di latte di capra, microparticolato di sieroproteine, olio dell'alga marina *Schizochytrium sp.* ed inulina DP ≤ 20 . Il latte fortificato così ottenuto è stato sottoposto a omogeneizzazione, pastorizzazione e acidificato mediante fermentazione lattica. Il prodotto finale, per effetto della tecnologia applicata, mostra una composizione chimica simile a quella del latte fortificato di partenza: grasso $4,1 \pm 0,1$ g/100g (75% apportato dal latte di capra e il 25% dall'olio di alga, fonte di omega-3, contenente nello specifico: acido docosaesaenoico DHA, 300 mg/100g e acido eicosapentaenoico EPA, 160 mg/100g); proteina $5,0 \pm 0,2$ g/100 g (50% caseina e 50% sieroproteina); inulina $7,0 \pm 0,0$ g/100 g; valore energetico $84,6 \pm 0,8$ kcal/100 g. Tale prodotto possiede specifiche proprietà funzionali derivanti dal maggior contenuto di sieroproteine (170% in più rispetto al latte di capra di partenza), dall'elevato contenuto in omega-3, e dalla presenza di una fibra solubile a valenza prebiotica associata ad una coltura probiotica. Inoltre, il limitato apporto calorico associato al contenuto di proteina (sieroproteina in particolare) e di fibra, potrebbero conferire al prodotto buone proprietà sazianti. Le caratteristiche fisico-chimiche e nutrizionali del prodotto si mantengono inalterate durante la conservazione a 4 ± 1 °C sino a 30 giorni, con una concentrazione della coltura probiotica superiore a $8 \log_{10}$ UFC/g. Il prodotto funzionale così formulato, presenta una consistenza simile ad uno yogurt da bere ed è stato giudicato gradevole al palato, cremoso e non eccessivamente acido. La presenza dell'olio di alga marina, nella dose utilizzata, sembrerebbe non conferire al prodotto sapori e/o odori sgradevoli. Come atteso, il prodotto realizzato soddisfa i requisiti nutrizionali di tre dei "nutrition claims" indicati nel Regolamento (CE) 1924/2006 e successiva modifica (UE) 116/2010: "alto contenuto di proteine", "alto contenuto di fibre" e "ricco di acidi grassi omega-3". Inoltre, il consumo di una porzione di 100 g garantirebbe un'ingestione complessiva giornaliera di cellule vive ad azione probiotica superiore a quella raccomandata dalle Linee Guida sui probiotici e prebiotici del Ministero della Salute.

Parole chiave: latte di capra, prodotto funzionale, sieroproteine microparticolate, probiotici, inulina, omega-3.

ABSTRACT - Development of a functional product from goat milk - The aim of this work was to develop a functional product (PF) obtained by acid coagulation of goat milk enriched with both functional nutrients and probiotic bacteria. This product satisfies the requirements of 3 "nutrition claims": "high protein", "high fibre", "source of omega-3 fatty acids" (according to Regulations EC 1924/2006 and EU 116/2010). The PF was made by mixing predefined amounts of whole milk, skimmed milk and/or cream of milk, microparticulated whey proteins obtained from concentrated whey goat milk, marine alga (*Schizochytrium sp.*) oil and inulin DP ≤ 20 . The enriched milk, previously homogenized and pasteurized, was inoculated with a starter culture. Aroma and probiotic cultures were also added to the milk. The final composition of PF was comparable to the enriched milk, because the process results in lower evaporation and no syneresis: fat 4.1 ± 0.1 g/100 g (75% from goat milk and 25% from the vegetable fat source of omega-3, in particular: docosahexa-enoic acid DHA, 300 mg/100g and eicosapentaenoic acid EPA, 160 mg/100 g); protein 5.0 ± 0.2 g/100 g (50% casein and 50% whey protein); inulin 7.0 ± 0.0 g/100 g; energy value 84.6 ± 0.8 kcal/100 g. PF has specific functional properties resulting from the high content of whey protein (170% more than the goat milk), omega-3 (DHA + EPA) and prebiotic soluble fibre (inulin), combined with a probiotic culture. The physico-chemical and nutritional characteristics of the product remain unchanged during storage at 4 ± 1 °C for 30 days, with a concentration of probiotic culture than $8 \log_{10}$ CFU/g. Therefore, 100 g of PF would provide a daily intake higher than that recommended for probiotics Guidelines of the Italian Ministry of Health. The PF obtained has a smooth texture, liquid consistency similar to yogurt drink, furthermore the presence of marine alga oil did not cause off-flavor.

Keywords: goat milk, functional product, microparticulated whey proteins, probiotics, inulin, omega-3.

RIMOZIONE DELLA AFLATOSSINA M₁ E POTENZIALI APPLICATIVI DI UNA LACCASI DA *PLEUROTUS ERYNGII* PER LA SICUREZZA DEL LATTE

Martina LOI^{1,2*}, Laura QUINTIERI¹, Francesca FANELLI¹, Vania C LIUZZI¹, Miriam HAIDUKOWSKI¹, Antonio F LOGRIECO¹, Giuseppina MULÈ¹.....23-32

* Corrispondenza ed estratti martina.loi@ispa.cnr.it

¹ Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, Consiglio Nazionale delle Ricerche (ISPA-CNR), via Amendola 122/O, 70126 Bari, Italia

² Dipartimento di Economia, Università degli Studi di Foggia. Via Napoli 25, 71122 Foggia, Italia

RIASSUNTO - L'aflatossina M₁ (AFM₁) è il principale metabolita derivante dall'idrossilazione dell'aflatossina B₁ (AFB₁) presente nel latte di animali alimentati con mangimi contaminati da AFB₁ ed è classificato nel gruppo 2B, potenzialmente cancerogeno per l'uomo, dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC). Il livello limite della AFM₁ nel latte crudo, trattato termicamente e destinato alla produzione di prodotti a base di latte è fissato a 50ng/kg dal regolamento europeo numero 1881 del 2006. Essendo resistente ai comuni trattamenti dell'industria alimentare, la presenza di AFM₁ è documentata in tutti i prodotti della filiera lattiero casearia, inclusi yogurt e formaggi, e rappresenta un serio pericolo per la salute. Lo sviluppo di metodi per la riduzione della contaminazione di aflatossine è un tema cruciale e attuale, ed è complicato dalla necessità di preservare le qualità organolettiche e nutrizionali della matrice trattata. In questo lavoro è stata valutata la capacità degradativa di una laccasi da *Pleurotus eryngii* verso l'AFM₁, sia in buffer che in latte, ed il suo effetto sulla componente proteica di questa matrice al fine di verificarne l'applicazione per il miglioramento della sicurezza di prodotti lattiero caseari. La riduzione di AFM₁ in buffer di sodio acetato pH 6,5 1mM, a 25°C, è di ca 50% dopo 1h di incubazione e risulta completa dopo 72h. Simili risultati sono stati ottenuti in latte, sebbene la cinetica di degradazione abbia registrato un rallentamento nelle prime tre ore di trattamento. L'analisi dei pattern proteici in SDS-PAGE ha evidenziato una riduzione nell'intensità delle bande di α e β caseine, di β -lattoglobulina e sieralbumina bovina, contemporaneamente alla comparsa di aggregati proteici di peso molecolare superiore ai 200kDa. I dati presentati dimostrano il potenziale applicativo della laccasi per lo sviluppo di metodologie green di degradazione di AFM₁ in prodotti a base di latte e per applicazioni tecnologiche volte al miglioramento della reologia e alla riduzione della componente allergenica in prodotti lattierocaseari. Parole chiave: sicurezza, latte, laccasi, aflatossina M₁, cross-link di proteine, reologia del latte, allergeni

ABSTRACT - Aflatoxin M₁ removal and potential applications of a laccase enzyme from *Pleurotus eryngii* for milk safety - Aflatoxin M₁ (AFM₁) is the main catabolite deriving from the hydroxylation of aflatoxin B₁ (AFB₁), found in the milk of animals fed with AFB₁ contaminated feeds. The International Agency for the Research on Cancer (IARC) has classified it in group 2B, thus possibly carcinogenic for humans. Their maximum limit in raw milk, heat-treated milk and milk for the manufacture of milk-based products, has been set by the Regulation (EC) 1881 of 2006 to 50ng/kg. AFM₁ resists to the most common treatments of food industry and persists in processed product. Its occurrence has been registered throughout the whole dairy supply chain, including yogurts and cheeses, and it represents a serious risk for humans and animals. The development of mild, green and efficient methods for AFM₁ degradation is an actual and crucial topic. Aflatoxins degradation is difficult to achieve since they must not affect the organoleptic and nutritional qualities of food. In this work we evaluated the activity of a fungal laccase from *Pleurotus eryngii* for the degradation of AFM₁ in buffer solution and in skimmed UHT milk. We also analyzed the effects on the protein pattern of milk in order to evaluate its application for the improvement of the safety of milk based products. AFM₁ degradation in sodium acetate buffer (pH 6.5 1mM at 25°C) was nearly 50% after one hour and complete after 72h. The same trend was registered in skimmed UHT milk, although with a lower rate of degradation, at least during the first three hours of treatment. The analysis of the protein pattern revealed that the intensity of α e β caseins, β -lactoglobulin and bovin sieralbumin electrophoretic bands significantly decreased, while the appearance of protein aggregates of molecular weight higher than 200kDa was detected. These results highlight several potential applications of this laccase for the development of green detoxification methods towards AFM₁ in milk, and also for the improvement of the rheological, emulsifying and allergenic properties of milk and dairy products.

Keywords: safety, milk, laccase, aflatoxin M₁, protein cross-linking, milk texture, allergenicity

STUDIO DELLA BIODIVERSITÀ DEL MICROBIOTA DEL LATTE BOVINO PER LA VALORIZZAZIONE DELLE RAZZE AUTOCTONE ITALIANE

Paola CREMONESI^{1*}, Federica RIVA², Maria Filippa ADDIS³, Lauretta TURIN², Claudia POLLERA², Marco SEVERGNINI⁴, Joel FILIPE², Dario CALONZI¹, Giulio CURONE², Daniele VIGO², Paolo MORONI², Valerio BRONZO², Bianca CASTIGLIONI¹...33-39

* Corrispondenza ed estratti: cremonesi@ibba.cnr.it

¹ Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria - C.N.R., SS-Lodi, via Einstein s/n, 26900 Lodi.

² Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Medicina Veterinaria, via Celoria 10, 20133 Milano.

³ R&D - Proteomics Lab, Porto Conte Ricerche S.r.l., S.P. 55 Porto Conte - Capo Caccia, Alghero.

⁴ Istituto di Tecnologie Biomediche - C.N.R., via Fratelli Cervi 93, 20090 Segrate.

RIASSUNTO - Una migliore conoscenza della qualità e delle caratteristiche del latte prodotto da razze autoctone risulta necessaria ai fini della loro valorizzazione. In questi ultimi anni, si è intensificato l'interesse per lo studio della composizione della comunità batterica presente nel latte (il cosiddetto microbiota) per l'impatto che i microrganismi presenti possono avere sia sulla salute dell'animale sia sulla qualità e la sicurezza dei prodotti lattiero-caseari. Ricerche preliminari condotte sul microbiota mammario delle principali specie di ruminanti (bovina, ovi-caprina, bufalina) hanno messo in evidenza come nel latte crudo sia presente una comunità microbica complessa, la cui composizione è influenzata sia da fattori endogeni, sia esogeni. Il presente studio mira, quindi, a comprendere le differenze nei meccanismi di interazione del microbiota del latte in bovine di razza Rendena e Frisona Italiana. A tal fine, è stata confrontata la composizione microbica del latte di tre bovine di razza Rendena con quella di tre bovine di razza Frisona Italiana, appartenenti allo stesso allevamento e sottoposte allo stesso regime gestionale. Sono stati raccolti campioni di latte dai singoli quarti degli animali a quattro diversi tempi: alla messa in asciutta (T1), il giorno del parto (T2), 7-10 giorni dal parto (T3) e 30 giorni dal parto (T4). Per verificare lo stato di salute della ghiandola mammaria sui campioni di latte è stata eseguita la conta delle cellule somatiche e l'analisi batteriologica. Dopo aver estratto il DNA dai campioni di latte, il gene 16S rRNA (regione V3-V4) è stato amplificato seguendo il protocollo standard di preparazione delle librerie Illumina e sequenziato mediante piattaforma Miseq. L'analisi batteriologica ha mostrato l'assenza di microrganismi contagiosi nel latte in entrambe le razze. Nella razza Rendena, il phylum predominante è risultato *Firmicutes* (94%), mentre nella razza Frisona Italiana il microbiota è risultato composto da *Firmicutes* (65%), *Proteobacteria* (15%), *Actinobacteria* (11%) e *Bacteroidetes* (6%). L'analisi condotta a livello di genere nella Rendena ha mostrato la netta prevalenza di *Streptococcus*, seguita da *Lactobacillus* e *Pediococcus*, mentre nella Frisona sono stati osservati come generi prevalenti *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium* e *Staphylococcus*. Per quanto riguarda le specie del genere *Streptococcus* presente, è stata osservata una differenza significativa fra la razza Rendena, dove il 51.6% degli streptococchi è costituito da *Streptococcus thermophilus*, batterio lattico utilizzato nella produzione di lattici fermentati, yogurt e formaggi, e la razza Frisona dove lo *Str. thermophilus* rappresenta solo l'1.72% degli streptococchi totali osservati. L'avvento di tecnologie high-throughput in grado di fornire un quadro completo della composizione microbica del latte consente una maggiore conoscenza delle caratteristiche di questi animali autoctoni, promuovendone l'allevamento e salvaguardandone, così, la biodiversità.

SUMMARY - Study of bovine milk microbiota biodiversity in autochthonous Italian breeds - In order to valorize the autochthonous cow's milk, a better knowledge of its quality and features is requested. In the last few years, a large interest in the milk microbiota composition has emerged, due to the impact that the microorganisms might have on the health status of animals, on public health and on quality of the dairy products. Preliminary data on the mammary microbiota of ruminants (cow, small ruminant and buffalo) showed that raw milk harbors a complex community of microbes affected by both endogenous and exogenous factors. The present study aims to better understanding the differences in the composition of the milk microbiota between Rendena and Italian Friesian breeds. The microbial composition of milk collected from three Rendena and three Italian Friesian cows from the same farm and with the same management was compared. Quarter samples were collected from each cow at different time points: dry off (T1), calving (T2), 7-10 days after calving (T3) and 30 days after calving (T4). We analyzed somatic cell count (SCC) and bacteriological cultures for each quarter. For the microbiome analysis, bacterial DNA was extracted from each quarter using a previously described protocol with minor modifications, and the 16S rRNA gene (V3-V4 region) was analyzed by Miseq (Illumina). Bacteriological analysis showed the absence of contagious bacteria in both breeds. The predominant Rendena's phylum was *Firmicutes* (94%). In Friesian, milk microbiota was more complex with *Firmicutes* (65%), *Proteobacteria* (15%), *Actinobacteria* (11%) and *Bacteroidetes* (6%). The analysis at the genus level showed that in Rendena cows the main microorganisms were *Streptococcus*, *Lactobacillus* and *Pediococcus*, whereas in Italian Holstein Friesian *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium* and *Staphylococcus* were found. Regarding the species of the *Streptococcus* genus, we demonstrated a significant difference between the two breeds. Indeed, in Rendena cows

51.6% of the *Streptococci* was represented by *Str. thermophilus*, a lactic acid bacterium widely used in the fermentation of dairy products (fermented milks, yogurt, different cheeses), that in Friesian cows represented only 1.72% of the observed *Streptococci*. The advent of high-throughput technologies for milk analysis can provide a detailed insight into the bacterial composition, increasing the knowledge of the factors and the microorganism interactions that could influence milk quality and promote breeding and biodiversity. Keywords: Friesian, Rendena, milk, microbiome, next generation sequencing.

Cremonesi *et al* (2016) *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 67 (1-2), 33-39

SOSTITUZIONE DEL LIQUIDO DI GOVERNO DELLA MOZZARELLA CON SIERO ALGINATO

Silvia de CANDIA^{1*}, Federico BARUZZI¹, Leonardo CAPUTO¹, Laura QUINTIERI¹...41-49

* Corrispondenza ed estratti: silvia.decandia@ispa.cnr.it; tel. (+39) 0805929384

¹ Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA)-CNR

RIASSUNTO - La qualità e la shelf-life della mozzarella tradizionale è correlata ai cambiamenti della composizione chimico-fisica e microbiologica del liquido di governo, nel quale si riversano zuccheri, peptidi e sali minerali provenienti dalla mozzarella. Il liquido di governo, normalmente costituito da acqua e sale, si trasforma così in un substrato di crescita in cui proliferano differenti popolazioni microbiche, incluse quelle alterative e patogene. Ne deriva che il controllo microbiologico del liquido di governo rappresenta uno dei fattori principali per la salubrità e la shelf-life della mozzarella durante la fase di conservazione e distribuzione. Una delle possibilità per contrastare l'alterazione della mozzarella è rappresentata dall'utilizzo di un siero a composizione definita e costante. Nel presente lavoro il liquido di governo di bocconcini di mozzarella è stato sostituito con soluzioni di siero neutralizzate, pastorizzate e gelificate differenti concentrazioni di alginato di sodio (siero-alginato). Le mozzarelle, conservate a 4°C per 25 giorni, sono state valutate per i parametri reologici, chimici e microbiologici. I risultati non hanno evidenziato significative variazioni di pH del siero-alginato fino a 7 giorni di frigoconservazione. A differenza del liquido di governo che tende ad acidificarsi raggiungendo valori di pH pari a 5,75 già al settimo giorno di frigoconservazione, il siero-alginato ha mostrato maggiore stabilità mostrando simili valori di pH dopo 17 giorni (5,96); trend di acidificazione simili sono stati registrati anche nelle rispettive mozzarelle. Le mozzarelle in siero-alginato hanno registrato una minore deformazione e più elevate percentuali di recupero quando sottoposte a sforzo meccanico, rispetto ai valori registrati per le mozzarelle controllo. Inoltre, le mozzarelle controllo rilasciavano circa il 5% in più del liquido al settimo giorno di frigoconservazione, rispetto alle mozzarelle conservate in siero alginato probabilmente a causa dell'assorbimento di liquido di governo all'interno della matrice caseinica. I dati microbiologici non hanno rivelato significative differenze tra i campioni in liquido di governo e quelli in siero alginato, sia nelle cinetiche che nei valori della popolazioni microbiche analizzate. I risultati ottenuti in questo lavoro, sebbene preliminari, dimostrano che il siero-alginato può essere utilizzato come metodo di conservazione alternativo al liquido di governo per stabilizzare almeno i parametri strutturali e chimici della mozzarella. Inoltre, l'implementazione in caseificio di tale metodo di conservazione, favorirebbe il parziale riutilizzo del siero riducendo gli onerosi costi del suo smaltimento.

SUMMARY - Replacement of Mozzarella cheese governing liquid with whey-alginate - Quality and shelf-life of traditional mozzarella cheese is related to physical-chemical and microbiological changes of governing liquid in which this cheese is dipped. The enrichment of the governing liquid with different nutrients (e.g. sugars, peptides and minerals) leads to increase microbial load and reducing shelf life of cold stored Mozzarella cheese. In the present work, the governing liquid of mozzarella cheese was replaced with sweet whey enriched with different amounts of sodium alginate (whey-alginate). Mozzarella cheese samples were stored at 4 °C for 25 days, monitoring microbiological physico-chemical and texture parameters. The preliminary results obtained in this work show that the whey-alginate can be exploited as a valuable method to extend shelf-life of the mozzarella cheese in term of structural and chemical characteristics.

de Candia *et al* (2016) *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 67 (1-2), 41-49