



Abschlussveranstaltung Projekt Heumilch

Chemische Marker in der Milch zum Nachweis von Silagezugabe in der Futterration von Milchkühen

Daniela Eisenstecken, Elena Venir, Demian Martini Lösch, Federico Fava, Peter Robatscher, Giovanni Peratoner, Aldo Matteazzi, Evelyn Soini



Was ist Heumilch?

DURCHFÜHRUNGSVERORDNUNG (EU) 2016/304 DER KOMMISSION

vom 2. März 2016

zur Eintragung einer Bezeichnung in das Register der garantiert traditionellen Spezialitäten [Heumilch/Haymilk/Latte fieno/Lait de foin/Leche de heno (g. t. S.)]

Heumilchwirtschaft ist die ursprünglichste Form der Milcherzeugung. Die Milch stammt von Tieren aus traditioneller nachhaltiger Milchwirtschaft. Der wesentliche Unterschied und der traditionelle Charakter bestehen darin, dass bei der Heumilchproduktion wie in der ursprünglichen Milchproduktion keine Gärfuttermittel verfüttert werden.



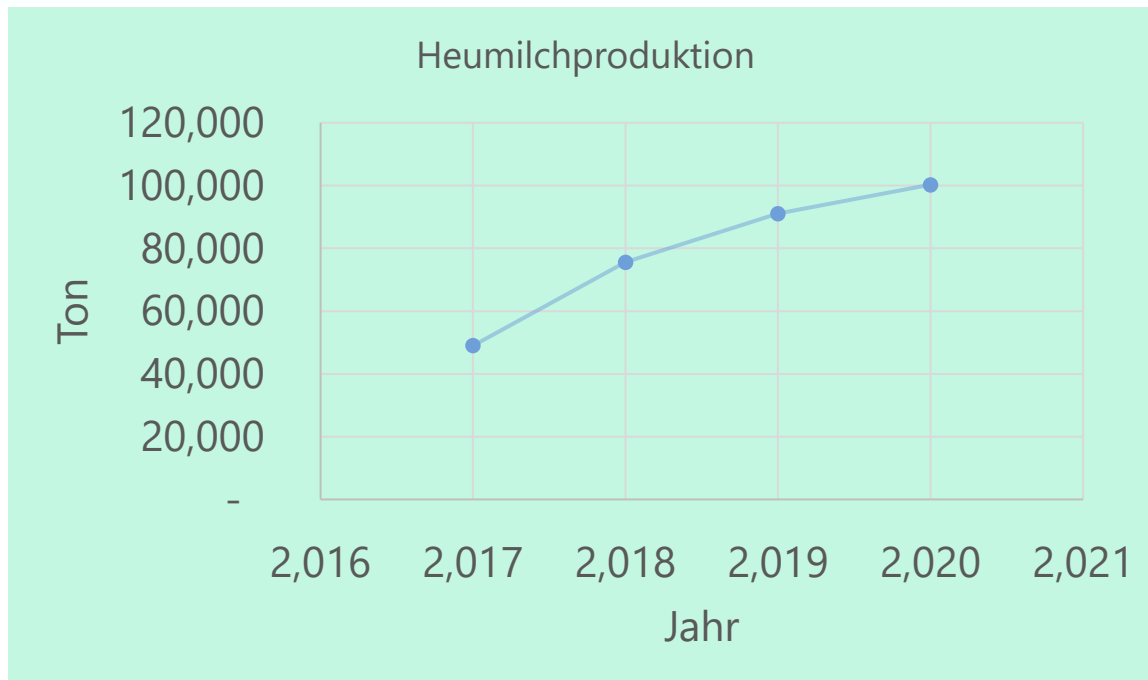
Verboten sind alle Arten von fermentierten Futtermitteln (Silage)





Heumilch in Südtirol

Warum ist Heumilch wichtig?



Daten des Sennereiverbands

Südtirol im Jahr 2022

- 100 Millionen kg Heumilch produziert
- Circa 1560 Heumilchbetriebe

Es ist keine spezifische Analyse für Heumilch vorgesehen

Kontrolle → Zertifizierungsstellen (ABCert) -
Sammlung nützlicher Informationen für die
Rückverfolgbarkeit der Lieferkette+ Inspektionen

- Traditionelle, umweltschonende Produktion
- Aufwertung lokaler Produkte
- Möglichkeit zur Verbesserung des Einkommens der Milchviehbetriebe =
Nachhaltigkeit der lokalen Produktion

WIE KANN MAN DIE ABWESENHEIT VON SILAGE GARANTIEREN?



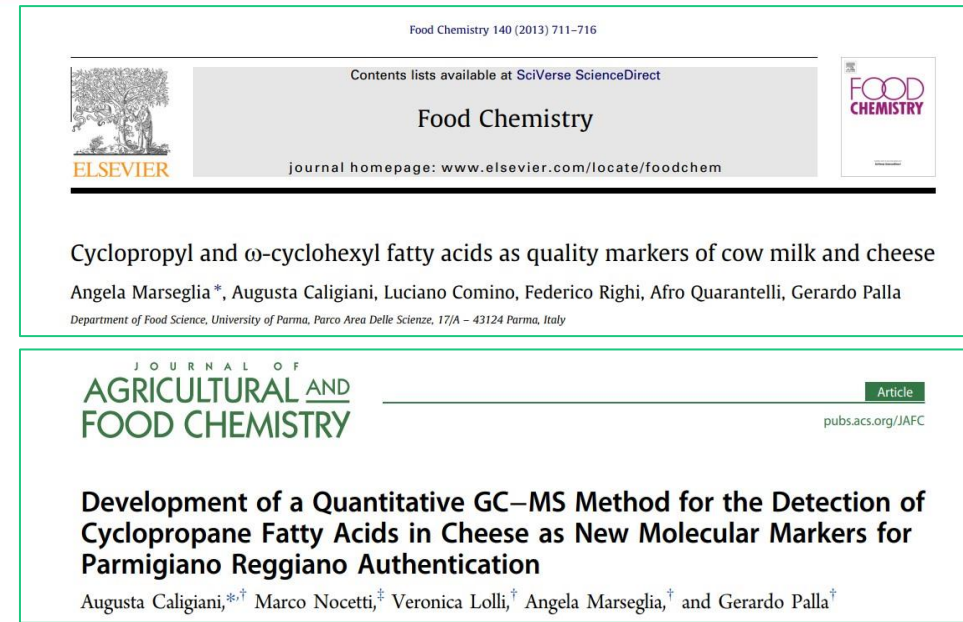
Vor Beginn des Projekts bekannte Informationen

- Marseglia et al. (2013) wiesen Cyclopropan-Fettsäuren (CPFA) in Käse nach, sie nutzten diesen Marker, um Grana Padano von Parmigiano Reggiano zu unterscheiden.
- CPFA ist in einigen Pflanzen (nicht in den lokalen Grünlandarten) und in den Membranen einiger Mikroorganismen, einschließlich Milchsäurebakterien und Coliformen, enthalten.
- Milchsäurebakterien, die während der Gärung in der Silage vorhanden sind, produzieren CPFA als Reaktion auf bestimmte Umweltbedingungen.
- Kühe nehmen CPFA über die Silage auf, somit gelangt ein Teil in die Milch und dann in den Käse.

Diese Angaben gelten für Grana P. und Parmigiano R., wobei die Referenzsilage Maissilage ist;



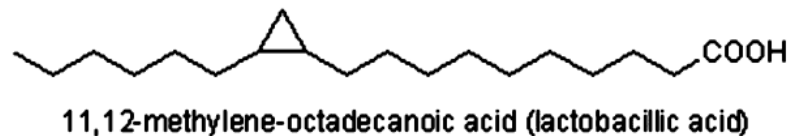
Können sie auch für Milch aus Südtirol eingesetzt werden, wo neben Maissilage auch Grassilage verwendet wird?





Das Ziel des Projekts

Entwicklung von Analysetechniken zur Unterscheidung zwischen Heumilch und Standardmilch, insbesondere durch den Nachweis von CPFA in der Milch, um die Abwesenheit von Mais- und Grassilage in der Ernährung von Heumilch-Milchkühen zu garantieren.





Informazioni sul progetto

- Das dreijährige Projekt "Chemische Marker in der Milch zum Nachweis von Silagezugabe in Futtermitteln von Milchkühen" wurde durch den **Europäischen Fonds für regionale Entwicklung (EFRE 1129)** finanziert.
- **Projektpartner:**



Sennereiverband Südtirol
Federazione Latterie Alto Adige

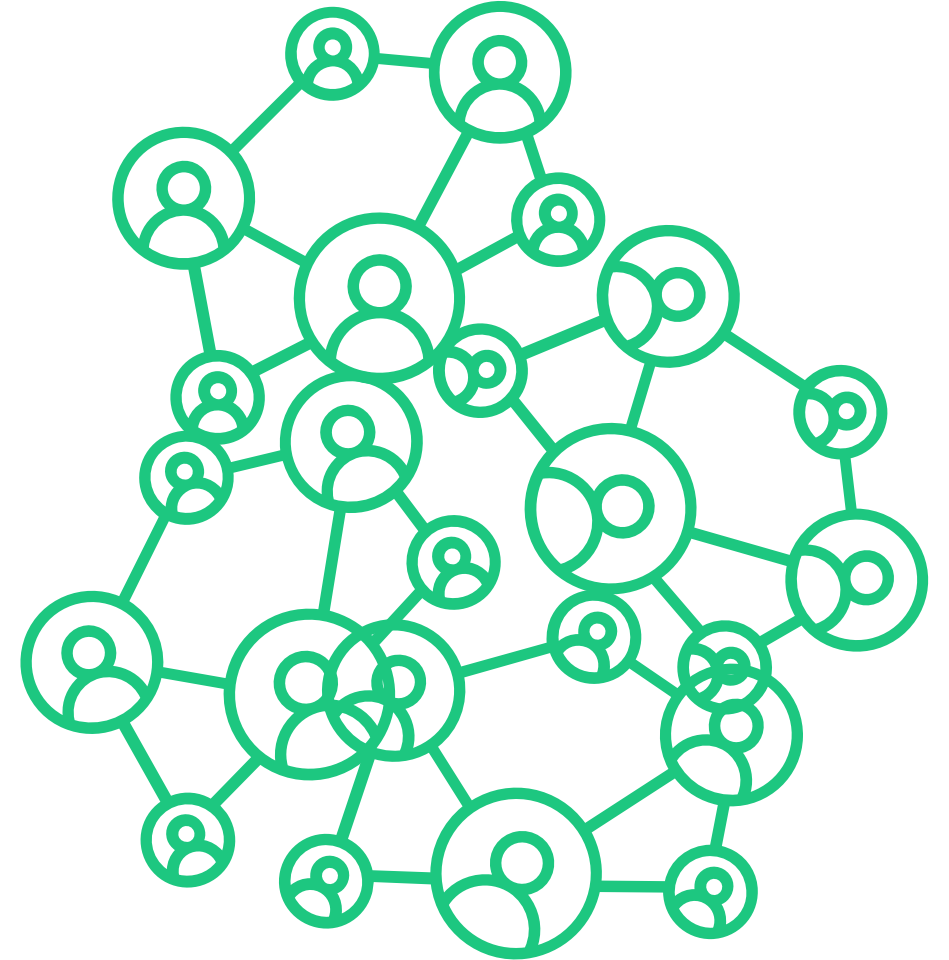
Service rund um die Milch · Al servizio del settore latte





Informationen zum Projekt

- Interdisziplinärer Ansatz, verschiedene Gruppen, die je nach Bedarf einbezogen werden
- Unterschiedliche Fähigkeiten und Kenntnisse
- Verschiedene Ebenen vertiefter Kenntnisse, die durch Wissenschaft und angewandte Forschung vom Land bis zum Tisch reichen





Versuchszentrum Laimburg – operative Gruppen



Versuchszentrum
Centro di Sperimentazione
Research Centre
LAIMBURG



© Ivo Corrà

Elena Venir



© Ivo Corrà

**Giovanni
Peratoner**



© Ivo Corrà

**Demian
Martini Lösch**

Obst und Gemüseverarbeitung & Grünlandwirtschaft

Idee, Projektplanung, Festlegung des Versuchsplans, Probenahme, Kontakte mit Erzeugern und Verbänden, Datenerhebung, Silierversuche im Labor, statistische Auswertung der Daten



**Daniela
Eisenstecken**



**Elke
Kaneppele**



Federico Fava



© Ivo Corrà

**Peter
Robatscher**

Labor für Aromen und Metaboliten

Idee, Mitarbeit am Projekt- und Versuchsplan, erste Analysen, Entwicklung einer optimierten Methode, Analyse von CPFA in Milch und Silage



Pressemitteilungen, Artikel für
die Öffentlichkeitsarbeit,
Produktion von Filmen,
verschiedene
Werbemaßnahmen und
Organisation von
Veranstaltungen; Präsentation
und Projektmanagement



© Ivo Corrà

**Franziska
Maria Hack**



© Ivo Corrà

**Isabella Oss
Pinter**



© Ivo Corrà

Julia Rizzo



© Ivo Corrà

**Agnese
Martinelli**



© Ivo Corrà

**Kathrin
Plunger**



© Ivo Corrà

**Cristina
Gadotti**



Johanna Höller



Vera Rehbichler



Andere Arbeitsgruppen der Laimburg, welche am Projekt mitgearbeitet haben



Zusammenarbeit in verschiedenen Projektphasen: Analyse der Futtermittel, DNA-Extraktion aus Silage, Verkostungstests, bibliographische Unterstützung, verschiedene technische Zusammenarbeit....



© Ivo Corrà

Aldo Matteazzi



© Ivo Corrà

Thomas Letschka



© Ivo Corrà

Christine Kerschbamer



Giuseppe Romano



Evelyn Soini



© Ivo Corrà

Elisa Vanzo



© Ivo Corrà

Giulia Marchetti



Martin Thalheimer



© Ivo Corrà

Stefan Morandell



Projektpartner – Freie Universität Bozen



Matteo Mario Scampicchio



Sebastian Imperiale

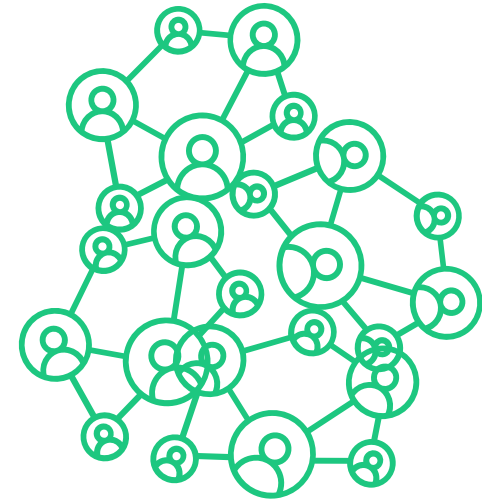


Ksenia Morozova



Mohsen Ramezani

Mitarbeit bei der Ausarbeitung
des Projekts und der Definition
des Versuchsplans; Entwicklung
von Schnellmethoden und der
entsprechenden Datenanalyse





Projektpartner - Sennereiverband



**Andreas
Österreicher**



Michl Pichler



Silvia Steinmayer



**Angelika
Oberkofler**



Astrid Vultaggio

Mitarbeit in
verschiedenen
Projektphasen: Definition
des Versuchsplans,
Probenahme, Suche nach
geeigneten Betrieben für
die Probenahme

Beratungsring Berglandwirtschaft BRING



Christian Plitzner

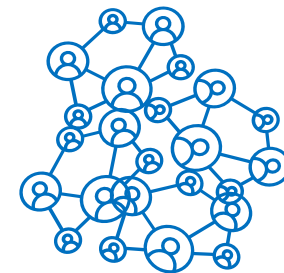


Simon Volgger

Mitarbeit bei der Suche nach geeigneten
Betrieben, Rationsberechnung, Mitarbeit bei
der Erstellung des Versuchsplans



**... zu guter Letzt
die lokalen Produzenten**



**Ein herzliches Dankeschön an alle 32 Betriebe, die teilgenommen haben und die
Proben zur Verfügung gestellt haben und dadurch das Projekt ermöglichten.**





Struttura del progetto

- **Esperimento I – Prove di insilamento in laboratorio**
Valutazione dell'influenza di alcuni fattori nella produzione di CPFA in insilati in prove di micro insilamento
- **Esperimento II - Concentrazione di marker CPFA nella prassi altoatesina**
Qual è il livello di CPFA nel latte altoatesino?
- **Esperimento III - Aggiunta di insilato alla razione di foraggio**
Se inserisco insilato nella dieta quanto tempo intercorre prima di vedere CPFA nel latte?
- **Esperimento IV - Rimuovere l'insilato dalla razione**
Se passo da latte normale a latte fieno, per quanto tempo i CPFA sono rinvenibili nel latte?





I. Prove di insilamento in laboratorio

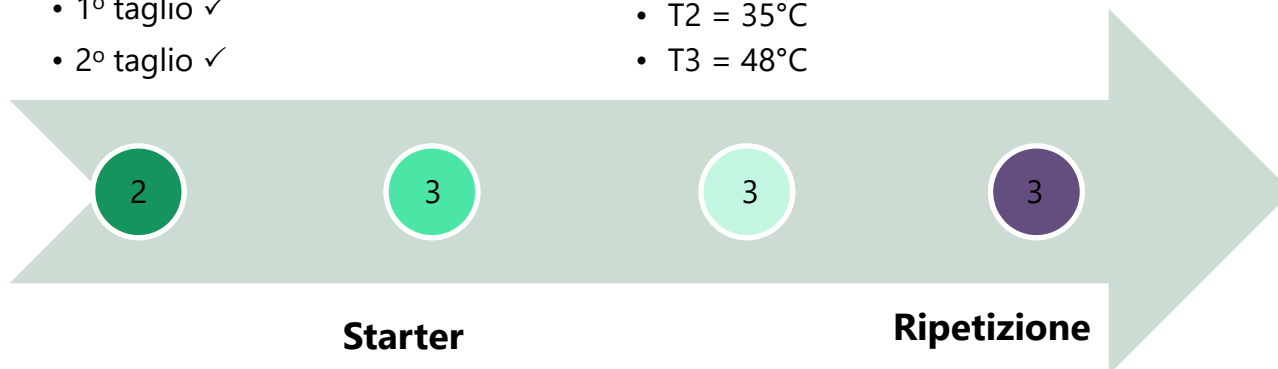
Valutazione dell'effetto di alcuni fattori sulla produzione di CPFA
in insilati in prove di micro insilamento

Sfalcio

- 1° taglio ✓
- 2° taglio ✓

Temperatura

- T1 = 22°C
- T2 = 35°C
- T3 = 48°C



Starter

- Controllo= senza starter
- Starter 1 (eterofermentante)
- Starter 2 (omofermentante)

Ripetizione



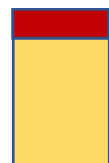


I. Prove di insilamento in laboratorio

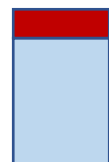
Setup degli incubatori



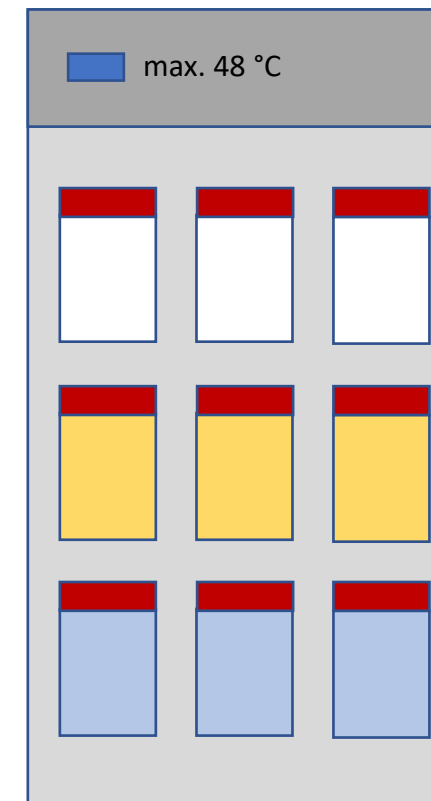
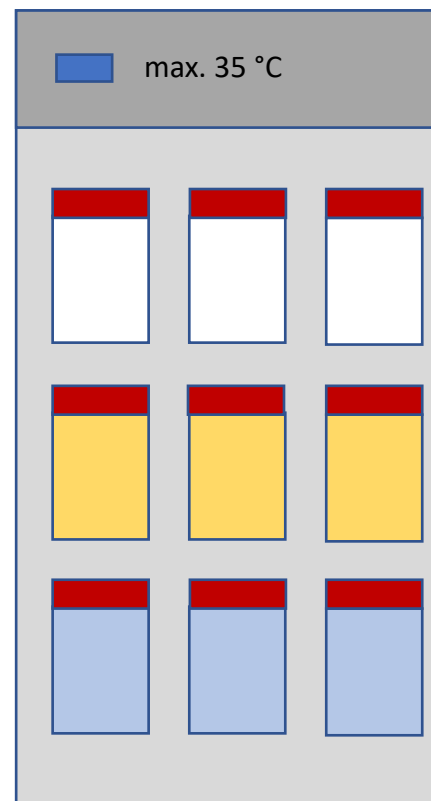
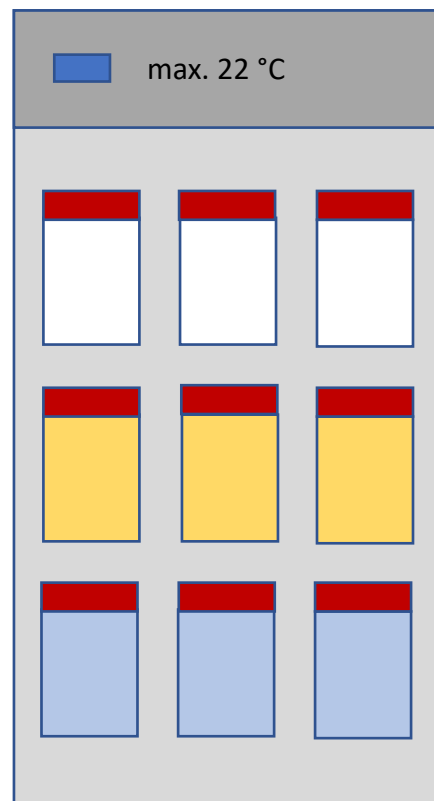
Nessuno starter
(Controllo)



Starter 1:
(Eterofermentativo)

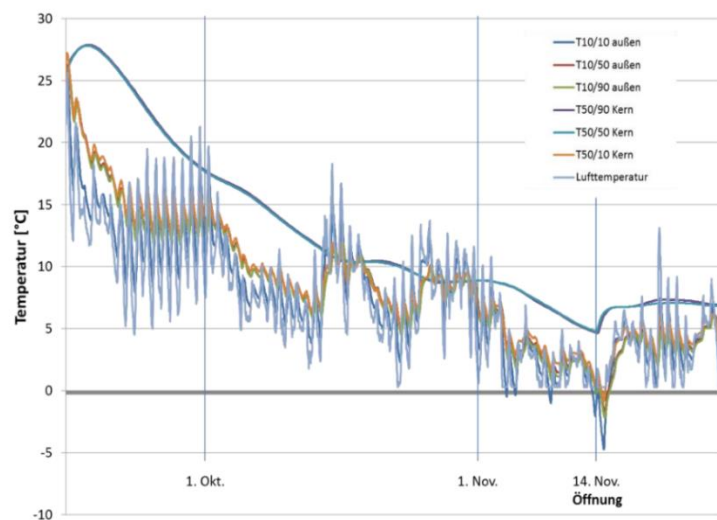


Starter 2:
(Omofermentativo)



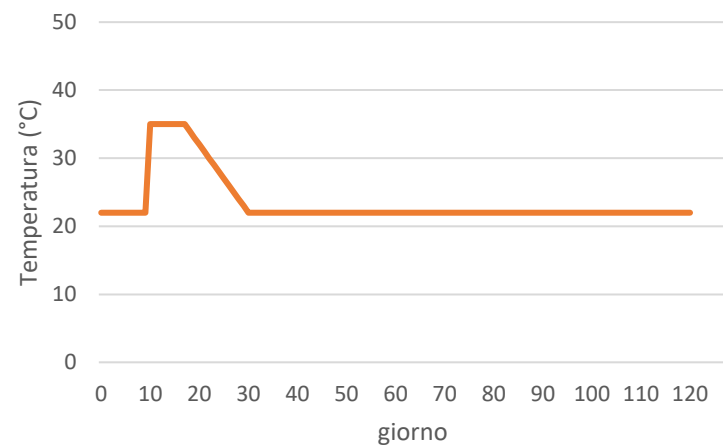


I. Prove di insilamento in laboratorio

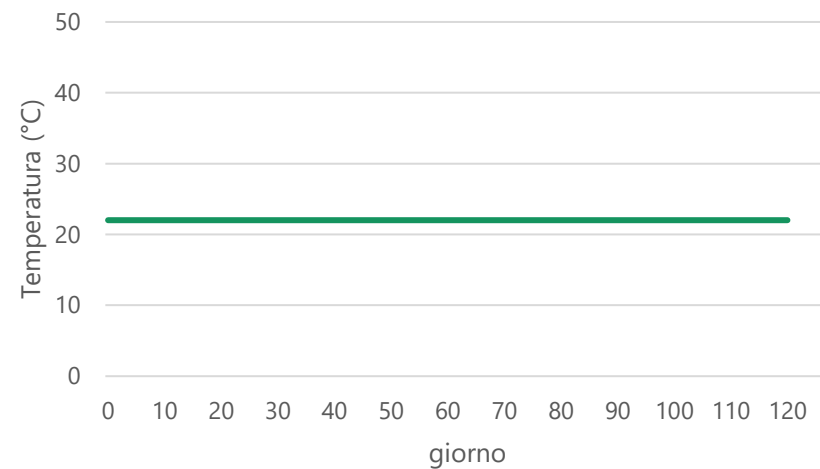


Resch et al. 2016

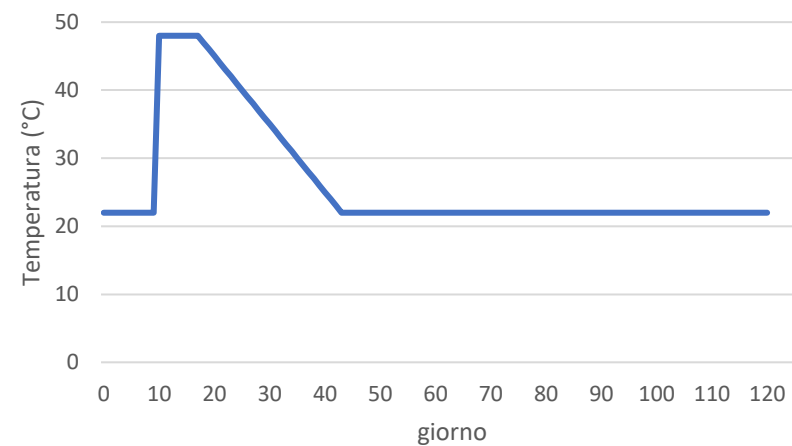
Incubatore 2 (35°C)



Incubatore 1 (22 °C)

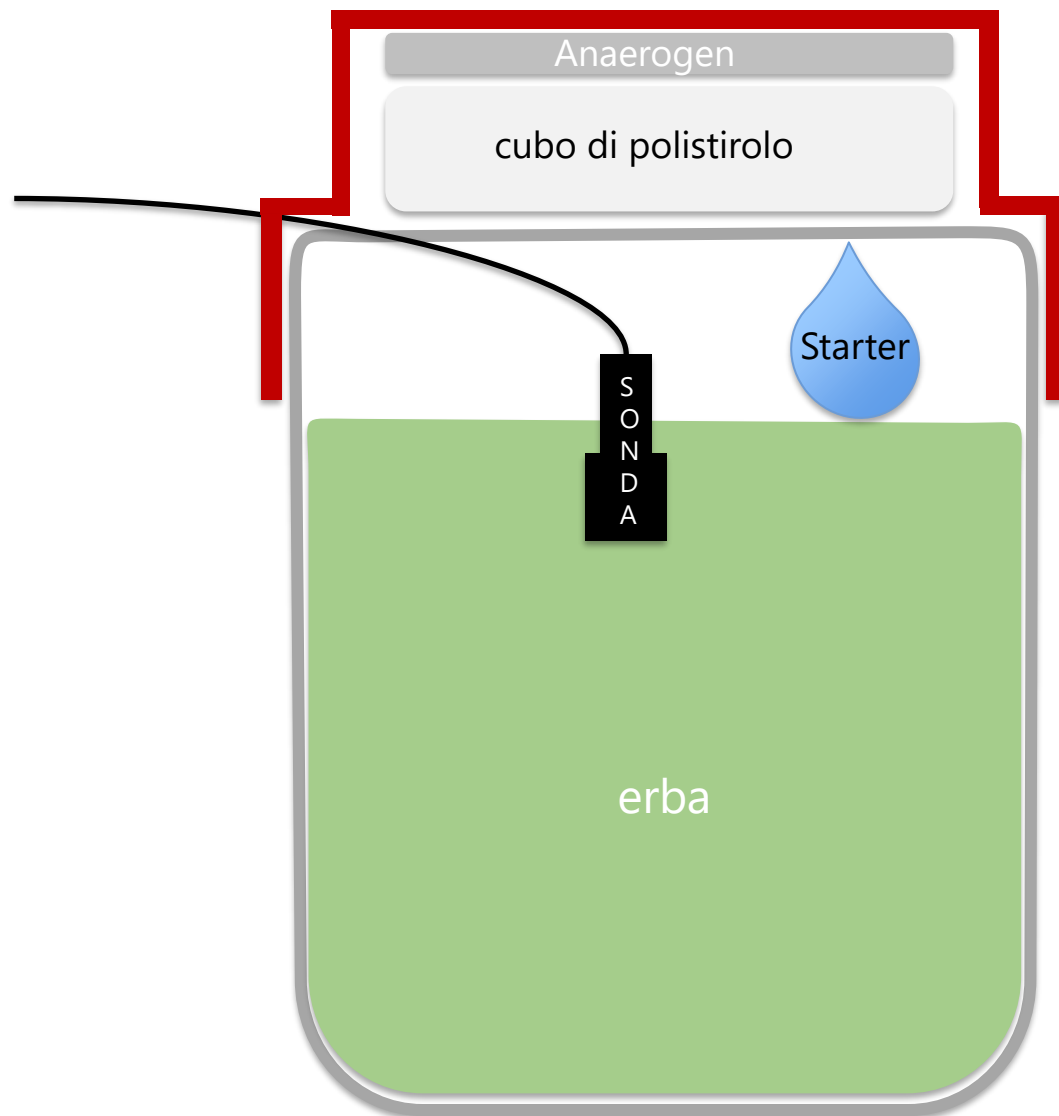


Incubatore 3 (48°C)





I. Prove di insilamento in laboratorio



- **Erba tagliata** in pezzi lunghi circa 4 cm
- **Preessicata** a
35,2 % s.s. (primo sfalcio)
27,6 % s.s. (secondo sfalcio)
- **Starter 1: Beikircher Pioneer** (eterofermentativo)
11GFT = $6,5 \times 10^7$ CFU/giara
 - ❖ LN 4017 *Lactobacillus buchneri*
 - ❖ LP 347 *Lactobacillus plantarum*
 - ❖ LP 7109 *Lactobacillus plantarum*
- **Starter 2: BONSILAGE forte** (omofermentativo)
 $1,25 \times 10^8$ CFU/giara
 - ❖ *Lactobacillus acidilactici*
 - ❖ *Lactobacillus paracasei*
 - ❖ *Lactococcus lactis*



I. Prove di insilamento in laboratorio

Analisi dei microsilos



Microsilos

Laimburg

Laboratorio analisi foraggi
Analisi secondo Weender

Laimburg

Laboratorio di aromi e metaboliti
Analisi CPFA

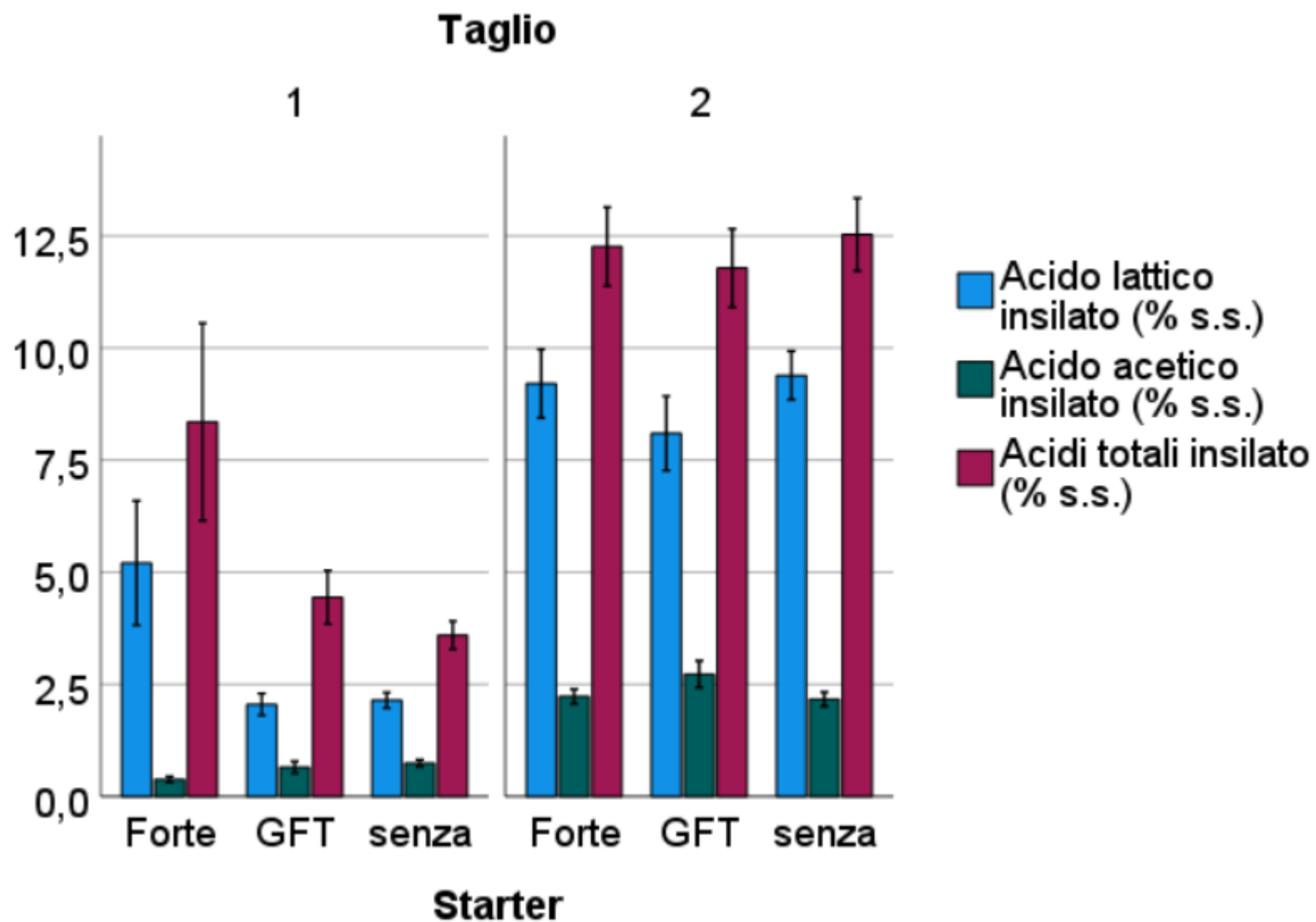
Eurofins

Microbiome Profiling



I. Prove di insilamento in laboratorio

Analisi dei microsilos





I. Prove di insilamento in laboratorio

Analisi dei microsilos

- Le sequenze di tutte le specie degli starter sono state trovate nei rispettivi campioni
- Lactobacillus buchneri* è la specie più competitiva

k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Lactobacillaceae;g__Lactobacillus;s__backii	0.3%	0.0%	0.0%	0.0%	0.
k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Lactobacillaceae;g__Lactobacillus;s__brevis	0.4%	0.0%	0.2%	1.0%	0.
k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Lactobacillaceae;g__Lactobacillus;s__buchneri	0.8%	0.0%	18.3%	1.1%	0.
k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Lactobacillaceae;g__Lactobacillus;s__coryniformis	0.0%	0.0%	0.0%	0.6%	0.
k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Lactobacillaceae;g__Lactobacillus;s__curvatus	0.0%	0.0%	0.1%	0.3%	0.
k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Lactobacillaceae;g__Lactobacillus;s__diolivorans	0.2%	0.0%	1.0%	0.0%	0.
k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Lactobacillaceae;g__Lactobacillus;s__helsingborgensis	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.
k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Lactobacillaceae;g__Lactobacillus;s__hilgardii	0.4%	0.0%	0.0%	0.0%	0.
k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Lactobacillaceae;g__Lactobacillus;s__kisonensis	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.
k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Lactobacillaceae;g__Lactobacillus;s__kullabergensis	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.



CPFA-Quantifizierung in Silageproben



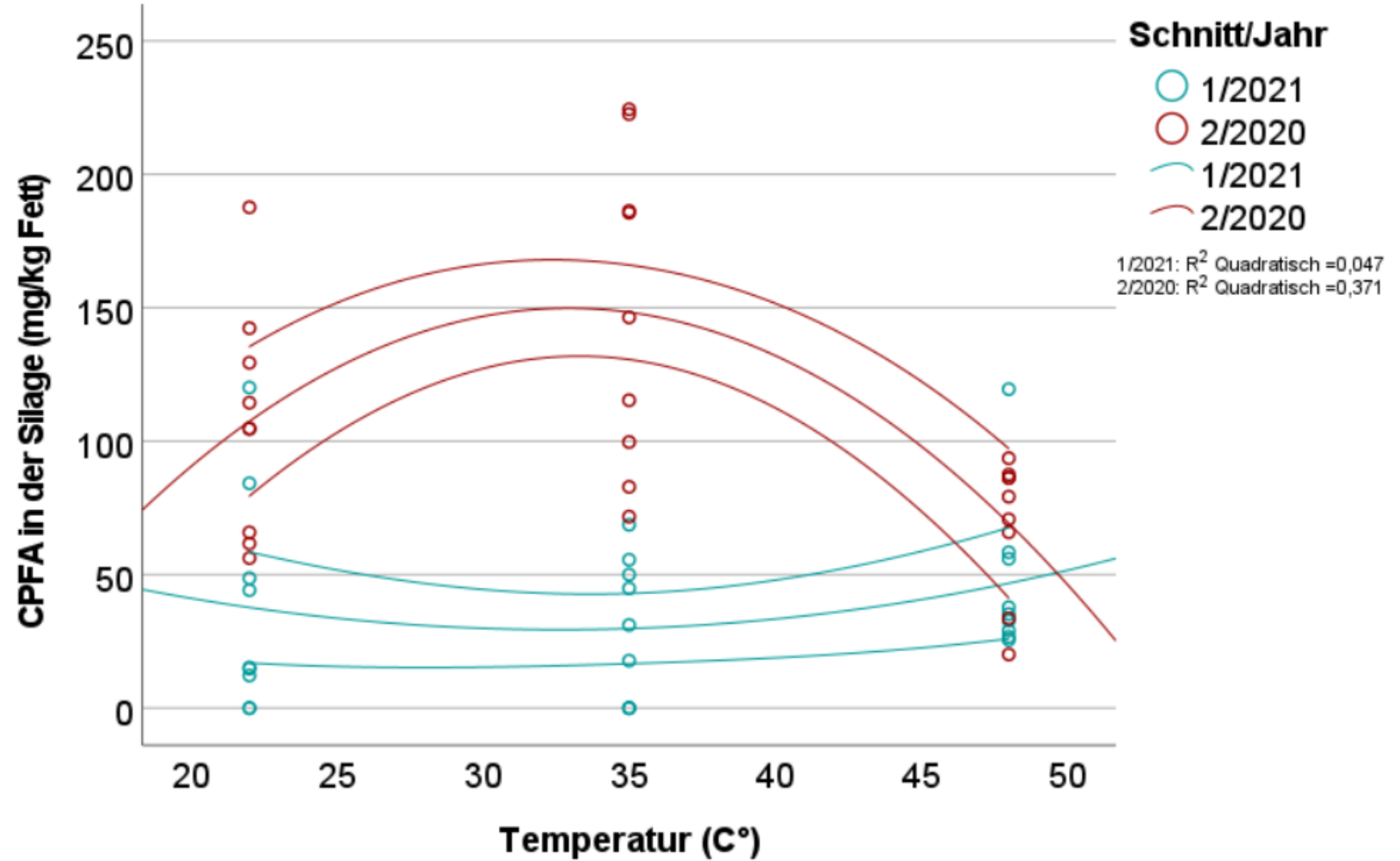


I. Siliversuche im Labor

Analysen der Mikrosilos



Effekt der Temperatur auf den CPFA-Gehalt in der Silage



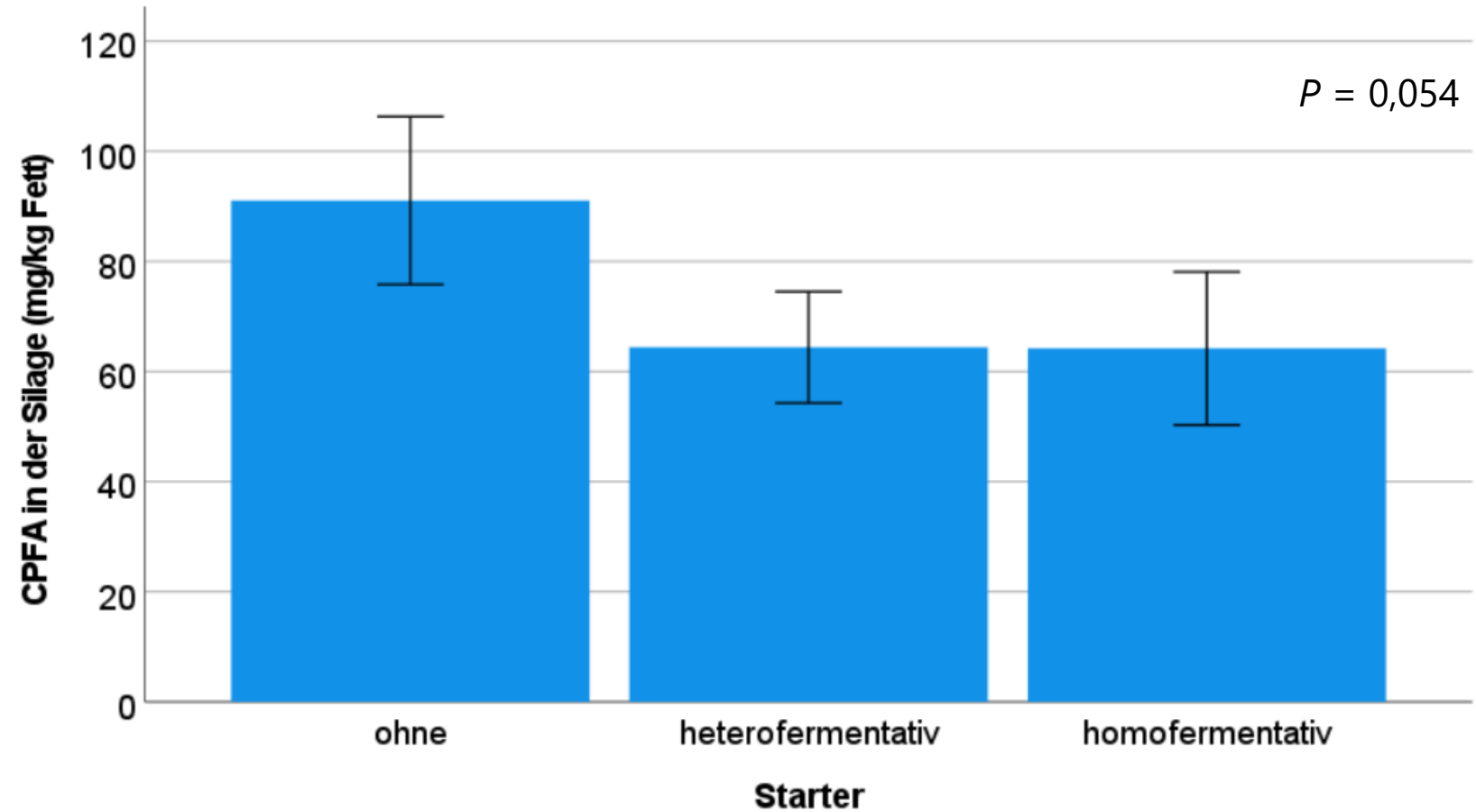


I. Silierversuche im Labor

Analysen der Mikrosilos



Effekt der Starter auf den CPFA-Gehalt

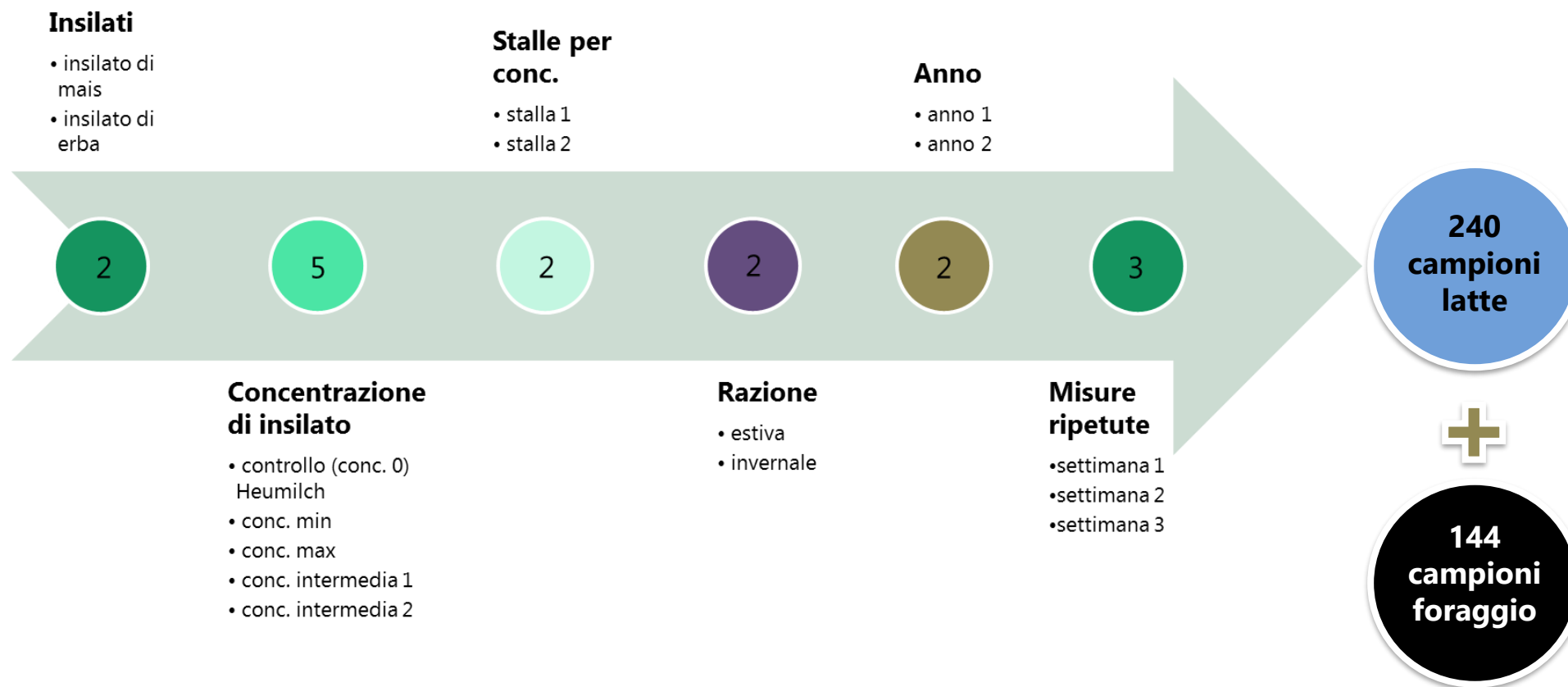


Fehlerbalken: +/- 1 SE



II. Concentrazione di marker CPFA nella prassi altoatesina

Piano di campionamento





II. Concentrazione di marker CPFA nella prassi altoatesina

La ricerca di aziende idonee

Criteri di esclusione :

- Tank / Serbatoio non monoaziendale
- Più di un tipo di foraggio fermentato

Criteri di ricerca delle aziende:

- Livello target di insilato nella razione

Aspetto favorevole:

- Socio BRING

Name des Betriebs:

Anschrift:

Name des Betriebsleiters/Kontaktperson:

Lieferantenkodex:

Telefonnummer:

E-Mail-Adresse:

Anzahl der Milchkühe:

Braunvieh	Original Braunvieh	Jersey	Fleckvieh	Pinzgauer	Schwarzbunte	Grauvieh	Andere Rassen und/oder Kreuzungen

Betriebseigener Milchsammeltank vorhanden?

- ☐ Ja
- ☐ Nein

Futtermittel:

- ☐ Grassilage
- ☐ Maissilage
- ☐ Andere fermentierte Futtermittel, z.B. Biertreber (Welche?)

Wie groß ist der geschätzte Anteil an Silage bezogen auf die Grundfütteration?

% Trockensubstanz

Wird das ganze Jahr Silage gefüttert?

- ☐ Ja
- ☐ Nein

Ab welchem Monat wird Silage in der Winterration gefüttert?

- ☐ Oktober
- ☐ November
- ☐ Dezember
- ☐ Januar
- ☐ Februar
- ☐ März
- ☐ keine Silage in der Winterration

Ab welchem Monat wird Silage in der Sommerration gefüttert?

- ☐ April
- ☐ Mai
- ☐ Juni
- ☐ Juli
- ☐ August
- ☐ September
- ☐ keine Silage in der Sommerration

Wird das Maissilo mit einer Schicht Gras abgedeckt?

- ☐ Ja
- ☐ Nein

Sind Sie Mitglied vom BRING?

- ☐ Ja
- ☐ Nein

Wurde im letzten Jahr eine Futterrationsberechnung durchgeführt?

- ☐ Ja
 - ☐ Nein
- Wenn ja, von wem?

Mappa delle aziende campionate nel progetto Heumilch

Livello di insilato (% in s.s. dell'intera razione)

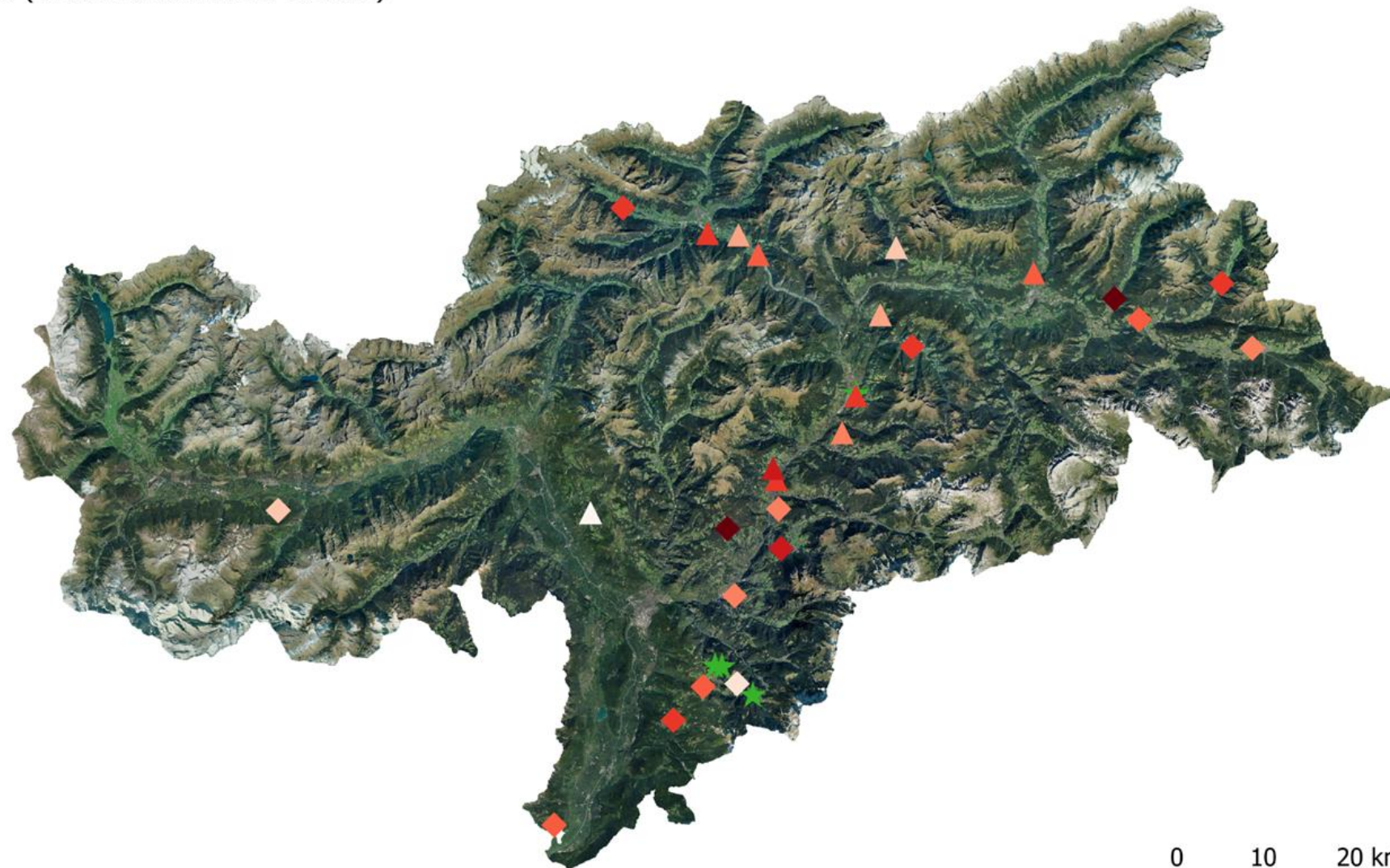
insilato mais

- 8 - 12
- 12 - 16
- 16 - 21
- 21 - 25
- 25 - 29
- 29 - 34
- 34 - 38
- 38 - 43
- 43 - 47

insilato erba

- 12 - 16
- 16 - 21
- 21 - 25
- 25 - 29
- 29 - 34
- 34 - 38
- 38 - 43
- 43 - 47
- 47 - 51

★ Heumilch



Ortofotocarta 2014/2015



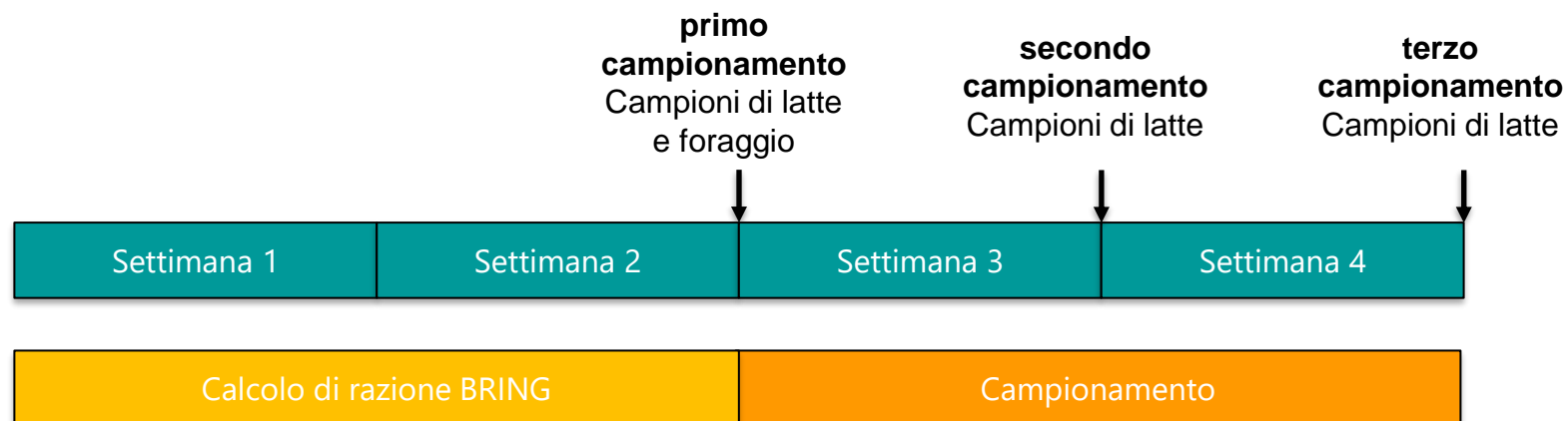
II. Concentrazione di marker CPFA nella prassi altoatesina

Tempistiche del campionamento

2019												2020												2021											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
										fase 1			fase 2					fase 3				fase 4													

■ razione invernale

■ razione estiva





II. Concentrazione di marker CPFA nella prassi altoatesina

Campioni di foraggio

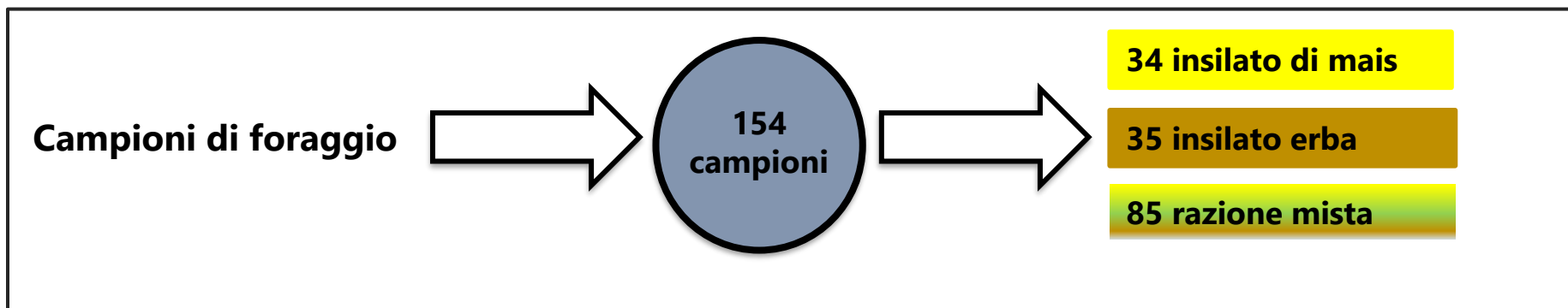
- Il prelievo è stato fatto al primo giorno di prelievo del latte
- Razione mista & insilato





II. Concentrazione di marker CPFA nella prassi altoatesina

Campioni raccolti



500 g **razione mista** → Laboratorio Analisi Foraggi Laimburg

400 g **insilato** → Laboratorio Analisi Foraggi Laimburg

→ Laboratorio per Aromi e Metaboliti Laimburg

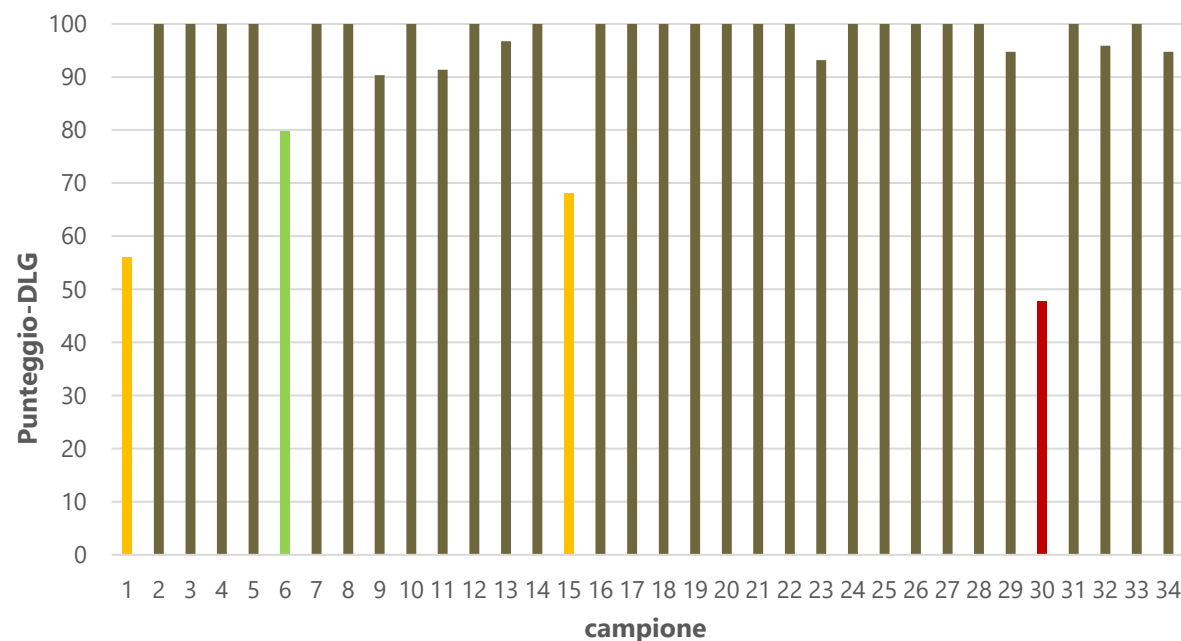


II. Concentrazione di marker CPFA nella prassi altoatesina

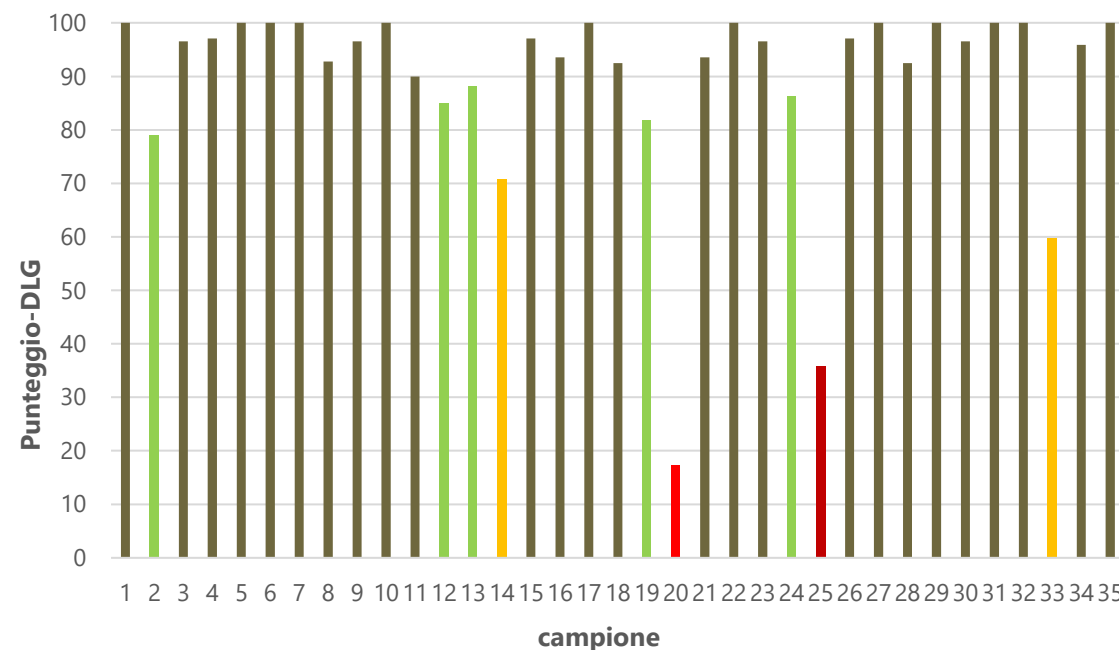
Risultati delle analisi dei foraggi

- I campioni di mangime sono stati valutati secondo l'analisi Weender
- La qualità dell'insilato è stata valutata secondo la chiave DLG (DLG Information 2/2006)

Insilato di mais



Insilato di erba



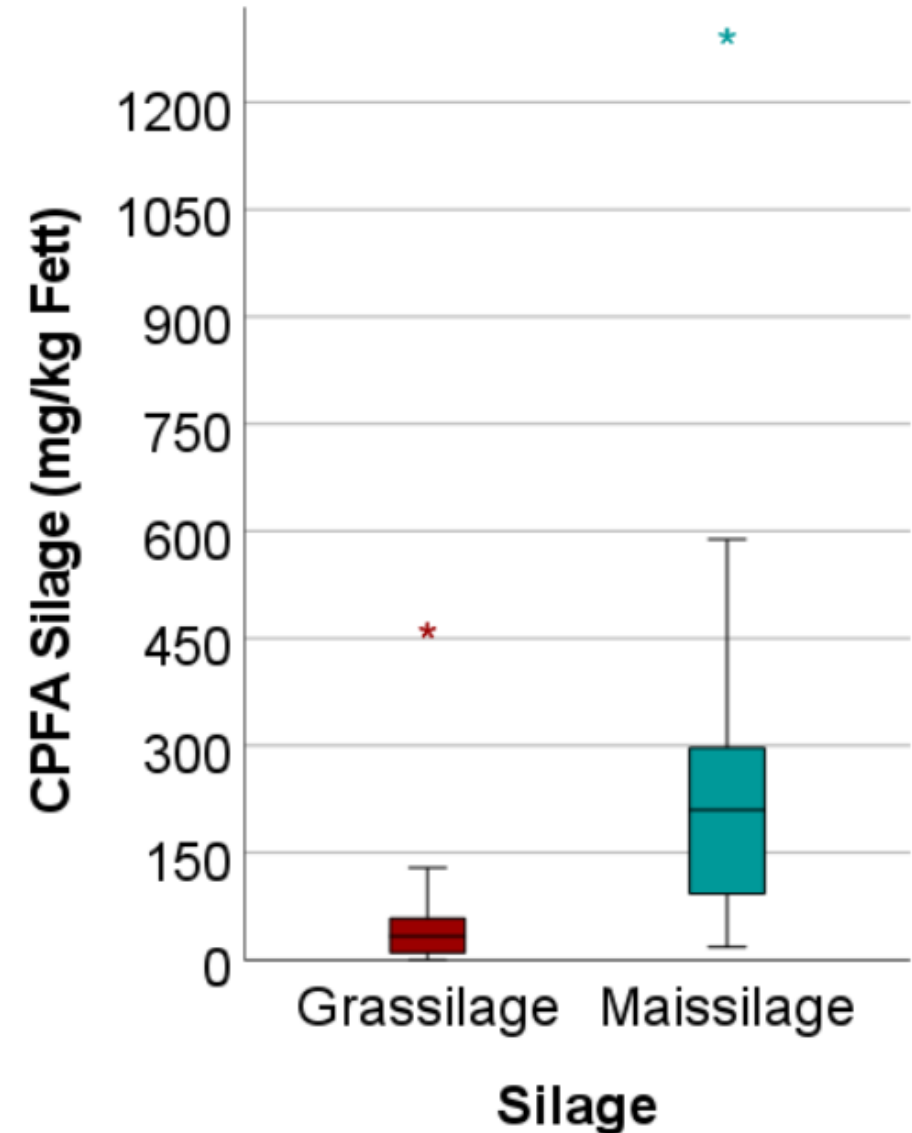
- molto bene
- bene
- bisognoso di miglioramento
- male
- molto male



II. Konzentration des Markers CPFA in der Südtiroler Praxis

Ergebnisse der CPFA Analysen der Futtermittel

	Wurde CPFA gefunden?	
	Nein	Ja
Grassilage	4	31
Maissilage	0	34





II. Concentrazione di marker CPFA nella prassi altoatesina

Campioni di latte

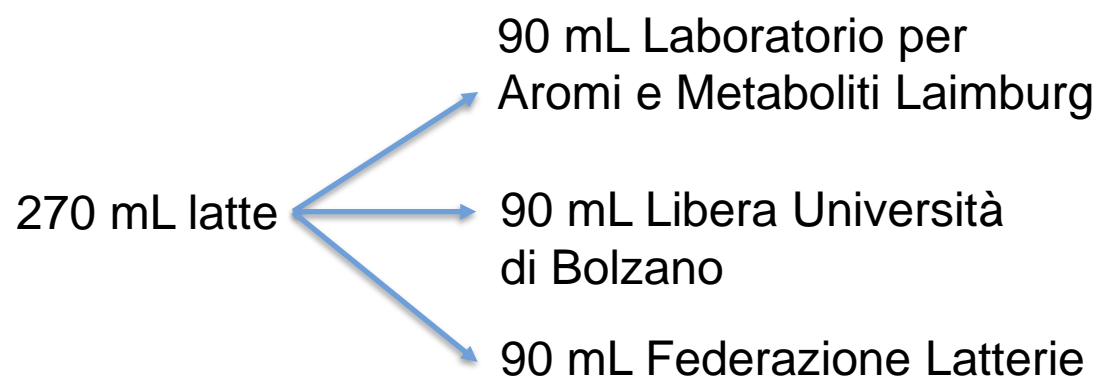
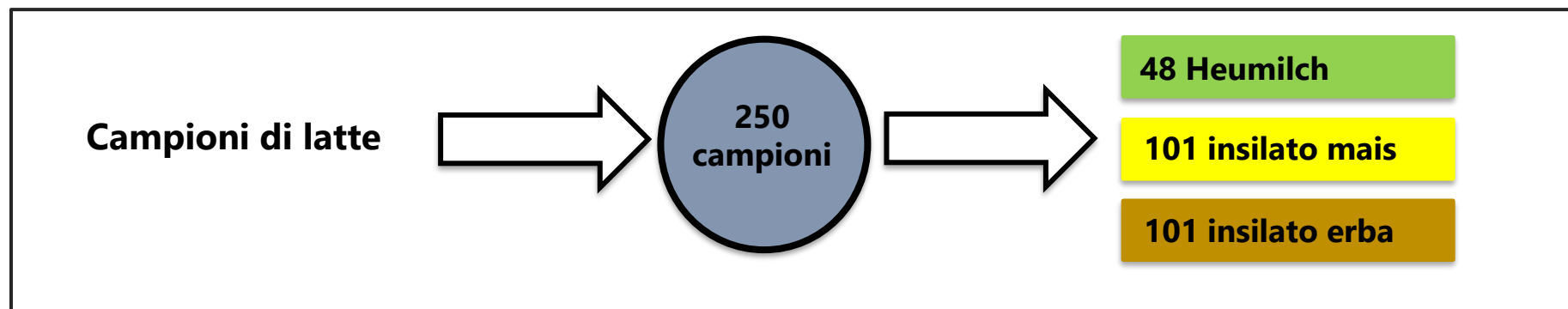


- Il campionamento è stato effettuato al mattino
- I campioni sono stati prelevati direttamente dal serbatoio del latte sfuso



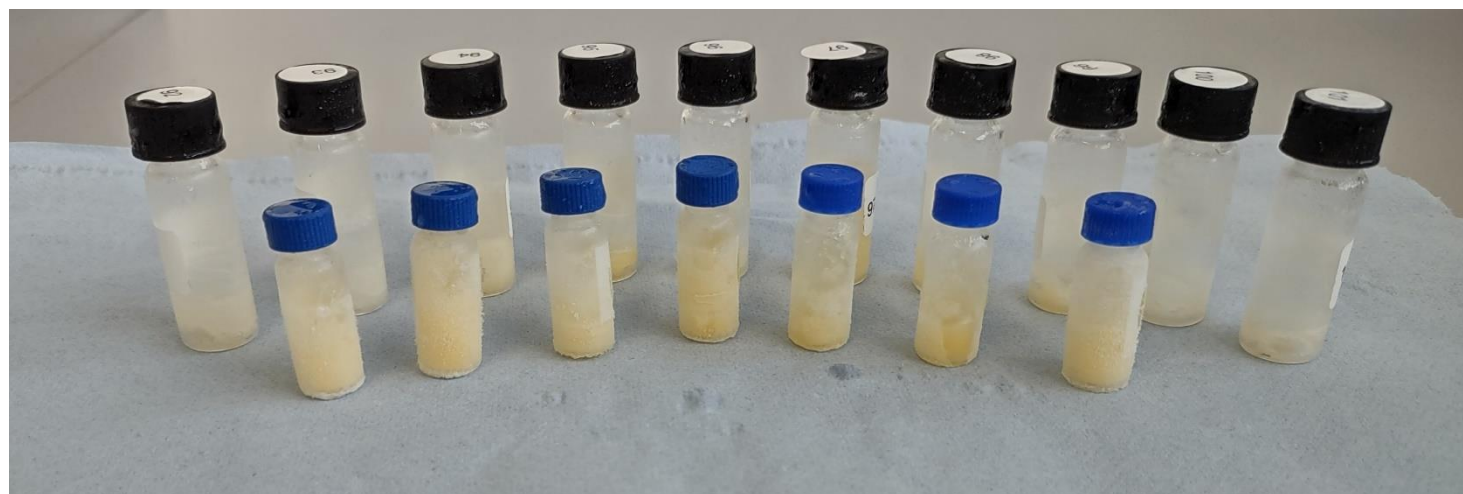
II. Concentrazione di marker CPFA nella prassi altoatesina

Campioni raccolti





II. Konzentration des Markers CPFA in der Südtiroler Praxis





II. Konzentration des Markers CPFA in der Südtiroler Praxis

CPFA Analyse in der Milch mit GC-MS

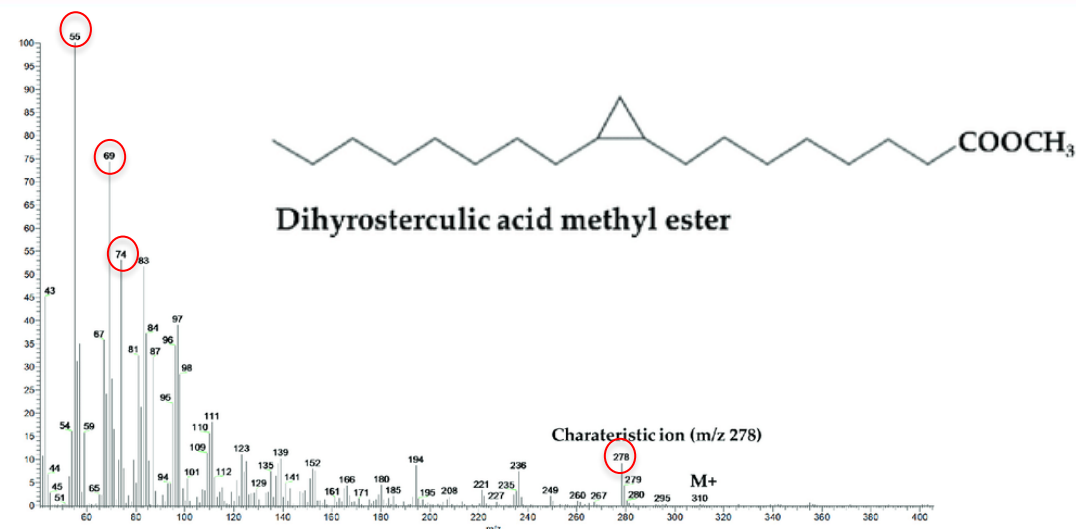


Vorbereitung der Proben:

- 100 μ L Trans-esterified sample
- 900 μ L n-Heptane

Parameters GC-MS:

- Subelco SLB-5ms column (30 m x 0.25 mm i.d x 0.25 μ m)
- Column Flow 1.00 mL/min
- Run 36 min total (T. Start 40 $^{\circ}$ C – T. End 280 $^{\circ}$ C)
- Injector T = 280 $^{\circ}$ C
- Ion source T = 230 $^{\circ}$ C
- Transfer line T = 280 $^{\circ}$ C
- Retention Time CPFA: **26,95** min
- CPFA detection in SIM: Quantifier: **55 m/z**; Qualifier: **69 m/z**,
278 m/z . M+ 310 m/z



Shimadzu GCMS-QP2010 SE



II. Konzentration des Markers CPFA in der Südtiroler Praxis

Ergebnisse der CPFA Analysen in der Milch

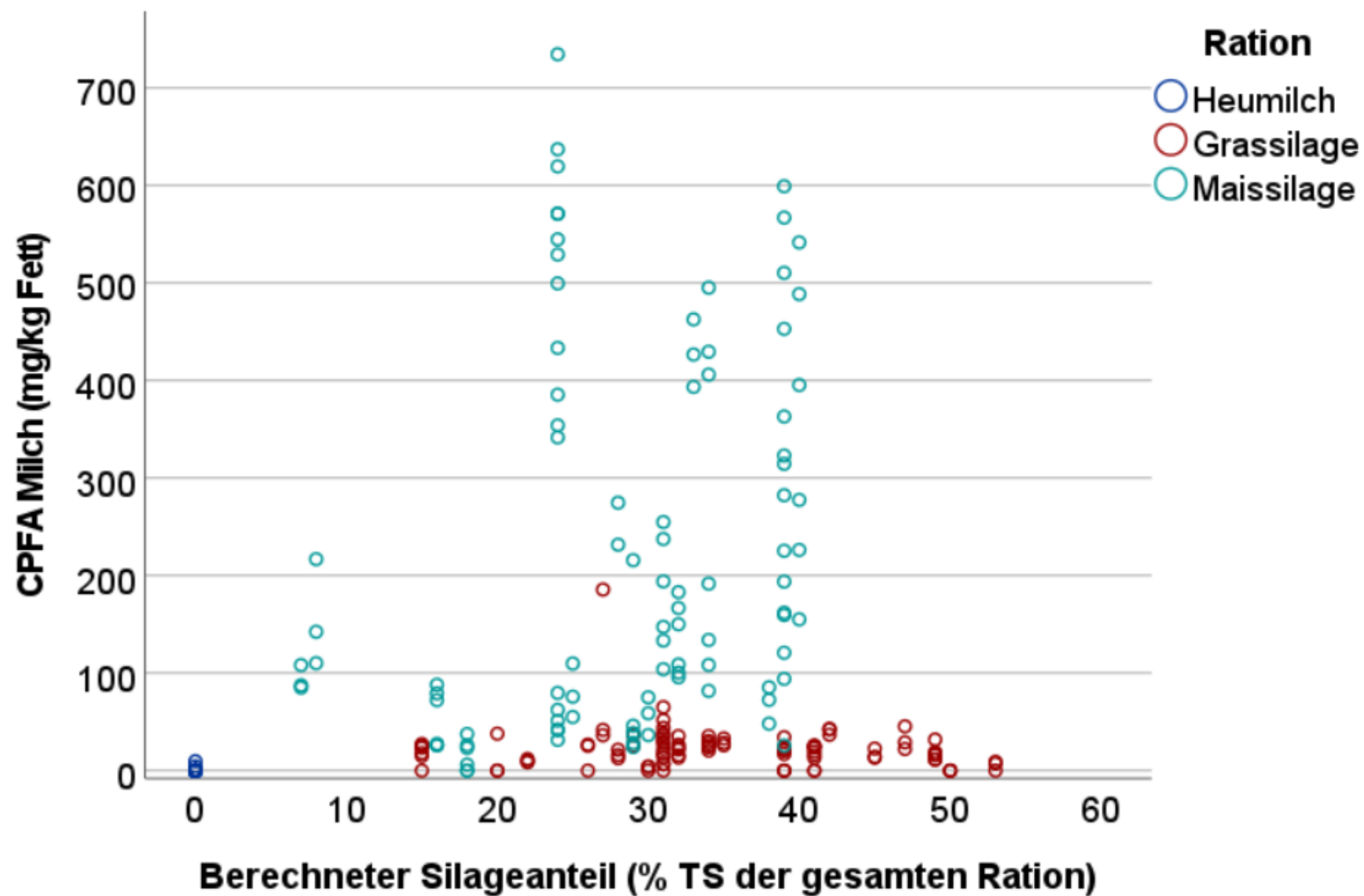
	Wurde CPFA gefunden?	
	Nein	Ja
Heumilch	100%	0%
Maissilage	2%	98% (7%)
Grassilage	15%	85% (32%)

Prozentwert der Fälle angegeben.
In Klammer angegebene Werte
resultieren aus einem Peak, der
unter der Grenze der
Quantifizierbarkeit liegt



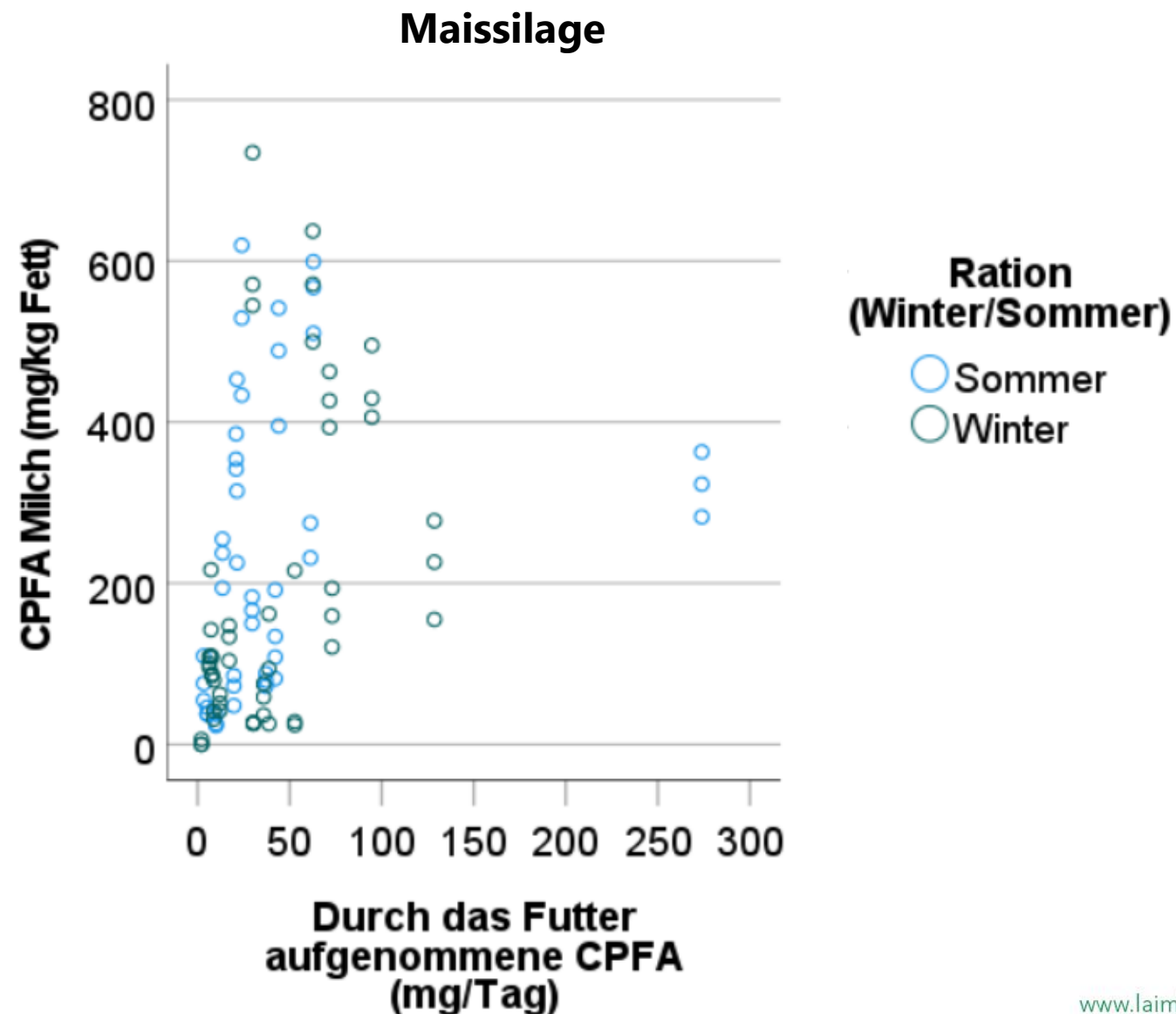
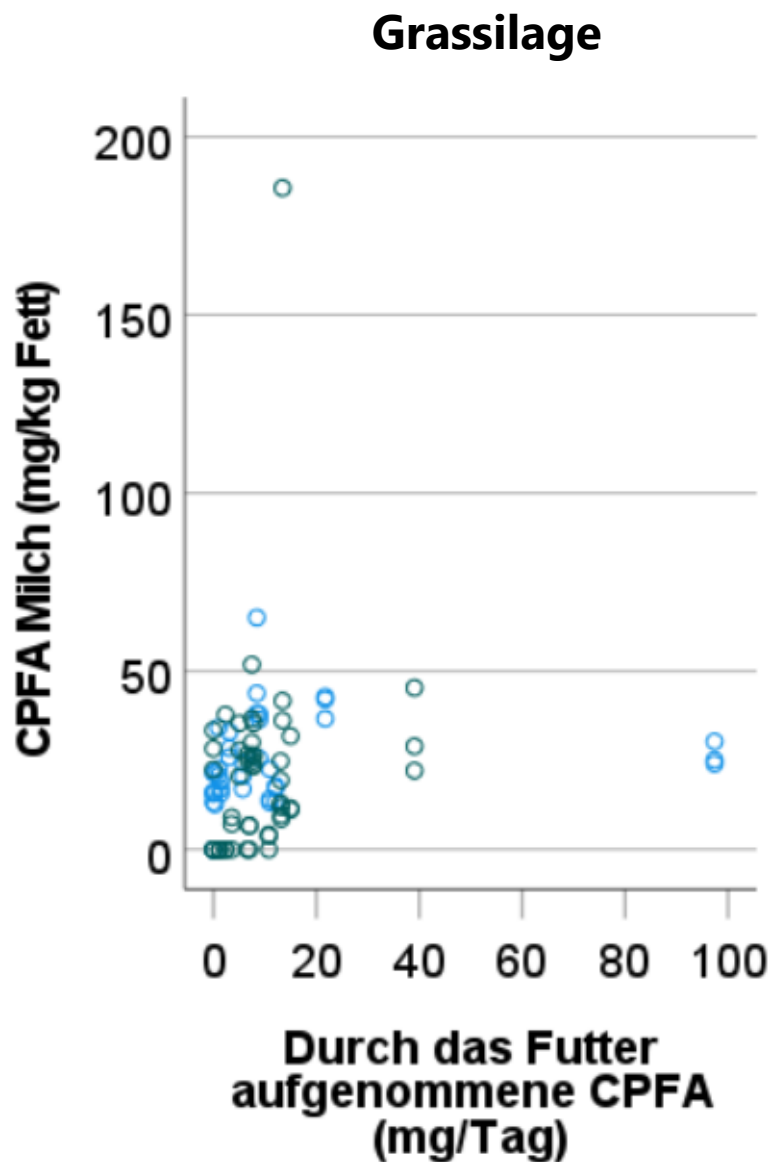


II. Konzentration des Markers CPFA in der Südtiroler Praxis





II. Konzentration des Markers CPFA in der Südtiroler Praxis





III. Se inserisco insilato nella dieta quanto tempo intercorre prima di vedere CPFA nel latte

Tempo

2 volte alla settimana
per 2 mesi
(incluso T_0)

Stalle

- stalla 1
- stalla 2
- ~~stalla 3~~



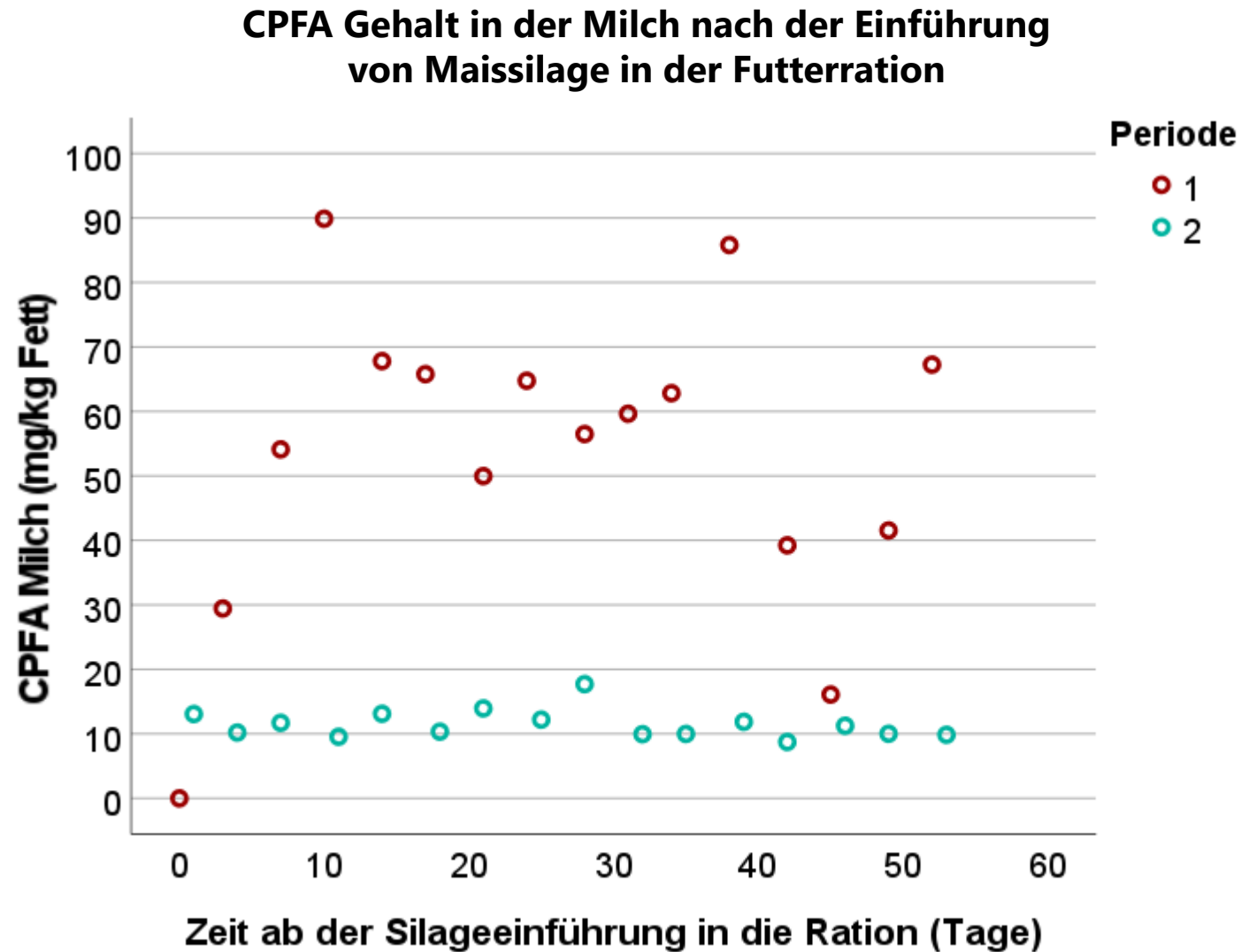
Insilato

- mais





III. Beginn von Silagefütterung: Wie lange braucht es, bis CPFA in der Milch nachgewiesen werden kann?





IV. Se passo da latte normale a latte fieno quale è il tempo di sospensione di insilati nella razione per non avere più CPFA nel latte

REG EU n. 509/2006 — Se le vacche sono state alimentate con foraggi insilati (mangimi fermentati), vi deve essere un periodo di attesa di almeno 14 giorni.

Tempo

- 0 gg
- 14 gg
- 28 gg
- 42 gg
- 56 gg

Stalle

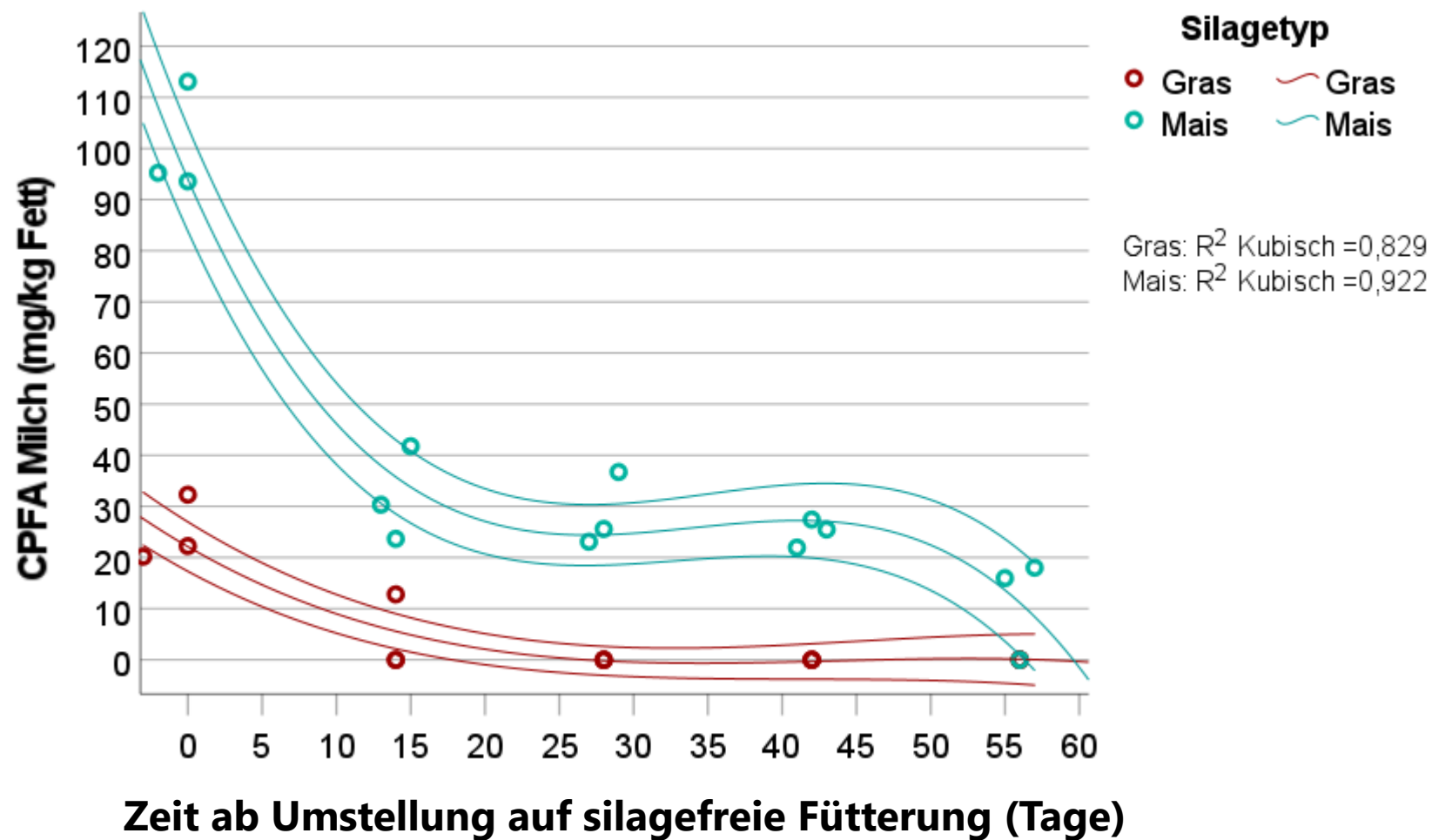
- stalla 1
- stalla 2
- stalla 3





IV. Wechsel von Standardmilch zu Heumilch - Wie lange ist CPFA noch in der Milch nachweisbar?

Veränderung des CPFA-Gehalts in der Milch nach einer Umstellung auf silagefreie Fütterung





- **Possibilità di impiego di CPFA come marker**
 - **Presenza-assenza**
 - Mai CPFA in latte prodotto senza insilati nella dieta (nessun rischio di riconoscere l'uso di insilati laddove non sono stati usati)
 - Alta affidabilità di CPFA nell'identificare latte prodotto con insilati di mais (corretto nel 98% dei casi)
 - Affidabilità inferiore nell'identificare latte prodotto con insilati d'erba (corretto nell'85% dei casi, ma circa un terzo sotto la soglia di quantificabilità)
 - La frequente combinazione di insilati di erba e mais nella prassi agricola riducono la rilevanza nella prassi dei falsi negativi degli insilati d'erba
 - **Dinamica temporale**
 - I CPFA compaiono subito nel latte appena introdotti nella dieta
 - I CPFA scompaiono lentamente dopo la loro sospensione nella dieta (15 gg. per gli insilati d'erba, ca. 2 mesi per quelli di mais, quindi non adatti a verificare il rispetto delle due settimane dalla loro sospensione nella dieta)



- **Relazione quantitativa foraggio-latte**
 - La concentrazione di CPFA è molto più bassa negli insilati di erba che in quelli di mais e lo stesso si osserva nel latte prodotto usando questi insilati
 - Non c'è una relazione quantitativa evidente tra la percentuale di insilati nella dieta e CPFA nel latte
 - La relazione tra quantità di CPFA assunti tramite la dieta e la loro concentrazione rilevata nel latte è debole per quanto riguarda gli insilati di mais e insignificante per gli insilati d'erba
- **Ancora da approfondire**
 - Fattori che favoriscono la produzione di CPFA durante l'insilamento

Grazie dell'attenzione Danke für die Aufmerksamkeit



efre·fesr
Südtirol · Alto Adige

Europäischer Fonds für regionale Entwicklung
Fondo europeo di sviluppo regionale



EUROPEAN UNION



AUTONOME
PROVINZ
BOZEN
SÜDTIROL



PROVINCIA
AUTONOMA
DI BOLZANO
ALTO ADIGE

[progetto Heumilch FESR1129 CUP: H36H19000000007, programma: investimenti a favore della crescita e dell'occupazione FESR 2014-2020; Investitionen in Wachstum und Beschäftigung“ EFRE 2014-2020]