

Mena Ritota¹, Maria Gabriella Di Costanzo¹, Stefania Barzaghi², Pamela Manzi^{1*}

Latte crudo per la caseificazione: influenza della temperatura di stoccaggio sulle caratteristiche chimico-nutrizionali

Raw milk for cheese-making: effects of the storage temperature on the chemical and nutritional characteristics

¹CREA - Centro di ricerca Alimenti e Nutrizione, Via Ardeatina 546, 00178, Roma, Italy

²CREA - Centro di ricerca Zootecnia e Acquacoltura, Via Antonio Lombardo 11, 26900, Lodi, Italy

*Corresponding author:

Pamela Manzi

CREA-Centro di Ricerca Alimenti e Nutrizione, Via Ardeatina 546, 00178, Rome, Italy.
Tel. 06 51494499 E-mail: pamela.manzi@crea.gov.it

Ricevuto il 9 dicembre 2020

Accettato il 12 febbraio 2021

DOI: 10.36138/STLC.02.2021.01

Riassunto

Obiettivi: La durata e la temperatura di refrigerazione del latte crudo sono tra le principali cause di alterazione della flora microbica del latte, che possono pregiudicare la qualità igienico-sanitaria. L'obiettivo di questo lavoro è quello di valutare l'influenza di un aumento nella temperatura di stoccaggio del latte destinato alla caseificazione del Provolone Valpadana DOP, tipologia piccante, su alcuni parametri d'interesse chimico-nutrizionale.

Materiali e Metodi: il latte di 7 aziende è stato analizzato per alcuni acidi organici, calcio e fosforo (totale e solubile), contenuto di vitamina A e un indice di processo (Grado di Isomerizzazione del Retinolo, GIR).

Risultati: L'acido lattico ed il GIR sono stati maggiormente influenzati dalla temperatura di stoccaggio del latte, indice che un aumento della

temperatura di refrigerazione può alterare l'attività della microflora casearia del latte, tuttavia, l'isomerizzazione del retinolo non ha portato ad una diminuzione significativa del contenuto di vitamina A nei campioni. Analogamente, anche per il calcio solubile si è osservato un aumento passando da 6 a 12°C nella temperatura di refrigerazione.

Conclusioni: I risultati hanno dimostrato come variazioni nei processi tecnologici nell'industria casearia non possano prescindere da una valutazione degli effetti sulle caratteristiche chimico-nutrizionali del latte.

Parole chiave:

- Latte crudo
- Temperatura di refrigerazione
- Acido lattico
- Isomerizzazione del retinolo
- Calcio solubile

Abstract

Objective: The duration and refrigeration temperature of raw milk are among the main causes of the alteration of the milk micro flora activity, which could even compromise its hygienic quality. The objective of this work was to evaluate the influence of an increase in the refrigeration temperature of raw milk for cheese making (Provolone Valpadana PDO) on some parameters of chemical and nutritional interest.

Materials and Methods: raw milk samples from 7 farmers were analyzed for their contents in: some organic acids, calcium and phosphorus (total and soluble contents), vitamin A and a process index, (the Degree of Retinol Isomerization, DRI).

Results: Lactic acid and DRI were the most influenced parameters by the storage temperature of the milk,

probably due to a modification in the activity of the milk micro flora. However, the retinol isomerization did not lead to a significant decrease in the vitamin A content of the samples. Similarly, an increase in the soluble calcium content was observed with increasing the refrigeration temperature from 6 to 12 °C.

Conclusions: The obtained results have shown that changes in the technological processes of the dairy sector should also take into account the evaluation of the effects on the chemical and nutritional characteristics of milk, and not only the milk microbiological aspects.

Keywords:

- Raw milk
- Refrigeration temperature
- Lactic acid
- Retinol isomerization
- Soluble calcium

INTRODUZIONE

La temperatura e la durata del tempo di stoccaggio del latte alla stalla sono tra le principali cause dell'alterazione della flora microbica naturalmente presente nel latte, fino ad arrivare, a volte, a pregiudicare la qualità igienico-sanitaria. Il Regolamento CE N. 853/2004 (1) stabilisce norme specifiche in materia d'igiene, riportando per il latte crudo l'obbligo di raffreddamento immediato, dopo la mungitura, ad una temperatura non superiore a 8°C in caso di raccolta giornaliera e non superiore a 6°C qualora la raccolta non sia effettuata giornalmente. Inoltre, deve essere mantenuta la catena del freddo durante il trasporto e, all'accettazione presso lo stabilimento di trasformazione, il latte deve essere rapidamente refrigerato (1). La refrigerazione del latte, pertanto, è uno strumento necessario per preservare la qualità microbiologica del latte, impedendo o rallentando la crescita della microflora contaminante ambientale.

A volte, per ragioni tecnologiche potrebbe essere utile aumentare le temperature di refrigerazione per favorire il mantenimento della carica microbica endogena e/o lo sviluppo di una microflora filo casearia, indispensabile per la produzione di particolari formaggi, come ad esempio quelli da latte crudo e a lunga stagionatura, in deroga al Reg. CE N. 853/2004 (1).

Le condizioni di stoccaggio del latte, oltre ad avere un impatto sulle caratteristiche microbiologiche, possono avere ripercussioni anche sulle proprietà chimico-nutrizionali del latte stesso, che non devono e non possono essere sottovalutate, in quanto influenzeranno il formaggio destinato al consumo, così come l'accettabilità da parte dei consumatori. Pertanto, in questo lavoro, parte di un più ampio progetto del MIPAAF (progetto TEMPRO D.M. 16837/7100/2019), sono stati valutati gli effetti di un incremento della temperatura di stoccaggio del latte crudo (da 6°C a 12°C) per la produzione del Provolone Valpadana DOP tipologia piccante, ai fini di una possibile modifica del disciplinare di produzione, su alcuni parametri di particolare interesse chimico-nutrizionale, che potrebbero subire variazioni a seguito di una modifica nella temperatura di stoccaggio. In particolare sono stati determinati: i) alcuni acidi organici, di fondamentale importanza ai fini tecnologici, poiché sono correlati con l'attività della microflora casearia e delle colture starter, con la crescita batterica e con l'evolversi della maturazione dei formaggi (2) oltre a contribuire all'aroma e al gusto di alcuni formaggi (2); ii) un indice chimico di prodotto e/o di processo: il Grado di Isomerizzazione del Retinolo (GIR), parametro sia di qualità che di tracciabilità per i prodotti lattiero caseari, in quanto aumenta con la severità del trattamento tecnologico (3) ed è funzione dell'attività dei microrganismi (4), oltre a concorrere alla stima dell'attività della vitamina A nel latte; iii) contenuto totale e solubile sia di calcio che di fosforo, dal momento che l'equi-

librio dinamico tra il calcio e il fosforo associati alle micelle di caseina e i minerali della frazione solubile dipende fortemente dalla loro concentrazione, dalla temperatura e dal pH del latte (5).

MATERIALI E METODI

Campioni di latte vaccino intero di massa sono stati campionati in 7 aziende (identificate con lettere da A a G), fornitrici di latte per la produzione del Provolone Valpadana DOP tipologia piccante.

Dopo la mungitura, i campioni (3 aliquote per ciascuna azienda) sono stati trasportati in laboratorio in condizioni refrigerate. Di queste 3 aliquote, la prima è stata conservata a -20°C fino al momento dell'analisi (campioni t0), la seconda è stata posta in bagnomaria a 6°C per 60 h (campioni T60-6°), mentre la terza è stata posta in bagnomaria a 12°C per 60 h (campioni T60-12°). Tutti i campioni sono stati conservati a -20°C fino al momento delle analisi.

Per la determinazione degli acidi organici, è stato utilizzato il metodo di Park et al. (6) con alcune modifiche. Campioni di latte sono stati estratti mediante agitatore rotante (30 min a 300 rpm) con H₃PO₄ 0,5%, ultracentrifugati (15 min a 20000 rpm, 4°C) e filtrati. La separazione è stata effettuata mediante UHPLC (Nexera, Shimadzu) in fase inversa e rivelazione a 210 nm (ad eccezione degli acidi ippurico e urico, rivelati rispettivamente a 227 nm e 280 nm) ed eluizione in isocratica con H₃PO₄ 0,5% a 0,5 ml/min.

La vitamina A è stata determinata secondo il metodo di Panfilì et al. (7) e il Grado di Isomerizzazione del Retinolo (GIR) è stato calcolato mediante il metodo di Panfilì et al. (3).

Calcio e fosforo totali sono stati determinati secondo il metodo AOAC (8). Le frazioni solubili di calcio e fosforo sono state determinate previa ultracentrifugazione del latte a 29100 rpm (80000 x g) per 1h a 20°C (9, 10) mediante Ultracentrifuga (Beckman). Successivamente, sulle aliquote di UltraCentrifugato (UC) è stata seguita la stessa metodica utilizzata per i minerali totali (8).

Tutte le analisi sono state effettuate in triplo e l'elaborazione statistica dei risultati (ANOVA seguita dal test di Tukey HSD) è stata effettuata mediante il pacchetto di elaborazione dati PAST (11), versione 2.17c. Le differenze sono state considerate significative per p<0,05.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Il profilo degli acidi organici è risultato qualitativamente simile in tutti i campioni, con differenze solo dal punto di vista quantitativo (Tabella I). L'acido citrico è risultato quello maggiormente presente, come confermato in letteratura (12), seguito dagli acidi tartarico e lattico. L'effetto della temperatura di stoccaggio sul contenuto dei singoli acidi or-

Tabella I. Composizione media degli acidi organici (mg/100g) in campioni di latte vaccino di 7 aziende e Grado di Isomerizzazione del Retinolo (GIR %) in funzione della temperatura di stoccaggio a t0, T60-6°C e T60-12°C. I valori riportati sono medie e deviazioni standard di tre repliche

Table I. Mean value of organic acids (mg/100g) in cow milk from 7 different farms and Degree of Retinol Isomerization (DRI%) as a function of the storage temperature at t0, T60-6°C and T60-12°C. Values are means and standard deviations of three replicates

Contenuto di	t0		T60-6°		T60-12°	
	Media	Dev Std	Media	Dev Std	Media	Dev Std
Ac. Citrico	146,23	a	143,36	a	132,95	a
Ac. Tartarico	59,04	a	50,69	a	39,73	a
Ac. Lattico	21,02	a	26,29	a,b	41,13	b
Ac. Ossalico	4,46	a	4,59	a	3,60	a
Ac. Orotico	6,84	a	6,67	a	6,41	a
Ac. Urico	3,02	b	3,05	b	2,89	a
Ac. Ippurico	1,41	a	1,34	a	1,20	a
GIR	1,32	a	1,88	a	2,50	b

per ogni riga, lettere diverse indicano differenze significative per p<0,05

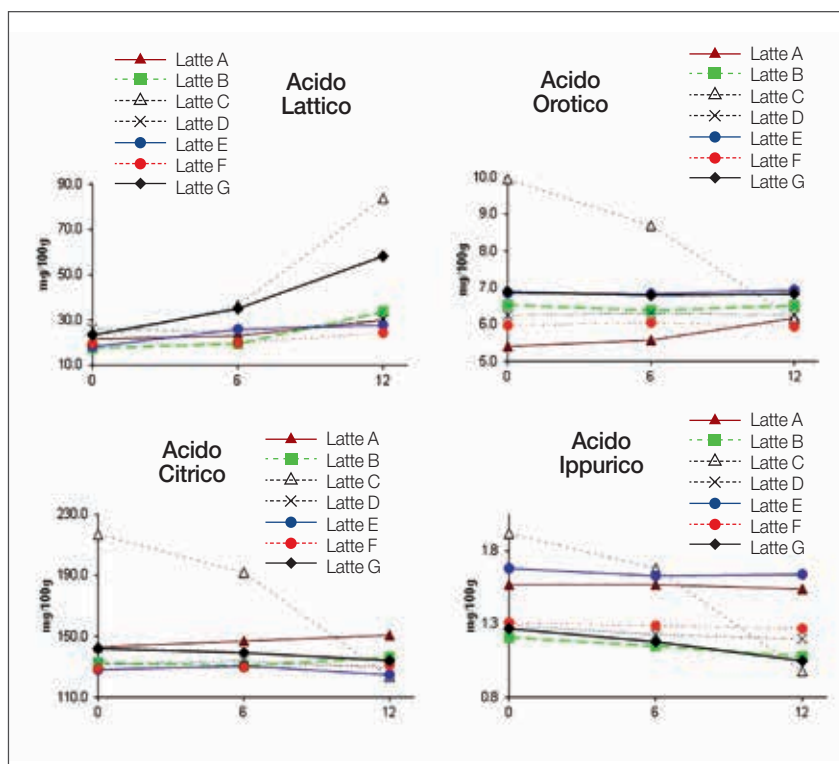


Figura 1. Andamento di alcuni acidi organici nei campioni di latte di in funzione della temperatura di stoccaggio a t0, T60-6°C e T60-12°C

Figure 1. Content of some organic acids in the milk samples as a function of the storage temperature at t0, T60-6°C and T60-12°C

ganici (**Tabella I**) è “mascherato” dall’elevata variabilità tra i latti, come dimostrato dagli alti valori di deviazione standard. L’acido lattico è l’unico per il quale si osserva un netto incremento (**Tabella I**), indice di un processo di fermentazione in atto passando da t0 a T6°C e a T12°C. Poiché la concentrazione degli acidi organici nel latte può essere influenzata da diversi fattori (6, 13, 14), si è preferito analizzarne l’andamento all’interno dei singoli campioni (**Figura 1**). L’aumento di acido lattico con l’aumentare della temperatura di stoccaggio è confermato in tutti i campioni, in particolar modo a T60-12°. In alcuni casi, tuttavia (campioni C, E e G), si evidenziano differenze significative (p<0,05) anche tra t0 e T60-6°, indice che il processo di fermentazione può iniziare già a questa temperatura. Il campione di latte C ha mostrato il contenuto di acido lattico più elevato, seguito dal latte G, indice che l’entità della fermentazione in questi campioni è molto più elevata. A conferma di ciò, vi è anche l’evoluzione di altri acidi organici, non solo il lattico, il cui andamento rispetto alla temperatura di stoccaggio è molto più marcato proprio nei campioni C e G, come ad esempio gli acidi citrico, ippurico e, in minor misura, orotico (**Figura 1**). È noto, infatti, che con l’evolversi della fermentazione del latte alcuni acidi organici aumentano, mentre altri diminuiscono (12, 15, 16), con variazioni più o meno evidenti a seconda dell’entità della fermentazione.

La vitamina A, il cui principale isomero è il *trans*-retinolo, è generalmente considerata un composto resistente al calore. Nel latte, il *trans*-retinolo può isomerizzare in primo luogo a 13-*cis*-retinolo per

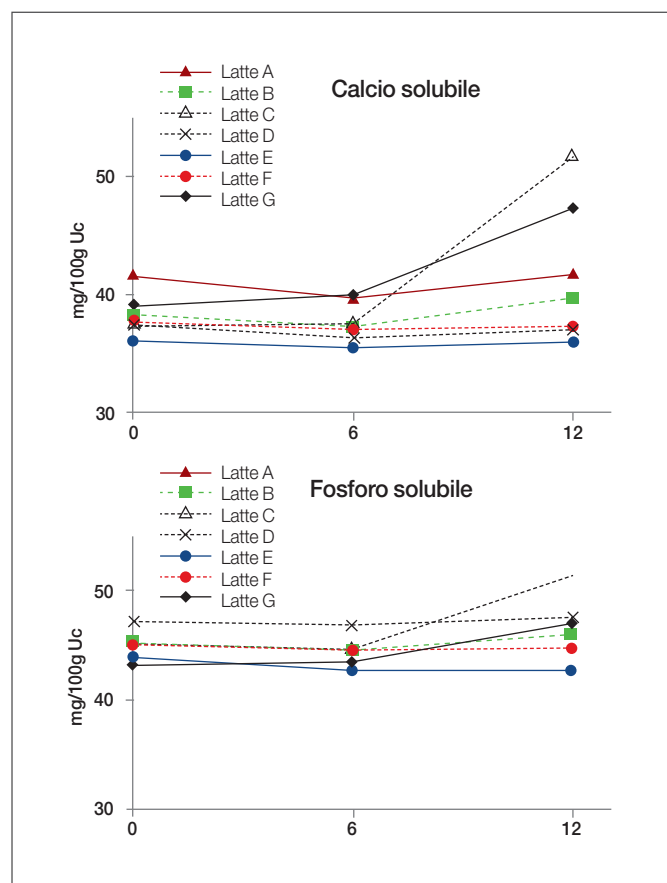


Figura 2. Calcio e fosforo solubili (mg/100g UltraCentrifugato) nei campioni di latte in funzione della temperatura di stoccaggio a t0, T60-6°C e T60-12°C

Figure 2. Soluble calcium and soluble phosphorus (mg/100g UltraCentrifugate) in the milk samples as a function of the storage temperature at t0, T60-6°C and T60-12°C

diversi fattori quali luce, temperatura, presenza di microrganismi e calore. Dal punto di vista strettamente nutrizionale è necessario considerare questa isomerizzazione poiché tale fenomeno può portare ad una diminuzione dell'attività vitaminica. Infatti, mentre l'isomero *trans*, ha un'attività pari al 100%, l'isomero 13-*cis* mostra un'attività vitaminica pari al 75% (17).

Per apprezzare al meglio l'influenza della temperatura di stoccaggio su *trans* e 13-*cis*-retinolo, e a causa dell'elevata variabilità di questi composti, è più corretto analizzare il loro rapporto percentuale, ovvero il Grado di Isomerizzazione del Retinolo (**Tabella I**). I valori di GIR hanno mostrato un aumento significativo ($p < 0,05$) da t0 a T60-12°, a conferma che l'aumento, seppur lieve, della temperatura di stoccaggio provoca un'isomerizzazione del retinolo dalla forma *trans* alla forma *cis*.

Tabella II. Rapporto molare calcio solubile/fosforo solubile nei campioni di latte delle 7 diverse aziende in funzione della T°C di stoccaggio a t0, T60-6°C e T60-12°C

Table II. Molar ratio between soluble calcium and soluble phosphorus in the milk samples of 7 different farms as a function of the storage temperature at t0, T60-6°C and T60-12°C

Campioni	T°C di stoccaggio	Media		Dev. Std.
Latte A	t0	0,71	a	0,00
Latte A	T60-6°	0,69	a	0,02
Latte A	T60-12°	0,71	a	0,00
Latte B	t0	0,65	a	0,01
Latte B	T60-6°	0,64	a	0,00
Latte B	T60-12°	0,67	a	0,01
Latte C	t0	0,65	a	0,01
Latte C	T60-6°	0,65	a	0,01
Latte C	T60-12°	0,78	b	0,01
Latte D	t0	0,61	a	0,01
Latte D	T60-6°	0,60	a	0,00
Latte D	T60-12°	0,60	a	0,00
Latte E	t0	0,64	a	0,00
Latte E	T60-6°	0,64	a	0,00
Latte E	T60-12°	0,65	a	0,01
Latte F	t0	0,65	a	0,01
Latte F	T60-6°	0,64	a	0,01
Latte F	T60-12°	0,64	a	0,01
Latte G	t0	0,70	a	0,00
Latte G	T60-6°	0,71	a	0,00
Latte G	T60-12°	0,78	b	0,01

Per ogni azienda, lettere diverse corrispondono a differenze significative per $p < 0,05$

Il contenuto di vitamina A nei campioni di latte analizzati, tuttavia, non ha mostrato differenze significative ed è risultato in media pari a 37,8 $\mu\text{g}/100\text{g}$ a t0, 37,6 $\mu\text{g}/100\text{g}$ a T60-6°C e 37,2 $\mu\text{g}/100\text{g}$ a T60-12°.

La composizione in minerali del latte è considerata relativamente costante, a meno di casi eccezionali, come ad esempio latti provenienti da animali mastitici (18). Pertanto, i contenuti di calcio e fo-

sforo totale hanno mostrato un intervallo di variabilità molto ristretto, tra 110,2 e 119,6 mg/100g per il calcio e tra 93,0 e 97,0 mg/100g per il fosforo, in linea con i dati di letteratura (19). Relativamente alle frazioni solubili, riportate in mg/100g di UltraCentrifugato (UC) in **Figura 2**, alcuni campioni hanno mostrato una differenza significativa ($p < 0,05$) per il calcio solubile tra t_0 e T60-6° e T60-12°, con un aumento molto più marcato nei campioni C e G. Questi aumenti potrebbero essere giustificati da un aumento dell'acidità del campione durante il periodo di stoccaggio (60 ore a 12°C), dovuta ad un'alterazione dell'attività della flora microbica. L'acidificazione, infatti, solubilizza progressivamente il fosfato di calcio colloidale e riduce il legame del calcio alla caseina (20). Tale risultato sarebbe confermato anche dall'aumento marcato di acido lattico osservato negli stessi campioni C e G (**Figura 1**). Anche per la frazione di fosforo solubile si è riscontrato un valore a T60-12° significativamente maggiore ($p < 0,05$) rispetto a t_0 e T60-6° nei campioni C e G. È importante sottolineare come l'entità dell'aumento di calcio e fosforo nella forma solubile sia risultata diversa nei vari lat-
(Tabella II): all'aumentare della temperatura di stoccaggio, tale rapporto tende a rimanere costante, ad eccezione di due campio-

ni (C e G), dove si osserva un lieve aumento, statisticamente significativo ($p < 0,05$), il che si potrebbe tradurre in una velocità di transizione dalla forma colloidale alla forma solubile più marcata per il calcio o più rallentata per il fosforo. In realtà, studi di letteratura avevano già mostrato come, durante la caseificazione, il calcio venga perso più velocemente nel siero rispetto al fosfato col diminuire del pH (21). Ancora una volta, l'aumento più marcato è stato osservato nei campioni di latte C e G.

Sebbene l'assorbimento *in vivo* del calcio assunto con il latte sia controllato da complessi meccanismi omeostatici, diversi studi hanno suggerito che il calcio assunto sotto forma solubile possa migliorarne l'assorbimento nel tratto gastrointestinale (22). Pertanto, l'aumento di calcio solubile osservato nei campioni di latte a T60-12° potrebbe avere un importante risvolto nutrizionale, sebbene sia importante tener presente che questo latte non è destinato al consumo diretto, bensì alla caseificazione. Tuttavia, non si può non tener conto che, in caseificazione, un latte "impovertito" di calcio nella sua forma colloidale rischierebbe di tradursi nella formazione di una cagliata demineralizzata, con conseguenze negative sulla qualità tecnologica del prodotto finito.

CONCLUSIONI

Questa ricerca potrà essere di supporto per l'ottimizzazione dei processi tecnologici, in quanto i risultati hanno mostrato come un aumento della temperatura di stoccaggio del latte, utile per favorire il mantenimento della carica microbica endogena del latte e/o lo sviluppo di una microflora filo casearia, può tradursi in alcuni casi: i) in un aumento del contenuto di acido lattico, indice di processi fermentativi in atto, e quindi di un'alterazione dell'at-

tività della flora microbica presente nel latte; ii) nell'isomerizzazione del retinolo dalla forma *trans* alla forma *cis*, che, fortunatamente in questo caso, non ha inciso in maniera significativamente negativa sul contenuto di vitamina A; iii) in un aumento della concentrazione di calcio solubile nel latte che, sebbene rappresenti un aspetto positivo dal punto di vista nutrizionale, può rappresentare uno svantaggio dal punto di vista tecnologico.

CONFLITTO DI INTERESSE

Gli autori dichiarano che non esistono conflitti di interesse economico da parte di uno o più autori.

RINGRAZIAMENTI

Gli autori desiderano ringraziare i colleghi del consorzio Provolone Valpadana DOP per aver fornito la campionatura.

La ricerca è stata finanziata nell'ambito del Progetto MIPAAF: Effetti della temperatura di stoccaggio sulla sicurezza e qualità del latte crudo e sulle caratteristiche del Provolone Valpadana DOP – TEMPRO, D.M. 16837/7100/2019 del 11/04/2019.

BIBLIOGRAFIA

1. Regolamento CE n. 853/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004. Gazzetta ufficiale dell'Unione Europea. 2004; L139/: 55.
2. González de Llano D, Rodríguez A, Cuesta P. Effect of lactic starter cultures on the organic acid composition of milk and cheese during ripening-analysis by HPLC. *J Appl Bacteriol.* 1996; 80(5): 570-576.
3. Panfili G, Manzi P, Pizzoferrato L. Influence of thermal and other manufacturing stresses on retinol isomerization in milk and dairy products. *J Dairy Res.* 1998; 65(2): 253-260.
4. Panfili G, Fratianni A, Di Criscio T, Gammariello D, Sorrentino E. Influence of microorganisms on retinol isomerization in milk. *J Dairy Res.* 2008; 75(1): 37-43.
5. Holt C. The milk salts: their secretion, concentrations and physical chemistry. In: Fox PF, editor. *Developments in dairy chemistry.* Dordrecht: Springer; 1985. p. 143-181.
6. Park Y, Lee J, Lee SJ. Effects of Frozen and Refrigerated Storage on Organic Acid Profiles of Goat Milk Plain Soft and Monterey Jack Cheeses. *J Dairy Sci.* 2006; 89: 862-871.
7. Panfili G, Manzi P, Pizzoferrato L. High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of tocopherols, carotenes, and retinol and its geometric isomers in Italian cheeses. *The Analyst.* 1994; 119(6): 1161-1165.
8. AOAC. Method 991.25. Calcium, magnesium and phosphorus in cheese. Arlington. VA. USA: Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists; 2002.
9. de la Fuente MA, Fontecha J, Juárez M. Partition of main and trace minerals in milk: effect of ultracentrifugation, rennet coagulation, and dialysis on soluble phase separation. *J Agric Food Chem.* 1996; 44(8): 1988-1992.
10. Liu DZ, Dunstan DE, Martin GJ. Evaporative concentration of skimmed milk: Effect on casein micelle hydration, composition, and size. *Food Chem.* 2012; 134(3): 1446-1452.
11. Hammer ÅY, Harper DAT, Ryan PD. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol electron.* 2001; 4: 9.
12. Urbiené S, Leskauskaitė D. Formation of some organic acids during fermentation of milk. *Pol J Food Nutr Sci.* 2006; 15/56(3): 277-281.
13. Dinkçi N, Akalin AS et al. Isocratic reverse-phase HPLC for determination of organic acids in Kargı Tulum cheese. *Chromatographia.* 2007; 66(1): 45-49.
14. Indyk HE, Woollard DC. Determination of orotic acid, uric acid, and creatinine in milk by liquid chromatography. *J AOAC Int.* 2004; 87(1): 116-122.
15. Dellaglio F. Starters for fermented milks. *IDF Bulletin.* 1988; 227: 27-34.
16. Driessen FM, Puhán Z. Technology of mesophilic fermented milk. *IDF Bulletin.* 1988; 227: 75-81.
17. Weiser H. SG, 201-208. Bioactivity of cis and dicis isomers of vitamin A esters. *Int J Vitam Nutr Res.* 1992; 62(3): 201-208.
18. Gaucheron F. The minerals of milk. *Reprod Nutr Dev.* 2005; 45(4): 473-483.
19. Manzi P, Di Costanzo MG, Mattera M. Updating nutritional data and evaluation of technological parameters of Italian milk. *Foods.* 2013; 2(2): 254-273.
20. de la Fuente MA. Changes in the mineral balance of milk submitted to technological treatments. *Trends Food Sci Technol.* 1998; 9(7): 281-288.
21. Lucey JA, Fox PF. Importance of calcium and phosphate in cheese manufacture: a review. *J Dairy Sci.* 1993; 76(6): 1714-1724.
22. de la Fuente MA, Montes F, Guerrero G, Juárez M. Total and soluble contents of calcium, magnesium, phosphorus and zinc in yoghurts. *Food Chem.* 2003; 80(4): 573-578.