

• TRASFERIMENTO DELL'AFLATOSSINA M1 IN ROBIOLA E PRIMOSALE

# Dal latte al formaggio aflatossine sotto controllo

Le prove hanno avuto l'obiettivo di verificare in che misura la concentrazione di aflatossine nel latte si trasferisce al formaggio: il latte contaminato nei limiti di norma (50 ppt) dà origine a formaggi contaminati al di sotto dei limiti precauzionali (450 ppt)

di G. Borreani, E. Tabacco, L. Cavallarin, S. Antoniazzi, D. Manassero, C. Zanoni, D. Giaccone

**L**a ricorrenza di annate agrarie calde e siccitose negli ultimi 10 anni ha posto l'esigenza di affrontare il problema della contaminazione da aflatossina del latte prodotto nella Pianura Padana con un approccio di filiera dal campo alla trasformazione. Infatti, come è noto, parte dell'aflatossina B1 (AFB1) ingerita con alimenti contaminati è trasformata a livello della ghiandola mammaria e trasferita nel latte nella sua forma AFM1 (Munksgaard *et al.*, 1987).

Come l'aflatossina B1, anche l'M1 è una molecola tossica, classificata dallo Iarc (International agency for research on cancer) come «potenzialmente cancerogena per l'uomo» (classe 2A). Il tasso di passaggio (*carry-over*) dell'aflatossina M1 nel latte risulta essere correlato prevalentemente a due fattori: livello produttivo degli animali e fase di lattazione. Negli allevamenti con produzioni superiori a 30 kg/capo giorno il tasso di *carry-over* risulta essere intorno al 4% dell'aflatossina B1 ingerita (3,7% con vacche che producono 35 kg/giorno) (Veldman *et al.*, 1992).



L'aflatossina B1 viene trasformata dall'animale in M1 e passa nel latte dopo 4 ore dall'ingestione

Il tasso di passaggio nel latte è del 4% dell'aflatossina ingerita per vacche con produzione di 30 kg/giorno

Il tasso di passaggio dipende da:  
• livello produttivo  
• fase di lattazione

L'aflatossina B1 dai foraggi passa alla vacca

COME SI SVILUPPA ASPERGILLUS

## Condizioni ottimali

Le aflatossine sono dei metaboliti secondari prodotti da funghi filamentosi del genere *Aspergillus* e, in particolare, da *A. flavus* e *A. parasiticus*. Essendo *A. flavus* un fungo da ambienti tropicali predilige alte temperature ambientali e si insedia prevalentemente su colture in stato di stress. La suscettibilità della coltura del mais quando si verificano condizioni di stress associata all'ubiquità di questi funghi (vivono sui residui colturali di molte piante) fanno sì che si possano trovare livelli di B1 rilevanti nella granella e negli insilati di mais (Borreani *et al.*, 2003; Borreani e Tabacco, 2004).

Infatti, le temperature ottimali di sviluppo di questo fungo sono intorno ai 35 °C, con minimo 15 °C e massimo 44 °C. Il ricorrere di annate agrarie calde ha accentuato il problema della contaminazione della coltura già in campo, spesso per la concomitanza di alte temperature (periodi con temperature comprese tra 27 e 38 °C), alti valori di umidità relativa (85%) associate a carenza idrica e a stati di forte stress del mais, predisponendo le colture all'infestazione da *Aspergillus*, con la produzione di aflatossine.

Le infezioni da *A. flavus* e *A. parasiticus* avvengono attraverso le setole della spiga, quando queste sono ingiallite ma ancora umide, o in associazione con danni da insetti o da uccelli direttamente sulle cariossidi in sviluppo. Quando intervengono condizioni di stress dovute alla siccità o alle alte temperature, può accadere che il fungo produca aflatossina durante la crescita della pianta. In queste situazioni il mais sia da granella sia da trinciato risulterà contaminato da aflatossina B1 già alla raccolta.

Poter prevedere e stabilire a livello di filiera quando si verificano le condizioni climatiche di sviluppo e contaminazione della coltura del mais, che contribuisce all'alimentazione dei bovini da latte delle aziende intensive della Pianura Padana per oltre il 50% della sostanza secca ingerita, diventa strategico per poter prevenire gli ingenti danni economici e di immagine che si riversano sull'intero settore lattiero-caseario. •

## Due caseificazioni tipiche piemontesi

### LAVORAZIONE

#### LATTICA FRESCA A LATTE CRUDO

**ROBIOLA.** Il latte è stato riscaldato a 25 °C ed è stato aliquotato in due contenitori (12 L/contenitore) per realizzare le due tesi sperimentali: latte non trattato (Tq), latte con aggiunta di 40 ppt di aflatoxina M1 (T50). Le due tesi poi sono state lavorate come riportato di seguito e il procedimento è stato ripetuto per 3 volte per ogni tesi.

Al latte è stato aggiunto un fermento mesofilo eterofermentante (1 unità per 100 L di latte) ed è seguita una sosta di 4 ore a temperatura ambiente per permetterne l'attivazione e l'inizio dell'acidificazione del latte. Successivamente si è proceduto all'aggiunta del caglio (caglio animale liquido (80:20) 1:10.000, alla dose di 15 mL/100 L) e alla fase di coagulazione, a 25 °C per 24

ore. Nella fase successiva di estrazione si è proceduto al taglio a dimensioni di circa 2 x 2 cm della cagliata e all'estrazione con mestolo. La cagliata così estratta è stata formata in fascelle, sottoposta a 4 rivoltamenti, salata e stoccata a 4 °C. Dopo 12 ore si è provveduto a un'ulteriore salatura e infine al campionamento delle forme ottenute. Per ogni tesi sono state ottenute 8 forme, che sono state campionate, sigillate in contenitori sottovuoto e poste in congelatore fino al momento delle analisi.

#### LAVORAZIONE PER FORMAGGIO FRESCO A COAGULAZIONE PRESAMICA

**PRIMOSALE.** Il latte è stato riscaldato a 40 °C ed è stato aliquotato in due contenitori (10 L/contenitore) per realizzare le due tesi sperimentali: latte non trattato (Tq), latte con aggiunta di 40 ppt di aflatoxina

M1 (T50). Le due tesi poi sono state lavorate come riportato di seguito e il procedimento è stato ripetuto per 2 volte per ogni tesi. Al latte è stato aggiunto un fermento termofilo omofermentante, lasciato attivare per 50 minuti. Successivamente è stato aggiunto il cloruro di sodio al latte alla dose di 0,7% sul tal quale.

Si è quindi proceduto all'aggiunta del caglio (liquido 1:10.000, alla dose di 40-50 mL/100 L) e alla coagulazione per 35-40 minuti. La cagliata è stata estratta e formata negli stampi e successivamente sottoposta a rivoltamenti veloci (3 rivoltamenti in 15 minuti). Le forme sono state lasciate a maturare per 2 ore e quindi poste a 4 °C. Le forme così ottenute (8 per tesi) sono state poi campionate, sigillate in contenitori sottovuoto e poste in congelatore fino al momento delle analisi. •

## Un progetto di filiera

Un progetto di filiera finanziato dalla Regione Piemonte (Assessorato all'ambiente, qualità e agricoltura) ha coinvolto, tra il 2006 e il 2008, enti piemontesi della ricerca (Dipartimento di agronomia, selvicoltura e gestione del territorio dell'Università di Torino e Istituto di scienze delle produzioni alimentari del Cnr), associazioni di produttori (Associazione regionale produttori latte Piemonte, Associazione regionale allevatori del Piemonte), nonché alcuni caseifici e centri di raccolta che lavorano complessivamente circa 700.000 t di latte all'anno raccolti da 284 aziende zootecniche conferenti. Il progetto ha previsto principalmente due fasi: una fase di monitoraggio del livello di contaminazione da aflatoxina M1 del latte piemontese prodotto nell'arco degli ultimi due anni e una seconda fase di studio del trasferimento dell'M1 dal latte al formaggio, in due caseificazioni tipiche piemontesi.

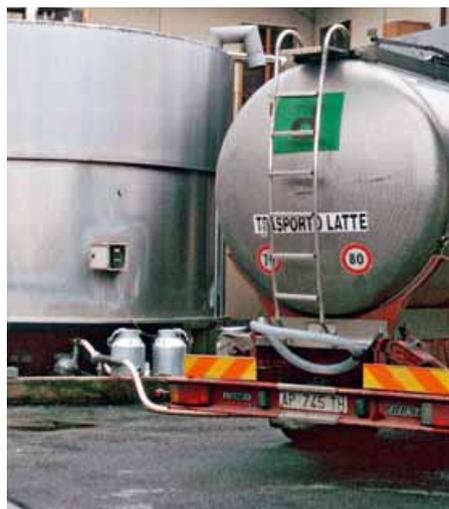
Il monitoraggio delle cisterne ha permesso di: comprendere l'evoluzione della problematica della contaminazione da aflatoxina M1 del latte; individuare i periodi dell'anno più critici; identificare alcune aziende «caso di studio» per approfondire le cause di presenza nel latte.

I dati raccolti nell'ambito del progetto sono stati integrati con quelli disponibili dal 2001 al 2005 per poter comprendere meglio la dinamica del problema in

alcune annate agrarie caratterizzate da diversi andamenti climatici. In *tabella 1* sono riportate le frequenze delle classi di contaminazione di oltre 6.000 campioni analizzati.

## L'influenza della stagione produttiva

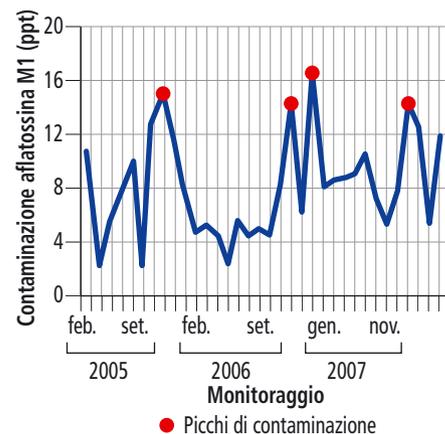
La variazione stagionale del contenuto in aflatoxina M1 nel latte, di cui si riporta l'evoluzione nei tre anni di sperimentazione (*grafico 1*), è stata studiata su alcuni centri di raccolta piemontesi (monitorati dal 2005 al 2007).



I picchi di contaminazione da aflatoxine si verificano in autunno-inverno

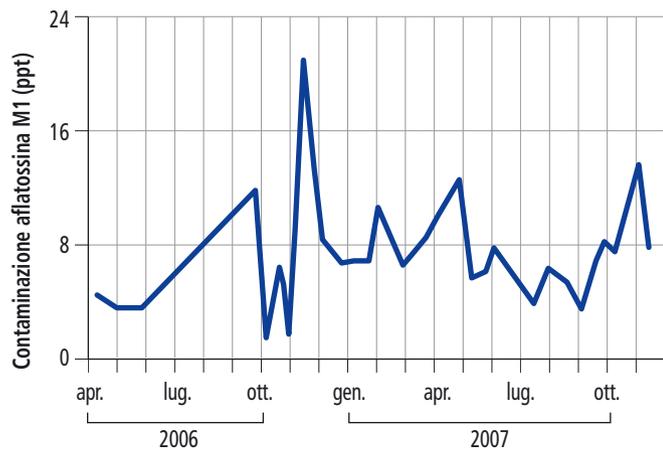
**TABELLA 1 - Suddivisione in classi di contaminazione da aflatoxina M1 (%) di 6.000 campioni di latte piemontese (2001-2007)**

Anno	Campioni (n.)	Classi di contaminazione (ppt)			
		0-10	10-20	20-50	> 50
2001	304	82,2	11,8	5,6	0,3
2002	416	74,8	13,0	8,4	3,8
2003	1.779	36,7	18,3	29,3	15,7
2004	1.528	23,6	26,0	38,1	12,3
2005	517	61,5	25,0	10,4	3,1
2006	689	72,6	19,3	6,5	1,6
2007	811	74,2	17,0	4,8	3,9
<b>Media</b>	-	<b>60,8</b>	<b>18,6</b>	<b>14,7</b>	<b>5,8</b>



(\*) Monitorati nei tre anni di sperimentazione.

**GRAFICO 1 - Evoluzione della contaminazione media mensile del latte di massa dei centri di raccolta (\*)**



**GRAFICO 2 - Evoluzione della contaminazione del latte di massa di uno dei centri di raccolta (campagne 2006 e 2007)**



**TABELLA 3 - Caratteristiche qualitative e livello di contaminazione con aflatoxina M1 del latte tal quale utilizzato per le due caseificazioni**

	Latte caseificato a	
	robiola	primosale
Grasso (%)	3,82	3,62
Proteine (%)	3,41	3,43
Lattosio (%)	4,82	4,81
Cellule somatiche (n./mL)	245.500	318.000
Urea (mg/dL)	28,64	32,84
Caseina (%)	2,67	2,73
Inibenti	assenti	assenti
Aflatossina M1 (ppt)	5,0	5,2

I picchi di contaminazione si verificano in concomitanza con il cambio della campagna maidicola (mesi di settembre e ottobre) che, in molte aziende conferenti, coincide anche con l'apertura dei nuovi silos. Nel grafico 2 è riportata, a titolo di esempio, l'evoluzione della contaminazione media del latte di massa di uno dei centri studiati per gli anni 2006-07 e il corrispondente valore della cisterna più contaminata.

## Aflatossina M1 dal latte ai formaggi

La normativa fissa a valori inferiori a 50 ng/kg (ppt) i contenuti massimi di aflatoxina nel latte dei Paesi dell'Ue e della Svizzera (tabella 2), mentre nei formaggi i limiti sono differenziati nei diversi Paesi, per l'Italia tale valore è provvisorio ed è 9 volte superiore a quello del latte, per i formaggi stagionati a pasta dura. Per contro, negli Stati Uniti il limi-

**TABELLA 2 - Limiti di legge per la contaminazione da aflatoxina M1 in latte, formaggi e burro in diversi Paesi**

	Limiti massimi (ppt o ng/kg)		
	latte	formaggi	burro
Italia	50	450 (*)	50
Austria	50	250	20
Svizzera	50	250	20
Olanda	50	200	20
Usa	500	-	-

(\*) Formaggi a pasta dura e filata.

In Ue i contenuti massimi di aflatoxine nel latte sono uguali nei vari Paesi; per i formaggi in Italia il limite è 9 volte superiore a quello del latte.

te di presenza di aflatoxina M1 nel latte è di 500 ppt, mentre non ci sono limiti normati per le produzioni casearie.

Questa apparente discrepanza è da attribuire alle differenti abitudini alimentari e alle differenti tipologie di produzioni lattiero-casearie tra le due realtà geografiche, specialmente per quanto riguarda i formaggi stagionati. A causa dell'affinità dell'aflatossina M1 per la componente caseinica del latte, durante i processi di caseificazione con latte contaminato, l'aflatossina si ripartisce tra cagliata e siero, ma l'associazione con la caseina causa una più elevata concentrazione nel formaggio rispetto al latte utilizzato.

I fattori di arricchimento calcolati vanno da 2,5-3,3 per i formaggi teneri a 3,9-5,8 per i formaggi duri (Pietri *et al.*, 2004). Per quanto riguarda le produzioni casearie italiane, le informazioni disponibili a questo proposito sono relative soprattutto al processo di produzione del Grana Padano (Piro *et al.*, 2004), ma non esistono attualmente dati in proposito sulle principali produzioni casearie piemontesi (dop e tipiche). Il progetto si è proposto di verificare in che misura avvenga la concentrazione utilizzando due tecnologie di caseificazione tipiche piemontesi.

## Le prove di caseificazione

Per definire un «indice di concentrazione» dell'aflatossina M1 in alcuni formaggi freschi piemontesi a coagulazione presamica e a coagulazione acida si è

provveduto alla realizzazione di prove sperimentali di caseificazione con latte contaminato sia naturalmente sia artificialmente a concentrazione nota.

I risultati riportati riguardano due lavorazioni realizzate con latte contaminato a due livelli: contaminazione naturale (circa 5 ppt) e contaminazione artificiale (circa 50 ppt). Le due lavorazioni conside-

rate sono state: lattica fresca (tipo Robiola) e presamica di formaggio fresco (tipo Primosale), entrambe su latte crudo.

I livelli di contaminazione da aflatoxina

M1 scelti rappresentano, per quanto riguarda il valore inferiore, una contaminazione media del latte piemontese in un'annata favorevole, mentre, per quanto riguarda la seconda concentrazione individuata il limite massimo di contaminazione fissato per il latte a livello europeo.

Il latte utilizzato per le lavorazioni sopra descritte è stato raccolto in un'azienda zootecnica che alleva vacche di razza Frisona della provincia di Torino, la cui analisi media è riportata in tabella 3. La contaminazione naturale del latte alla

*I picchi di contaminazione si verificano in concomitanza con il cambio della campagna maidicola*


**LIMITI DI AFM1  
IN ITALIA**

Latte	50 ppt
Formaggio	450 ppt

**TABELLA 4 - Contaminazioni medie di aflatoxina M1 in latte e formaggi e relativi indici di concentrazione nelle due lavorazioni**

	Tipo di contaminazione (*)	Aflatoxina M1		Indice di concentrazione
		nel latte (ppt)	nel formaggio (ppt)	
Primosale	Tq	5,2	12,5	2,4
	T50	45,8	63,5	1,4
Robiola	Tq	5,0	22,8	4,1
	T50	47,4	77,5	1,6

(\*) Tq = contaminazione naturale; T50 = contaminazione artificiale a 50 ppt.

stalla, determinata in HPLC, è risultata essere pari a circa 5 ppt.

La contaminazione artificiale del latte a 50 ppt è stata effettuata miscelando al latte una dose opportuna di soluzione standard di aflatoxina M1 a concentrazione nota. La somma delle contaminazioni naturale e artificiale ha dato luogo a latte contaminato rispettivamente a 45,8 e 47,4 ppt nella prova di caseificazione a Robiola e

a Primosale. Le caseificazioni e le analisi sono state condotte come meglio specificato nel riquadro a pag. 46.

La tabella 4 illustra i risultati della prova di caseificazione con latte contaminato, utilizzando le due diverse tecnologie di caseificazione a coagulazione presamica e acida. I contenuti nel Primosale caseificato naturalmente e contaminato artificialmente a 50 ppt sono stati rispettivamente 12,5 ppt e 63,5 ppt. Questo indica che si è verificata una concentrazione dell'aflatoxina M1 nei formaggi rispetto al latte con cui sono stati prodotti pari a 2,4 volte nel caso del latte contaminato naturalmente a 5,2 ppt e pari a 1,4 volte per il latte contaminato artificialmente a 45,8 ppt. Il contenuto rilevato nella robiola caseificata con latte naturalmente contaminato a 5,0 ppt è stato di 22,8 ppt, con una concentrazione pari quindi a 4,1 volte, mentre nella Robiola prodotta con latte contaminato

artificialmente a 47,4 ppt è stata di 77,5 ppt, con una concentrazione di 1,6 volte.

I dati ottenuti confermano quanto descritto in letteratura per altre tipologie di caseificazione per quanto riguarda la concentrazione dell'aflatoxina M1 durante i processi di caseificazione. Inoltre questi risultati costituiscono i primi dati disponibili circa gli indici di concentrazione in caseificazioni tipiche piemontesi e i livelli di concentrazione nei relativi formaggi. La sperimentazione indica che il latte contaminato al limite di norma di legge (50 ppt) dà origine, per le due caseificazioni considerate, a formaggi contaminati al di sotto dei limiti precauzionali previsti per i formaggi (450 ppt).

•  
**Giorgio Borreani**  
**Ernesto Tabacco**

Dipartimento di agronomia, selvicoltura  
e gestione del territorio  
Università di Torino  
giorgio.borreani@unito.it

**Laura Cavallarín**  
**Sara Antoniazzi**

Ispa-Cnr, Sezione di Torino  
**Diego Manassero**  
Tecnico caseario

**Cinzia Zanoni, Daniele Giaccone**  
Associazione regionale  
allevatori del Piemonte  
Torino

I risultati presentati nel lavoro sono stati ottenuti nell'ambito del Progetto finanziato, dall'Assessorato all'ambiente, qualità e agricoltura della Regione Piemonte (responsabile Moreno Soster): «Analisi delle problematiche legate alla presenza di aflatoxine nella filiera lattiero-casearia: studio del trasferimento dell'aflatoxina B1 dal latte al formaggio e strategie aziendali per il contenimento del rischio di accumulo».



Per consultare la bibliografia:  
[www.informatoreagrario.it/rdLia/08ia46\\_3801\\_web](http://www.informatoreagrario.it/rdLia/08ia46_3801_web)

# Dal latte al formaggio aflatossine sotto controllo

## BIBLIOGRAFIA

- Borreani G., Tabacco E., Cavallarin L. (2003)** - *Contaminazione da micotossine negli insilati di mais*. L'Informatore Agrario, 59 (31): 49-55.
- Borreani G., Tabacco E. (2004)** - *Per un latte senza aflatossine meglio analizzare gli alimenti*. L'Informatore Agrario, 60 (2): 53-56.
- Munksgaard L., Larsen J., Werner H., Andersen P.E., Viuf B.T. (1987)** - *Carry-over of aflatoxin from cows' feed to milk and milk products*. Milchwissenschaft, 42: 165-167.
- Pietri A., Bertuzzi T., Fortunati P., Piva G. (2004)** - *Determinazione dell'aflatossina M1 nei formaggi: nuovo metodo enzimatico di estrazione*. Atti del convegno: «Le micotossine nella filiera agroalimentare», Istituto superiore di sanità, Roma, 29-30 novembre: 94.
- Piro R., Daminelli P., Biancardi A., Finazzi G., Boni P. (2004)** - *Coefficiente di trasferimento dell'aflatossina M1 nel formaggio grana*. Atti del convegno: «Le micotossine nella filiera agroalimentare», Istituto superiore di sanità, Roma, 29-30 novembre: 28.
- Veldman A., Meijs J.A.C., Borggreve G.J., Heeres-van der Tol J.J. (1992)** - *Carry-over of aflatoxin from cows' food to milk*. Animal Production, 55: 163-168.