

NUOVI FORMULATI PRE-DIPPING PER L'IGIENE DELLA MAMMELLA

Francesco ADDUCI*¹, Hazem S. ELSHAFIE¹, Cristiana LABELLA¹, Mauro MUSTO¹,
Pierangelo FRESCHI¹, Rosanna PAOLINO¹, Carlo COSENTINO¹

RIASSUNTO - Esistono diverse categorie di microrganismi ambientali che, se pur non patogeni, hanno una spiccata attività anti casearia che dequalificano irrimediabilmente la qualità ed il valore commerciale del prodotto. I batteri del genere *Clostridium* ed in particolare il *Clostridium tyrobutyricum* (Gram+) sono tra le principali cause del gonfiore tardivo nei formaggi duri e semiduri. Con le opportune operazioni di gestione dell'intera filiera di produzione del latte è possibile contenere il numero di spore di clostridi migliorando la qualità casearia del latte. In particolare, l'utilizzo di un prodotto sterilizzante per il lavaggio della mammella prima della mungitura può risultare utile per ridurre o evitare la contaminazione. Nella pratica casearia come agente antimicrobico viene di prassi utilizzato il lisozima (E1105) estratto dall'albume. Tale enzima lo ritroviamo, però, anche in alte percentuali nel latte di asina congiuntamente ad altri fattori proteici di difesa immunitaria. Scopo della presente ricerca è stata la valutazione dell'efficacia antibatterica di tre diverse formulazioni di pre-dipping sperimentali realizzate con l'aggiunta di latte d'asina (pastorizzato e condensato all'80%) e nisina (E234, polipeptide policiclico prodotto dal *Lactococcus lactis*): F1=15% latte di asina e 0,02% nisina; F2=15% latte di asina e 0,04% nisina; F3= 15% latte di asina e 0,06% nisina. L'attività antimicrobica delle tre formulazioni è stata valutata mediante test in vitro con la tecnica del disc diffusion method sui seguenti microrganismi: *Bacillus megaterium*, *Bacillus mojavensis*, *Clavibacter michiganensis* e *Clostridium tyrobutyricum*. Tale attività è stata comparata con due antibiotici, quali l'Ampicillina (100 µg/mL) e la Kanamicina (50 µg/mL), e con un pre-dipping commerciale. I risultati evidenziano un'attività inibitoria in tutte e tre le formulazioni sperimentali verso i seguenti microrganismi: *C. tyrobutyricum*, *B. megaterium*, *B. mojavensis*, *C. michiganensis*, *Xanthomonas campestris*. Nessuna attività è stata rilevata nei confronti dell'*Escherichia coli*. Tra le tre differenti formulazioni sono state registrate differenze significative ($P \leq 0,05$) per l'attività inibitoria verso il *C. tyrobutyricum*, F2 ha espresso la maggiore attività. Per tutte le formulazioni sperimentali, l'efficacia rilevata, è inferiore rispetto all'ampicillina. Dal confronto tra i pre-dipping sperimentali e il commerciale sono emerse differenze significative ($P \leq 0,05$) nei livelli di efficacia verso il *C. tyrobutyricum*. In particolare, le nuove formulazioni hanno

* Corrispondenza ed estratti: francesco.adduci@unibas.it; tel. (+39) 3403749556

¹ Scuola di Scienze Agrarie, Forestali, Alimentari ed Ambientali, SAFE Università degli Studi della Basilicata. Viale dell'Ateneo lucano 10, 85100 Potenza (PZ)

manifestato tutte un'attività superiore al commerciale ma solo per F1 e F2 tali differenze sono risultate significative ($P \leq 0,05$).

Parole chiave: clostridi, pred-dipping, lisozima, nisina, latte d'asina.

SUMMARY - New pre-dipping formulated for udder hygiene - There are different categories of environmental microorganisms that, although non-pathogenic, have a strong anti dairy activities that irretrievably reduce the quality and commercial value of the product. The *Clostridium* bacteria, in particular *Clostridium tyrobutyricum* (Gram+) are among the main causes of late blowing in hard and semi-hard cheeses. With the appropriate management operations of milk production chain is possible to contain the number of clostridia spores improving the milk quality. In particular, the use of a sterilizing product for washing udder before milking may be useful to reduce or to prevent contamination. Usually, lysozyme (E1105) extracted from the album is used as antimicrobial agent. This enzyme is even in high percentages in donkey milk with other factors of immune defense. The aim of this research was to evaluate the antibacterial efficacy of three different formulations of experimental pre-dipping realized with the addition of donkey milk (pasteurized and condensed to 80%) and the nisin (E234, polycyclic polypeptide produced by *Lactococcus lactis*): F1 = 15% donkey milk and 0.02% nisin; F2 = 15% donkey milk and 0.04% nisin; F3 = 15% donkey milk and 0.06% nisin. The antimicrobial activity of the three formulations was evaluated by in vitro tests with the disk diffusion method on the following microorganisms: *Bacillus megaterium*, *Bacillus mojavensis*, *Clavibacter michiganensis* and *Clostridium tyrobutyricum*. This activity was compared with two antibiotics, such as Ampicillin (100 mg/mL) and Kanamycin 50 mg/ mL, and with a commercial pre-dipping. The results show the inhibitory activity in all three experimental formulations to the following microorganisms: *C. tyrobutyricum*, *B. megaterium*, *B. mojavensis*, *C. michiganensis*, *Xanthomonas campestris*. No activity was detected against *Escherichia coli*. Among the three different formulations significant differences were recorded ($P \leq 0,05$) for the inhibitory activity against *C. tyrobutyricum*, F2 expressed the high activity. The effectiveness detected is lower than ampicillin for all experimental formulations. The comparison between experimental and commercial pre-dipping is significant ($P \leq 0,05$) for effectiveness towards *C. tyrobutyricum*. In particular, the new formulations have shown an activity higher than the commercial, but only for F1 and F2 such differences were significant ($P \leq 0,05$).

Keywords: clostridium, pred-dipping, lysozyme, lysine, donkey milk.

INTRODUZIONE

La carica microbica del latte che arriva fin al caseificio è direttamente correlata alle condizioni igieniche osservate dagli operatori nel corso della mungitura e alle modalità di conservazione e di trasporto. Nel corso della mungitura il latte, che all'interno della mammella sana è sterile, viene inquinato dai microrganismi presenti nell'ambiente di allevamento, per esempio nella paglia, nelle cuccette, sulle macchine mungitrici. Tali microrganismi sono ubiquitari e la contaminazione può avvenire durante la mungitura

o tra una mungitura e l'altra, quando gli animali si alimentano o ruminano ma più spesso avviene subito dopo la mungitura, quando il tappo di cheratina non si è ancora formato e lo sfintere del capezzolo è ancora pervio. Esistono diverse categorie di microrganismi ambientali che, se pur non patogeni, hanno una spiccata attività anti casearia. Questo gruppo di microrganismi è responsabile dei più comuni difetti dei formaggi quali il gonfiore tardivo caratteristico dei formaggi cotti ed a stagionatura prolungata. Il difetto consiste principalmente in una disorganiz-

zazione della pasta che assume una consistenza spugnosa oppure si manifesta con occhiate, fessurazioni, sfogliature e aperture a carattere cavernoso che interessano in particolare, la parte centrale delle forme che tendono a gonfiarsi ed in alcuni casi fin a spaccarsi del tutto [1]. Il difetto, se marcato, può dare luogo a sapori rancidi ed odori sgradevoli, dovuti alla produzione di acido butirrico ed aldeide acetica, che dequalificano irrimediabilmente la qualità ed il valore commerciale del prodotto [2]. Gli agenti responsabili di questa alterazione sono i batteri del genere *Clostridium* ed in particolare il *Clostridium tyrobutyricum* (Gram+), che fermentano i lattati, dando origine ad acido butirrico, anidride carbonica e idrogeno [3].

I clostridi sono presenti in numero molto variabile in ogni tipo di suolo e rivestono un ruolo importante nella degradazione della sostanza organica producendo acidi, alcoli, CO₂ e H₂. Dal terreno, a causa di fattori ambientali (pioggia, vento ecc.) e delle macchine operatrici passano sui foraggi, dagli insilati le spore di clostridi arrivano alla mangiatoia e una volta ingerite passano inalterate nell'apparato digerente. Durante il transito nel digerente le cellule vegetative trasportate dai liquidi digestivi e dai tessuti vegetali sporificano e questo spiega l'incremento significativo del numero di spore tra l'ingesta (razione) e l'escreta (feci). Nel corso della mungitura il latte viene quindi inquinato dai clostridi presenti nelle feci. Il numero di spore presenti nel latte varia in caso di differenti operazioni di pulizia della mammella durante la mungitura [4]. Passate nel latte le spore si mantengono vitali durante tutte le fasi della caseificazione. Anche il riscaldamento cui viene sottoposta la cagliata non è in grado di inattivarle. Durante la fase di stagionatura del formaggio, mentre diminuiscono i germi potenzialmente patogeni [5], i clostridi possono ritrovare un ambiente favorevole alla loro moltiplicazione ed ingenerare i gonfiori tardivi del formaggio [6, 7].

Con le opportune strategie aziendali di

gestione dell'intera filiera di produzione del latte è possibile contenere considerevolmente il numero di spore di clostridi migliorando la qualità casearia del latte. Infatti, il numero di spore nei latti commerciali destinati alla caseificazione di formaggi come il Grana Padano negli ultimi anni è stato fortemente ridotto [8] e talora è mantenuto al di sotto delle 200 spore/litro. Nella pratica casearia, per prevenire il difetto del gonfiore tardivo, viene di prassi utilizzato il lisozima (E1105) estratto dall'albumina d'uovo [2]. Sebbene i principali allergeni delle uova sono l'ovalbumina e l'ovomucoide diversi studi hanno dimostrato che anche il lisozima contenuto nell'uovo è difatti un allergene [9, 10]. Kerkaert et al [11] riportano in uno studio sulle reazioni allergiche alle uova, che in cinque su ventuno casi si sono verificate reazioni attribuite alla presenza di questo additivo (lisozima) nel formaggio.

Altra fonte importante ed alternativa di lisozima è il latte di asina. Il tenore in lisozima del latte di asina si attesta, secondo alcuni autori, su valori di 3750,0 ± 250,0 mg/l, [12] a fronte del valore riferito per il latte vaccino pari circa a 0,09 mg/l [13]. L'attività antibatterica del latte di asina è stata testata su varie tipologie di microrganismi. Aliva et al [14] riportano gli effetti inibitori del lisozima su alcuni ceppi di *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. beijerinckii* mentre nessun effetto inibente è stato registrato a carico del *C. sporogenes*. Conte et al [15] hanno valutato l'attività inibente del lisozima a carico dello *Pseudomonas sp.*, e parzialmente su alcuni ceppi di *Salmonella* mentre non è stata osservata alcuna inibizione a carico di *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*. Inoltre, il latte d'asina possiede un'elevata attività antibatterica rispetto a *Salmonella Choleraesuis* e *Shigella dysenteriae* [16].

Lo scopo del presente lavoro di ricerca è stata la realizzazione di un pre-dipping addizionato con latte d'asina al fine di valutare l'attività antibatterica del lisozima in esso contenuto. L'azione del lisozima presente nel

pre-dipping dovrebbe attuarsi a carico dei microrganismi Gram+ in generale e dei Clostridi in particolare normalmente presenti sulla cute del capezzolo delle vacche in lattazione. Nel contempo si è testato anche l'attività del lisozima nei confronti dei microrganismi contagiosi normalmente presenti in ambiente di allevamento e pertanto anche sulla cute mammaria. La realizzazione del pre-dipping sperimentale ha previsto varie fasi al termine delle quali sono stati eseguiti dei test in vitro per valutare l'efficacia dei singoli preparati. Nel presente lavoro sono stati riportati i metodi, le fasi ed i risultati preliminari dei test in vitro relativi alle prove di efficacia dell'attività antibatterica dei preparati realizzati.

MATERIALI E METODI

a) Formulazione pre-dipping sperimentale - Per la realizzazione dei tre pre-dipping sperimentali è stato utilizzato latte di asina pastorizzato e condensato. La pastorizzazione del latte di asina crudo è stata effettuata a +63 °C per 30 minuti; la condensazione per evaporazione sotto vuoto utilizzando l'evaporatore rotante RV8, IKA®-Werke (GmbH & Co. KG, Germania) dotato di un modello di pompa a vuoto PC 3001 Vario (Vacuubrand GmbH, Wertheim, Germania), è avvenuta alle seguenti condizioni: bagnomaria a temperatura di 35 °C; pressione 40 mbar; tempo di elaborazione a 2 e 3 h per la condensazione rispettivamente al 40% e 20% del volume iniziale corrispondente al latte condensato al 60 ed all'80%. Per l'estrazione e la quantificazione del lisozima nel latte d'asina condensato, è stata utilizzata la metodologia proposta da Cosentino *et al* [17]. L'attività antibatterica del latte di asina pastorizzato, pastorizzato condensato al 60% e al 80% è stata valutata con la tecnica del disc diffusion method. In breve, un'aliquota di 20 µl di ciascun campione di latte è stata piastrata su dischi di Agar [18]. L'attività inibente è stata valutata sui seguenti microrganismi: *B. megaterium*, *B. mojavensis*, *C. michiganensis* and *C. tyrobutyricum*. Tale attività è

stata comparata con due antibiotici di uso comune quali l'Ampicillina (100 µg/mL) e la kanamicina (50 µg/mL).

Sulla base dei risultati ottenuti dalla prove precedenti si è proceduto alla realizzazione di tre formulazioni di pre-dipping sperimentale (F1, F2, F3). Per la realizzazione delle tre formulazioni è stato utilizzato il latte d'asina condensato all'80% in quanto il condensato al 60% ha manifestato problemi di stabilità fisica legati alla separazione delle fasi. Tutti i preparati contengono: latte d'asina (condensato all'80% con contenuto in lisozima di 825 mg/L) 15%; acqua, glicerina, glucoside laurico, sodio lauril sarcosinato, alcol benzilico, deidroacetato di sodio, acido citrico, benzoato di sodio, sorbato di potassio. Le tre formulazioni di pre-dipping differiscono per il contenuto di nisina che rispettivamente è 0.02% in F1, 0.04% in F2, 0.06% in F3). L'inserimento della nisina (E234), peptide policiclico ad attività antibatterica prodotto dal *Lactococcus lactis* [14], ha avuto lo scopo di preservare la stabilità microbiologica del preparato visto l'elevato contenuto in lattosio dello stesso, derivante dal latte di asina.

b) Valutazione dell'attività antibatterica del pre-dipping sperimentale - L'attività antibatterica delle tre formulazioni di pre-dipping è stata valutata con la tecnica del disc diffusion method: un'aliquota di 20 µl per ciascun campione di pre-dipping è stata piastrata su dischi di Agar [18]. L'attività inibente delle tre formulazioni è stata valutata sui seguenti microrganismi: *B. megaterium*, *B. mojavensis*, *C. michiganensis* e *C. tyrobutyricum*. Tale attività è stata comparata con due antibiotici quali l'Ampicillina (100 µg/mL) e la kanamicina 50 µg/m e con un pre-dipping commerciale. Di seguito si riporta la composizione del pre-dipping commerciale: 1% Acido fosforico profumi, anionici, perossido di idrogeno; 1-5% Urea, tensioattivi non ionici (alchilpoliglicoside, acidi grassi esterificati), pantenolo, sorbitolo, acido lattico; 5-15% glicerina; (specifica: Alchilpoliglucoside: EINECS Polimero, Quantità: inferiore al

2%; Etossi solfato di alcool: EINECS Polimero, Quantità: inferiore al 0,5%; acido lattico EINECS 200-018-0; Quantità: 2-5%; EINECS 231-765-0 perossido di idrogeno; Quantità: inferiore al 0,5%).

c) Analisi Statistica - I risultati sono stati elaborati e sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA), seguita dal test di Tukey di confronto multiplo con una probabilità di $P < 0.05$ utilizzando il pacchetto di software statistico SPSS versione 13.0 (2004) per rilevare la significatività tra i diversi trattamenti.

RISULTATI E DISCUSSIONE

1) Pre-dipping sperimentali - Il tenore in lisozima del latte d'asina utilizzato nelle prove è stato pari a: 1089,06 mg/L per il latte pastorizzato e 5500,00 mg/L per il latte pastorizzato condensato all'80%. La scelta del latte d'asina pastorizzato e condensato all'80% come componente delle tre formulazioni di pre-dipping è dovuta sia al maggior contenuto in lisozima nel prodotto finale (825 mg/L) che a ragioni di stabilità fisica del prodotto. Come dimostrato da Cosentino *et al* [17, 18] la condensazione non inficia né l'attività antiossidante né la concentrazione del lisozima nel latte d'asina.

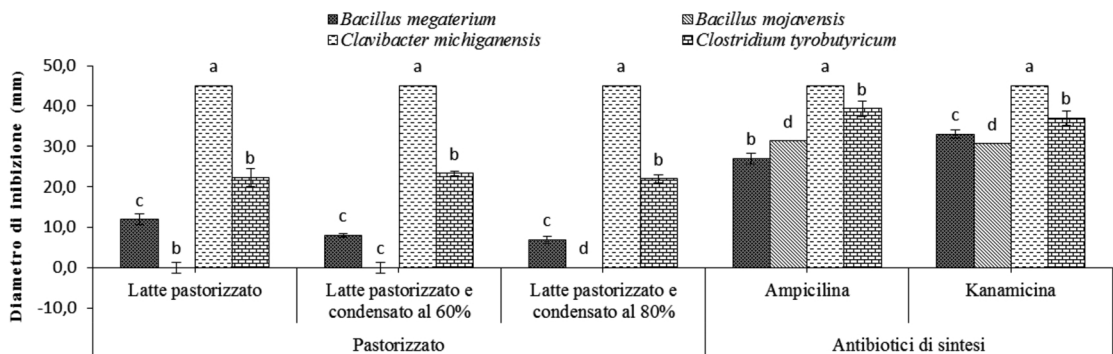
La valutazione dell'attività antimicrobica

del latte d'asina è riportata in figura 1. Dai risultati ottenuti si registra un egual grado di attività antimicrobica nei confronti dei microrganismi utilizzati in prova e che tale attività non differisce in maniera significativa in funzione del grado di condensazione. Dal confronto tra i diversi campioni di latte ed i due antibiotici sono emerse differenze significative, in termini di diametro di inibizione, nei confronti dei seguenti microrganismi: *Clostridium tyrobutyricum*, *Bacillus megaterium*, *Xanthomonas*. Nessuna differenza è stata registrata nei confronti del *Clavibacter michiganensis* in cui il diametro di inibizione è risultato pressoché identico per tutti i campioni in prova. Non è stata registrata alcuna attività antimicrobica delle tre tipologie di latte in prova nei confronti del *Bacillus mojavensis* mentre per il *Clostridium tyrobutyricum* l'attività antimicrobica è risultata identica.

2) Attività antibatterica dei pre-dipping sperimentali - Successivamente si è proceduto alla valutazione del grado di attività antimicrobica delle tre formulazioni di pre-dipping, contenenti il 15% di latte di asina (pastorizzato e condensato all'80%) e tre diverse aliquote di nisina (F1 0,02%, F2 0,04%, F3 0,06%). L'attività antimicrobica delle tre formulazioni di pre-dipping speri-

Figura 1 - Attività antimicrobica delle tre tipologie di latte: pastorizzato, pastorizzato condensato al 60% ed all'80%. Le barre con lettere differenti per ciascun batterio indicano valori medi significativamente differenti a $P < 0,05$ secondo Tukey test

Figure 1 - Antimicrobial activity of the three types of milk: pasteurized, pasteurized condensed to 60% and to 80%. Bars with different letters for each bacterium indicate mean values significantly different at $P < 0.05$ according to Tukey test



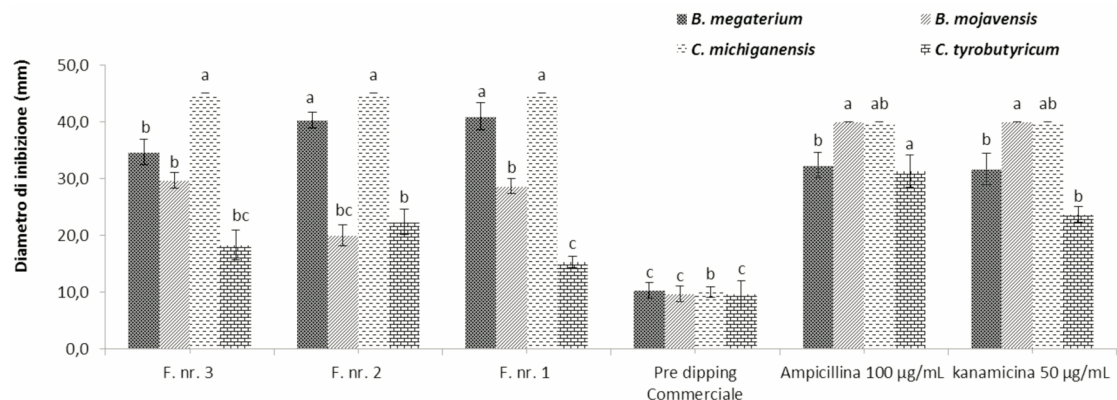
mentali è stata confrontata con quella di un pre-dipping commerciale (normalmente in uso presso le aziende di bovine da latte) e con l'efficacia di due antibiotici quali l'ampicillina (100 µg/ml) e la kanamicina (50 µg/ml). In figura 2 si evince un'attività antimicrobica delle tre formulazioni del pre-dipping sperimentale nei confronti dei seguenti microrganismi: *Clostridium tyrobutyricum*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mojavensis*, *Clavibacter michiganensis*, *Xanthomonas campestris*. Tra le formulazioni sperimentali (F1, F2, F3) sono state registrate differenze significative ($P \leq 0,05$) per l'attività inibente esercitata nei confronti del *C. tyrobutyricum*. Infatti, quella con il maggior diametro di inibizione è risultata essere la F2 (15% di latte di asina; 0,04% nisina). Il livello di inibizione registrato per quest'ultima non differisce in maniera significativa da quello della Kanamicina mentre si pone, alla stregua delle formulazioni F1 e F3, al di sotto dell'efficacia rilevata per l'Ampicillina. Dal confronto tra le tre formulazioni sperimentali ed il pre-dipping commerciale sono emerse delle differenze significative ($P \leq 0,05$) nel livello di efficacia rispetto al *C. tyrobutyricum*. In particolare, tutte e tre le formulazioni sperimentali (F1, F2, F3)

hanno registrato un livello di attività superiore al pre-dipping commerciale, ma solo in F2 e F3 tale differenza nel grado di attività è risultata essere significativa ($P \leq 0,05$).

L'attività inibente registrata è dovuta in gran parte all'azione esercitata dal lisozima contenuta nel latte di asina nei confronti dei microrganismi Gram+ utilizzati in prova. Tale attività antibatterica si esplica nella catalisi dell'idrolisi del legame beta 1,4 tra l' (NAM) e la (NAG) del principale costituente della parete cellulare dei Gram+. Tale attività è svolta in maniera sinergica con la lattoferrina e le immunoglobuline contenute nel latte [20]. La maggiore attività antimicrobica rilevata rispetto al solo latte d'asina pastorizzato (tal quale e condensato al 60 ed all'80%), è imputabile sia alla nisina che ad altri costituenti presenti nelle tre formulazioni (alcol benzilico, deidroacetato di sodio, acido citrico, benzoato di sodio, sorbato di potassio). La Nisina è un batteriocina peptidica policationica prodotta dalla fermentazione di *Lactococcus lactis*. L'alcol Benzilico, Deidroacetato di sodio, acido citrico, benzoato di sodio, sorbato di potassio partecipano attivamente anche se in maniera blanda all'attività inibente nei confronti dei Gram+.

Figura 2 - Attività antimicrobica dei pre-dipping sperimentali (F1, F2, F3). Le barre con lettere differenti per ciascun batterio indicano valori medi significativamente differenti a $P < 0,05$ secondo Tukey test

Figure 2 - Antimicrobial activity of the experimental pre-dipping (F1, F2, F3). Bars with different letters for each bacterium indicate mean values significantly different at $P < 0,05$ according to Tukey test



CONCLUSIONI

Il *Clostridium tyrobutyricum* è una delle principali cause del gonfiore tardivo nei formaggi semi-stagionati. Tale batterio si trova principalmente nelle feci delle vacche i cui residui sporcano le mammelle contaminando il latte. Strategie aziendali, come l'utilizzo di prodotti sterilizzanti per il lavaggio della mammella prima della mungitura, risultano vincenti per ridurre o evitare la contaminazione. E' proprio in questo ambito che si inserisce l'idea della creazione di un nuovo pre-dipping preparato con il latte d'asina condensato, ricco dell'enzima antibatterico lisozima. L'attività antimicrobica dei prodotti è stata testata su diversi batteri

Gram positivi e confrontata con il pre-dipping commerciale e con gli antibiotici kanamicina e ampicillina. Tutte le formulazioni preparate sono risultate di gran lunga più efficaci rispetto al pre-dipping commerciale e paragonabili alle attività degli antibiotici sintetici. La migliore attività antimicrobica è stata mostrata dal pre-dipping contenente il 15% di latte d'asina condensato e lo 0.02% di nisina.

Ringraziamenti:

Relazione presentata al 5° Congresso Lattiero-Caseario AITeL - Bari 9 settembre 2016 "Latte e derivati: ricerca, innovazione e valorizzazione".

Bibliografia

- 1) Cosentino C, Paolino R, Valentini V, Musto M, Ricciardi A, Adduci F, D'Adamo C, Pecora G, Freschi P (2015) Effect of jenny milk addition on the inhibition of late blowing in semihard cheese. *J Dairy Sci* 98 5133–5142
- 2) Salvadori del Prato O (2001) I Minicaseifici aziendali, Calderini Edagricole
- 3) Garde S, Arias R, Gaya P, Nunez M (2011) Occurrence of *Clostridium* spp. in ovine milk and Manchego cheese with late blowing defect: identification and characterization of isolates. *Int Dairy J* 21 272-278
- 4) Stadhouers J, Jørgensen K (1990) Prevention of the contamination of raw milk by a hygienic milk production. *Bull Int Dairy Fed* 251 32–36
- 5) Panari G, Perini S, Guidetti R, Pecorari M, Merialdi G, Albertini A (2001) Indagine sul comportamento di germi potenzialmente patogeni nella tecnologia del formaggio Parmigiano-Reggiano. *Sci Tecn Latt- Cas* 52 13-22
- 6) Bottazzi V (1993) I batteri lattici nella maturazione del formaggio grana. *L'Industria del latte* 29 73-88
- 7) Pellegrino L, De Noni I, Mannino S, Resmini P (1996) Galattosio residuo nel formaggio Grana Padano in fascera e possibile rilevamento mediante biosensore. *Industria del Latte*, 32 49-62
- 8) Colombari G, Borreani G, Crovetto G M (1999) Comparison of lucerne silage and ventilated hay in maize silage-based rations for dairy cows for the production of milk destined for Grana cheese. *Grass Forage Sci* 54 184-194
- 9) Frémont S, Kanny G, Nicolas J P, Moneret-Vautrin D A (1997) Prevalence of lysozyme sensitization in an egg-allergic population. *Allergy* 52 224–228
- 10) Pérez-Calderón R, Gonzalo-Garijo M A, Lamilla-Yerga A, Mangas-Santos R, Moreno-Gaston I (2007) Recurrent angioedema due to lysozyme allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 17 264–266
- 11) Kerkaert B, Mestdagh F, De Meulenaer B (2010) Detection of hen's egg white lysozyme in food: 297 comparison between a sensitive HPLC and a commercial ELISA method. *Food Chem* 298 580–584

- 12) Salimei E, Fantuz F (2012) Equid milk for human consumption. *Inter Dairy J* 24 130-142.
- 13) Claeys WL, Verraes C, Cardoen S, De Block J, Huyghebaert A, Raes K, Dewettinck K, Herman L (2014) Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. *Food Control* 42 188-201
- 14) Ávila M, Gómez N, Hernández T, Garde S (2014) Inhibitory activity of reuterin, nisin, lysozyme and nitrite against vegetative cells and spores of dairy-related *Clostridium* species. *Inter J Food Micr* 172 70–75
- 15) Conte F, Piccinini R, Daprà V, Gagliano G (2006) Valutazione dell'attività del lisozima nel latte d'asina. *Atti Conv. Naz. S.I.S.Vet.*, 40:453-453 (formato CD)
- 16) Zhang X Y, Zhao L, Jiang L, Dong M L, Ren F Z (2008) The antimicrobial activity of donkey 331 milk and its microflora changes during storage. *Food Control* 19:1191–1195
- 17) Cosentino C, Labella C, Musto M, Paolino R, Naturali S, Freschi P (2015) Effect of different physical treatments on antioxidant activity of jenny milk. *Int J Agric Sci* 5 874-877
- 18) Bhunia A K, Johnson M C, Ray B (1988) Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J Applied Bacter* 65 261–268
- 19) Cosentino C, Labella C, Elshafie H S, Camele I, Musto M, Paolino R, D'Adamo C, Freschi P (2016) Effects of different heat treatments on lysozyme quantity and antimicrobial activity of jenny milk. *J Dairy Sci* 99 5173-5179
- 20) Benkerroum N (2008) Antimicrobial activity of lysozyme with special relevance to milk. *African J of Biotech* 7 4856-4867

