

# **AFLATOSSINA M<sub>1</sub> NEL LATTE: DISTRIBUZIONE TRA I PRODOTTI DELLA TRASFORMAZIONE CASEARIA TIPO GRANA**

Amedeo Pietri (a), Terenzio Bertuzzi (b), Annalisa Mulazzi (a), Gianfranco Piva (a), Alberto Pecorari (b), Gianluca Gambini (b), Marco Nocetti (b)

(a) *Istituto di Scienze degli Alimenti e della Nutrizione, Facoltà di Agraria, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza*

(b) *Consorzio del Formaggio Parmigiano-Reggiano, Reggio Emilia*

## **Introduzione**

L'Aflatossina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) è il 4-idrossi-derivato dell'Aflatossina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) e può essere presente nel latte di animali in lattazione che hanno consumato mangimi contaminati da AFB<sub>1</sub>. Se il latte contaminato viene usato nella produzione di formaggi, questi presentano una concentrazione di AFM<sub>1</sub> maggiore di quella del latte di partenza; questo fattore di arricchimento è dovuto ad un'interazione idrofobica che si viene a formare tra l'AFM<sub>1</sub> e la caseina nel corso della caseificazione. Il Reg. CE 1881/2006, che stabilisce i livelli massimi di alcuni contaminanti negli alimenti, fissa un limite massimo per l'AFM<sub>1</sub> di 0,050 µg/kg per il latte e di 0,025 µg/kg per il latte destinato ai lattanti, mentre per i prodotti lattiero-caseari i valori massimi ammissibili vanno calcolati tenendo conto della concentrazione provocata dall'essiccazione o dalla trasformazione.

In questo studio, sono state condotte alcune mini-caseificazioni per la produzione di formaggio tipo grana, con l'obiettivo di valutare il fattore di arricchimento nella cagliata e la distribuzione dell'AFM<sub>1</sub> nei prodotti derivanti dal processo di caseificazione.

## **Materiali e metodi**

### **Caseificazioni**

Lo studio ha previsto, per 5 giorni non consecutivi, la raccolta di latte ottenuto da alcune vacche alimentate il giorno precedente con mais naturalmente contaminato da AFB<sub>1</sub>.

Il latte di ogni mungitura è stato quindi utilizzato per due differenti processi di trasformazione casearia tipo grana, per un totale di 10 caseificazioni; queste sono state eseguite su scala ridotta, utilizzando 20-25 L di latte. L'analisi per la determinazione di AFM<sub>1</sub> è stata eseguita nel latte intero, nella crema di affioramento (panna), nel latte di caldaia, nel siero innesto, nella cagliata, nel siero cotto, nella ricotta, nella scotta (siero residuo della produzione della ricotta), nel burro e nel latticello (Figura 1).

Un'aliquota di 200 mL per i campioni liquidi e di 50-200 g per quelli solidi è stata conservata a -20°C fino al momento dell'analisi.

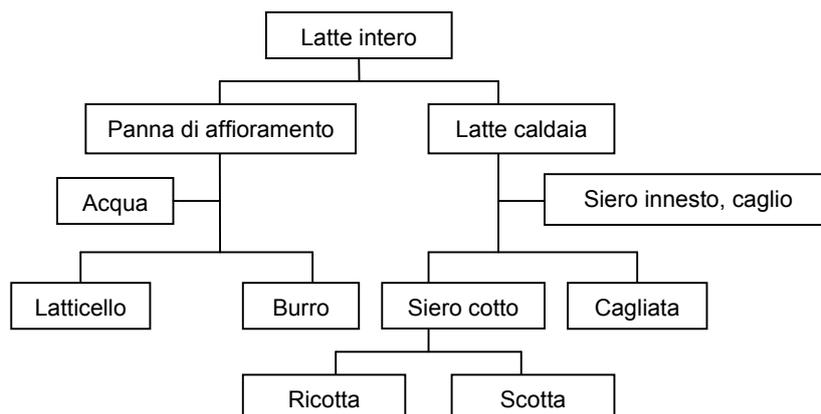


Figura 1. Schema generale delle mini-caseificazioni

### Analisi di AFM<sub>1</sub> nel latte, siero cotto, scotta, latticello

Un'aliquota di 40 mL di campione è stata centrifugata per 10 min. a 7000 g e a 4°C e successivamente filtrata su filtro di carta; 20 mL del filtrato sono stati quindi purificati mediante colonna ad immunoaffinità (R-Biopharm) (1). Dopo lavaggio della colonna con 5 mL di acqua distillata, l'AFM<sub>1</sub> è stata eluita in provetta graduata con 2,5 mL di CH<sub>3</sub>OH. L'estratto purificato è stato concentrato sotto flusso di N<sub>2</sub>, quindi portato a 2 mL con la miscela CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O=25:75, agitando in bagno ad ultrasuoni e su vortex. L'estratto è stato infine filtrato (0,45 µm) prima dell'analisi HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*).

### Analisi di AFM<sub>1</sub> in formaggi, panna, burro e ricotta

Ad un'aliquota di 5 g di campione, pesati in un provettone da centrifuga, sono stati aggiunti 50 mL di una soluzione di pepsina allo 0,2% in HCl 0,075 N (2). Il campione, dopo aver controllato che il pH della soluzione fosse compreso tra 2,4 e 3,0 (eventualmente corretto con NaOH 0,1 N), è stato posto in stufa termostata a 42°C per 16 ore sotto continua agitazione. Al termine della digestione enzimatica, la soluzione è stata neutralizzata a pH 7-7,5 con NaOH 1N (3-5 mL), centrifugata a 11700 g a 4°C per 10 min., infine filtrata su filtro di carta. Un'aliquota di 30 mL del filtrato è stata purificata mediante colonna di immunoaffinità (R-Biopharm); dopo lavaggio della colonna con 5 mL di acqua distillata, l'AFM<sub>1</sub> è stata eluita in provetta graduata con 2,5 mL di CH<sub>3</sub>OH. L'estratto è stato quindi evaporato sotto flusso di N<sub>2</sub> e ripreso con 1 mL di miscela CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O=25:75, agitando in bagno ad ultrasuoni e su vortex; infine, è stato filtrato (0,45 µm) prima dell'analisi HPLC.

### Analisi HPLC

La separazione cromatografica è stata effettuata mediante colonna RP-18 (125x4,0 mm, Merck), e fase mobile CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O=25:75 a flusso 1 mL/min.; l'AFM<sub>1</sub> è stata determinata con rivelazione fluorimetrica ( $\lambda_{eccitazione}=365$  e  $\lambda_{emissione}=440$  nm).

## Risultati e discussione

### Percentuale di recupero e limiti di rivelazione

Nel caso dei campioni di latte, siero cotto, scotta e latticello, il limite di rivelazione e di quantificazione sono stati rispettivamente di 0,001 e 0,003  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Per verificare l'accuratezza del metodo di analisi, l'AFM<sub>1</sub> è stata estratta da un campione di latte in polvere certificato con un valore di AFM<sub>1</sub> pari a 0,260  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (FAPAS); l'analisi, effettuata in triplo, ha dato un valore medio di  $0,254 \pm 0,005$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Nel caso di campioni di formaggio, panna, burro e ricotta il limite di rivelazione e di quantificazione sono stati di 0,010 e 0,030  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Per il formaggio tipo grana, sono state effettuate prove di recupero a due livelli (0,250 e 0,500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , in triplo), aggiungendo ad un campione non contaminato (maturazione 3 mesi) un volume noto di una soluzione standard di AFM<sub>1</sub>; i valori ottenuti sono risultati compresi tra 94,8% e il 98,2%. La deviazione standard è risultata sempre inferiore al 2,5%.

### Caseificazioni

Le concentrazioni di AFM<sub>1</sub> nei campioni di latte intero utilizzati per le caseificazioni erano comprese tra 0,027 e 0,460  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Nella Tabella 1 sono riportate le concentrazioni di AFM<sub>1</sub> nei vari prodotti.

**Tabella 1. Valori di AFM<sub>1</sub> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) nel latte intero e nei prodotti della caseificazione**

Caseificaz.	Latte intero	Panna	Latte caldaia	Cagliata	Siero cotto	Scotta	Ricotta	Burro	Latticello
1	0,040	< 0,010	0,039	0,122	0,022	0,019	0,040	< 0,010	0,008
2	0,027	0,019	0,021	0,082	0,013	0,012	0,046	< 0,010	0,013
3	0,081	0,044	0,083	0,343	0,056	0,049	0,115	< 0,010	0,026
4	0,063	0,040	0,062	0,178	0,040	0,029	0,180	< 0,010	0,019
5	0,043	0,017	0,035	0,154	0,021	0,016	0,046	< 0,010	0,009
6	0,038	0,020	0,038	0,136	0,025	0,017	0,043	< 0,010	0,009
7	0,270	0,113	0,273	0,966	0,168	0,128	0,280	0,017	0,047
8	0,335	0,154	0,333	1,202	0,217	0,184	0,374	0,107	0,094
9	0,386	0,171	0,365	1,234	0,213	0,128	0,280	0,050	0,062
10	0,460	0,223	0,480	1,699	0,298	0,184	0,374	0,110	0,091

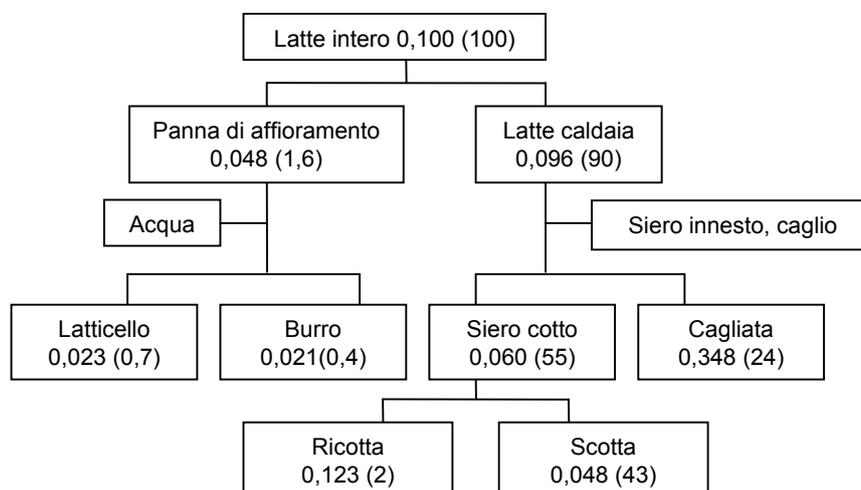
Considerando separatamente i diversi passaggi delle caseificazioni, si può osservare che, dopo il processo di scrematura, le concentrazioni di AFM<sub>1</sub> del latte di caldaia sono risultate molto simili a quelle del latte intero; la distribuzione media percentuale, calcolata come rapporto fra le quantità di AFM<sub>1</sub>, è stata del  $90 \pm 9\%$  nel latte scremato e solo dell' $1,6 \pm 0,6\%$  nella panna (con un bilancio di massa pari a  $92 \pm 9\%$ ). Nel processo di caseificazione, la resa media è stata pari al 7,5% (20 kg di latte  $\rightarrow$  1,5 kg di cagliata); le cagliate hanno evidenziato concentrazioni di AFM<sub>1</sub> tra 0,082 e 1,699  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , con un fattore di arricchimento medio pari a  $3,6 \pm 0,5$ . Con un bilancio di massa medio vicino al 90%, la distribuzione percentuale media di AFM<sub>1</sub> è stata pari al  $27 \pm 3\%$  nella cagliata e al  $60 \pm 4\%$  nel siero cotto. Nei campioni di siero innesto non è stata rilevata AFM<sub>1</sub>. Il siero cotto è stato quindi utilizzato per la produzione della ricotta; il fattore di arricchimento medio in questa trasformazione è risultato pari a  $2,1 \pm 0,9$ . La distribuzione

percentuale nella ricotta, pari a  $5\pm 3\%$  è risultata piuttosto bassa, evidenziando come la tossina presente nel siero rimanga prevalentemente nella scotta.

Infine, l'ultima parte del processo ha previsto l'impiego della panna per la preparazione del burro. Le concentrazioni di AFM<sub>1</sub> nel burro sono state superiori al limite di rivelazione solo nelle ultime 4 caseificazioni (con le concentrazioni nel latte di partenza più elevate); sia il fattore di arricchimento che la distribuzione percentuale sono risultati molto bassi e variabili (per le basse concentrazioni e le difficoltà nel recupero quantitativo del burro), pari rispettivamente a  $0,2\pm 0,3$  e a  $9\pm 14\%$ .

## Conclusioni

In conclusione, ipotizzando per il latte intero una concentrazione di  $0,100 \mu\text{g}/\text{kg}$ , le concentrazioni medie di cagliata, siero cotto, ricotta e burro risulterebbero rispettivamente di  $0,348$ ,  $0,060$ ,  $0,123$  e  $0,021 \mu\text{g}/\text{kg}$  (Figura 2).



**Figura 2. Concentrazioni ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) e percentuali di distribuzione (tra parentesi) di AFM<sub>1</sub> nei prodotti della caseificazione, partendo da un latte contaminato a livello di  $0,100 \mu\text{g}/\text{kg}$**

## Bibliografia

1. Mortimer DN, Gilbert J, Shepher MJ. Rapid and highly sensitive analysis of AFM<sub>1</sub> in liquid and powdered milk using an affinity column cleanup. *Journal of Chromatography* 1987;407:393-8.
2. Pietri A, Bertuzzi T, Fortunati P, Piva G. Determinazione dell'Aflatossina M1 nei formaggi: nuovo metodo enzimatico di estrazione. In: Miraglia M, Brera C (Ed.). *1° Congresso nazionale. Le micotossine nella filiera agro-alimentare. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 29-30 novembre 2004. Atti*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2005. (Rapporti ISTISAN 05/42). p. 318-21.