
VALUTAZIONE DELLA GENUINITÀ DEL GRASSO LATTICO BUFALINO MEDIANTE ANALISI DELLA COMPOSIZIONE LIPIDICA VIA HRGC

Romano R., Borriello I., Lambiase G., Pannone N., Chianese L., Spagna Musso S.
*Dipartimento di Scienza degli Alimenti, via Università 100, Facoltà di Agraria Portici (NA).
rafroman@unina.it

INTRODUZIONE

L'aggiunta fraudolenta di latte vaccino a latte di bufala nella preparazione della Mozzarella di Bufala Campana, è una pratica piuttosto frequente soprattutto per ragioni economiche. Per garantire la genuinità della Mozzarella di Bufala Campana, ai fini della tutela del consumatore, è necessario disporre di metodi analitici per:

- ✓ poter rilevare quantità anche minime di latte bovino in miscela con quello di bufala nel prodotto finito;
- ✓ poter procedere alla valutazione quantitativa della miscela di latte.

La determinazione gascromatografica della componente trigliceridica del latte vaccino riveste un ruolo fondamentale nella rivelazione dei grassi estranei. La metodica proposta da Precht, pubblicata sulla Gazzetta Ufficiale delle Comunità europee del 1 marzo 1995 L 46, prende in esame i trigliceridi a numero pari di atomi di carbonio per calcolare l'eventuale aggiunta di grassi estranei, sia vegetali che animali, nel grasso di latte vaccino e prodotti lattiero-caseari derivati, mediante il calcolo di opportuni indici S. In precedenti sperimentazioni sono stati definiti, applicando il metodo di Precht al grasso lattico bufalino, cinque nuovi intervalli "S" utili per la rilevazione di sofisticanti non lattici aggiunti al grasso di latte di bufala. Alla luce di questi risultati l'obiettivo del presente studio è stato quello di proporre nuovi indici di genuinità per il latte di bufala utili per la rilevazione di sofisticanti di natura lattica mediante gascromatografia ad alta risoluzione (HRGC).

MATERIALI E METODI

Sono stati monitorati 250 campioni di latte di bufala e 25 lavorazioni di mozzarella di bufala campana. L'estrazione della frazione lipidica dal latte è stata effettuata con il Metodo Schmidt-Bondzynsky-Ratzlaff, (MIPAF DM 21/4/86). Una quantità omogenea rappresentativa di grasso di latte di bufala e di vacca è stata impiegata per la preparazione di miscele a titolo noto dal 25% al 5% di grasso lattico vaccino in grasso bufalino.

La determinazione della componente acidica è stata eseguita mediante analisi HRGC degli esteri metilici degli acidi grassi previa trans-esterificazione (Nota *et al.*, 1995). Si è impiegato un gascromatografo Perkin Elmer mod. Auto System XL con: vaporizzatore a temperatura programmata (PTV), rivelatore FID, colonna capillare lunga 100m, 0,25mm ID; 0,20µm spessore film, fase stazionaria 50% Cyanopropil Methyl Silicone mod. SP (Supelco Bellofonte, USA). Le condizioni di lavoro della camera sono state: temperatura iniziale 100°C x 5 min., incremento di 3°C/min fino a 165°C dove sosta 10 min., incremento di 3°C/min fino a 240°C x 28 min. Rapporto di splittaggio: 1/60 ml/min. Temperatura del rivelatore FID: 250°C. L'identificazione dei picchi è stata effettuata mediante standard esterno: SupelcoTM 37 component FAME MIX, Qual Mix BR2 Larodan. L'analisi gascromatografica dei trigliceridi è stata effettuata preparando una soluzione al 5% di grasso anidro in esano ed iniettando 1,5 µl al gascromatografo. È stato utilizzato un gascromatografo DANI GC 1000 equipaggiato con: detector a ionizzazione di fiamma (FID); vaporizzatore a temperatura programmata (PTV); colonna capillare RTX 65 TG (35% dimethyl- 65% diphenyl polysiloxane), 30 m., 0,25 mm. ID, 0,10 µm df. Condizioni

operative : Oven (camera): temperatura iniziale 250°C per 2 min., incremento di 6°C/min. fino a 360°C per 25 min. Rapporto di splittaggio: 1/60;FID. Gas carrier: He, flusso 1,2 mL/min.

L'analisi quantitativa è stata condotta determinando il fattore di risposta di ogni componente mediante un mix a titolo noto di trigliceridi BCR (Community Bureau of Reference, CRM 519). Dalla risposta ottenuta è stato calcolato il fattore di normalizzazione, utilizzato per la correzione della percentuale di ogni singolo trigliceride.

RISULTATI E DISCUSSIONE

L'analisi della componente acidica del grasso lattico di bufala eseguita mediante HRGC, ha permesso la separazione, l'identificazione e la quantificazione di 48 diversi acidi grassi che vanno dall'acido butirrico (C4) all'acido decosapentaenoico (DPA) (C22:5), di cui solo 13 presenti in quantità superiori all'1%. Sulla base di tale identificazione si può notare che i più abbondanti sono gli acidi grassi a medio peso molecolare (48,33%) dal C11 al C16:1.

Tabella 1: Composizione media % in acidi grassi del grasso lattico bufalino e della Mozzarella di bufala Campana.

Acidi grassi	Latte	Mozzarella	Δ %
	Media %	Media %	
∑ Basso PM	7,93	7,89	0,51
∑ Medio PM	48,33	48,27	0,12
∑ Alto PM	37,59	37,61	-0,05
∑ Saturi	65,23	65,17	0,10
∑ Insaturi	27,33	27,34	-0,01
Saturi/Insaturi	2,39	2,38	0,11
∑ n-3	0,17	0,15	3,66
∑ n-6	1,93	1,97	-1,84
n-3/n-6	0,09	0,08	5,40
∑ CLA	0,76	0,74	1,92
∑ Acidi grassi dispari	3,39	3,38	0,25

Sottoponendo i campioni di latte bufalino ad analisi gascromatografica mediante una colonna 65% Phenyle di 30m, è stato possibile separare e quantificare gli isomeri strutturali delle famiglie trigliceridiche dal C24 al C54 per un totale di 126 diversi isomeri.

Suddividendo i trigliceridi in:

- ✓ basso peso molecolare (C24-C32)
- ✓ medio peso molecolare (C34-C42)
- ✓ alto peso molecolare (C44-C54)

Tabella 2: Composizione media % in Trigliceridi del grasso lattico bufalino e della Mozzarella di bufala Campana.

TG	latte	mozzarella	Δ%
24	0,30	0,33	-13,11
26	0,51	0,50	2,38
28	1,03	1,01	1,13
30	1,50	1,49	0,69
32	3,22	3,20	0,55
ΣBasso PM	6,55	6,54	0,20
34	8,24	8,07	2,09
36	15,29	15,05	1,58
38	16,42	16,35	0,38
40	9,99	9,98	0,10
42	5,67	5,58	1,70
ΣMedio PM	55,60	55,02	1,05
44	5,53	5,45	1,38
46	7,21	7,25	-0,51
48	8,13	8,28	-1,94
50	8,88	9,17	-3,23
52	6,26	6,48	-3,52
54	1,99	2,04	-2,59
ΣAlto PM	37,99	38,67	-1,78

Dalla tabella 2 si evince che la categoria a medio peso molecolare è la più abbondante (55,60%) e che le famiglie C36 e C38 sono le più rappresentative con, rispettivamente, il 15,29% e il 16,42% del totale dei trigliceridi.

Al fine di ricavare degli indicatori utili per la valutazione della genuinità del latte di bufala, è stata effettuata l'analisi HRGC degli acidi grassi e dei trigliceridi anche del latte vaccino, principale sofisticante del latte di bufala e della mozzarella di bufala campana. Poiché non sono state evidenziate differenze di tipo qualitativo tra le due matrici lipidiche l'attenzione è stata posta sulle differenze quantitative esistenti tra gli acidi grassi del latte bufalino e quello vaccino. In tabella 3 si riporta la composizione acidica del latte bufalino, di quello vaccino e la variazione percentuale (bufala-vacca) rispetto al latte di bufala. I dati ottenuti sono stati elaborati statisticamente e dall'analisi è emerso che gli EMAG che presentano differenze statisticamente significative sono:

-C4:0, C8:0, C10:0, C11:0, C12:0, iso/anteiso C13:0, iso/anteiso C14:0, C14:1, iso C15:0, iso/anteiso C16:0, C16:0, C16:1, iso/anteiso C17:0, C17:0, C17:1, iso/anteiso C18:0, C18:0, altri C18:2, C20:0, C20:1, C22:0, C20:3 n3, C20:4 n6, EPA, C24:0, con $p < 0,001$; C12:1, CLA (9t,11c; 10c,12t), Σ CLA, C20:3 n6, DPA, con $p < 0,01$.

Tabella 3: Composizione media% \pm sd degli acidi grassi del grasso lattico bufalino e vaccino
 A, indica una differenza significativa entro la riga $p < 0.001$, a, indica una differenza significativa entro la riga $p < 0.01$

EMAG	bufala	\pm sd	vacca	\pm sd	$\Delta\%$
C4:0	3,25 ^A	0,29	2,66 ^A	0,23	18,3
C8:0	1,03 ^A	0,12	1,24 ^A	0,09	-19,87
C10:0	1,83 ^A	0,21	2,58 ^A	0,25	-41,32
C11:0	0,09 ^A	0,02	0,27 ^A	0,02	-201,46
C12:0	2,46 ^A	0,26	3,36 ^A	0,31	-36,54
C12:1	0,04 ^a	0	0,04 ^a	0,01	15,69
iso/anteiso C13:0	0,03 ^A	0,01	0,08 ^A	0,01	-222,58
iso/anteiso C14:0	0,19 ^A	0,02	0,14 ^A	0,02	23,55
C14:1	0,36 ^A	0,04	0,3 ^A	0,04	17,31
iso C15:0	0,65 ^A	0,12	0,9 ^A	0,03	-39,04
iso/anteiso C16:0	0,38 ^A	0,04	0,31 ^A	0,04	19,75
C16:0	29,28 ^A	1,31	27,53 ^A	1,68	5,97
C16:1	1,67 ^A	0,23	1,40 ^A	0,11	16,32
iso/anteiso C17:0	0,03 ^A	0,01	0,16 ^A	0,02	-482,97
C17:0	0,55 ^A	0,06	0,63 ^A	0,06	-13,59
C17:1	0,09 ^A	0,02	0,14 ^A	0,01	-48,79
iso/anteiso C18:0	0,19 ^A	0,05	0,25 ^A	0,02	-32,37
C18:0	10,87 ^A	1,18	9,20 ^A	0,62	15,36
altri C18:2	0,53 ^A	0,06	0,73 ^A	0,17	-37,1
C20:0	0,21 ^A	0,02	0,16 ^A	0,01	23,83
C20:1	0,32 ^A	0,06	0,6 ^A	0,17	-85,83
CLA (9 γ ,11 ϵ : 10 ϵ ,12 γ)	0,01 ^a	0,01	0,01 ^a	0,01	35,99
Σ CLA	0,03 ^a	0,01	0,04 ^a	0,02	-40,12
C22:0	0,09 ^A	0,01	0,06 ^A	0,01	35,86
C20:3 n6	0,06 ^a	0,01	0,08 ^a	0,01	-18,26
C20:3 n3	0,02 ^A	0,01	0,01 ^A	0	32,87
C20:4 n6	0,02 ^A	0,01	0,04 ^A	0,02	-92,67
EPA	0,03 ^A	0,01	0,05 ^A	0,01	-109,23
C24:0	0,05 ^A	0,01	0,03 ^A	0,01	27,13
DPA	0,03 ^a	0,02	0,02 ^a	0,01	39,14

Questi acidi grassi sono stati utilizzati per formulare rapporti caratteristici di genuinità. Il valore medio percentuale di tre ripetizioni degli EMAG da C4 a C24 dei campioni di latte di bufala sono stati inseriti nelle formule riportate in tabella 4 in modo tale da ottenere, per ciascuna formula, il relativo intervallo min-max di oscillazione. Le formule, i cui intervalli ottenuti per il grasso bufalino e quello vaccino non hanno presentato sovrapposizioni, sono state testate attraverso miscele a titolo noto (25%, 20%, 15%, 10%, 5%) di latte vaccino in bufalino al fine di individuarne il limite di rilevabilità. Procedendo in questo modo si è potuto constatare (tab. 4) che: la formula $(iso-anteisoC13:0 * iso-anteisoC14:0) / iso-anteisoC17:0$ presenta un limite di rilevabilità del 25%, la formula $(C10+C12) / iso-anteisoC17:0$ del 20%, la formula $C11:0 / (iso-anteisoC13:0 * iso-anteisoC17:0)$ del 15%, mentre tutte le altre presentano un limite più alto e quindi risultano poco sensibili per valutare l'aggiunta di latte vaccino in latte bufalino.

Per quanto riguarda i dati derivanti dall'analisi trigliceridica del latte bufalino l'attenzione è stata rivolta ai singoli isomeri strutturali delle famiglie trigliceridiche. Le famiglie che presentano differenze statisticamente significative sono:

- C₃₂, C₄₀ e C₅₀ con $p < 0.001$;
- C₃₄, C₃₆, C₃₈, C₄₂, C₄₄, C₄₆ e C₄₈ con $p < 0.05$.

Tabella 4: Formule dei rapporti acidi di genuinità calcolate per le miscele di grasso lattico vaccino in grasso bufalino.

FORMULA	MIX			VACCA		BUFALA	
	25%	20%	15%	min-max	min-max		
iso-anteisoc17:C17:1	0,58	0,57	0,52	0,88-1,56	0,16-0,72		
iso-anteisoc16:C11:0	3,03	3,26	3,59	0,75-1,40	2,72-6,50		
C10:C11:0	16,36	16,89	18,31	7,08-10,39	12,96-26,48		
(C20:0+C20:1)/C22:0	7,36	7,04	6,77	8,82-20,90	4,23-8,80		
C14:1/iso-anteisoc13:0	9,9	10,1	10,2	2,75-5,71	6,20-20,50		
(C10+C12)/iso-anteisoc17:0	72	79,24	89,13	27,07-43,90	83,06-220,78		
(iso-anteisoc16:0+C16:1)/iso-anteisoc13:0	60,8	61,5	62,1	18,48-23,81	36,73-110,66		
C12:0/(C16:1+C17:1)	1,44	1,42	1,4	1,95-2,33	1,06-1,73		
iso-anteisoc C17:0/(C17:0+C17:1)	0,09	0,08	0,07	0,15-0,27	0,03-0,09		
(iso-anteisoc13:0+iso-anteisoc14:0)/ iso-anteisoc17:0	0,1	0,12	0,14	0,05-0,09	0,11-0,23		
C11:0/(iso-anteisoc13:0+iso-anteisoc17:0)	50,8	53,71	55,65	15,47-29,32	60,24-214,19		

All'interno di ogni famiglia gli isomeri sono stati numerati progressivamente al fine di identificarli in modo univoco. Gli intervalli ottenuti dall'analisi della famiglia del C₃₄ e del C₅₀ (formula "a": $(a_4+a_7)/\sum C_{34}$ dove a₄ e a₇ rappresentano rispettivamente il quarto ed il settimo isomero di struttura della famiglia C₃₄ e formula "i": $(i_4+i_7)/\sum C_{50}$, dove i₄ e i₇ rappresentano rispettivamente il quarto ed il settimo isomero di struttura della famiglia C₅₀), non presentando sovrapposizione, sono stati testati attraverso miscele a titolo noto (30%, 20%, 15%, 10%, 7%) di latte vaccino in bufalino al fine di individuare il limite di rilevabilità.

La formula "i" ha mostrato un limite di rilevabilità del 10%, mentre la formula "a" è utile solo per verificare miscele superiori al 30%.

Tabella 5: Formule dei rapporti trigliceridici di genuinità calcolate per le miscele di grasso lattico vaccino in grasso bufalino.

FORMULA	MIX					VACCA	BUFALA
	30%	20%	15%	10%	7%	min-max	min-max
<i>a</i>	0,631	0,633	0,638	0,642	0,645	0,554-0,602	0,607-0,650
<i>i</i>	0,194	0,171	0,170	0,169	0,164	0,191-0,255	0,123-0,168

CONCLUSIONI

In questo lavoro sperimentale, la valutazione della componente acidica e trigliceridica via HRGC è stata impiegata per la messa a punto di un metodo di rilevazione del contenuto di latte vaccino in bufalino. Processando statisticamente i risultati, è stato possibile individuare alcuni intervalli caratteristici ottenuti applicando specifiche formule.

Dal confronto dei valori ottenuti dalle miscele a titolo noto di latte vaccino in bufalino e gli intervalli di genuinità proposti, è emerso che il limite di rilevabilità per gli acidi grassi è pari al 15%. La tecnica gascromatografica ad alta risoluzione utilizzata nello studio dei trigliceridi per valutare la genuinità del latte di bufala ha mostrato una sensibilità pari al 10% nei confronti del latte vaccino, e si è dimostrata versatile e di facile applicazione nonché più rapida e più economica rispetto alle tecniche elettroforetiche e biomolecolari ad oggi utilizzate come metodi ufficiali.

BIBLIOGRAFIA

- Banfi S., Bergna M., Povo M., Contarini G. (1999) J. High Resol. Cromatogr. 22(2), 93-96.
 Collomb M., Spahni M., Buhler T. (1998) Trav. Chim. Aliment. Hyg. 89, 59-83.
 Contarini G., Battelli G. (1997) Riv. Ital. Sostanze Grasse. 527-532.
 Contarini G., Leardi R., Toppino P.M. (1993) Riv. Ital. Sost. Grasse, 70, 491-499.
 Lercker G., Frega N., Bocci F., Bertacco G. (1992) Sci. Tecn. Latt.-Cas. 43, 95-110.
 Nota G., Naviglio D., Romano R., Luongo D. (1995) Riv. Ital. Sost. Grasse, 72, 73-76.
 Precht D. (1991) Kielermilchwirtschaftliche Forschungsberichte 43, 219-242.
 Romano R., Lambiase G., Spagna Musso S., Chianese L. (2004) Progress in nutrition 6(4), 275-284.
 Romano R., Lambiase G., Scalzone E., Addeo F., Chianese L., Masucci F. (2004) Riv. Ital. Sost. Grasse, 6, 342-346.
 Zicarelli L. (2004) Sci. Tecn. Latt.-Cas., 55, 167-169.

All'interno di ogni famiglia gli isomeri sono stati numerati progressivamente al fine di identificarli in modo univoco. Gli intervalli ottenuti dall'analisi della famiglia del C₃₄ e del C₅₀ (formula "a": $(a_4+a_7)/\sum C_{34}$ dove a₄ e a₇ rappresentano rispettivamente il quarto ed il settimo isomero di struttura della famiglia C₃₄ e formula "i": $(i_4+i_7)/\sum C_{50}$, dove i₄ e i₇ rappresentano rispettivamente il quarto ed il settimo isomero di struttura della famiglia C₅₀), non presentando sovrapposizione, sono stati testati attraverso miscele a titolo noto (30%, 20%, 15%, 10%, 7%) di latte vaccino in bufalino al fine di individuare il limite di rilevabilità.

La formula "i" ha mostrato un limite di rilevabilità del 10%, mentre la formula "a" è utile solo per verificare miscele superiori al 30%.

Tabella 5: Formule dei rapporti trigliceridici di genuinità calcolate per le miscele di grasso lattico vaccino in grasso bufalino.

	MIX					VACCA	BUFALA
FORMULA	30%	20%	15%	10%	7%	min-max	min-max
<i>a</i>	0,631	0,633	0,638	0,642	0,645	0,554-0,602	0,607-0,650
<i>i</i>	0,194	0,171	0,170	0,169	0,164	0,191-0,255	0,123-0,168

CONCLUSIONI

In questo lavoro sperimentale, la valutazione della componente acidica e trigliceridica via HRGC è stata impiegata per la messa a punto di un metodo di rilevazione del contenuto di latte vaccino in bufalino. Processando statisticamente i risultati, è stato possibile individuare alcuni intervalli caratteristici ottenuti applicando specifiche formule.

Dal confronto dei valori ottenuti dalle miscele a titolo noto di latte vaccino in bufalino e gli intervalli di genuinità proposti, è emerso che il limite di rilevabilità per gli acidi grassi è pari al 15%. La tecnica gascromatografica ad alta risoluzione utilizzata nello studio dei trigliceridi per valutare la genuinità del latte di bufala ha mostrato una sensibilità pari al 10% nei confronti del latte vaccino, e si è dimostrata versatile e di facile applicazione nonché più rapida e più economica rispetto alle tecniche elettroforetiche e biomolecolari ad oggi utilizzate come metodi ufficiali.

BIBLIOGRAFIA

- Banfi S., Bergna M., Povoletto M., Contarini G. (1999) J. High Resol. Chromatogr. 22(2), 93-96.
 Collomb M., Spahn M., Buhler T. (1998) Trav. Chim. Aliment. Hyg. 89, 59-83.
 Contarini G., Battelli G. (1997) Riv. Ital. Sostanze Grasse. 527-532.
 Contarini G., Leardi R., Toppino P.M. (1993) Riv. Ital. Sost. Grasse, 70, 491-499.
 Lercker G., Frega N., Bocci F., Bertacco G. (1992) Sci. Tecn. Latt.-Cas. 43, 95-110.
 Nota G., Naviglio D., Romano R., Luongo D. (1995) Riv. Ital. Sost. Grasse, 72, 73-76.
 Precht D. (1991) Kielermilchwirtschaftliche Forschungsberichte 43, 219-242.
 Romano R., Lambiase G., Spagna Musso S., Chianese L. (2004) Progress in nutrition 6(4), 275-284.
 Romano R., Lambiase G., Scalzone E., Addeo F., Chianese L., Masucci F. (2004) Riv. Ital. Sost. Grasse, 6, 342-346.
 Zicarelli L. (2004) Sci. Tecn. Latt.-Cas., 55, 167-169.