

The seal of the University of Naples Federico II is a large, circular emblem in the background. It features a central figure, likely a saint or historical figure, holding a staff and a book. The figure is surrounded by a Latin inscription: "UNIVERSITAS NEAPOLITANA FEDERICI SECUNDI".

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II**

FACOLTÀ AGRARIA DI PORTICI

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE E TECNOLOGIE DELLE PRODUZIONI AGRO – ALIMENTARI
XVIII CICLO**

**STUDIO QUALI – QUANTITATIVO DELLA
COMPOSIZIONE LIPIDICA
DEL GRASSO LATTICO DI BUFALA: EFFETTO DELLA
STAGIONALITÀ, DELL’ALIMENTAZIONE E MESSA A
PUNTO DI UN METODO DI
VALUTAZIONE DELLA GENUINITÀ**

Tutor:
Ch.mo
dr. Raffaele Romano

Dottorando:
Dott. Gianfranco Lambiase

INDICE

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUZIONE | 1 |
| 1.1 | Il mercato Lattiero Caseario | 1 |
| 1.2 | La bufala | 2 |
| 1.3 | Il prodotto tipico | 6 |
| 1.4 | La Mozzarella di Bufala e la memoria storica | 8 |
| | Bibliografia | 9 |
| 2 | IL LATTE DI BUFALA | 10 |
| 3 | IL BURRO | 13 |
| | Bibliografia | 15 |
| 4 | LA FRAZIONE LIPIDICA DEL LATTE DI BUFALA | 16 |
| 4.1 | I trigliceridi | 18 |
| 4.2 | Gli acidi grassi | 22 |
| 4.2.1 | I CLA | 26 |
| | Bibliografia | 30 |
| 5 | FATTORI DI VARIABILITA' DEL GRASSO LATTICO | 32 |
| | Bibliografia | 35 |
| 6 | LEFRODI | 36 |
| 6.1 | Definizioni | 36 |
| 6.1.1 | Frodi Sanitarie | 36 |
| 6.1.2 | Casi di frode sanitaria | 36 |
| 6.1.3 | Frodi Commerciali | 37 |
| 6.2 | La problematica della genuinità | 38 |
| 6.2.1 | Genuinità della Mozzarella di Bufala | 40 |
| 6.2.2 | Genuinità del burro | 42 |
| | Bibliografia | 47 |
| 7 | OBIETTIVI | 49 |
| 8 | MATERIALI E METODI | 51 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 8.1 | Pianificazione | 51 |
| 8.2 | Campionamento | 52 |
| 8.3 | Determinazioni quantitative | 53 |
| 8.3.1 | Determinazione quantitativa di grasso, proteine, lattosio e residuo magro | 54 |
| 8.3.2 | Estrazione della matrice lipidica dal latte | 54 |
| 8.3.3 | Estrazione del grasso dalla mozzarella | 56 |
| 8.3.4 | Preparazione delle miscele tra i grassi | 57 |
| 8.3.5 | Analisi chimica della razione alimentare | 57 |
| 8.3.6 | Separazione attraverso TLC | 59 |
| 8.3.7 | Analisi gascromatografica | 60 |
| 8.3.8 | Analisi statistica | 64 |
| | Bibliografia | 66 |
| 9 | RISULTATI E DISCUSSIONI | 67 |
| 9.1 | Variabilità stagionale ed alimentare | 67 |
| 9.1.1 | Valutazione quali-quantitativa della frazione lipidica del latte di bufala | 67 |
| 9.1.2 | Valutazione della variazione della componente acidica e trigliceridica in funzione della stagionalità | 68 |
| 9.1.3 | Valutazione della variazione della componente acidica e trigliceridica in funzione del fattore alimentare | 70 |
| 9.2 | Valutazione della genuinità del grasso lattico | 78 |
| 9.3 | Caratterizzazione della componente acidica e trigliceridica della Mozzarella di Bufala Campana | 93 |
| 9.4 | Valutazione della genuinità del grasso della mozzarella | 98 |
| 9.4.1 | Analisi dei trigliceridi | 98 |
| 9.4.2 | Analisi degli acidi grassi | 102 |
| | Bibliografia | 104 |
| 10. | CONCLUSIONI | 105 |

1. INTRODUZIONE

1.1 IL MERCATO LATTIERO CASEARIO

Il livello produttivo del latte, nello scenario mondiale degli ultimi dieci anni, ha avuto un andamento piuttosto altalenante, con variazioni consistenti a seconda dei diversi paesi ma comunque sempre in crescita (**Tateo, 2003**).

La globalizzazione dei mercati porta necessariamente a dover tener conto della distribuzione mondiale della produzione di latte che, secondo i dati dell'osservatorio latte della SMEA, ha subito negli ultimi anni profondi cambiamenti portandosi nel 2000 al 38% per l'Europa, al 28% per l'Asia, al 15% per il Nord America, al 10% per l'America centrale e del Sud ed al 4% sia per l'Africa che per l'Oceania.

L'11 settembre ha indotto una contrazione dei consumi e quindi delle importazioni di latte, latte in polvere, caseine e derivati in genere nell'America del nord, con conseguente ristagno del mercato e sovrabbondanza di prodotto in tutta la filiera produttiva mondiale.

Il settore lattiero-caseario rappresenta una delle componenti principali del sistema agro-alimentare nazionale. Al primo posto per giro d'affari tra i settori della trasformazione, al suo interno convive una multiforme realtà sia zootecnica che industriale. La stessa variegata gamma di prodotti che il settore nazionale riesce a proporre al mercato rappresenta la fotografia più nitida di tutto ciò che opera lungo la filiera, primi fra tutti i trenta formaggi DOP (**Il mercato del latte rapporto 2003**), i quali hanno sicuramente contribuito in modo significativo all'aumento del 18% delle vendite tra il 1996 ed il 2000.

E' comunque importante sottolineare che in Italia la produzione di latte, che era andata costantemente aumentando dal 1996 al 1999, anche in funzione della variazione delle quote latte di competenza, ha subito una percettibile inversione di tendenza negli ultimi anni di circa lo 0.5%.

1.2 LA BUFALA



La popolazione bufalina mondiale, ammonta a circa 167 milioni di capi così distribuiti:

quasi il 97% in Asia (concentrati maggiormente in India, Cina, e Pakistan), circa il 2% in Africa (con la consistenza maggiore in Egitto) ed il resto tra l'Europa (soprattutto Italia, Romania, Turchia) e l'America Latina (Brasile, Venezuela, Colombia, e Argentina) (**FAO, 2001**).

Il bufalo (*Bubalus bubalis* L.) è classificato in due gruppi: swamp (67%) e river (33%). I bufali swamp sono allevati soprattutto nei paesi del sud-est asiatico dove sono utilizzati principalmente come animali da lavoro, invece quelli del genere river ,allevati in India, Pakistan, Sri Lanka e Nepal, rappresentano un elemento essenziale per l' approvvigionamento di latte e di carne per le popolazioni.

Al gruppo river fanno capo, invece, numerose razze, tra cui la “Mediterranea” , che è diffusa in Egitto, Medio Oriente, Sud America e in Europa dove il patrimonio bufalino complessivo è di circa 415.000 capi ed il 59% dei quali è in Italia (**FAO, 2001**).

La razza allevata in Italia è oggi indicata con la denominazione “Bufala Mediterranea Italiana”. Diverse sono le ipotesi sulla comparsa della bufala in Italia; una di queste, sostenuta anche da Maymone (1945), è che sia stata introdotta nel VI secolo dall'Ungheria durante le invasioni barbariche. Numerose testimonianze fanno ritenere che assunse una certa importanza nella realtà economica e sociale nel nostro Paese tra il XII e il XIII secolo.

La specie bufalina continuò a mantenere quest' importanza fino al XVIII secolo, durante il quale questo tipo di allevamento era presente nella maggior

parte del territorio nazionale e non limitato alle zone paludose dell' Italia centro-meridionale.

Agli inizi del XIX secolo, in Italia, come conseguenza dell'incremento demografico, ci fu bisogno di nuove terre coltivabili. L'allevamento bufalino, organizzato su un sistema semiselvatico, si trovò in difficoltà e venne sempre più relegato nelle zone acquitrinose dove gli investimenti zootecnici erano quasi inesistenti, rappresentando, secondo Maymone, "una vera fortuna per le zone paludose che non avrebbero potuto trovare altra forma di sfruttamento".

Il bufalo divenne l' animale tipico di queste zone, perché si adattava all'allevamento brado, utilizzando qualsiasi tipo di foraggio, anche scadente, come diverse erbe palustri, richiedeva poche cure e presentava una notevole resistenza alle malattie. Oltre alla produzione di carne e latte, era impiegato nel ripulire i canali dalle erbe mediante il pascolamento e di ripristinare i corsi d' acqua interrati mediante il calpestio lungo l'alveo, contribuendo così a mantenere l'equilibrio ambientale (**Pugliese, 1998**). In Italia, con l' inizio della rivoluzione industriale, venne avviato un processo di bonifica di ampie zone paludose per recuperare terre alla agricoltura, che portò ad una drastica riduzione di bufali sul nostro territorio (19.000 capi nel 1908; 15.000 nel 1930; 13.000 nel 1942). Questo processo, che negli anni '50 sembrava inarrestabile, stava portando alla scomparsa di questa specie dal territorio italiano con un minimo storico 5.500 capi nel 1950.

Per rilanciare l' allevamento bufalino, si ritenne di dover allevare questa specie in un ambiente confinato tutto l'anno, applicando le stesse tecniche per l'allevamento bovino. Maymone e la sua scuola iniziarono, nel dopoguerra, una serie di studi per verificare la possibilità tecnica e la convenienza economica a trasformare tale allevamento da semiselvatico a intensivo. I risultati positivi di queste sperimentazioni e la conseguente applicazione sul territorio,

sicuramente, hanno contribuito a frenare la riduzione delle aziende bufaline (Pugliese, 1998).

Il patrimonio bufalino italiano è andato incontro ad una continua espansione passando da una consistenza pari a circa 12000 capi del primo dopoguerra a 245000 stimati dall'ANSAB nel 2002. Tali distribuzioni bufaline si concentrano prevalentemente in Campania (77% nel 51.6% delle aziende) e nel Lazio (15.8% nel 38% delle aziende).

In particolare, in questa regione, l'allevamento bufalino si localizza in provincia di Caserta nell'area del basso Volturno-Garigliano, dalla media valle del Volturno e nel piano Campano, mentre nel Salernitano si estende dalla media e bassa valle del Sele fino alle pendici dei monti Alburni e del Cilento. Gli allevamenti napoletani sono situati, nella gran parte nei pressi del lago di Licola e dei Regi Lagni. La crescita della popolazione bufalina nel mondo dal 1993 al 2001 è stimata intorno all' 8%, in Italia, invece, la crescita considerando lo stesso periodo è del 142% (AIA, 2001).

Analizzando i diversi fattori che hanno contribuito alla crescita della popolazione bufalina in Italia, considerando che oggi non vi è una cultura del latte di bufala come bevanda alimentare, si può affermare con molta sicurezza che tale incremento è stato determinato principalmente dall' aumento del consumo della Mozzarella ottenuta con latte di bufala e di Mozzarella di Bufala Campana a marchio DOP, un prodotto di alta qualità, con sapore caratteristico riconoscibile dai consumatori (De Stefano, 1999).

Questo fattore, in aggiunta alla crisi del comparto bovino iniziata nel 1984 in seguito alle restrizioni imposte dalla Comunità Europea sulle quote di produzione del latte, ha favorito l'espansione dell' allevamento bufalino (Proto, 1995; Zicarelli 1990).

Attualmente, l'allevamento della bufala è praticato prevalentemente in aziende specializzate nelle quali la quasi totalità della produzione lorda vendibile è

costituita dalla vendita del latte e, marginalmente da quella della carne. Il valore aggiunto complessivo per l'intera filiera è pari a 260 milioni di euro (Castrillo, 2003).

1.3 IL PRODOTTO TIPICO

Senza ombra di dubbio la carta vincente delle aziende bufaline è stata la creazione o per meglio dire l'eredità di un formaggio che per le sue caratteristiche peculiari è stato ed è molto gradito dai consumatori sia a livello nazionale che internazionale. La Mozzarella di Bufala Campana è uno dei più noti formaggi a “pasta filata fresca”. Questa denominazione riguarda i formaggi la cui tecnologia di produzione è caratterizzata dalla filatura conseguente alla fase di maturazione realizzata con l'acidificazione della cagliata sotto siero (**Sciancalepore, 1999**)

In origine la mozzarella era prodotto esclusivamente con latte di bufala ma, con il forte sviluppo del settore, si iniziò a produrre latticini con latte di vacca attribuendogli sempre la dicitura di “Mozzarella di Bufala”. Nel maggio del 1993 viene riconosciuto il marchio nazionale D.O.C. che limita l'adozione impropria del nome Mozzarella di Bufala Campana per prodotti che non si attengono al disciplinare studiato e proposto (sulla scorta delle notizie storiche del prodotto) dal consorzio fondato per la tutela di questo prodotto.

Vengono quindi fissate, oltre alle caratteristiche della materia prima (latte) e del prodotto finito, anche le aree di produzione DOP che in un primo momento, fino al 2003,



comprendevano le province di Caserta, Salerno, Latina e Frosinone ed da alcuni comuni della provincia di Napoli, Roma e Benevento.

Nel 2003, con il Reg CE n. 1107/96 viene ampliata la zona DOP inglobando anche la provincia di Foggia e di Isernia. Solo le mozzarelle prodotte seguendo quanto specificato dal disciplinare, potranno essere effigiate del simbolo del consorzio (parte superiore, sole a raggi rosso, parte inferiore campo verde, parte centrale recante la testa nera della bufala). Il marchio del consorzio di tutela, con l'indicazione degli estremi di legge e del numero di autorizzazione

rilasciato dallo stesso e apposto sull'incarto, è garanzia di autenticità, sia rispetto alla tipicità del prodotto che alla provenienza geografica.

Nel 1996 con il Regolamento n° 1107 si giunge all'attribuzione della certificazione Europea del D.O.P. ossia la Denominazione Di Origine Controllata per il prodotto "Mozzarella di Bufala Campana"

Il marchio della **DOP**, *denominazione di origine protetta* è un logo blu e giallo



con i solchi di un campo arato al centro di un sole circondato dalle 12 stelle dell'Unione Europea. I produttori di mozzarelle per poter ricevere, e mantenere, il marchio "mozzarella di bufala campana" devono impiegare solo latte di bufala 100% da capi allevati nella zona di riferimento e trasformato in loco secondo le regole dettate dal disciplinare.

1.4 LA MOZZARELLA DI BUBALA E LA MEMORIA STORICA

Le prime testimonianze sulla Mozzarella di Bufala risalgono al 1400, quando veniva chiamata semplicemente “Mozza”, perché la fase finale del processo di lavorazione terminava con la mozzatura.

Il termine Mozzarella lo si trova per la prima volta nel 1570 in un libro di cucina di un cuoco della corte papale, certo Scappi (**Scappi *et al.*, 1570**).

Nel '700 la Mozzarella era molto presente sui mercati di Napoli, forse grazie alla Tenuta Reale di Carditello, una azienda all'avanguardia per quel tempo nel settore dell'allevamento che contribuì sicuramente alla commercializzazione e al consumo di questo formaggio (Aliso , 1976).

Con l'unificazione dell' Italia, si venne a creare, ad Aversa, un mercato all'ingrosso chiamato "Taverna" che stabiliva quotidianamente le quotazioni delle Mozzarelle in foglie di giunco e di mortella disposte in cassette di vimini e di castagno; oggi tale tradizione si e' persa: ne resta tuttavia il ricordo nel richiedere le Mozzarelle usando l'espressione "mazzo di Mozzarelle", come se fossero ancora chiuse in fasci di giunco.

La Mozzarella, a causa della deperibilità, veniva prodotta in scarsa quantità e consumata localmente da una ristretta cerchia di "raffinati degustatori". Essa si configurava inizialmente, come una varietà meno nobile della provola ed era sicuramente la scarsa conservabilità a giustificarne la sua assenza, al contrario delle Provole, dalle tavole napoletane (**Correale, 1987**).

BIBLIOGRAFIA

Alisio G. (1976). Siti reali dei Borboni, 47-65.

Archivio Della Reggia Di Caserta. (1790). Serie “Carditello e Calvi”, fasc. 675: Conti della Reale bufalaria e Carbone, dal primo gennaio a tutt’aprile, c. 506.

Castrillo M. (2003). Una specie che resiste alla globalizzazione. *l’Allevatore*, 10.

Correale E. (1987). *Informatore Zootecnico*, 9, 52-55.

D.P.C.M. 10/05/93 in G.U. n° 219, (1993). Disciplina di produzione della Mozzarella di Bufala Campana.

De Stefano F. (1999). *L’informatore agrario*, 51, 59-62.

Il Mercato Del Latte. Osservatorio Latte - ISMEA. Rapporto 2003.

Proto V. (1996). INEA, Quaderni metodologici INEA, Collana Zootecnia n.9.

Pugliese C. (1998). Storia del bufalo italiano. *Bubalus bubalis*, 2, 30-38.

Rapporto AIA 2001.

Rapporto FAO 2001.

Scappi B. (1570). Opera, c. 275r.

Sciancalepore V. (1999). *Industrie Agrarie*.

Tateo F., Bonomi M. (2003). Guida all’analisi chimica degli alimenti sez. Latte e Derivati. edizioni ARS.

Zicarelli L. (1990). Considerazioni sull’allevamento bufalino. Salerno, ERSAC.

2 IL LATTE DI BUFALA

In base al **R.D 9/5/29 n° 994 e successive modifiche** il latte si definisce come:

“ un liquido di colore bianco opaco o giallognolo, dal sapore dolciastro derivante dalla mungitura regolare, completa ed ininterrotta delle ghiandole mammarie di animali in buono stato di salute e di nutrizione”. Può essere chiamato semplicemente latte quello proveniente da bovine, per le altre specie invece va sempre specificato.

Esso risulta essere una miscela complessa di sostanze di notevole importanza biologica e nutrizionale (proteine, grassi, lattosio, vitamine, sali, etc), costituisce un sistema dietetico bilanciato e favorisce la moltiplicazione della flora intestinale simbiotica.

Il contenuto in macro e micro costituenti oltre che i parametri chimico-fisici sono confrontati in **tabella 1** con i valori relativi al latte di vacca.

| Composizione chimica | Latte di bufala | Latte di vacca |
|------------------------------------|------------------------|-----------------------|
| Acqua | 81,5 | 87,5 |
| Sostanza secca | 18,5 | 12,5 |
| Residuo magro | 10,3 | 9,0 |
| Caseina | 3,6 | 2,8 |
| Lattoalbumina e lattoglobulina | 0,7 | 0,6 |
| Grasso | 7,0-9,6 | 3,6-4,5 |
| Lattosio | 5,0 | 4,5 |
| Calcio (Ca ²⁺) mg/100g | 180-240 | 120-160 |
| Fosforo (P) mg/100g | 120-140 | 65-110 |
| Rapporto Ca/P | 1.61 | 1.31 |
| Ceneri | 0,8 | 0,75 |
| pH | 6,5-6,7 | 6,6-6,7 |
| Acidità (SH) | 4,2-5,0 | 3,3-3,5 |
| Densità (15°C) | 1,031-1,034 | 1,028-1,035 |
| Punto crioscopico (-°C) | 0,56-0,59 | 0,52-0,55 |
| Diametro globuli (micron) | 1,0-6,0 | 1,0-10,0 |
| Azione al caglio | ++++ | +++ |

fonte: Istituto Nazionale di ricerca per gli alimenti e la Nutrizione

Tabella.1- Confronto tra la composizione del latte di vacca e di bufala

Il latte di Bufala pur possedendo delle caratteristiche generali molto simili a quelle del latte vaccino se ne discosta per il più alto livello di grasso e proteine, che determinano la più elevata resa del latte: 25 kg di Mozzarella, contro i 13 kg ottenuti mediamente dalla stessa quantità di latte vaccino con un incremento di circa 1,8 (Zicarelli, 2001).

Altro aspetto della tipicità del latte bufalino risiede nella sua qualità microbiologica. In condizioni normali nel latte di Bufala sono presenti alcuni ceppi di “lattobacilli” in concentrazioni superiori a quelle contenute nel latte vaccino. L’attività metabolica di questi batteri risulterebbe responsabile, per la maggior parte, del sapore e dell’aroma tipici di questo formaggio, la

produzione di particolari composti, oltre ad influire sul fenomeno di acidificazione della cagliata durante la trasformazione.

3 IL BURRO

Burro e formaggio, due dei prodotti storici dell'alimentazione, hanno origini che risalgono a molti anni prima di Cristo.

Circa il burro, citazioni del suo nascere o delle sue qualità, addirittura da qualcuno ritenute magiche, ritrovano negli scritti di Erodoto, nella Bibbia, nelle parole di Re Salomone; tracce e testimonianze provengono dall'Asia meridionale, dagli Sciti, Romani, Galli. In Francia Carlo Magno emanò decreti che ne favorissero il consumo.

E altrettanto dicasi per il formaggio. Qui vengono tirati in ballo i Liguri, i Celti che sarebbero stati i primi scopritori e diffusori almeno nell'area Europea, di questo meraviglioso derivato del latte. Siamo più o meno nel 1000 Ac e già il formaggio era cibo fondamentale per quanti accudivano vacche, capre e pecore...ma anche per i molti che esse non avevano diretti contatti.

Burro e formaggio dunque un binomio che attrasse ben presto per esigenze di vita quasi tutti gli addetti ai lavori, pastori e contadini, alleati da tecniche comuni di trasformazione e stagionatura, via via affinate, che tuttavia consentivano anche esiti finali differenziati o dalle proprietà delle materie prime o dall'ambiente o da personali metodiche di lavorazione.

La denominazione burro, ai sensi dell'art 1 della legge 23/12/1956, è riservata al prodotto ottenuto dalla crema ricavata dal latte di vacca, dal siero del latte di vacca e a quello ottenuto da loro miscele. Il burro deve rispondere ai requisiti chimico, chimico fisici ed organolettici che sono:

a) provenienza da latte conforme alle disposizioni sanitarie; b) non contenere materie estranee alla composizione del latte o della crema del latte di provenienza.

Il burro destinato al consumo diretto o alle industrie alimentari comprese le dolciarie deve avere un contenuto in peso di materia grassa non inferiore all'82%.

La denominazione burro di qualità è riservata al prodotto ottenuto unicamente dalla crema del latte di vacca, che risponde ai requisiti organolettici, analitici ed igienico sanitari stabiliti con decreto del Ministero delle Politiche Agricole.

Ai prodotti ottenuti dalla crema e dal siero provenienti da animali diversi dalla vacca può essere attribuita la denominazione burro purché seguita dalla indicazione della specie animale.

Il burro di qualità deve risultare esente da residui di eventuali sostanze chimiche salvo quelle ammesse per le produzioni lattiero –casearie.

Tale puntualizzazione non è di scarsa importanza visto che negli ultimi anni, a causa dell'incremento della richiesta di mozzarella di bufala, sta crescendo la produzione e la commercializzazione di burro bufalino.

Tale dato è in controtendenza rispetto ai dati delle vendite nazionali; infatti, le vendite di burro hanno imboccato un trend decrescente già dai primi anni '90, trend che non sembra destinato ad esaurirsi, visto il nuovo brusco calo dei volumi registrato nel 2002 (-2.3%).

Si tratta come è noto, di un tendenza di medio periodo che coinvolge il cambiamento delle abitudini alimentari e le preoccupazioni salutistiche che da anni si focalizzano sul burro, cui non sembra aver posto rimedio l'introduzione di prodotti nuovi, a ridotto contenuto in grasso. (Il mercato del latte rapporto 2003).

BIBLIOGRAFIA

R.D 9/5/29 n° 994

ZICARELLI L. (2001). Atti I Congresso Nazionale sull'Allevamento del Bufalo. Eboli (SA). 1-19.

OSSERVATORIO latte-ISMEA; *il rapporto del latte 2003*.

4. LA FRAZIONE LIPIDICA DEL LATTE DI BUFALA

Nel latte di bufala, come è noto il grasso costituisce, dopo l'acqua, il componente più importante, oscillando in media tra il 7 ed il 10%.

La matrice lipidica del latte di bufala è presente sotto forma di globuli, in dispersione instabile, e, per tale motivo, sono le sole sostanze estraibili dal latte senza modificazioni degli altri costituenti.

I globuli di grasso si presentano eterogenei ed essenzialmente costituiti da una microgoccia di trigliceridi, circondati da un involucro complesso (membrana o film di adsorbimento) il cui studio rileva la presenza di diverse sostanze. La membrana esterna del globulo, formata dall'0.5-1% dei lipidi totali, racchiude il core di trigliceridi che è formato dal 95-98% dei lipidi totali del latte (**King, 1955**).

Come nel latte bovino, anche in quello bufalino le dimensioni dei globuli di grasso variano ampiamente, ma il valore medio del loro diametro si attesta tra 4,1 e 4,8 μm contro i 3,0 – 3,5 μm di quelli del latte bovino. In ambedue le specie il diametro medio dei globuli di grasso è lievemente più elevato in estate che in inverno.

I meccanismi biologici di formazione e di secrezione dei globuli di grasso da parte della cellula mammaria, nonché la struttura dei globuli stessi, sono stati oggetto di ampie indagini (**Stenberg et al, 1981; MacPerson et al, 1983**). In particolare è stato sottolineato che i globuli di piccole dimensioni prevalgono numericamente su quelli di grandi dimensioni, ma è in quest'ultimi che sono contenuti i maggiori quantitativi di grasso (**Timmen et al, 1988**) perché il rapporto volume/superficie decresce con il decrescere del diametro dei globuli. Tale differenza si riflette in una diversa distribuzione della componente acidica nelle due tipologie di globuli (**Cavaliere et al, 1994**).

I lipidi si trovano nel latte sotto forma globulare in dispersione instabile e comprendono 3 specie di sostanze associate:

- ✓ Lipidi polari: fosfolipidi di natura complessa che costituiscono circa l'1% del totale.
- ✓ Sostanze lipoidiche o insaponificabile: steroli (principalmente colesterolo 0.3%) alcoli e vitamine (A, E, D e K), rappresentanti l'1.2 % del totale.
- ✓ Lipidi neutri: sostanza grassa propriamente detta, costituita da gliceridi per circa il 97-98% del totale.

Si riporta in **tabella 2** la composizione percentuale della frazione lipidica del latte di bufala.

| Componenti | % |
|---|------------------|
| Trigliceridi | 97-98 |
| Fosfolipidi | 0,01-0,03 |
| Colesterolo | 0,25-0,4 |
| Acidi grassi liberi, Cere, Mono – Digliceridi, | tracce |
| Carotene | - |
| Vitamina A | 0,5-1,5 mg/100g |
| Vitamina E | 2,5 mg/100g |
| Vitamina K | 0,05-0,5 mg/100g |
| Vitamina D | tracce |

Tabella.2- Composizione % della frazione lipidica del grasso di latte bufalino

La vitamina A è presente in maggiori quantità nel latte di Bufala rispetto al latte vaccino a differenza del suo precursore, il β -carotene, presente in quantità minore (**Correale, 1987**). Questo scarso contenuto di carotenoidi dà al latte di Bufala ed ai suoi derivati, come il burro e la Mozzarella, un colore bianco opaco rispetto alla sfumatura giallastra esibita dal latte vaccino.

Il grasso contenuto nel latte di bufala è di fondamentale importanza per l'industria casearia, in quanto oltre ad essere insieme alle proteine uno dei

principali componenti che concorre alla resa, esso può anche essere utilizzato come marker di genuinità della mozzarella e di prodotti derivati come il burro. Infine non può essere trascurato un altro aspetto fondamentale della frazione lipidica del latte di bufala, ovvero quello nutrizionale, dato l'alto contenuto percentuale di acidi grassi mono e polinsaturi essenziali. Tra questi particolare importanza è stata attribuita negli ultimi anni ai CLA acronimo utilizzato per identificare gli isomeri coniugati dell'acido linoleico (conjugated linoleic acid) (**McGuire, 1999; Bauman et al. 1999**).

4.1 I TRIGLICERIDI

Il grasso presente nel latte è costituito per il 97-98% da trigliceridi (TG), che sono triesteri degli acidi grassi alifatici e del glicerolo, inoltre, sono presenti digliceridi (DG) e monogliceridi (MG), rispettivamente per l'1.5% e lo 0.5% dei lipidi totali (**tabella 2**).

Nell'ipotesi che i 400 acidi grassi (Jensen et al., 1988) si distribuiscano casualmente nell'ambito delle tre posizioni della glicerina, il numero massimo di TG ottenibile sarebbe pari a 1×400^3 , pari a 64.000.000 di possibili combinazioni.

In realtà la distribuzione non è casuale e l'esistenza di siti preferenziali di esterificazione permette di limitare il numero di possibili famiglie trigliceridiche. Sono stati identificati 43 tipi di TG presenti in quantità superiore allo 0.5%. Per il latte di vacca la distribuzione stereospecifica degli acidi grassi nei TG è la seguente: l'acido butirrico è esterificato quasi esclusivamente in posizione 3, l'acido palmitico in ugual misura in posizione 1 e 2, l'acido oleico preferibilmente in posizione 1 e l'acido linoleico prevalentemente in posizione 2.

Pertanto, sebbene siano stati condotti numerosi studi al fine di identificare i tipi e le proporzioni dei trigliceridi presenti nel grasso del latte, non è possibile

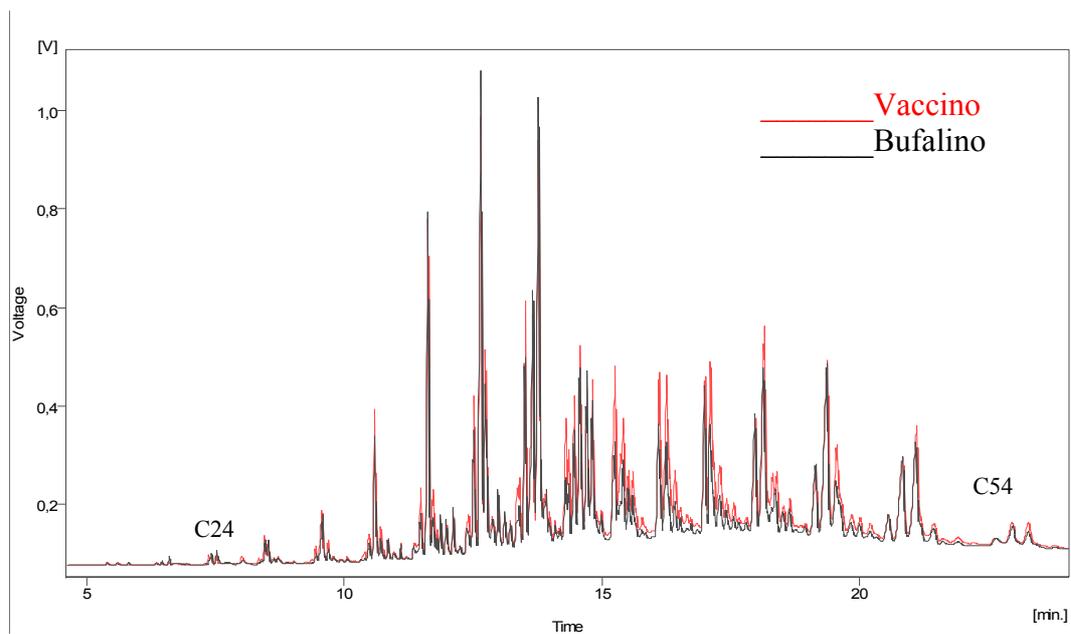
determinare la composizione in maniera definitiva. Composizione e struttura dei trigliceridi sono molto importanti poiché si ripercuotono sulle proprietà fisiche e nutrizionali del grasso del latte e, quindi, sulle caratteristiche dei prodotti di trasformazione a base di grasso, come il burro (**Precht, 1997**).

La struttura dei trigliceridi, infatti, è responsabile delle proprietà fisiche, quali cristallizzazione e punto di fusione, che hanno un importante effetto sulla consistenza e sul sapore dei prodotti a base di grasso. La composizione in acidi grassi dei trigliceridi e la loro posizione sul glicerolo all'interno del trigliceride influisce sulla digeribilità dei trigliceridi e sulle proprietà nutritive dei trigliceridi e dei singoli acidi grassi.

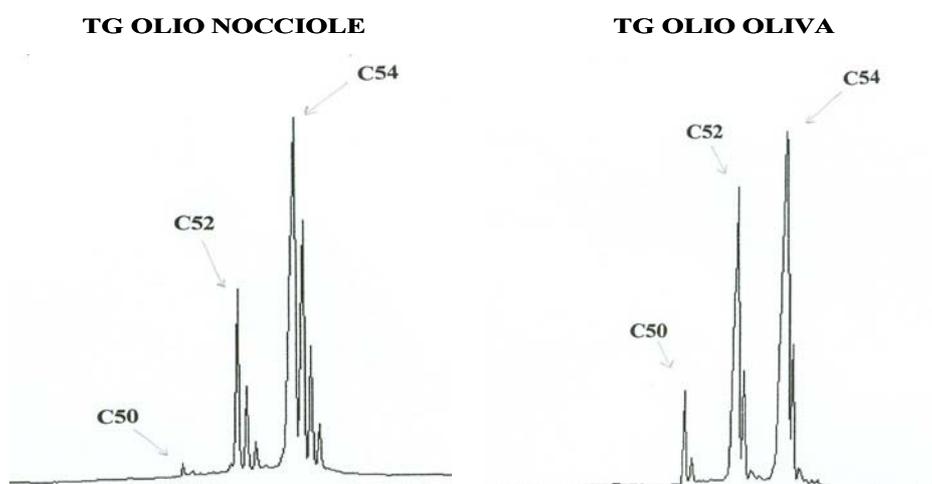
Le caratteristiche dei trigliceridi possono essere studiate mediante gas cromatografia, analisi che permette di determinare gli acidi grassi che compongono il latte e la loro distribuzione nei trigliceridi.

Questa tecnica analitica consente di separare le famiglie trigliceridiche in funzione del crescente numero di atomi di carbonio, compreso tra 24 e 54, fornendo un profilo cromatografico che ne descrive le caratteristiche qualitative e quantitative.

Dal punto di vista quantitativo, il profilo cromatografico dei trigliceridi è diverso a seconda del tipo di latte considerato; non è stata però riscontrata alcuna differenza dal punto di vista qualitativo. Per il grasso lattico dei ruminanti, in generale, si può riportare un andamento trigliceridico (**figura 1**) che in modo più o meno marcato può essere assimilato ad una doppia campana (bimodale), diverso da quello unimodale dei trigliceridi di altri grassi, siano essi di origine animale (strutto) che di origine vegetale (oli) (**figura 2**).



**Fig.1. Profilo trigliceridico del grasso lattico di bufala e di vacca.
(colonna GC 50 mt 65% Phenile)**



**Fig.2. Profilo trigliceridico di due oli vegetali.
(colonna GC 50 mt 65% Phenile)**

La caratteristica di questi ultimi profili è la distribuzione parziale dei trigliceridi che va da 50 a 54 atomi di carbonio.

Ritorniamo ora al confronto di alcuni grassi di natura lattica. Per semplicità in figura 3 si riporta sotto forma di schematizzazione il profilo trigliceridico. E' possibile notare differenze di tipo quantitativo molto marcate.

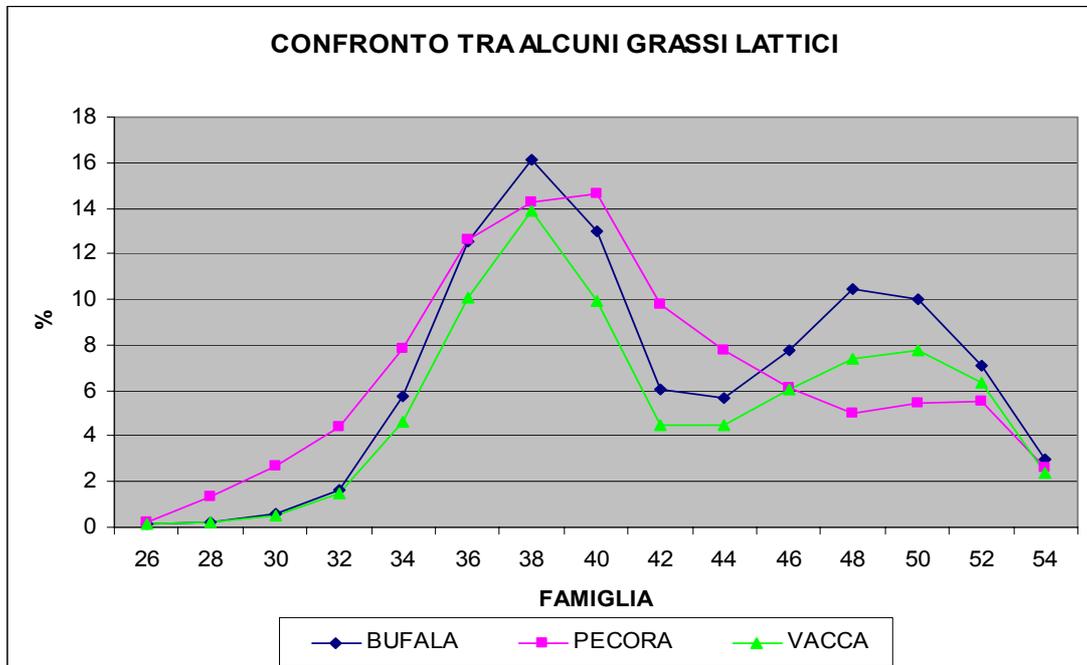


Fig.3. Confronto trigliceridico tra alcuni grassi lattici.

La differenza sostanziale si osserva tra il profilo del grasso lattico di bufala e vacca rispetto a quello della pecora. Quest'ultimo non presenta il tipico andamento bimodale delineato per gli altri grassi lattici.

Numerosi studi sono stati dedicati alla composizione trigliceridica del latte vaccino, mentre sono pochi quelli relativi al latte bufalino. Gli studi presenti in

letteratura (**Albonico et al, 1968; Addeo et al, 1981; Lund, 1988**) permettono significative osservazioni.

Confrontando l'andamento trigliceridico del latte bufalino e vaccino **figura 1 e 3** si riscontra, per entrambe le specie, che i massimi delle due curve sono costituiti dalle famiglie C_{38} e C_{50} , con un punto di minimo rappresentato dalla famiglia C_{44} . Le differenze di ordine quantitativo si riscontrano per le famiglie C_{42} e C_{46} , più abbondanti nel latte vaccino rispetto a quello bufalino e C_{32} , C_{36} più abbondanti nel latte bufalino rispetto a quello vaccino.

Per quanto riguarda la correlazione esistente tra la componente acidica e la distribuzione nei trigliceridi, è stato notato che la quantità dei trigliceridi a 36 e a 48 atomi di carbonio è positivamente correlata con l'aumento dell'acido palmitico ($C_{16:0}$), invece la quantità dei trigliceridi a 38 e a 52 atomi di carbonio sembra legata all'acido oleico ($C_{18:1}$). Il livello quantitativo dei trigliceridi a 50 atomi di carbonio è influenzato positivamente dell'acido stearico (**Addeo et al., 1980**).

4.2 GLI ACIDI GRASSI

Dall'idrolisi dei trigliceridi si ottengono il 90 % degli acidi grassi della frazione lipidica. Attualmente sono stati identificati circa 400 diversi tipi di acidi grassi, ma soltanto 14 sono presenti in concentrazione superiore all'1% (**Jensen et al, 1991**).

Gli acidi grassi possono essere classificati in funzione del numero di atomi di carbonio in:

infissi ($C > 10$);

volatili ($C < 10$);

basso peso molecolare (C_4 - C_{10});

medio peso molecolare (C_{11} - C_{16});

alto peso molecolare (C_{17} - C_{24})

Da un punto di vista chimico in saturi monoinsaturi, polinsaturi poiché il doppio legame conferisce loro tipiche caratteristiche.

Tra gli acidi grassi saturi sono più abbondanti l'acido palmitico con il 30% e acido stearico con il 21% mentre tra gli insaturi l'acido oleico con il 12,5%.

Studi effettuati sul latte bufalino con tecnica gascromatografica, di cui si riporta un tracciato in figura 4, (Addeo *et al*, 1981) hanno confermato che circa il 98% degli acidi grassi è costituito da un numero pari di atomi di carbonio compresi tra il C₄ e il C₂₀ mentre i dispari sono presenti solo in tracce.

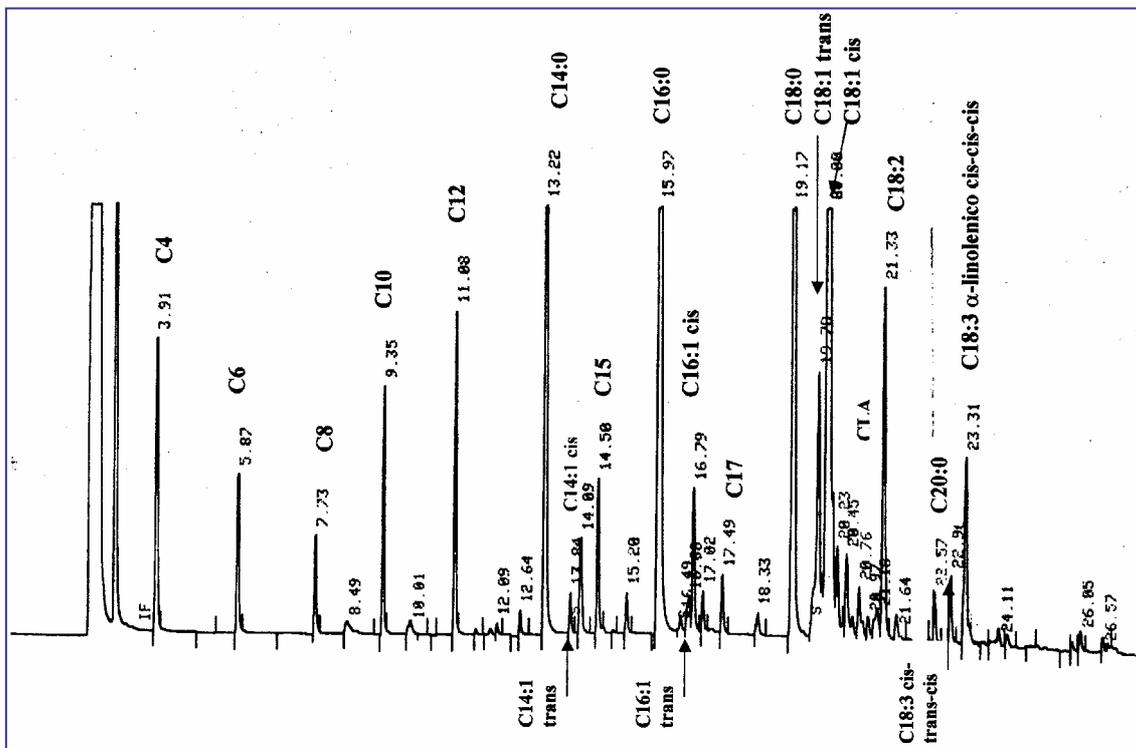


Fig.4. Tracciato gascromatografico di un grasso lattico.

Rispetto ad un latte vaccino e pecorino, il latte di bufala riporta un minor contenuto in acidi grassi a basso peso molecolare e un maggior contenuto in acidi grassi ad alto peso molecolare mono e polinsaturi, tra cui ω -3 e CLA, che

lo rendono un alimento ad alto valore nutrizionale (**Cucurachi, et al., 1968; Addeo et al., 1981**).

Nella categoria degli acidi grassi polinsaturi (PUFAs, Polyunsaturated Fatty Acids) sono comprese due importanti sottoclassi di acidi grassi:

- **gli acidi grassi ω -3** che comprendono:
 - ✓ *l'acido α -linolenico (LNA) C18:3 ω -3;*
 - ✓ *l'acido eicosapentaenoico (EPA) C20:5 ω -3;*
 - ✓ *l'acido docosapentaenoico (DPA) C22:5 ω -3;*
 - ✓ *l'acido docosaesaenoico (DHA) C22:6 ω -3.*

- **acidi grassi ω -6** che comprendono:
 - ✓ *l'acido linoleico (LA) C18:2 ω -6;*
 - ✓ *l'acido γ -linolenico (GLA) C18:3 ω -6;*
 - ✓ *l'acido arachidonico (AA) C20:4 ω -6.*

I primi sono caratterizzati dall'aver il 1° doppio legame in posizione 3, mentre i secondi in posizione 6.

I meccanismi con cui gli acidi grassi di queste due famiglie agiscono sulla salute dell'uomo sono stati negli ultimi anni oggetto di numerosi studi mentre risulta essere già nota l'importanza del loro apporto attraverso la dieta. Ad esempio, tra i composti della serie ω -6, va sottolineata l'importanza dell'acido arachidonico, il quale, oltre ad avere un ruolo strutturale e funzionale nelle membrane cellulari e subcellulari, è anche precursore di prostaglandine, trombossani e leucotrieni (**Samah, 2003**).

Gli acidi grassi della famiglia ω -3 hanno, invece, effetti fisio-metabolici differenti tra cui i più importanti sono:

- *modificazione del metabolismo delle lipoproteine con riduzione dei trigliceridi (-30%), sia di quelli a digiuno che di quelli postprandiali;*

- *regressione del processo arterosclerotico grazie alla riduzione della sintesi di citochine e interleuchina;*
- *prevenzione della trombosi grazie all'inibizione della sintesi, nelle piastrine, del trombossano A₂;*
- *riduzione della risposta infiammatoria;*
- *inibizione della risposta immune (Berra et al., 2003).*

Tali acidi grassi hanno poi un ruolo molto importante nell'espressione di alcuni geni che codificano per proteine enzimatiche coinvolte nella lipogenesi, nella glicolisi e nel trasporto del glucosio negli adipociti, ed influenzano la crescita cellulare, l'espressione genica, l'infiammazione, la β -ossidazione e i fattori di crescita. Infine, particolare attenzione è stata posta negli ultimi anni nel valutare gli apporti nutrizionali di acidi grassi in forme isometriche non fisiologiche: gli acidi grassi trans (TFA) naturalmente presenti in alimenti come latte e derivati (3-6% dei grassi totali).

Recenti studi suggeriscono un ruolo negativo di questi acidi nel processo aterofenetico (Troisi et al., 1992), ma caso a sé sembrerebbe l'acido linoleico coniugato (CLA) che avrebbe diversi effetti positivi sulla salute dell'uomo (Contato, 2004).

4.2.1 I CLA

CLA è l'acronimo di *Conjugated Linoleic Acid* ed è un termine collettivo utilizzato per indicare una serie di isomeri posizionali e geometrici dell'acido linoleico (LA) (Bessa *et al.*, 2000). Essi presentano un sistema di doppi legami coniugati che possono presentare configurazione *cis* o *trans* (Cannella *et al.*, 2000) e per questo motivo sono inclusi nel gruppo degli acidi grassi trans (t9-t11; t10-c12; t10-t12; e c9-c11 e t9-c11) (Breda Mulvihill, 2001; Fritsche *et al.*, 1998). La struttura dei due isomeri più rappresentativi è mostrata in **figura 5**:

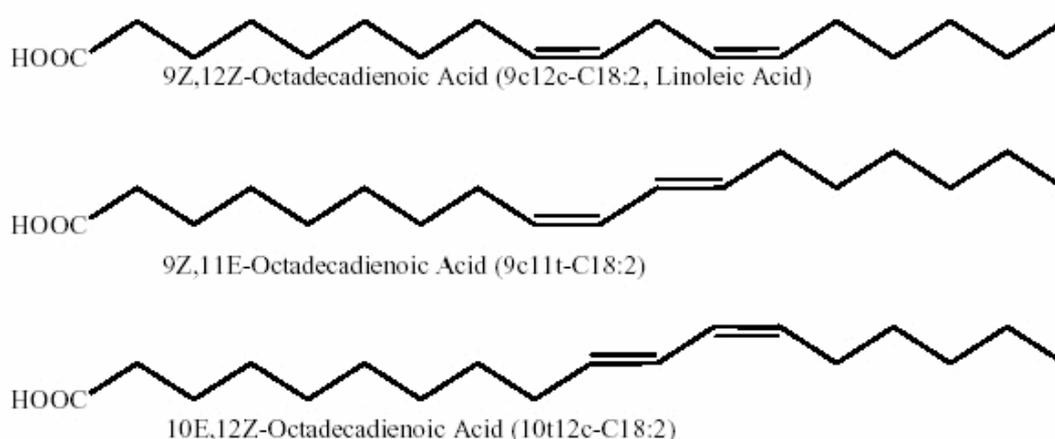


Fig. 5. Struttura chimica dell'acido linoleico e dei CLA (9c-11t;10t-12c C18:2)

L'acido linoleico coniugato e i suoi isomeri sono conosciuti da lungo tempo, ma l'interesse per queste molecole è relativamente recente. Infatti, diversi studi, in *vivo* ed in *vitro*, hanno permesso di attribuir loro proprietà anti-cancerogene, anti-aterogene, anti-diabetiche e la capacità di stimolare le proprietà immunologiche (Bretoni *et al.*, 1999; Banni *et al.*, 1999). Inoltre, alcuni ricercatori, affermano che i CLA possiedono anche interessanti proprietà nutrizionali in quanto la loro presenza nella dieta, sia in animali giovani, che in animali adulti, sembra indurre un aumento della massa magra a

scapito di quella grassa (**Banni et al., 1999**). Infine sembra che esercitino un effetto protettivo nell'insorgenza della malattia arterosclerotica (**Cannella et al., 2000**). Le diverse proprietà sono schematizzate in **figura 6**.

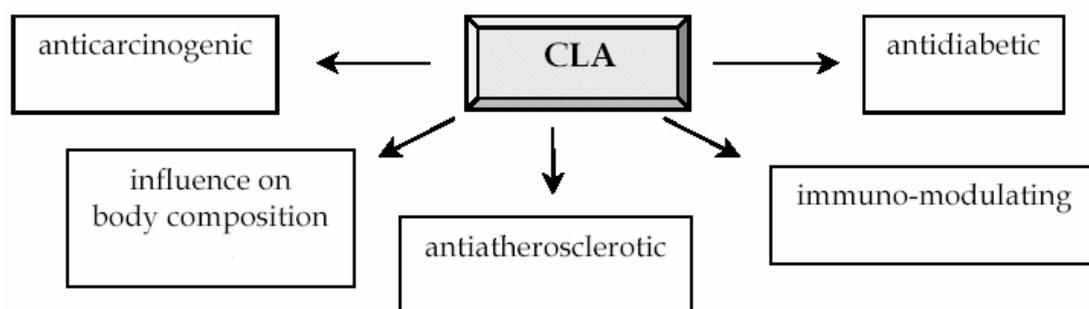


Fig. 6. Effetti fisiologici dei CLA.

I CLA sono naturalmente presenti in alimenti di origine animale, in particolare di ruminanti, come carne e latte (**tabella 3**) (**McGuire et al., 1999, Pariza et al., 2000**). I diversi contenuti di CLA negli alimenti normalmente consumati sono riportati in **tabella 4**:

| <i>Ruminanti</i> | CLA (g/100g grasso) |
|-----------------------------|----------------------------|
| pecora | 1.2% |
| vacca | 0.7% |
| capra | 0.6% |
| <i>Non Ruminanti</i> | |
| donna | 0.4% |
| cavalla | 0.1% |

Tab. 3 - Contenuto medio di CLA nel latte di differenti specie.

| | Contenuto in CLA (g/100 g) |
|--------------------------|---------------------------------------|
| Burro | 0,63-2,02 |
| Latte | 0,46-1,78 |
| Carne | 0,67-0,99 |
| Prosciutto | 1,62-2,02 |
| Pesce | 0,04-0,28 |
| Yogurt | 0,43-1,12 |
| Formaggio | 0,50-1,70 |
| Maiale | 0,15 |
| Tacchino | 0,96 |
| Piante oleaginose | n.r. |

Tab. 4 - Contenuto medio di CLA negli alimenti.

La carne dei ruminanti mostra contenuti di CLA più alti mentre prodotti ittici e pollame, eccetto il tacchino, ne contengono quantità esigue.

Ciò si può spiegare per la presenza dell'acido linoleico isomerasi nella flora batterica dei ruminanti che isomerizza l'acido linoleico a CLA (**Kepler *et al.*, 1967**). I prodotti lattiero-caseari mostrano elevate quantità di CLA. Ad esempio, il loro contenuto nel latte va dallo 0.63% nel latte condensato all'1.65% nel latte vaccino. I formaggi, invece, hanno un contenuto totale in CLA che va dai 3.6 a 19.9 mg/g di grasso, con il *cis-9*, *trans-11* isomero maggiormente presente (**Prandini *et al.*, 2001**). Tra i formaggi nazionali, quelli che hanno presentato i più alti livelli in CLA sono stati Pecorino Romano, Pecorino Siciliano, Pecorino Sardo e Fontina; mentre tra i formaggi stranieri, più elevati contenuti sono stati ritrovati nell'Emmenthal Svizzero.

Analisi effettuate sui prodotti di derivazione non ruminale, quali prodotti ittici, hanno messo in evidenza un contenuto in tracce di CLA; in modo particolare

va dallo 0.01% nel luccio allo 0.09% nella carpa (**Fritsche *et al.*, 1998**). Anche gli olii edibili, come olio di girasole, oliva e soia, presentano solo quantità inferiori allo 0.01%. Altra fonte alimentare di CLA risultano essere i prodotti industriali come torte, cioccolata e snack che contengono grassi in diverse quantità (**Fritsche *et al.*, 1999**).

Il contenuto di CLA negli alimenti dipende da molti fattori:

- composizione alimentare (**Griinari *et. al.* 1998**);
- contenuto in PUFA (**Saurer *et. al.* 1998**);
- regime alimentare (**Saurer *et. al.* 1998**);
- stagionatura dei formaggi (**Boylston *et. al.* 1995**);
- tipo di alimentazione (il latte di vacche al pascolo contiene più CLA di quello di vacche in stalla) (**Dhiman *et. al.* 1999**).

BIBLIOGRAFIA

ADDEO F., KUZDZAL-SAVOIE S. (1980). *Le Lait.*, 61, 14-26.

ADDEO F., KUZDZAL-SAVOIE S. CHIANESE L., MALORI A., SEPE C. (1981). *Le Lait.*, 61, 187-212.

ALAIS C., (2001). *Scienza del latte :principi di tecnologia del latte e derivati.*

ALBONICO F., MINCIONE B., ADDEO F., AMENO M. (1969). *Industrie Agrarie.*, 7, 210.

ALBONICO F., MINCIONE B., CASILLO R. (1968). *Produzioni Animali.*, 7, 269.

BANNI S., ANGIONI S., CARTA G., CASU V., MURRU M.E., MELIS M.P., DESSI' M.A., VARGIOLU S., CORONGIU F.P., (1999). *Progress in Nutrition* 1, 3-4: 38-48

BERRA B., BELLIA G., MONTOEFANO G., (2004). *Progress in Nutrition* 149-159.

BERTONI G., TREVISI E., (1999). *Progress in Nutrition* 1, 3-4: 19-29.

BESSA R.J.B., SANTOS-SILVIAJ., RIBIERO J.M.R., PORTUGAL A.V., (2000). *Liv. Prod. Sci.*, 63 (3), 201-211.

BREDA MULVIHILL., (2001). *Brithish Nutrition Foundation Bulletin.* 26, 295-299.

CANNELLA C., GIUSTI A.M., (2000). *Ital. J. Food Sci.*, 12, 36-55.

CAVALIERE A., SOLIMENE R., INTRIERI F. (1994). *Industrie Alimentari*, XXXIII, 11051106.

CONTATO R. (2004). *Ingredienti Alimentari* III dicembre, 68-70.

DHIMAN, T. R., ANAMD, G. R., SATTER, L. D., & PARIZA, M. W. (1999). *Journal of Dairy Sci.*, 82, 2146-2156.

FRITSCHÉ S. & FRITSCHÉ J. (1998). *Journal of the American Oil ChemiSTS Society* 75(10):1449-51.

JENSEN R.G., CLARK R.M., (1988). Page 171 in *Fundamentals of dairy chemistry*.3rd ed.

- KEPLER, C. R. & TOVE, S. B. (1967). Journal of Biological Chemistry, 242, 5686-5692.
- KING N. (1955). Commonwealth Agr. Bureaux-Fahan.
- MCGUIRE M.A., MCGUIRE M.K., (1999). Proceedings of the American Society of Animal Science, 1-8.
- MCPERSON A.V. KITCHEN B.J. (1983). J. Dairy Res., 50, 107-115.
- OSSERVATORIO latte-ISMEA; *il rapporto del latte 2003*.
- PARIZA M., PARK Y., COOK M.E., (1999). P.S.E.B.M., 223, 8-13.
- PRECHT D., MALKINTIN J. (1997). Nahrung, 41, 330-335.
- SAMAH S. M. ALLAM (2003). La rivista delle Sostanze Grasse, Vol. LXXX Marzo/Aprile.
- SAURER F. D., V. FELLNER, R. KINSMAN, J. K. G. KREMER, H. A. JACKSON, A. J. LEE, S. (1998). J.Anim. Sci., 906-914.
- STEMBERG B.H., PATTON S. (1981). J. Dairy Sci., 64, 422-429.
- TIMMEN H., PATTON S. (1983). Lipids, 23, 685-699.
- TROISI R., WILLET WC & WEISS ST (1992). Am. J. Clinique Nutrition, 56, 1019-1024.

5 FATTORI DI VARIABILITA' GRASSO LATTICO

Le caratteristiche quali-quantitative del latte sono influenzate da fattori endogeni ed esogeni all'animale **tabella 5 (Salvadori del Prado, 1998)**.

| Fattori che influenzano la composizione del latte | |
|--|---|
| Aumento del tenore in grasso | Riduzione del tenore in grasso |
| Ambiente Temperature medie e basse | Ambiente Temperature elevate |
| Alimentazione Presenza di fibra grossolana Adegua presenza di foraggio Impiego di cereali fioccati Sostanze grasse (acidi grassi saturi) Sostanze grasse protette (acidi grassi insaturi) Impiego di sostanze tampone Impiego di modulatori delle fermentazioni ruminali Proteine a bassa degradabilità | Alimentazione Tenori inadeguati di fibra grezza (<16%) Tenori inadeguati in NDF (<28%) Trinciatura dei foraggi troppo corta (<4cm) Amidi e zuccheri facilmente fermentescibili Oli e grassi polinsaturi non protetti Grassi non idoneamente conservati (irrancidimento) Eccesso di foraggi verdi Proteine ad elevata degradabilità |
| Modalita' di somministrazione degli alimenti Tecnica unifeed Somministrazione frazionata dei concentrati | Modalita' di somministrazione degli alimenti Somministrazione separata dei foraggi e dei concentrati Somministrazione non frazionata dei concentrati |

Tab.5- Fattori di variabilità della frazione lipidica del latte

La frazione lipidica del latte, indipendentemente dalla specie, è il costituente più variabile (**Contarini *et al.*, 2001**).

Numerosi studi effettuati sulla componente lipidica del latte bovino e ovino riportano variazioni nella composizione degli acidi grassi correlate al tipo di dieta (**Tripaldi *et al.*, 1997**), alla stagione, ai fattori genetici, allo stato di lattazione. Studi piuttosto recenti hanno dimostrato la possibilità di agire sulla qualità del grasso cambiando la composizione della razione utilizzata (**Chilliard *et al.*, 2001; Chilliard *et al.*, 2002**). In particolare, per il latte vaccino, è stato evidenziato che il contenuto in grasso tende a diminuire all'aumentare del numero di lattazioni; inoltre è stato riscontrato un progressivo aumento degli acidi grassi a corta catena e una diminuzione di quelli a lunga catena durante la lattazione. Tra tutti i fattori l'alimentazione ha un peso maggiore; sia per gli effetti che induce a livello ormonale, sia perché consente all'organismo dell'animale di rendere disponibili, per la mammella, i precursori necessari alle sintesi (**Piva *et al.*, 1989**). Le caratteristiche delle razioni alimentari si ripercuotono a livello della flora ruminale, incidendo sulla sintesi degli acidi grassi volatili; infatti, la frazione lipidica è influenzata da tutti quei fattori che modificano, nel rumine, il rapporto acido acetico/acido propionico (**Toppino, 2002**).

La possibilità di modificare il grasso del latte dipende dall'efficienza con cui gli acidi grassi di origine alimentare passano nel reticolo endoplasmatico delle cellule della ghiandola mammaria, dove ha luogo l'esterificazione degli acidi grassi.

L'efficienza di questo trasferimento dipende da numerosi fattori quali la dieta, lo stadio di lattazione, il livello di ingestione, il tipo di grasso utilizzato. La digeribilità post-ruminale dei lipidi è un altro punto critico del trasferimento degli acidi grassi dalla dieta al latte ed è influenzato dal livello di lipidi nella

dieta, dal tipo di grasso somministrato (libero o protetto) e dal grado di saturazione dei grassi.

E' stato osservato che razioni a basso contenuto in grasso sono facilmente degradate dai ruminanti (**Palmquist *et al.*, 1978; Sutton, 1989**). Già nel 1968 Albonico *et al.*, riportano in uno studio sulla composizione acidica del latte di bufala, un incremento dell'acido oleico correlato a una variabile alimentare (trebbie di birra).

Bertoni (1994) evidenzia per la bufala un aumento del contenuto in grasso relazionato ad un'elevata concentrazione energetica della razione; successivamente Tripaldi (1997) evidenzia per il latte vaccino, un aumento degli acidi grassi a corta catena in relazione ad un elevato contenuto energetico della razione somministrata.

Infascelli (2003), in uno studio sull'alimentazione bufalina, riferisce di una diminuzione della produzione lattea e del suo contenuto in grasso in corrispondenza di un aumento del tenore in cellulosa grezza nella razione.

La quantità di CLA presente nel latte è influenzata sicuramente dal tipo d'alimentazione, infatti, come riportato da letteratura sembra che essi siano sostanzialmente inferiori nella stagione autunno invernale quando le vacche sono alimentate in stalla con foraggi conservati, rispetto alla primavera e all'estate, quando le bovine sono tenute al pascolo (**White, 2001**). Dimon, studiando gli effetti della dieta sul contenuto di CLA nel latte vaccino, evidenzia che diete ricche in semi di soia aumentavano in modo sostanziale il contenuto di CLA nel latte.

BIBLIOGRAFIA

ALBONICO F., MINCIONE B., CASILLO R. (1968). Produzioni Animali, 7, 269-278.

BERTONI G., PICCIOLI CAPPELLI F. (1994). L'Informatore Agrario. 18, 29-33.

CHILLIARD Y., FERLAY A., DOUREAU M. (2001). Livestock Prod. Sci., 70, 31-48.

CHILLIARD Y., FERLAY A., LOOR J., ROUEL J., MARTIN B. (2002). Ital. J. Anim. Sci. 1, 243-254.

INFASCELLI F. (2003). Atti II Convegno Nazionale sull'Allevamento del Bufalo.

PALMQUIST D.L., CONRAD H.R. (1978). J. Dairy Sci. 61, 890-901.

PIVA G., MASOERO F., PRANDINI A., FUSCONI G. (1989). Scienze e Tecnologie Lattiero Casearia, 40, 253-275.

SALVADORI DEL PRATO O. (1998). Trattato di tecnologia casearia. Ed agricole.

SUTTON J.D. (1989). J. Dairy Sci. 72, 2801-2820.

TRIPALDI C., CATILLO G., MARTILLOTTI F. AND ANGELUCI M. (1997). Buffalo J. 1, 1-13.

WHITE S.L., BERTRAND J.A., WADE M.R., WASHBURN S.P., GREEN J.T., JENKINS T.C. (2001). Journal of Dairy Sci. 84, 2295-2301.

6 LE FRODI

6.1 DEFINIZIONE

La frode alimentare è un termine generico che si riferisce alla produzione e al commercio di alimenti non conformi alla normativa vigente. Le frodi alimentari si dividono in due tipologie: frodi sanitarie e frodi commerciali.

6.1.1 FRODI SANITARIE

Si tratta di fatti che consistono nel rendere nocive le sostanze alimentari e attentano alla salute pubblica. Possono essere commessi da “chiunque detiene per il commercio o pone in commercio o distribuisce per il consumo, acque, sostanze o cose da lui avvelenate, adulterate o contraffatte in modo pericoloso per la salute pubblica”(artt. 442 e 444 del Codice Penale). Il reato si configura anche per il solo fatto di esporre (porre in commercio) sostanze pericolose, pur se non sono state ancora vendute, oppure anche se si tratta di distribuzione gratuita.

6.1.2 CASI DI FRODE SANITARIA.

1. **Adulterazione.** Una sostanza alimentare è adulterata quando ad opera dell'uomo viene introdotta una modifica della sua composizione a seguito di mescolamento con altre sostanze di qualità inferiore o a seguito di privazione di elementi utili o caratterizzanti il prodotto.

2. **Contraffazione.** L'alimento viene posto in commercio con una composizione o con valori diversi da quelli dichiarati. L'inganno in cui può essere tratto il consumatore può essere esplicito o implicito. Esplicito se si dichiara il falso, implicito quando il tipo di confezione, la forma, il marchio, pur in assenza di una oggettiva dichiarazione di falso, possono trarre in inganno il consumatore.

Sofisticazione. Viene modificata la composizione di un alimento sostituendo parzialmente alcuni elementi della sostanza alimentare con l'aggiunta di alimenti di qualità e valore inferiore, oppure mediante l'uso di sostanze chimiche (additivi) non consentite dalla legge.

Alterazione. Consiste in modifiche delle caratteristiche chimico-fisiche e/o organolettiche di un alimento, dovute a processi naturali. Sono casi in cui la condotta umana (ad esempio disattenzione o dimenticanza) può aver provocato l'episodio, ma in modo colposo e non doloso. Non vi è volontà cioè di arrecare un danno.

6.1.3 FRODI COMMERCIALI

Art. 515 del Codice Penale. Ledono i diritti contrattuali e patrimoniali del consumatore. Si tratta del caso in cui nell'esercizio di una attività commerciale avviene la “consegna all'acquirente di una cosa per un'altra, o diversa da quella dichiarata o pattuita per origine, provenienza, qualità o quantità”. Non vi è alterazione delle qualità dell'alimento tali da renderlo nocivo, ma un illecito profitto a danno del consumatore. Per configurare una frode in commercio è sufficiente anche una piccola differenza, circa l'origine del prodotto o la provenienza, o sul sistema di preparazione, o sulla quantità (caso tipico è la cosiddetta “vendita per tara merce”).

6.2 LA PROBLEMATICHE DELLA GENUINITA'

La qualità alimentare rappresenta, un complesso insieme di proprietà e requisiti in grado di soddisfare i bisogni espressi dai consumatori.

Si è ormai concordi nel ritenere che, gli strumenti necessari a garantire la qualità dei prodotti agroalimentari sono l'autocontrollo dei produttori (**D.lgs. 155/97**), la trasparente e puntuale etichettatura e la tracciabilità di filiera

(178/2002 CE), per seguire tutto il percorso di un alimento dalla materia prima fino al consumatore.

Negli ultimi anni, con un'attenta attività di controllo, si sono potute accertare frodi di una certa rilevanza riferita a diversi prodotti agroalimentari ma, le più importanti per gravità e ricadute economiche, sono ascrivibili all'imitazione o alla contraffazione di prodotti a denominazione registrata.

Nell'ambito del settore lattiero-caseario, l'attività di controllo condotta nel 2003, ha riportato i risultati indicati in **tabella 6**:

| | |
|------------------------------|---------|
| Sopralluoghi | 2638 |
| Operatori controllati | 2221 |
| Operatori irregolari | 369 |
| Prodotti controllati | 6918 |
| Campioni analizzati | 1070 |
| Campioni irregolari | 138 |
| Sequestri | 21 |
| Valore dei sequestri | 15776,2 |

Tab. 6 - Riepilogo attività di controllo MiPaF svolta nell'anno 2003.

Le frodi di maggior peso economico sono dovute alla contraffazione di formaggi di qualità legata all'origine geografica e all'illecito impiego di materie prime di scarsa qualità o non consentite dalla legislazione nella produzione dei formaggi tradizionali.

In **figura 7** sono indicati i controlli svolti dall'ispettorato centrale repressioni frodi, formaggio per formaggio:

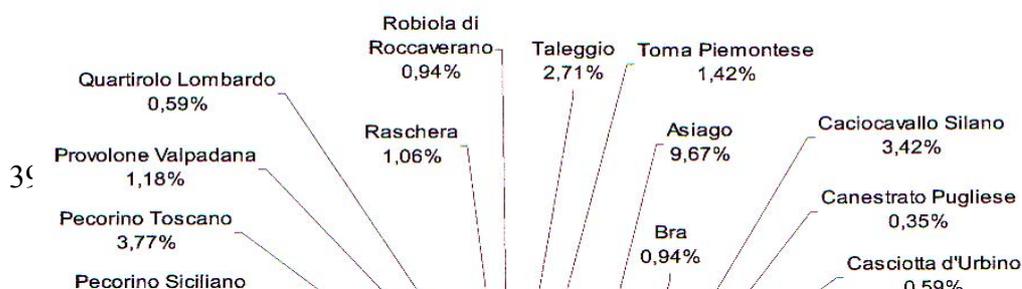


Fig.7. Controlli dell'ispettorato frodi per i formaggi.

L'attività svolta ha particolarmente interessato le verifiche estese a tutta la filiera dei formaggi tipici, di quelli a pasta filata, dei prodotti dichiarati di latte di bufala, di capra e di pecora e dei formaggi a DOP, con particolare riguardo anche alla Mozzarella di Bufala Campana.

Tra gli illeciti più frequentemente accertati all'analisi, si evidenzia:

- impiego di latte vaccino nella produzione di formaggi dichiarati di bufala, pecora o capra o nei casi più gravi nella produzione di formaggi a DOP;
- abuso di denominazioni a DOP per formaggi comuni;
- presenza di additivi non consentiti;
- utilizzo di derivati lattieri in polvere non consentiti in formaggi freschi a pasta filata comuni (mozzarella);
- illecito uso della DOP;
- presenza di grasso estraneo al latte in formaggi comuni e nel burro;

- irregolarità nell'etichettatura e negli incarti, specie per la tutela della Mozzarella di Bufala Campana (**MiPaF, 2003**).

6.2.1 GENUINITÀ DELLA MOZZARELLA DI BUFALA

Per garantire la genuinità della mozzarella di bufala campana si prende come riferimento il disciplinare contenuto nel **DPR 28/9/1979**. Tale disciplinare prevede per la produzione l'utilizzo esclusivo di latte di bufala. In tal modo rimane escluso un impiego anche parziale di latte bovino. In tale evenienza, la mozzarella non potrà essere più denominata "di bufala" ed il latte bovino dovrà essere necessariamente incluso tra gli ingredienti di produzione.

In base a tale premessa, ai fini della tutela del consumatore, è necessario poter disporre di metodi analitici

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

I metodi più utilizzati in passato hanno fatto ricorso al dosaggio del β -carotene (assente nel latte di bufala), al rapporto di alcuni acidi grassi presenti nella frazione lipidica e all'analisi della frazione proteica. I metodi che sono risultati più promettenti ai fini della identificazione del latte bovino si basano sull'analisi delle frazione proteica. Le risposte qualitative ottenute sono univoche e certe.

I metodi di analisi proposti si basano sulla ricerca di frazioni omologhe di proteina sia a livello di frazione caseinica sia di quella siero-proteica Regolamento (CE) n° 213/2001 del 09 gennaio 2001, Allegato XV, Articolo 10.

Sono stati proposti vari metodi elettroforetici basati sul riconoscimento della caseina α_1 , β -caseina, γ_2 -caseina ed α -lattalbumina bovina. I metodi si basano sulla differente mobilità elettroforetica di proteine omologhe dei latti delle due

specie. Tali differenze sono dovute a sostituzioni amminacidiche determinate da variazioni di natura genetica.

Recentemente è stato dimostrato che è possibile mettere in evidenza e dosare anche piccole quantità di latte bovino in miscela con quello di bufala (0.5% limite richiesto dalla CE) in campioni di mozzarella di bufala facendo ricorso alla cromatografia liquida ad alta risoluzione delle proteine del siero del formaggio solubili a pH 4,6.

Poiché il latte bovino contiene una frazione siero-proteica, la α -lattoglobulina A, assente nel latte di bufala, è possibile distinguere fino all'1% di latte bovino nella mozzarella di bufala.

Si ritiene che i metodi di ricerca basati sull'analisi delle caseine risultino più affidabili di quelli che considerano le proteine del siero. Le caseine risultano particolarmente stabili al calore mentre le proteine del siero del latte risultano più facilmente denaturabili e perciò anche più difficilmente rilevabili nei casi particolari di energici trattamenti termici per il risanamento del latte.

E' auspicabile che nel prossimo futuro possano essere resi disponibili metodi analitici di semplice e rapida esecuzione che consentano di rilevare la presenza di latte bovino in miscela con quello di bufala già nel latte conferito al caseificio.

Occorre infatti sottolineare che l'applicazione di tali metodiche impiega tempi di analisi relativamente lunghi ed una non semplice manualità, pertanto è auspicabile che possano trovarsi metodi analitici di più semplice e rapida esecuzione (Sacchi *et al.*, 1992).

6.2.2 GENUINITÀ DEL BURRO

La definizione di burro di qualità proposta dalla CEE (*Documento commissione CEE VI - D- 1 numero VI /1058/92 HG/me (9220)*) definisce il prodotto come un emulsione solida di acqua nella sostanza grassa in cui la frazione grassa

proveniente esclusivamente e direttamente dal grasso del latte o dalla crema di latte è presente ad una concentrazione di almeno dell'82%. Il grasso del latte è costituito per il 97-98% da trigliceridi e da piccole quantità di mono e digliceridi, colesterolo libero ed esterificato (fra loro in rapporto di circa 10:1), acidi grassi liberi e fosfolipidi.

La composizione dei trigliceridi del grasso del latte, fra quelle di prodotti naturali, è sicuramente la più caratteristica per la sua complessità e singolarità.

La presenza di oltre 150 acidi grassi distinti, dà la possibilità di esistenza di un numero enorme di trigliceridi diversi. La composizione degli acidi grassi del burro dalla quale si calcolano i parametri o "indici" della qualità del prodotto.

La determinazione della composizione di un alimento, nel controllo della sua genuinità, quale il grasso di latte o il burro, oggi non può prescindere dalla valutazione delle composizioni dei trigliceridi e di quella degli acidi grassi.

Questa determinazione, se associata ad altre quali quella dei digliceridi (**Motta et al., 1983; Riva et al., 1981**) e degli esteri del colesterolo oltre a quella degli acidi grassi minori (a 14 e 15 atomi di carbonio), consente di evidenziare anche modeste aggiunte di prodotti con composizione difficilmente rilevabile in una miscela con il burro (o con il grasso di latte) (**Lercker et al., 1992**).

Per la valutazione della genuinità del burro non salato valgono alcuni parametri analitici specifici:

| INDICE | VALORE |
|---------------------------|-----------------------------|
| GRASSO | min 82% |
| ACQUA | max 16% |
| SOLIDI NON GRASSI | max 2% |
| ACIDI GRASSI LIBERI (FFA) | max 1.2 mmol/100g di grasso |

| | |
|--------------------|-----------------------------------|
| PEROSSIDI | max 0.3 Meq Ossigeno/1000g grasso |
| GRASSO NON LATTICO | rilevabile mediante analisi GC |

In merito a quest'ultimo punto, la bozza di disposizione non formula alcuna proposta, lasciando per ora ai singoli Paesi la gestione e la scelta delle metodiche più adatte all'identificazione dei grassi estranei, eventualmente miscelati al burro.

Differenti sono i sistemi a disposizione degli organi di controllo per valutare la presenza di grassi estranei di origine non lattica nel grasso del latte vaccino:

- la determinazione degli steroli diversi dal colesterolo per individuare eventuali grassi vegetali (**Lercker 1992, Contarini 2001**) (EEC N. **3942/92**).
- la composizione degli acidi grassi e il calcolo di particolari rapporti fra alcuni di essi.

Per la rilevazione di queste particolari frodi fino agli inizi degli anni 80 in Italia sono stati utilizzati 9 rapporti tra particolari acidi grassi scelti tra quelli indicati da diversi Autori, in seguito ad un approfondito studio bibliografico analitico e statistico effettuato da Toppino e coll. nel 1982. In **tabella 7** vengono schematizzati tali rapporti.

| INDICI | LIMITI DI VALIDITA' |
|-------------------------|---------------------|
| C4/C6+C8 | 0,70-1,80 |
| C12:0/C10:0 | 1,00-1,30 |
| C14:0/C12:0 | >1,80 |
| C13:1/C18:0 | >2,00 |
| C18:0/C8 | 3,90-8,40 |
| C6+C8+C10:0+C12:0/C18:0 | 0,90-1,41 |
| C14:0/C18:2 | 4,95-13,00 |

| | |
|-----------------------------|------------|
| C18:2/C8 | 0,56-1,71 |
| C18:0/C6+C8 | 0,56-1,71 |
| C18:0/C12:0 | 2,15-3,83 |
| C14:0/C18:0 | 0,86-1,42 |
| C18:0+C18:1/C6+C8 | 6,95-10,90 |
| C10/C8 | 1,5-2,5 |
| C14/C12 | 2,4-4,1 |
| C16+C18:1/C6+C10 | 6,8-10,1 |
| C6+C8+C10+C12/C18:1 | 0,4-0,6 |
| C16+C18+C18:1/C6+C8+C10+C12 | 4,5-6,1 |

Tab.7- Limiti di validità per alcuni rapporti caratteristici degli acidi grassi (Contarini et al.1993)

Studi effettuati in Italia ed in altri paesi negli anni successivi per mettere in evidenza eventuali influenze di un'alimentazione variamente grassata nella composizione acidica del latte, hanno condotto all'abbandono dei rapporti acidi come mezzo di rilevazione della frode.

E' stato osservato come la composizione acidica del grasso protetto artificialmente (saponi di calcio) o naturalmente (soia e cotone integrali), somministrato alle vacche determini variazioni simili nella corrispondente composizione acidica del grasso del latte prodotto. L'alimentazione delle vacche con soia integrale, cotone integrale e saponi di calcio di acidi a lunga catena induce variazioni nella composizione acidica del latte tali da rendere il burro genuino non distinguibile da quello aggiunto di grassi estranei.

Nasce quindi l'esigenza di ricercare nuove vie per l'analisi della frazione lipidica del latte in grado, sia di caratterizzarla in modo più approfondito, sia per garantirne la genuinità.

Il metodo di riferimento per la rilevazione di grassi estranei, sia vegetali che animali come sego e lardo, nel grasso di latte vaccino e di prodotti lattiero-caseari è riportato sulla G. U. delle Comunità Europee del 1 marzo 1995 L.46. Ai fini della vigente norma per grassi estranei nel grasso di latte si intendono tutti i grassi vegetali e animali escluso il grasso di latte.

Tale metodica ufficializzata dalla CE è stata presentata dal Veroffentlichungen der Bundesanstalt für Milchforschung di Kiel ed è basata sulla determinazione gascromatografica, per mezzo di una colonna apolare impaccata corta, della composizione trigliceridica della frazione lipidica.

Diversi autori hanno ritenuto interessante, dopo il recepimento e la messa a punto di questa metodica, verificare la possibilità di operare, per ottenere gli stessi risultati, con colonne capillari apolari parimenti corte, con notevole risparmio di tempo per l'analisi. (**Contarini et al., 1993**).

I risultati hanno messo in risalto che anche la gascromatografia FID con iniettore PTV oppure On-Column con colonna capillare poteva essere utilizzata ottenendo i medesimi risultati (**Contarini et al. 1997; Banfi et al. 1999**).

Tale procedura (**Precht et al., 1991**) permette quindi di rilevare, attraverso l'analisi gascromatografica dei trigliceridi a numero pari di atomi di Carbonio, l'eventuale aggiunta di grassi estranei sia vegetali che animali al grasso vaccino, mediante l'applicazione di equazioni derivanti da regressioni multiple ed il confronto dei dati ottenuti con limiti prefissati ad un intervallo di confidenza del 99% con una sensibilità stimata tra il 3% e il 5%.

Attraverso tali equazioni vengono calcolati 5 indici definiti "S" relativi uno alla formula totale mentre gli altri 4 consentono di trarre indicazioni circa la presenza di altri grassi estranei.

Ad ogni valore di S è associato un intervallo di normalità e, secondo quanto specificato dal decreto, basta che uno solo degli indici cada al di fuori dell'intervallo specificato, per poter dire che il campione di grasso lattico non genuino.

In tabella 8, sono riportate le 5 formule per il calcolo degli indici S e in tabella 9 gli intervalli del parametro S riferito al grasso del latte vaccino (Regolamento CE n° 213/2001, Allegato XXV, Articolo 19).

| |
|--|
| Formula per gli oli di SOIA, GIRASOLE, OLIVA, RAVIZZONE, SEMI DI LINO, GERME DI GRANO, GERME DI GRANTURCO, COTONE ED OLIO DI PESCE $2.0983 * C30+0.7288 * C34+0.6927 * C36+0.6353 * C38+3.7452 * C40-1.2929 *$ |
| Formula per il grasso di COCCO e di PALMISTO $3.7553 * C32+1.1134 * C36+1.3648 * C38+2.1544 * C42+0.4273 * C44+0.5809 * C46+1.2926 * C48+1.0306 * C50+0.9953 * C52+1.2396 * C54 = S$ |
| Formula per l'olio di PALMA e SEGO $3.6644 * C28+5.2297 * C30-12.5073 * C32+4.4285 * C34-0.2010 * C36+1.2791 * C38+6.7433 * C40-4.2714 * C42+6.3739 * C46 = S$ |
| Formula per il LARDO $6.5125 * C26+1.2052 * C32+1.7336 * C34+1.7557 * C36+2.2325 * C42+2.8006 * C46+2.5432 * C52+0.9892 * C54 = S$ |
| Formula TOTALE $-2.7575 * C26+6.4077 * C28+5.5437 * C30-15.3247 * C32+6.26 * C34+8.0108 * C40-5.0336 * C42+0.6356 * C44+6.0171 * C46 = S$ |

Tab.8- Formule per il calcolo dei parametri S.

| Formula di rilevazione di | Intervallo S |
|--|----------------|
| Olio di semi di soia, girasole, oliva, ravizzone, semi di lino, germe di grano e granturco, olio di pesce e semi di cotone | 98.05 – 101.95 |
| Grasso di cocco e palmisto | 99.42 – 100.58 |
| Olio di palma e sego | 95.90 – 104.10 |
| Lardo | 97.96 – 102.04 |
| Formula totale | 95.68 – 104.32 |

Tab.9- Intervalli per gli indici S.

BIBLIOGRAFIA

BANFI S., BREGA M., POVOLO M., CONTARINI G. J. High Resol. Cromatogr. 22, (2) 93-96 (1999).

Commission Regulation (EEC) N. 3942/92 of 22 December 1992. Reference method for the determination of sitosterol and stigmasterol in butteroil. Off. J. European Communities N. L 399/29 del 31/12/1992, pp 29-38 (1992).

CONTARINI G., BATTELLI G., La rivista Italiana delle Sostanze Grasse . Vol LXXIV NOV (1997).

CONTARINI G., LEARDI R., PEZZI C., TOPPINO P.M.. La rivista Italiana delle sostanze grasse. Vol LXX OTT (1993).

Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee. “Metodo di riferimento per la rilevazione di grassi estranei nel grasso del latte mediante analisi GC dei trigliceridi L 46/11-23 (1995).

LERCKER G., FREGA N., BOCCI F., BERTACCO G. Scienza e tecnica Lattiero-casearia. 43, (2), 95-110 (1992).

MINISTERO DELLE POLITICHE AGRICOLE E FORESTALI (MIPAF). RELAZIONE ATTIVITA' 2003.

MOTTA L., BRIANZA M., STANGA F. AMELOTTI G. La rivista Italiana delle Sostanze Grasse-Volume LX- OTT (1983)

PRECHT D. *Kielermilchwirtschaftliche Forschungsberichte* 43, 219-242 (1991).

RIVA M., DAGHETTA A., GALLI M.. La rivista Italiana delle Sostanze Grasse-Volume LVIII-SETT (1981)

SACCHI R., ADDEO F., MASI P. (1992). Prodotti alimentari tipici del mezzogiorno Progetto Strategico CNR.

Regolamento CE n° 213/2001 del 09 gennaio 2001, Allegato XV, Articolo 10.

7 OBIETTIVI

L'allevamento della bufala negli ultimi anni è stato interessato da profondi mutamenti che hanno riguardato, in particolare, gli aspetti alimentari. Questi rivestono un ruolo estremamente rilevante nel determinare i risultati tecnici ed economici dell'azienda zootecnica e nutrizionale per il prodotto.

Infatti, sempre più diffuse sono le aziende che adottano moderne tecniche di alimentazione, come ad esempio, l'unifeed (piatto unico), e utilizzano specifici standard di razionamento, come quelli proposti dalla Commissione tecnico – scientifica del Consorzio Mozzarella di Bufala Campana (CMBC).

Nell'ultimo periodo sta diffondendosi negli allevamenti bufalini anche l'utilizzo alimentare dei grassi rumino-protetti al fine di incrementare la concentrazione energetica della razione e migliorare, quindi, le performance produttive degli animali. E' risaputo infatti che anche nella bufala, durante la prima fase della lattazione, è necessario fornire diete con una maggiore densità energetica al fine di bilanciare gli effetti dell'inappetenza.

L'utilizzo di un tale tipo di integrazione, inoltre, risulta utile in quanto il rapporto costo dell'integrazione/costo per litro di latte, è molto più favorevole che nella vacca.

D'altra parte però, l'utilizzo di questi prodotti può comportare modifiche abbastanza rilevanti sul profilo acidico del grasso del latte e, di conseguenza sulle caratteristiche dei prodotti caseari.

Se le variazioni non sono state evidenziate dai controlli ufficiali effettuati sul latte, che solo eccezionalmente considerano la composizione acidica della frazione lipidica, sono state invece rilevate prima saltuariamente e poi in crescendo fino ai livelli attuali, dai controlli effettuati sul burro.

Attualmente, anche se numerose sono le ricerche che hanno valutato l'effetto dell'impiego dei grassi sul profilo acidico del latte bovino, ovino e caprino, mancano studi specifici relativi alla bufala.

Gli obiettivi della ricerca sono stati:

- 1- caratterizzare la componente lipidica (trigliceridi, acidi grassi e componente acidica minore) del latte di bufala e della mozzarella alla luce delle nuove tecniche gascromatografiche (HRGC);

- 2- valutare l'effetto "alimentazione" sul profilo acidico e trigliceridico del latte bufalino;
- 3- delineare la mappatura lipidica del latte di bufala nel corso dell'anno solare registrando, nel contesto di aziende situate nello stesso territorio, le variazioni dei componenti della frazione grassa (trigliceridi, acidi grassi, steroli);
- 4- verificare come il processo di produzione della Mozzarella di Bufala possa influire sul profilo lipidico;

Identificate e studiate le fonti di variabilità (stagionale, alimentare e tecnologica) obiettivo ultimo è stato ricavare attraverso l'HRGC degli indicatori acidici e trigliceridici, utili per lo studio della genuinità del latte di bufala, della mozzarella e del prodotto ottenuto dai suoi intermedi di produzione (siero, acqua di filatura e/o crema): il burro di bufala.

8 MATERIALI E METODI

8.1 PIANIFICAZIONE

La fase desk ha previsto la selezione di aziende zootecniche, caseifici e burrifici sul territorio regionale capaci di poter supportare la sperimentazione.

Le attività zootecniche che sono state considerate valido supporto alla ricerca sono state quelle che:

- ottemperano ai requisiti igienico sanitari come da legge;
- posseggono un numero di capi superiori a 50;
- effettuano controlli sanitari di routine sull'allevamento;
- garantiscono una separazione strutturale tra i gruppi di animali;
- hanno la possibilità di modulare l'alimentazione a seconda delle nostre richieste.

Per quanto concerne i caseifici l'attenzione è stata rivolta verso quelle aziende che:

- ottemperano ai requisiti igienico sanitari come da legge (DPR 54, D Lgs 155/97);
- producono esclusivamente Mozzarella di Bufala Campana D.O.P;
- hanno sistemi di produzione sia artigianale che industriale;
- dispongono di più linee di produzione per studi in parallelo;
- dispongono di un laboratorio interno per le analisi di processo.

Tra i burrifici è stato scelto quello che lavora materie prime diverse come creme di siero e creme di latte e, all'occorrenza ha la possibilità di separare ed identificare le due produzioni.

8.2 CAMPIONAMENTO

Durante i tre anni di sperimentazione sono stati prelevati campioni di diversa natura in zone diverse e da allevamenti con particolari management aziendali. Al fine di riassumere tale fase si riporta di seguito una schematizzazione.

| Campioni prelevati | N° Campioni per anno di sperimentazione | | |
|--|---|-----------|-----------|
| | 1° | 2° | 3° |
| BUFALA | | | |
| Latte azienda <i>A</i> zona <i>1</i> <i>Alimentazione std</i> | 50 | 50 | - |
| Latte azienda <i>A</i> zona <i>1</i> <i>Alimentazione +G</i> | 50 | 50 | - |
| Latte azienda <i>B</i> zona <i>1</i> <i>Alimentazione std</i> | 50 | 50 | - |
| Latte azienda <i>B</i> zona <i>1</i> <i>Alimentazione +G</i> | 50 | 50 | - |
| Latte azienda <i>C</i> zona <i>1</i> <i>Alimentazione std</i> | 50 | 50 | - |
| Latte azienda <i>C</i> zona <i>1</i> <i>Alimentazione +G</i> | 50 | 50 | - |
| Latte zona <i>2</i> <i>Alimentazione std</i> | 100 | - | - |
| Mozzarella zona <i>1</i> | - | 60 | - |
| Mozzarella zona <i>2</i> | - | 50 | 88 |
| Acqua di filatura, Siero, Cagliata | - | 10 | - |
| Burro | 80 | - | - |
| VACCA | 1° | 2° | 3° |
| Latte zona <i>3</i> <i>Alimentazione std</i> | | | |
| Mozzarella zona <i>3</i> | - | 80 | - |
| Burro | 80 | 60 | - |
| Zona 1 = Salernitano | Alimentazione std = tradizionale (Unifeed) | | |
| Zona 2 = Casertano | Alimentazione +G = con aggiunta di grassi by-pass | | |
| Zona 3 = Napoletano | | | |

8.3 DETERMINAZIONI QUANTITATIVE

E' possibile suddividere i campioni prelevati nelle diverse aziende in tre tipologie:

- Liquidi (Latte, Siero, Acqua di filatura)

- Solidi (Mozzarella, Cagliata, Burro)
- Granulari (Alimenti somministrati)

Per ogni tipologia citata sono state condotte determinazioni specifiche di cui si dettaglia nella schematizzazione che segue.

| LIQUIDI | | | |
|-------------------------|------------------|----------|-------------------|
| DETERMINAZIONE | Latte | Siero | Acqua di filatura |
| pH | X | X | X |
| Acidità °SH | X | - | - |
| Grasso % | X | X | X |
| Proteine % | X | - | - |
| Lattosio % | X | - | - |
| Residuo secco % | X | - | - |
| Analisi GC del grasso | X | X | X |
| Analisi Microbiologiche | X | - | - |
| SOLIDI | | | |
| DETERMINAZIONE | Mozzarella | Cagliata | Burro |
| Acidità % | - | - | X |
| Numero Perossidi | - | - | X |
| Grasso % | X | X | X |
| Residuo secco % | X | X | X |
| Analisi GC del grasso | X | X | X |
| DETERMINAZIONE | GRANULARI | | |
| Grasso % | X | | |
| Residuo secco % | X | | |
| Protidi grezzi | X | | |
| Fibra grezza | X | | |
| Ceneri | X | | |
| Analisi GC del grasso | X | | |

8.3.1 DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DI GRASSO, PROTEINE, LATTOSIO E RESIDUO MAGRO

Per ogni campione liquido prelevato, è stata effettuata una determinazione quantitativa percentuale in grasso, proteine, lattosio e residuo secco magro,

avvalendosi del *Milkoscan* (S 50 type 75610 - mod. 54 B - Foss Electric – Danimarca).

Si tratta di uno strumento con microprocessore incorporato che utilizza uno spettrofotometro a raggi infrarossi (IR), collegato ad un computer.

Le letture di assorbimento sono state effettuate a:

- 5.63 μm per i grassi: assorbimento specifico del legame estere, in particolare del gruppo $\text{C} = \text{O}$;
- 6.40 μm per le proteine peptidico;
- 9.55 μm per il lattosio

Il residuo secco magro inoltre è calcolato dallo strumento sommando alle proteine ed al lattosio il valore delle ceneri, che per la bufala è pari al 0.8 %.

8.3.2 ESTRAZIONE DELLA MATRICE LIPIDICA DAL LATTE

Il tenore in materia grassa è stato determinato gravimetricamente, previa estrazione della stessa con etere etilico da una soluzione ammoniacale (Rose Gottlieb) o acida (Schmidt-Bondzynsky-Ratzlaff) (**Ministero delle Politiche Agricole e Forestali DM 21 aprile 1986**), evaporazione dei solventi e pesata del residuo.

METODO “ROSE GOTTLIEB” (FIL-IDF 59:1970)

80 mL di latte sono versati in 4 falcon da 50 mL e centrifugati a 7000 rpm per 10 minuti. Successivamente sono stati posti a -12°C per 10 minuti circa al fine di far consolidare lo strato di crema.

La crema affiorata è stata prelevata con una spatola e trasferita in una falcon nella quale sono stati aggiunti in sequenza:

- 3 mL di soluzione ammoniacale al 25% (v/v)
- 10 mL di Etanolo al 95% (v/v)
- 20 mL di una soluzione Etere-Eptano in rapporto 1:1 (v/v)

Il tutto viene agitato su vortex per 5 minuti e successivamente centrifugato a 2500 rpm per 10 minuti.

Il surnatante, prelevato con una pipetta, viene trasferito in pallone da 250 mL previa filtrazione su solfato di sodio anidro.

Tale procedura viene ripetuta altre 2 volte.

Gli estratti raggruppati nel pallone sono portati a secco attraverso evaporatore rotante.

METODO SCHMIDT-BONDZYNSKY-RATZLAFF (FIL-IDF 5A:1969)

160 mL di latte sono stati versati in 4 falcon da 50 mL e centrifugati a 7000 rpm per 10 minuti. Dopo tale fase sono stati posti a -12°C per 10 minuti circa al fine di far consolidare lo strato di crema di crema.

La crema affiorata, prelevata con una spatola, è stata trasferita in una falcon nella quale sono stati aggiunti in sequenza:

- 1 mL di soluzione acida per acido cloridrico al 25% (v/v)
- 10 mL di Etanolo al 95% (v/v)
- 20 mL di una soluzione Etere-Eptano in rapporto 1:1 (v/v)

Il tutto è stato agitato su vortex per 5 minuti e successivamente centrifugato a 2500 rpm per 10 minuti.

Il surnatante, prelevato con una pipetta, è trasferito in pallone da 250 mL previa filtrazione su solfato di sodio anidro.

Tale procedura viene ripetuta altre 2 volte.

Gli estratti raggruppati nel pallone sono stati portati a secco attraverso evaporatore rotante.

8.3.3 ESTRAZIONE DEL GRASSO DALLA MOZZARELLA

La frazione lipidica è stata determinata gravimetricamente tramite idrolisi del prodotto, opportunamente omogeneizzato, con soluzione acida per acido

cloridrico al 25% in alcol etilico e successiva estrazione della materia grassa mediante miscela etere etilico–n-eptano (2:1 v/v).

10 grammi di mozzarella tritata, sono stati sottoposti ad estrazione con 40 ml di miscela acida per acido cloridrico al 25% in etanolo (1:1 v/v).

Il campione dopo agitazione è stato posto a 50°C per 30 minuti. A raffreddamento avvenuto sono stati aggiunti 50 ml di soluzione etere etilico – n-eptano (2:1 v/v).

Successivamente il campione è stato centrifugato a 3500 g x 10 min. per permettere la separazione delle fasi.

L'aggiunta della miscela solvente è stata ripetuta altre 2 volte.

La miscela estratta, somma delle tre, è stata anidrificata su solfato di sodio anidro e filtrata su filtri di cellulosa a fascia nera, prima di essere portata a secco mediante evaporatore rotante.

I reattivi utilizzati sono stati:

- acido cloridrico Carlo Erba al 25% p/v (d. 1.125);
- alcol etilico Carlo Erba 95% v/v;
- etere etilico Carlo Erba esente da perossidi;
- eptano Carlo Erba purezza GC;
- solfato di sodio anidro Applichem 99%

8.3.4 PRERPARAZIONE DELLE MISCELE TRA I GRASSI

I campioni di grasso estratto da latte di bufala e di vacca, sono stati utilizzati per la preparazione dei due differenti mix. Questi sono stati utilizzati per la

preparazione di miscele a titolo noto (30%,20%, 15%, 10%, 7%) di grasso vaccino in grasso bufalino.

8.3.5 ANALISI CHIMICA DELLA RAZIONE ALIMENTARE

I campioni di razione alimentare prelevati in azienda sono stati sottoposti alla determinazione del contenuto in sostanza secca (SS) attraverso essiccazione del campione in stufa a ventilazione forzata a 65°C, fino al raggiungimento del peso costante (24 - 72 ore in funzione del tipo di alimento).

Successivamente, i campioni essiccati sono stati macinati in mulino a martelli e coltelli con griglia a fori del diametro di 1 mm. Sul campione così ottenuto sono stati determinati i parametri previsti dagli schemi Weende (protidi grezzi; estratto etereo; fibra grezza e ceneri) in accordo con le indicazioni proposte da Martillotti *et al.*, (1987).

I protidi grezzi (PG) sono stati determinati con il metodo Kjeldhal, che stima il contenuto proteico degli alimenti moltiplicando il contenuto in azoto totale per 6,25, coefficiente convenzionale di conversione dell'azoto in PG (Borgioli, 1983). Con questo metodo si determina l'azoto proteico, amminico, ammidico, ammoniacale ed ureico.

La procedura si basa sulla mineralizzazione a caldo del campione, con acido solforico al 96% e, successiva distillazione dell'azoto ammoniacale con raccolta su acido solforico a titolo noto.

La fibra grezza (FG) è stata determinata secondo il metodo Henneberg e Stohmann, basato sulla determinazione gravimetrica del residuo di una doppia idrolisi, prima acida e poi alcalina, di 1 g di campione, al netto delle ceneri. Questo residuo insolubile contiene sostanze utilizzabili dai batteri, come la cellulosa a più bassa solubilità, e sostanze indigeribili dai microrganismi presenti nel ruminante, come la lignina, che però è in parte solubile in sostanze alcaline e, quindi, sfugge alla determinazione, ed altri composti. La cellulosa

più solubile, e quindi facilmente fermentescibile, e le emicellulose si trovano, invece, nel dato relativo agli estrattivi inazotati. In definitiva, la FG non rappresenta un composto chimico ben definito, ma una frazione convenzionale che comprende diverse sostanze della parete delle cellule vegetali, formata da glucidi (sostanze pectiche, emicellulose, cellulosa, lignina).

L'estratto etero (EE) è stato determinato secondo il metodo Soxhlet, che opera su 3 g di campione e si basa sull'estrazione con etere di petrolio (p.e. 40 - 60°C), sull'eliminazione del solvente per distillazione e pesata di quanto residua.

Le ceneri (CE), che rappresentano la frazione minerale, sono state determinate per differenza di peso dopo l'incenerimento di 5 g di campione in muffola a 550°C, fino al raggiungimento del peso costante e scomparsa delle particelle di residui carboniosi. Il completamento a 100 delle ceneri rappresenta la sostanza organica (SO).

Gli estrattivi inazotati (EI) costituiscono il contenuto cellulare e sono stati determinati come complemento a 100 della somma dei contenuti in proteina grezza, estratto etero, fibra grezza e ceneri.

8.3.6 SEPARAZIONE ATTRAVERSO TLC

Strumentazione:

- lastrine TLC (20x20cm) POLYGRAM SIL G/UV₂₅₄ for TLC (MACHEREY-NAGEL);
- camera di sviluppo
- solvente di corsa : 40 ml eptano (purezza GC), 40 ml di etere diisopropilico (purezza GC) e 4 ml di acido acetico (purezza GC);
- lampada UV (254 nm)

Procedura.

Dopo il condizionamento della lastrina a 80°C per 20', a circa un cm dalla base della lastrina sono stati posizionati in serie 20 µl di una soluzione all'1% di grasso in esano.

Evaporato l'esano, la lastrina è stata riposta nella camera di sviluppo, contenente il solvente di corsa. La corsa è considerata ultimata quando la linea del solvente si trova ad una distanza di 1 cm dall'estremità superiore della lastrina.

Rimossa la lastrina dalla camera e asciugata del solvente residuo si passa alla nebulizzazione con soluzione alcolica di diclorofluoresceina. Le bande delle frazioni trigliceridiche sono evidenziate sotto luce UV a 254 nm.

Mediante una spatolina si rimuove lo strato di silice a cui è legato il campione e, dopo agitazione per 30' in miscela etere-eptano (rapporto 1:1 V/V) si procede alla filtrazione ed allontanamento del solvente.

Il campione, ripreso con esano, è stato analizzato attraverso gascromatografia.

8.3.7 ANALISI GASCROMATOLOGRAFICA

-ACIDI GRASSI (EMAG)

La determinazione della componente acidica è stata eseguita mediante l'analisi degli esteri metilici degli acidi grassi previa trans-esterificazione (Nota *et al.*, 1995; AOAC-IUPAC 963.22).

Questa reazione, oltre a liberare gli acidi grassi dal legame col glicerolo, li trasforma in una forma più volatile, maggiormente adatta all'analisi gascromatografica.

La trans-esterificazione è stata effettuata utilizzando KOH in MeOH (2N).

La procedura ha previsto la preparazione di una soluzione di grasso in esano al 5%. Di questa soluzione ne è stato prelevato 1ml al quale sono stati aggiunti 300 µl di potassa metanolica 2N.

Il tutto è stato agitato per qualche minuto su Vortex, per favorire la separazione delle 2 fasi che si formano in seguito alla trans-esterificazione, una fase inferiore costituita da glicerolo e metanolo e una superiore contenente gli esteri metilici degli acidi grassi (EMAG).

Quindi è stato prelevato 1µl dalla fase superiore per l'analisi gascromatografica.

Strumentazione HRGC

Gascromatografo Perkin Elmer mod. Auto System XL equipaggiato con vaporizzatore a temperatura programmata (PTV) e rivelatore a ionizzazione di fiamma di idrogeno.

Colonna capillare lunga 100m, 0,25mm ID; 0,20µm spessore film, fase stazionaria 50% Cyanopropil Methyl Silicone mod. SP (Supelco Bellefonte, USA).

Condizioni operative

- *PTV* (Vaporizzatore a temperatura programmata)
50°C x 0.1 min., incremento di 500°C/min. fino a 260°C dove sosta per 10 min.
- *Oven* (Camera) ***ANALISI DEL GRASSO LATTICO***

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 260°C per 28 min.

Rapporto di splittaggio: 1/60 ml/min.

Gas carrier: H₂, flusso 20cm/sec

Gas ausiliare: H₂

Temperatura del rivelatore FID: 260°C

FID: miscela aria/H₂ 10:1

- *Oven (Camera) ANALISI DEI GRASSI VEGETALI*

Temperatura iniziale: 160°C x 1 min., incremento di 5°C/min fino 260°C per 15 min.

Rapporto di splittaggio: 1/60 ml/min.

Gas carrier: H₂, flusso 20cm/sec

Gas ausiliare: H₂

Temperatura del rivelatore FID: 260°C

FID: miscela aria/H₂ 10:1

Identificazione e quantificazione

L'identificazione dei picchi è stata effettuata mediante uno standard esterno (SupelcoTM 37 component FAME MIX). Si sono quindi confrontati i tempi di ritenzione degli standard puri a concentrazione nota con quelli dei campioni, il tutto nelle stesse condizioni operative.

L'area percentuale di ogni composto è stata quantificata con il metodo dello standard esterno calcolandone il fattore di correzione.

Strumentazione per GC classica

La colonna utilizzata è in silice fusa, 50metri, 0,25 mm, d.i. 0,25 µm, f.t., con fase stazionaria 50% Cyanopropil Methyl Silicone (Quadrex 007-23).

Condizioni operative

Le condizioni utilizzate per la analisi sono: gas di trasporto He, flusso 2ml/min; gas ausiliari idrogeno ed elio, rapporto di splittaggio 1/60 v/v, temperatura FID 260⁰ C.

La programmazione del PTV è di 50⁰ C per 10 sec, incremento di 600⁰ C al min fino a 260⁰ C dove resta per 3 min. Per la camera invece la programmata è di 150⁰ C per 1 min, con un incremento di 5⁰ C al min fino a 230⁰ C dove resta per 15 min.

Identificazione e quantificazione

L'identificazione è stata effettuata con la metodica dello standard esterno (Supelco FAME Mix C14 – C22) nelle stesse condizioni gas cromatografiche e paragonando i rispettivi tempi di ritenzione.

Per la quantificazione è stato utilizzato il metodo della normalizzazione interna previo calcolo del fattore di correzione.

-TRIGLICERIDI (Metodo di Precht)

L'analisi è stata effettuata preparando una soluzione al 4% di grasso anidro in esano ed iniettandone 1 µl al gas cromatografo.

E' stata utilizzata una colonna capillare ed un iniettore PTV in sostituzione rispettivamente della colonna impaccata prevista dal metodo ufficiale e dell'iniettore on-column.

La percentuale dei trigliceridi è stata calcolata seguendo la procedura di integrazione prevista dal metodo ufficiale di analisi.

Strumentazione

Gas cromatografo GC Trace 2000 ThermoFinnigan equipaggiato con iniettore a temperatura programmata (PTV) e rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID).

Colonna capillare 35% dimethyl 65% diphenyl polysiloxane, 7.5 m, 0.25 mm ID, 0.10 µm spessore film; Rtx 65 TG (Restek corporation, Bellefonte, USA).

Condizioni operative

Per la massima risoluzione e quindi per la separazione delle varie famiglie il metodo prevedeva l'utilizzo della seguente programmata:

- *PTV* (Vaporizzatore a temperatura programmata)

60°C per 10 sec, incremento di 500°C/min. fino a raggiungere 370°C per 5 min.

- *Oven* (Camera)

Temperatura iniziale: 230 °C per 2 min., incremento di 20°C/min. fino a 350°C dove sosta 7 min.

- *Rapporto di splittaggio*: 450 ml/min;
- *Gas carrier*: He 13 ml/min
- *Temperatura del rivelatore FID*: 360°C
- *FID miscela aria/idrogeno* 10:1

Identificazione e quantificazione

L'identificazione è stata condotta attraverso l'utilizzo di uno standard esterno (BCR CRM 519) contenente in concentrazione nota i gliceridi con atomi di carbonio compresi tra 26 e 54.

La quantificazione è stata effettuata con il calcolo dei fattori di correzione, valutata seguendo la procedura dettata dal metodo ufficiale CE e applicando i suggerimenti di Contarini et al. del 1993.

Calcolo degli indici S

Per la determinazione di tali indici si è seguita la stessa strada proposta dal metodo ufficiale (riportata al paragrafo 6.2.2).

-TRIGLICERIDI

(Metodo per l'analisi delle sottofamiglie Regolamento CE n° 213/2001)

Si procede in modo simile a quanto specificato per il metodo di Precht, le uniche differenze erano:

- Quantità iniettata 1.5 µl di una soluzione al 4% con rapporto di splittaggio 1/60;
- Iniettore a temperatura programmata (PTV) e rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID).
- Colonna capillare 35% dimethyl 65% diphenyl polysiloxane, 30 m, 0.25 mm ID, 0.10 µm spessore film; Rtx 65 TG (Restek corporation, Bellefonte, USA).
- Oven (Camera) Temperatura iniziale: 230 °C per 2 min., incremento di 5°C/min. fino a 350°C dove sosta 10 min.

8.3.8 Analisi Statistica

L'elaborazione statistica è stata condotta mediante analisi della varianza utilizzando il pacchetto statistico JUMP. Sono state individuate due elaborazioni. Nella prima, i dati dell'intero anno di sperimentazione sono stati inseriti in modello comprendente gli effetti azienda, mese di prelievo e l'interazione azienda x mese di prelievo. Nella seconda, i dati delle singole aziende sono stati inseriti in un modello comprendente l'effetto variazione della dieta, considerando come tale ogni variazione qualitativa della razione somministrata.

Modello 1:

$$Y = \mu + M_i + A_j + (M*A)_{ij} + \text{errore}$$

Dove

Y = dato sperimentale

μ = media generale

M_i = effetto del mese di prelievo ($i = 1 \div 12$)

A_j = effetto dell'azienda

Modello 2:

$Y = \mu + D_i + \text{errore}$

Y = dato sperimentale

μ = media generale

D_i = effetto della dieta ($i = 1 \div 5$ nell'azienda 1 ; $1 \div 5$ nell'azienda 2 ; $1 \div 6$ nell'azienda 3)

Gli altri dati raccolti sono stati analizzati utilizzando il software Statistical Analysis System (SAS).

Tutte le variabili sottoposte ad elaborazione sono state analizzate con il test statistico del T-Student.

BIBLIOGRAFIA

AOAC-IUPAC 963.22

FIL-IDF 59:1970

FIL-IDF 5A:1969

BORGIOLI E. (1983) Nutrizione ed alimentazione degli animali agricoli. Edagricole, Bologna 350.

MARTILLOTTI F., BARTOCCI S., TERRAMOCCIA S. (1996). Tavole dei valori nutritivi degli alimenti di interesse zootecnico. INEA, Quaderni metodologici n° 9.

Metodi Ufficiali di Analisi per i formaggi (DM del 21 aprile 1986).

NOTA G., SPAGNA MUSSO S., NAVIGLIO D., ROMANO R., IMPROTA G. (1995). Rivista Italiana delle Sostanze Grasse. vol. 7, 24-25.

REGOLAMENTO (CE) n° 213/2001 del 09 gennaio 2001.

9 RISULTATI E DISCUSSIONI

9.1 Variabilità stagionale ed alimentare

In base ai risultati ottenuti è emerso come il piano alimentare somministrato alle bufale e la stagionalità siano fattori determinanti nel modificare la composizione lipidica del latte.

9.1.1 Valutazione quantitativa della frazione lipidica del latte di bufala

I campioni di latte prelevati ad intervalli regolari nelle aziende sottoposte a sperimentazione sono stati analizzati via Milkoscan per la determinazione del contenuto in grasso, lattosio, proteine ed estratto magro. Tali risultati, riportati in **tabella 10**, hanno permesso di delineare la curva del grasso nell'anno di sperimentazione.

| % GRASSO | | | | |
|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| Mese | AZIENDA A | AZIENDA B | AZIENDA C | Media |
| <i>Maggio</i> | 7.05 | 7.88 | 7.39 | 7.44 |
| <i>Giugno</i> | 7.21 | 6.78 | 6.73 | 6.91 |
| <i>Luglio</i> | 7.53 | 7.75 | 6.3 | 7.19 |
| <i>Agosto</i> | 7.82 | 7.91 | 7.63 | 7.76 |
| Settembre | 8.07 | 7.78 | 7.02 | 6.62 |
| Ottobre | 9.07 | 9.26 | 6.29 | 8.21 |
| Novembre | 9.63 | 8.94 | 7.85 | 8.81 |
| Dicembre | 7.18 | 10.21 | 9.47 | 8.95 |
| <i>Gennaio</i> | 9.24 | 10.09 | 8.18 | 9.17 |
| <i>Febbraio</i> | 8.07 | 10.06 | 8.01 | 8.71 |
| <i>Marzo</i> | 7.85 | 8.85 | 8.32 | 8.34 |
| <i>Aprile</i> | 7.91 | 9.17 | 7.16 | 8.08 |
| Media | 8.05 ± 0.8 | 8.72 ± 1.1 | 7.53 ± 0.9 | 8.1 ± 0.9 |

Tab. 10- Grasso rilevato nelle diverse aziende durante la sperimentazione.

E' possibile notare l'aumento del tenore in grasso nel periodo che va da Giugno a Gennaio dove si raggiunge il massimo annuale (9.17%). Successivamente si assiste alla diminuzione progressiva fino al livello minimo corrispondente al mese di Giugno (6.91%).

9.1.2 Valutazione della variazione della componente acidica in funzione dell'azienda e della stagionalità

In **tabella 11** è riportata la significatività statistica dei fattori testati per i diversi parametri del grasso del latte considerati. Da essa si evidenzia che sia l'effetto mese di prelievo che l'effetto azienda sono risultati sempre statisticamente significativi.

| VALORI DI P RELATIVI A FATTORI SPERIMENTALI TESTATI NEI DUE MODELLI | | | | | | |
|---|------------------------|----------|--------------|------|-----------|------|
| | MODELLO 1 | | | | MODELLO 2 | |
| | AZIENDA | MESE | MESE*AZIENDA | R | DIETA | R |
| Acidi Grassi | | | | | | |
| Cat. corta (C4 – C10) | 31,57*** | 16,3*** | 3,33*** | 0,68 | 12,2*** | 0,57 |
| Cat. media (C12 – C16) | 1,86 | 14,77*** | 9,64*** | 0,76 | 9,26*** | 0,5 |
| Cat. lunga (C17 – C20) | 12,41 | 3,22*** | 4,35*** | 0,72 | 13,22*** | 0,59 |
| Saturi | 9,00*** | 10,13*** | 5,29*** | 0,67 | 7,54*** | 0,45 |
| Monoinsaturi | 39,39*** | 14,97*** | 5,63*** | 0,76 | 15,58*** | 0,63 |
| Polinsaturi | 109,71*** | 4,12*** | 10,42*** | 0,81 | 23,99*** | 0,72 |
| CLA | 2,56*** | 9,11*** | 8,90*** | 0,57 | 7,94*** | 0,46 |
| Trigliceridi | | | | | | |
| (C24-C32) | 39,98*** | 5,89*** | 5,97*** | 0,71 | 8,68*** | 0,48 |
| (C34-C48) | 12,20*** | 4,84*** | 7,24*** | 0,67 | 7,25*** | 0,44 |
| (C50-C54) | 19,50*** | 6,05*** | 6,67*** | 0,69 | 7,46*** | 0,45 |
| Colesterolo | 3,67* | 12,39*** | 2,53*** | 0,63 | 4,94*** | 0,35 |
| *P < 0.05 | ***P < 0.001 | | | | | |

Tab. 11- Significatività dei parametri esaminati nella sperimentazione.

Uniche eccezioni sono rappresentate dai parametri acidi grassi a catena media e catena lunga per i quali l'effetto azienda non è apparso significativo. L'interazione azienda - mese è apparsa in tutti i casi statisticamente significativa sulle variabili indicate, indicando che nelle tre aziende i parametri hanno assunto andamenti diversi nel corso dell'anno di sperimentazione. Ancora da questa tabella si nota che (modello 2) anche il parametro dieta, se considerato unico fattore, incide in modo statisticamente significativo sulle variabili esaminate.

Passiamo ora nel dettaglio della componente acidica e vediamo come essa vari in funzione della stagionalità. In **tabella 12** sono riportati i valori dei singoli

acidi grassi in funzione dell'epoca di prelievo. Per comodità è stato suddiviso l'anno di campionamento nelle quattro stagioni.

| | Primavera | Estate | Autunno | Inverno | | |
|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------|-------------|
| Acidi grassi | % | % | % | % | media | ± ds |
| C4 | 3,31 ±0.02 | 3,37 ±0.24 | 3,59 ±0.10 | 3,51 ±0.05 | 3,45 | 0,13 |
| C6 | 1,46 ±0.12 | 1,35 ±0.10 | 2,34 ± 0.25 | 1,79 ±0.18 | 1,74 | 0,44 |
| C8 | 0,93 ±0.10 | 0,74 ± 0.04 | 1,17 ±0.17 | 0,98 ± 0.18 | 0,96 | 0,17 |
| C10 | 2,09 ±0.29 | 1,92 ± 0.16 | 2,13 ±0.35 | 1,89 ±0.43 | 2,01 | 0,12 |
| Catena corta | 7.79 | 7.38 | 8.8 | 8.17 | 8.14 | 0.79 |
| C12 | 2,78 ±0.32 | 2,35 ±0.05 | 2,41 ±0.38 | 2,54 ±0.62 | 2,52 | 0,19 |
| X1 | 0,19 ±0.03 | 0,17 ±0.02 | 0,20 ±0.01 | 0,20 ±0.02 | 0,19 | 0,01 |
| C14:0 | 11,18 ±0.73 | 10,63 ±0.15 | 10,64 ±0.74 | 10,46 ±1.22 | 10,73 | 0,32 |
| C14:1 T | 0,34 ±0.04 | 0,31 ±0.04 | 0,33 ±0.01 | 0,34 ±0.01 | 0,33 | 0,02 |
| C14:1 C | 1,22 ±0.18 | 1,03 ±0.17 | 1,05 ±0.10 | 1,17 ±0.10 | 1,12 | 0,09 |
| C15 | 1,10 ±0.09 | 1,06 ±0.17 | 1,04 ±0.06 | 1,07 ±0.05 | 1,07 | 0,03 |
| X2 | 0,42 ±0.04 | 0,37 ±0.05 | 0,36 ±0.03 | 0,40 ±0.01 | 0,39 | 0,03 |
| C16:0 | 32,65 ±0.70 | 32,20 ±2.72 | 27,74 ±0.36 | 29,14 ±1.58 | 30,43 | 2,38 |
| C16:1 T | 0,36 ±0.03 | 0,30 ±0.04 | 0,43 ±0.02 | 0,43 ±0.03 | 0,38 | 0,06 |
| C16:1 C | 1,73 ±0.36 | 1,69 ±0.29 | 1,50 ±0.20 | 1,61 ±0.22 | 1,63 | 0,10 |
| Catena media | 51.97 | 50.13 | 45.68 | 47.37 | 48.78 | 2.81 |
| C17 | 0,49 ±0.01 | 0,50 ±0.10 | 0,49 ±0.04 | 0,51 ±0.05 | 0,50 | 0,01 |
| X3 | 0,25 ±0.02 | 0,23 ±0.07 | 0,24 ±0.02 | 0,27 ±0.04 | 0,25 | 0,02 |
| C18:0 | 11,36 ±0.72 | 12,95 ±1.26 | 12,30 ±1.54 | 12,19 ±2.43 | 12,20 | 0,65 |
| C18:1 T | 1,82 ±0.17 | 2,03 ±0.47 | 1,96 ±0.32 | 2,06 ±0.53 | 1,97 | 0,11 |
| C18:1 C | 20,21 ±0.95 | 22,73 ±1.18 | 20,21 ±0.90 | 21,14 ±1.51 | 21,07 | 1,19 |
| CLA | 0,65 ±0.06 | 0,54 ±0.20 | 0,56 ±0.05 | 0,69 ±0.12 | 0,61 | 0,07 |
| C18:2 | 2,19 ±0.40 | 2,61 ±1.05 | 2,52 ±0.35 | 2,07 ±0.17 | 2,35 | 0,26 |
| C20 | 0,19 ±0.01 | 0,19 ±0.01 | 0,28 ±0.06 | 0,20 ±0.02 | 0,21 | 0,04 |
| C18:3 | 0,88 ±0.15 | 0,85 ±0.32 | 1,13 ±0.24 | 0,99 ±0.18 | 0,96 | 0,13 |
| Catena lunga | 38.04 | 42.64 | 39.68 | 40.12 | 40.12 | 1.9 |
| saturi | 68,42 | 68,06 | 64,91 | 65,14 | 66,63 | |
| insaturi | 29,39 | 31,56 | 29,68 | 30,52 | 30,29 | |
| sat/ins | 2,33 | 2,16 | 2,19 | 2,13 | 2,20 | |

Tab. 12- Composizione % media (± ds) degli acidi grassi del latte di bufala nelle diverse stagioni.

Si può notare come esista una differenza significativa nelle diverse stagioni di questi componenti. Il grasso del latte estivo contiene una percentuale superiore di acidi grassi mono (C18:1) e polinsaturi (C18:2, C18:3, CLA). E' interessante

sottolineare che, anche se la distribuzione acidica si modifica in modo più o meno spinto durante le quattro stagioni, il rapporto saturi/insaturi non varia statisticamente.

In **figura 8** si riporta il tracciato GC degli esteri metilici degli acidi grassi della frazione lipidica del latte di bufala.

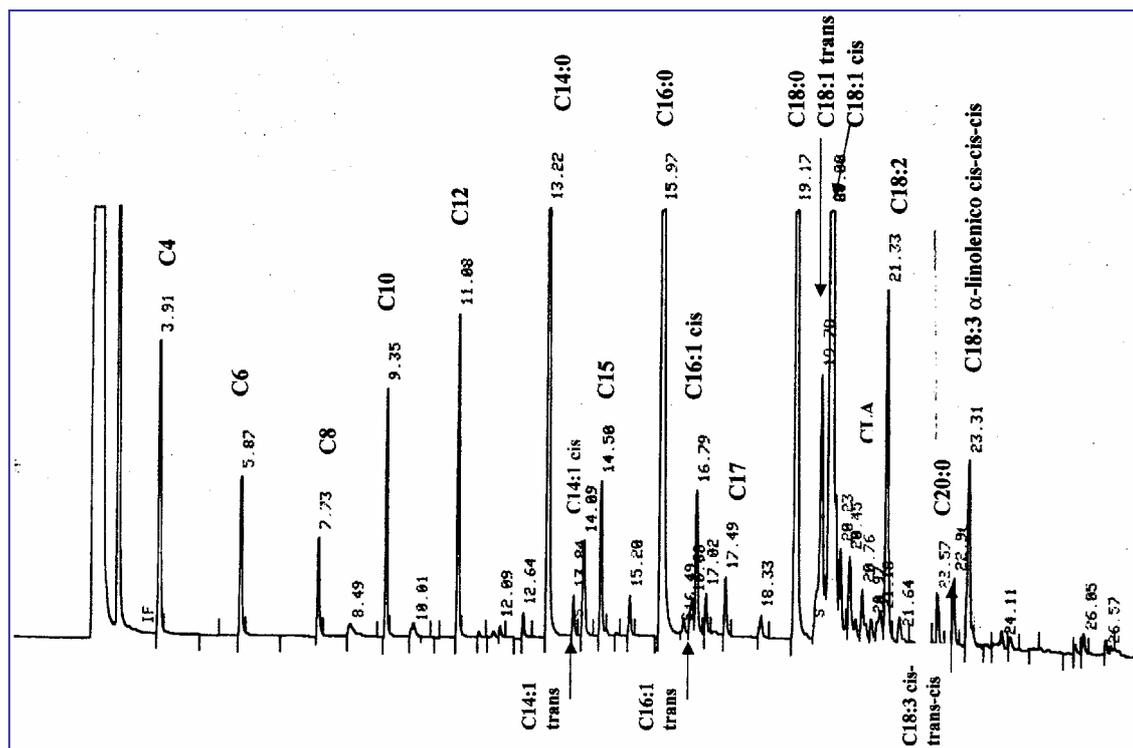


Fig. 8. Tracciato GC degli EMAG del latte.

9.1.3 Valutazione della variazione della componente acidica e trigliceridica in funzione della tipologia di dieta somministrata

In **tabella 13** sono riportati alcuni componenti delle razioni alimentari utilizzate nelle tre aziende nel periodo di osservazione.

| Componente Razione | C16:0 | C16:1 | C18:0 | C18:1 | C18:2 | C18:3 | C20:0 | Totale |
|--------------------|-------|--------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|
| LOIETTO FRESCO | 12,96 | tracce | 2,90 | 3,41 | 20,74 | 35,98 | 7,64 | 83,63 |
| FIENO MISTO AVENA | 26,73 | tracce | 7,56 | 27,58 | 18,62 | 2,70 | 6,50 | 89,69 |
| SEMI DI COTONE | 53,81 | tracce | 3,25 | 4,67 | 25,8 | 1,68 | tracce | 88,63 |
| POLPA BIETOLA | 34,83 | tracce | 2,72 | 7,05 | 3,46 | 32,44 | tracce | 80,50 |
| FARINA ESTR. SOIA | 20,82 | tracce | 3,08 | 25,30 | 44,70 | 5,46 | tracce | 99,36 |
| FARINA MAIS | 55,29 | tracce | 3,19 | 5,60 | 24,09 | 6,38 | tracce | 94,55 |
| INSILATO PRIMAVERA | 26,41 | tracce | 3,51 | 26,55 | 17,98 | 7,38 | 2,42 | 84,25 |
| INSILATO MAIS | 15,24 | tracce | 2,42 | 26,39 | 49,36 | 4,18 | tracce | 97,59 |
| INSILATO LOIETTO | 26,39 | tracce | 4,28 | 41,85 | 16,72 | 3,84 | 1,38 | 94,46 |
| FIOCCHI DI SOIA | 19,28 | tracce | 7,48 | 36,04 | 33,42 | 1,88 | 0,75 | 98,85 |
| GRASSI BY-PASS | 46,13 | 7,78 | 8,63 | 19,99 | 9,90 | tracce | tracce | 92,43 |

Tab. 13- Composizione acidica media (%) dei componenti delle razioni alimentari.

Le due fonti di grasso si differenziavano in maniera sostanziale per il profilo acidico riportato in **figura 9**. I fiocchi di soia integrali presentano un elevato contenuto in acido linoleico C_{18:2} (33.42%) e oleico C_{18:1} (36.04), mentre i grassi by-pass sono costituiti in massima parte da acido palmitico C_{16:0} (46.13) (**tabella 13**).

È possibile osservare che i fiocchi di soia hanno una composizione prevalentemente insatura (>70%), mentre i grassi idrogenati mostrano un profilo sostanzialmente saturo (>60%).

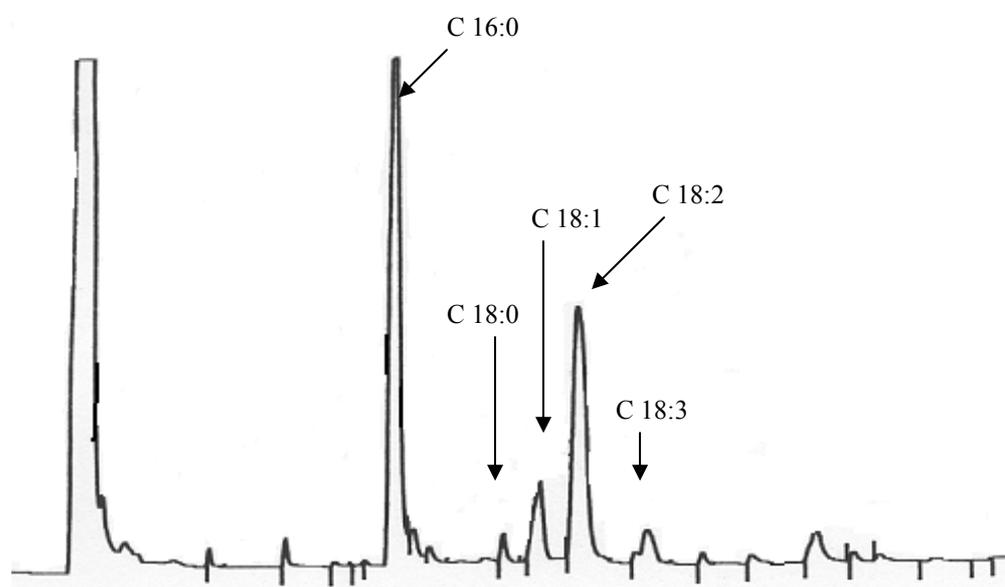
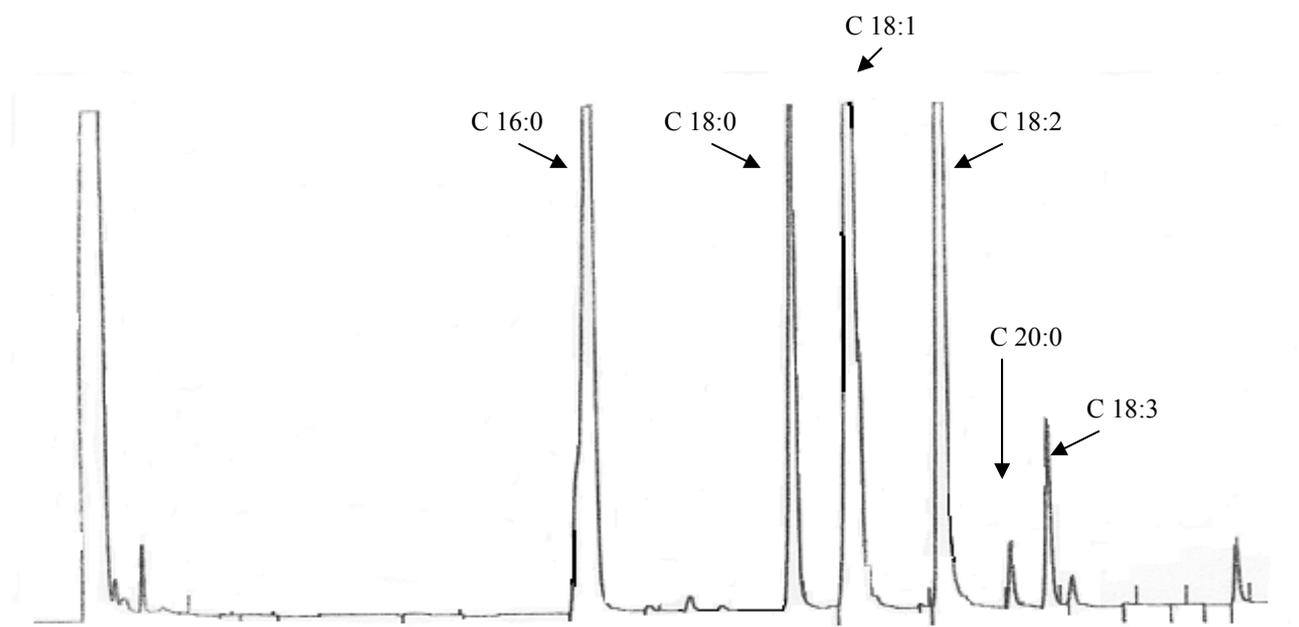


Fig. 9. Tracciati gascromatografici degli EMAG di alcuni grassi rumino-protetti.

La composizione e la natura di questi costituenti della dieta delle bufale ha un effetto significativo sulla frazione lipidica del latte.

Vediamo in modo più preciso qual è stato il piano adottato dalli diverse aziende.

L'azienda denominata I non ha mai utilizzato in modo continuativo alimenti con elevato contenuto lipidico, fatta eccezione per il periodo luglio - agosto 2002 (1 kg di fiocchi di soia con un valore di EE 19.2% SS che fornisce per un apporto di 192 g di grasso/capo/d) e luglio - agosto 2003 (0.350 kg grasso idrogenato di palma puro al 99% per un apporto totale di 347 g di grasso/capo/d).

Nell'azienda denominata PO, sono stati utilizzati per tutto il periodo di osservazione sia grassi protetti (in media 460 g, EE 23%, per un apporto in grassi di 106 g) sia semi di cotone (in media 1.5 kg, EE del 22%, per un apporto in grassi di 330 g).

Relativamente al profilo acidico, i grassi idrogenati presentano le stesse caratteristiche del prodotto utilizzato nell'azienda I, mentre i semi di cotone hanno presentato elevate percentuali di acido palmitico C_{16:0} (53.81%) e linoleico C_{18:2} (25.81%).

Nell'azienda PA è stato continuamente utilizzato olio idrogenato di palma anche se gli apporti sono stati sensibilmente inferiori rispetto all'azienda PO (in media 0.140 kg, EE 84%, per un apporto in grassi di 118 g).

In definitiva, quindi, gli apporti di grassi protetti nelle tre aziende possono così riassunti:

Azienda I: apporti abbastanza sostenuti, ma limitati nel tempo.

Azienda PO: apporti sostenuti e continui.

Azienda PA: apporti moderati, ma continui.

Relativamente alla composizione acidica, in tutte le aziende i grassi somministrati erano prevalentemente costituiti da acido palmitico C_{16:0} e acido linoleico C_{18:2}.

Tali differenze negli apporti di grassi si riflettono sulla concentrazione in EE della razione che è risultata più alta nell'azienda PO (in media nel periodo di osservazione 3.6%), seguita da quella PA (2,7) e, infine, da quella I (2.2%).

L'analisi statistica, condotta sui tutti i campioni di latte prelevati in azienda nel corso del periodo di indagine, ha evidenziato differenze statisticamente significative tra la composizione acidica e trigliceridica del latte ottenuto da animali alimentati con razioni contenenti grassi protetti, rispetto a quella ottenuta dal gruppo standard (senza grassi rumino-protetti) (**tabella 14, 15**).

| Acidi grassi | Gruppo controllo | Gruppo by-pass |
|------------------------|---------------------------|---------------------------|
| C4 | 3,48 ± 0,11 | 3,55 ± 0,10 |
| C6 | 1,91 ± 0,13 | 1,8 ± 0,11 |
| C8 | 1,06 ± 0,09 ^A | 0,9 ± 0,06 ^B |
| C10 | 2,22 ± 0,04 ^A | 1,77 ± 0,02 ^B |
| Catena corta | 8,68 | 8,03 |
| C12 | 2,76 ± 0,10 ^A | 2,45 ± 0,11 ^B |
| X1 | 0,18 ± 0,01 | 0,19 ± 0,02 |
| C14:0 | 11,36 ± 0,23 | 11,53 ± 0,18 |
| C14:1T | 0,32 ± 0,01 | 0,30 ± 0,01 |
| C14:1C | 1,16 ± 0,04 ^a | 1,05 ± 0,03 ^b |
| C15 | 0,98 ± 0,03 | 0,99 ± 0,03 |
| X2 | 0,37 ± 0,04 ^a | 0,34 ± 0,01 ^b |
| C16:0 | 30,15 ± 0,41 ^a | 31,74 ± 0,65 ^b |
| C16:1t | 0,43 ± 0,02 ^a | 0,39 ± 0,01 ^b |
| C16:1c | 1,74 ± 0,12 | 1,66 ± 0,16 |
| Catena media | 49,46 | 50,05 |
| C17 | 0,50 ± 0,01 ^a | 0,46 ± 0,03 ^b |
| x3 | 0,26 ± 0,02 | 0,23 ± 0,01 |
| C18:0 | 11,07 ± 0,86 | 11,77 ± 0,98 |
| C18:1t | 1,95 ± 0,21 | 1,78 ± 0,02 |
| C18:1c | 21,53 ± 0,66 | 21,18 ± 0,56 |
| CLA | 0,85 ± 0,02 ^A | 0,55 ± 0,06 ^B |
| C18:2 | 2,79 ± 0,12 ^A | 2,50 ± 0,20 ^B |
| C20 | 0,22 ± 0,01 | 0,19 ± 0,01 |
| C18:3 | 1,26 ± 0,09 | 1,21 ± 0,08 |
| Catena lunga | 40,45 | 39,87 |
| Saturi | 66,53 | 67,94 |
| Monoinsaturi | 27,13 | 26,36 |
| Polinsaturi | 4,90 | 4,26 |
| R (sat./insat.) | | |

a,b Indica una differenza significativa entro la riga p<0,01

A,B Indica una differenza significativa entro la riga p<0,001

Tab. 14- Confronto tra la composizione acidica (%) del latte del gruppo controllo e del gruppo by-pass.

| Trigliceridi | Gruppo controllo | Gruppo by-pass |
|-----------------|---------------------------|---------------------------|
| C24 | 0,10 ± 0,01 | 0,10 ± 0,01 |
| Col | 0,19 ± 0,03 ^a | 0,21 ± 0,01 ^b |
| C26 | 0,31 ± 0,02 ^a | 0,36 ± 0,02 ^b |
| C28 | 0,79 ± 0,06 ^A | 0,69 ± 0,04 ^B |
| C30 | 1,30 ± 0,01 ^A | 1,09 ± 0,03 ^B |
| C32 | 2,94 ± 0,08 ^A | 2,5 ± 0,09 ^B |
| Basso PM | 5,63 | 4,75 |
| C34 | 7,72 ± 0,13 ^A | 6,99 ± 0,11 ^B |
| C36 | 13,61 ± 0,31 ^A | 14,56 ± 0,40 ^B |
| C38 | 14,02 ± 0,79 ^A | 14,97 ± 0,66 ^B |
| C40 | 9,92 ± 0,47 | 10,02 ± 0,34 |
| C42 | 6,40 ± 0,37 ^a | 5,92 ± 0,41 ^b |
| C44 | 5,56 ± 0,21 ^a | 5,81 ± 0,22 ^b |
| C46 | 7,02 ± 0,21 | 6,97 ± 0,25 |
| C48 | 8,79 ± 0,31 | 8,95 ± 0,36 |
| Medio PM | 73,06 | 74,23 |
| C50 | 9,41 ± 0,21 ^A | 9,56 ± 0,32 ^B |
| C52 | 7,55 ± 0,39 ^A | 8,08 ± 0,50 ^B |
| C54 | 2,89 ± 0,02 ^a | 3,03 ± 0,03 ^b |
| Alto PM | 19,85 | 20,68 |

a,b Indica una differenza significativa entro la riga p<0,01
A,B Indica una differenza significativa entro la riga p<0,001

Tab. 15- Confronto tra la composizione trigliceridica (%) del latte del gruppo controllo e del gruppo by-pass.

In generale con l'aggiunta dei grassi protetti nella dieta si osserva una significativa riduzione di C₈ e di C₁₀ tra gli acidi grassi a basso peso molecolare, un aumento del C_{16:0} nella componente a medio peso molecolare e dei CLA nella frazione ad alto peso molecolare.

I risultati ottenuti mostrano che l'utilizzo dei grassi by-pass (saponi di calcio), ha determinato una diminuzione degli acidi grassi a basso ed ad alto peso molecolare e l'aumento di quelli saturi ed a medio peso molecolare.

Relativamente alla composizione trigliceridica, la presenza di grassi ha comportato un aumento dei gliceridi a medio ed alto peso molecolare e una riduzione di quelli a basso peso molecolare.

L'analisi della frazione sterolica ed in particolar modo del colesterolo, non ha messo in evidenza delle variazioni significative di tale parametro in funzione dell'alimentazione. Il motivo di tale fenomeno è stato ampiamente motivato da studi di Garcia Olmeto (1986). Questa sperimentazione che prevedeva l'utilizzo di carbonio marcato ha rilevato che gli steroli assunti con la dieta solo parzialmente vengono inglobati nella frazione lipidica del latte. Tale risultato evidenzia l'origine endogena di tale costituente.

9.2 Valutazione della genuinità del grasso lattico

A tutela del grasso lattico vaccino ci sono metodi quali la determinazione degli steroli diversi dal colesterolo per individuare i grassi vegetali (**Banfi et al. 1999; Collomb et al. 1998; Nota et al. 1995; Lipp et al. 1996; Lercker et al. 1992**); la composizione degli acidi grassi e il calcolo di particolari rapporti tra gli stessi, metodologia quasi abbandonata ed inefficace per valutare le adulterazioni del burro con altri grassi animali, soprattutto sego; la composizione trigliceridica proposta dal metodo ufficiale.

Il metodo di riferimento per la determinazione dei grassi estranei nel grasso del latte e dei derivati lattiero-caseari mediante analisi gascromatografica dei trigliceridi viene riportato dalla Gazzetta Ufficiale delle Comunità europee del 1 marzo 1995 (**L46/11-23, 1995**).

La procedura messa a punto da Precht (**Precht 1991**) permette di rilevare, attraverso l'analisi cromatografica dei trigliceridi a numero pari di atomi di carbonio, l'aggiunta eventuale di grassi di diversa origine, sia vegetali che animali non lattici, al grasso vaccino mediante l'applicazione di equazioni derivanti da regressioni multiple ed il confronto dei dati ottenuti con limiti prefissati ad un intervallo di confidenza del 99%.

Dato che in letteratura non viene riportato un riferimento specifico per la determinazione della genuinità del grasso del latte di bufala si è ritenuto utile, sulla base delle considerazioni descritte, verificare l'idoneità del metodo ufficiale nel caso in cui il campione sia di origine bufalina.

Sui campioni di grasso estratto dal latte di sicura derivazione e sui campioni di burro di bufala (per un totale di 500 campioni), è stata applicata la procedura prevista da Precht.

Seguendo la metodologia ufficiale (**L46/11-23 1995**), è stato determinato il fattore di risposta mediante una miscela a composizione nota in trigliceridi

preparata dal BCR (**Community Bureau of Reference**) con la sigla CRM 519.

Dal fattore di normalizzazione, è stata calcolata la percentuale corretta dei trigliceridi dei campioni di grasso bufalino. I trigliceridi sono stati separati individuando anche il trigliceride a numero dispari di atomi di carbonio (sottopico). L'integrazione è stata effettuata seguendo le specifiche della metodica ufficiale e i suggerimenti di Contarini et al (1993). Tutti i trigliceridi da 24 a 54 atomi di carbonio nonché colesterolo sono stati esattamente normalizzati a 100 dopo che sono stati tarati e calcolati al secondo decimale. Il valore medio di tre ripetizioni dei trigliceridi con atomi di carbonio da 26 a 54 dei campioni di grasso sono stati inseriti nelle cinque formule riportate in **tabella 8** in modo tale da ottenere i parametri S, indici per l'individuazione della genuinità del grasso. Va specificato che, nel momento in cui uno solo dei valori di S calcolati cade al di fuori dell'intervallo indicato in **tabella 9**, è estremamente probabile che il campione sia adulterato.

L'elaborazione statistica dei parametri S relativi ai 500 campioni di grasso analizzati viene evidenziata in **tabella 16**.

| | "S" min | "S" max | media | Valori Precht (grasso vaccino) |
|----------------|---------|---------|--------|-----------------------------------|
| TOTALE | 132.95 | 148.11 | 140.53 | 94.58 – 105.42 |
| LARDO | 100.34 | 118.24 | 109.29 | 97.65 – 102.35 |
| PALMA | 125.84 | 136.90 | 131.37 | 94.91 – 105.09 |
| SOIA... | 102.61 | 107.01 | 104.81 | 97.43 – 102.57 |
| COCCO | 96.17 | 104.81 | 101.49 | 99.14 – 100.86 |

Tab.16- Valori statistici degli indici S ottenuti per il grasso di latte di bufala.

E' possibile osservare come il valore medio dei 5 parametri S sono distanti dai limiti fissati per almeno una delle cinque formule. I risultati mostrano un distacco significativo dal range stabilito per il grasso di latte vaccino e una

forte variabilità tra i parametri S relativi alle 5 formule e in particolare per la formula totale.

I risultati della sperimentazione sono riassunti sinteticamente in **tabella 17**.

| | |
|--|------------|
| Totale campioni analizzati | 500 |
| Campioni nei limiti con tutti i 5 valori di S | 0 |
| Campioni fuori dai limiti con tutti i 5 valori S | 45% |
| Campioni con almeno un valore di S fuori dal limite | 55% |
| <i>Formule fuori limite (%)</i> | |
| TOTALE | 83 |
| LARDO | 37 |
| PALMA | 29 |
| SOIA | 78 |
| COCCO | 80 |

Tab.17- Quadro riepilogativo della sperimentazione.

Si nota come la formula totale ottenuta con l'applicazione delle relazioni matematiche di Precht è quella che in percentuale maggiore (83%) rispetto alle altre è risultata significativamente lontana dal range stabilito per il grasso vaccino, seguita dal cocco, dalla soia, dal lardo e infine dalla palma.

I dati ottenuti dalla sperimentazione hanno messo in evidenza che il metodo ufficiale, utilizzato per il controllo della genuinità del grasso vaccino, non risulta idoneo nel caso in cui il sofisticante è grasso di bufala.

Constatato ciò, è stata verificata la sensibilità del metodo di Precht per aggiunta al grasso vaccino di grasso estraneo di origine bufalina.

A tal fine sono state preparate miscele al 3,5,6,10,20,22.2,25,30% di grasso di bufala in grasso di vacca

I risultati hanno evidenziato che la minima concentrazione di grasso bufalino rilevabile è stata del 25% (che corrisponde al 50% di miscela latte vaccino in latte bufalino).

Tali risultati sono riportati in **tabella 18** dove si può osservare come variano i cinque indici S al variare della concentrazione di grasso bufalino aggiunto.

| Risultato della formula | | | | | |
|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------|--------------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| Aggiunte | Totale | Lardo | Palma | Soia | Cocco |
| 3 % | 100.30 ± 0.89 | 100.10 ± 0.78 | 99.92 ± 0.65 | 99.96 ± 0.73 | 100.23 ± 0.88 |
| 5 % | 99.64 ± 0.69 | 100.05 ± 0.32 | 99.34 ± 0.42 | 99.23 ± 0.58 | 99.93 ± 0.28 |
| 6 % | 101.12 ± 0.32 | 100.04 ± 0.75 | 110.65 ± 0.59 | 100.12 ± 0.96 | 100.4 ± 0.98 |
| 10 % | 100.58 ± 0.67 | 99.92 ± 0.23 | 99.94 ± 0.61 | 99.87 ± 0.86 | 100.14 ± 0.61 |
| 20 % | 101.88 ± 0.43 | 100.86 ± 0.58 | 101.67 ± 0.45 | 100.1 ± 0.68 | 100.26 ± 0.91 |
| 22,50 % | 101.31 ± 0.24 | 100.01 ± 0.25 | 101.34 ± 0.61 | 98.86 ± 0.21 | 100.72 ± 0.32 |
| 25 % | 104.51 ± 0.23 | 99.98 ± 0.36 | 104.53 ± 0.52 | 99.70 ± 0.12 | 99.35 ± 0.27 |
| 30 % | 105.82 ± 0.12 | 98.82 ± 0.35 | 107.40 ± 0.25 | 99.56 ± 0.54 | 98.72 ± 0.42 |
| Rif. L46 1995 | 95.68- 104.32 | 97.96- 102.04 | 95.90- 104.10 | 98.05- 101.95 | 99.42- 100.58 |

Tab.18- Sensibilità del metodo di Precht per aggiunta di grasso bufalino a grasso vaccino.

Tali valori permettono di concludere che il metodo di Precht non è efficace nella rilevazione del grasso bufalino eventualmente presente nel latte vaccino e nei suoi derivati (crema e/o burro).

Al fine di mettere a punto una nuova serie di intervalli degli indici “S” utili per la valutazione della genuinità del grasso lattico di bufala, sono stati processati i 500 campioni di grasso attraverso la metodica di Precht e, attraverso l’identificazione del minimo valore e del massimo è stato possibile ricavare gli intervalli (**tabella 19**).

| Formula | Limiti di Riferimento “S” Alimentazione standard | Limiti di Riferimento “S” Alimentazione con grassi |
|----------------|---|---|
| Totale | 107.93 - 118.70 | 102.25 - 118.70 |
| Lardo | 93.30 - 106.50 | 92.350 - 106.50 |
| Palma | 107.31 - 118.03 | 102.83 - 118.03 |
| Soia | 99.86 - 104.37 | 98.76 - 104.37 |
| Cocco | 95.59 - 105.71 | 94.74 - 105.71 |

Tab.19- Nuovi limiti S per il grasso di latte di bufala

Interessante notare che gli intervalli sono differenti a seconda che si considerino i campioni di grasso lattico ottenuti da animali alimentati con dieta classica e quelli con dieta additivata con grassi by-pass, questo a conferma di quanto detto dei paragrafi precedenti relativamente alla variabilità acidica e quindi trigliceridica indotta da alimentazioni particolari.

Ai fini della presente sperimentazione, verranno testati quelli con intervallo di oscillazione più ampio ottenuti da bufale cui era stata somministrata una dieta con grassi by-pass; includendo questi ultimi gli intervalli “S” del grasso lattico di bufale alimentato in modo standard.

Il passo successivo è stato quindi quello di accertare la validità dei nuovi intervalli nella rilevazione dei sofisticanti non lattici maggiormente riscontrati nei casi di frode: cocco, strutto, palma, lino, arachide, oliva, soia, sesamo, girasole. Per verificare la sensibilità sono state preparate miscele di grassi

estranei sopra citati in un grasso mix ottenuto dalla miscelazione dei 500 campioni. Le concentrazioni testate sono state 1% 3% 5% e 7% 10% (p/p).

In **tabella 20** si riassumono i risultati ottenuti.

Il riscontro numerico ha evidenziato che soltanto tre delle cinque formule di riferimento sono risultate specifiche ed efficaci per valutare la presenza - assenza di grassi estranei non lattici.

Il limite di rilevabilità del sofisticante ha avuto oscillazioni tra il 3% (olio di cocco) ed il 5% per tutti gli altri. Le formule utili sono state denominate A,B,C. In particolare le formule B e C hanno mostrato una specificità di riconoscimento verso l'olio di cocco, d'oliva e lo strutto. La formula A è invece quella che può fornire informazioni di massima circa la sofisticazione o meno del campione con un limite di rilevabilità del 5%.

| | Formula | Sensibilità | S min | Smax |
|---|----------------|--------------------|--------------|-------------|
| (Grassi estranei totali) | A | 5,0% | 107,93 | 118,7 |
| (Olio di cocco) | B | 3,0% | 95,59 | 105,71 |
| (Olio di oliva) | C | 5,0% | 107,31 | 118,03 |
| (Strutto) | B | 5,0% | 95,59 | 105,71 |
| | C | | 107,31 | 118,03 |
| (A) Formula grassi totali: olio di girasole, arachide, lino, sesamo e palma $-2.7575 * C26 + 6.4077 * C28 + 5.5437 * C30 - 15.3247 * C32 + 6.26 * C34 + 8.0108 * C40 - 5.0336 * C42 + 0.6356 * C44 + 6.0171 * C46 = S$ | | | | |
| (B) Formula olio di cocco e strutto $3.6644 * C28 + 5.2297 * C30 - 12.5073 * C32 + 4.4285 * C34 - 0.2010 * C36 + 1.2791 * C38 + 6.7433 * C40 - 4.2714 * C42 + 6.3739 * C46 = S$ | | | | |
| (C) Formula olio d'oliva e strutto $2.0983 * C30 + 0.7288 * C34 + 0.6927 * C36 + 0.6353 * C38 + 3.7452 * C40 - 1.2929 * C42 + 1.3544 * C44 + 1.7013 * C46 + 2.5283 * C50 = S$ | | | | |

Tab.20- Limiti di rilevabilità del metodo proposto e formule relative.

Questo metodo, pur presentando una sensibilità accettabile nei confronti dei grassi di natura non lattica, ancora una volta non è utile per frodi operate attraverso la miscelazione di latti di origine diversa al latte di bufala.

Questo a conferma della similitudine qualitativa del profilo trigliceridico del grasso lattico dei diversi ruminanti.

A tale punto della ricerca potremmo dire che per questa classe di sofisticazioni è quindi necessario ricorrere a tecniche elettroforetiche o di biologia molecolare molto sensibili ma lunghe e laboriose.

Al fine di ricercare un protocollo analitico di più semplice attuazione per rilevare frodi di latte vaccino in latte bufalino, si è abbandonata la cromatografia su colonna capillare di 7,5m (a bassa risoluzione), utile per la rilevazione di grassi di origine non lattica in miscela con il grasso di bufala e si è ritornati alla gascromatografia con colonna di 50m capillare (alta risoluzione HRGC).

Il profilo trigliceridico delle due specie è simile qualitativamente come è possibile notare in **figura 10** dove si riporta la sovrapposizione di due tracciati caratteristici e differisce esclusivamente per il quantitativo dei singoli gliceridi come sottolineato nei paragrafi precedenti.

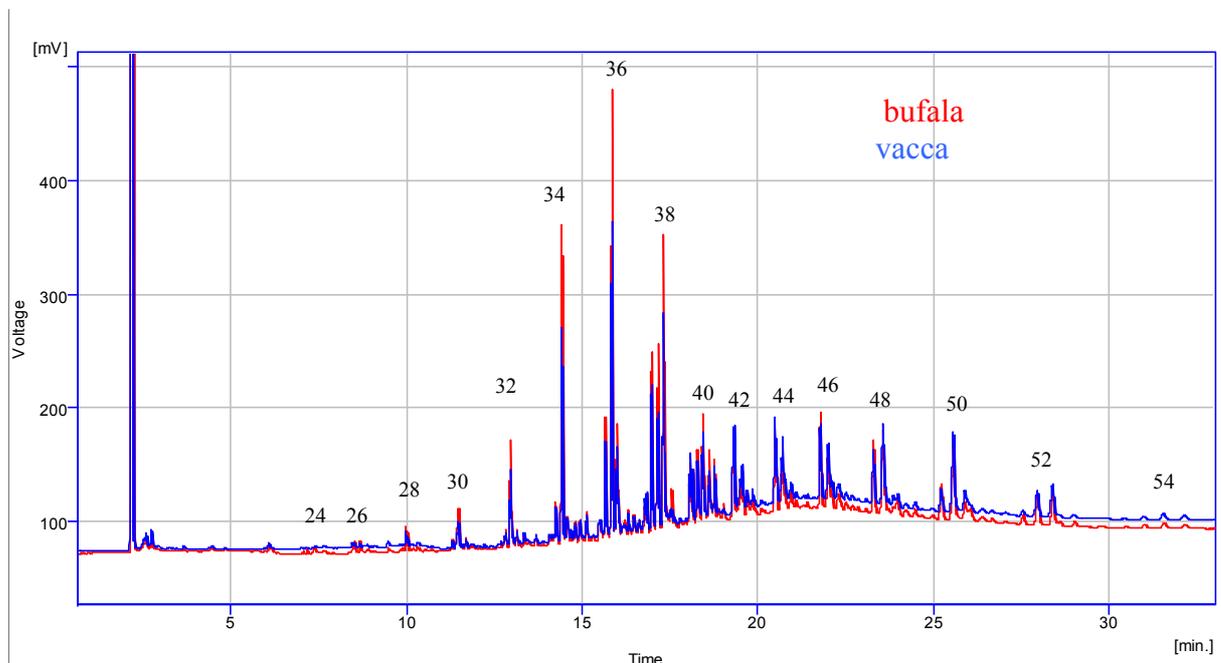


Fig. 10. Profilo trigliceridico del grasso vaccino e bufalino.

Per tale motivo, nella ricerca di amplificare eventuali differenze, si è proceduto alla separazione dei trigliceridi attraverso la cromatografia su strato sottile TLC (thin layer chromatography).

Si riporta in **figura 11** una schematizzazione della lastrina TLC dopo il frazionamento.

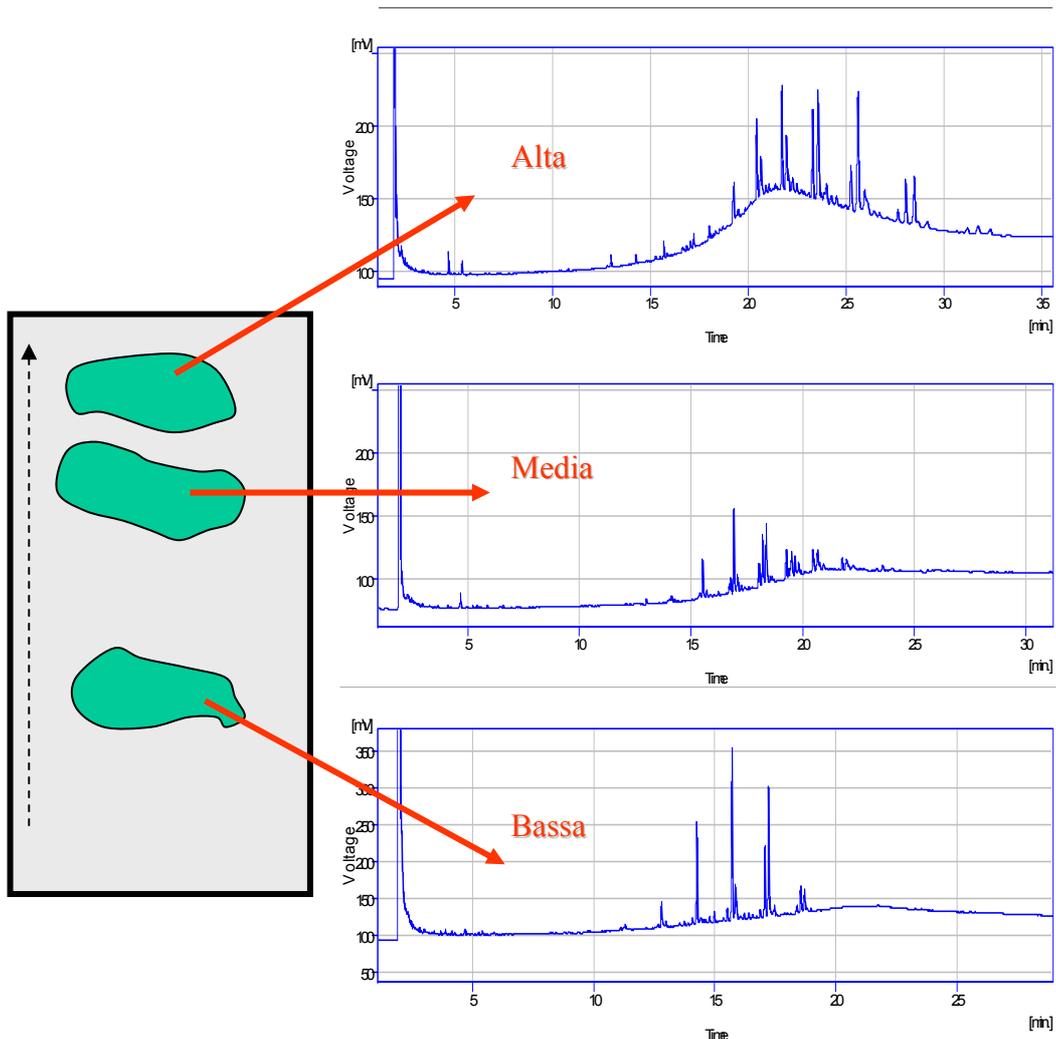


Fig. 11. *Rappresentazione della distribuzione delle bande trigliceridiche sulla lastrina TLC dopo il frazionamento.*

Attraverso la cromatografia su strato sottile è stato possibile frazionare il grasso in tre bande diverse in funzione delle caratteristiche dei trigliceridi (peso molecolare e grado di insaturazione).

I valori percentuali medi ottenuti dall'analisi quantitativa di 10 campioni di grasso vaccino e 10 di grasso bufalino sono riportati nelle **tabelle 21, 22 e 23**.

| Famiglia | BANDA BASSA | | | | Δ% |
|----------|--------------------|------|--------------------|------|-------|
| | Bufala | | Vacca | | |
| | media | d.s. | media | d.s. | |
| 24 | 0,10 | 0,00 | 0,13 | 0,06 | 33,33 |
| 26 | 0,25 | 0,07 | 0,14 | 0,09 | 44,00 |
| 28 | 0,38 | 0,32 | 0,43 | 0,26 | 11,80 |
| 30 | 1,33 ^a | 0,50 | 2,56 ^b | 0,56 | 91,67 |
| 32 | 6,58 ^a | 1,43 | 8,96 ^b | 1,13 | 36,15 |
| 34 | 18,47 | 2,23 | 20,39 | 1,82 | 10,41 |
| 36 | 34,61 | 1,61 | 33,53 | 1,65 | 3,11 |
| 38 | 28,68 ^A | 3,05 | 25,89 ^B | 2,47 | 9,72 |
| 40 | 9,34 | 2,38 | 8,30 | 2,12 | 11,18 |

A e B indicano una differenza significativa entro la riga con $P < 0.05$

a e b = indica una differenza significativa entro la riga con $P < 0.001$

Tab. 21- Valori medi e variazione percentuale dei trigliceridi della banda bassa.

| Famiglia | BANDA MEDIA | | | | Δ% |
|----------|-------------|------|-------|------|-------|
| | Bufala | | Vacca | | |
| | media | d.s. | media | d.s. | |
| 32 | 1,11 | 0,61 | 1,51 | 0,58 | 35,74 |
| 34 | 5,03 | 0,65 | 5,95 | 1,33 | 18,32 |
| 36 | 14,21 | 2,04 | 14,71 | 2,36 | 3,51 |
| 38 | 26,43 | 2,75 | 24,6 | 1,76 | 6,92 |
| 40 | 26,1 | 0,80 | 24,96 | 1,82 | 4,36 |
| 42 | 15,51 | 1,57 | 16,56 | 2,13 | 6,76 |
| 44 | 7,51 | 2,28 | 7,56 | 1,59 | 0,64 |
| 46 | 2,81 | 1,38 | 2,68 | 0,92 | 4,95 |

A e B indicano una differenza significativa entro la riga con $P < 0.05$

a e b = indica una differenza significativa entro la riga con $P < 0.001$

Tab. 22- Valori medi e variazione percentuale dei trigliceridi della banda media.

| Famiglia | BANDA ALTA | | | | Δ% |
|----------|------------|------|-------|------|-------|
| | Bufala | | Vacca | | |
| | media | d.s. | media | d.s. | |
| 40 | 1,37 | 0,51 | 1,68 | 1,30 | 22,60 |
| 42 | 5,07 | 2,24 | 4,83 | 2,16 | 4,80 |
| 44 | 11,87 | 2,82 | 11,86 | 1,74 | 0,00 |
| 46 | 17,86 | 1,33 | 17,90 | 1,77 | 0,20 |
| 48 | 21,73 | 0,97 | 20,14 | 1,73 | 7,30 |
| 50 | 23,40 | 2,05 | 24,15 | 2,25 | 3,20 |
| 52 | 12,88 | 2,63 | 12,80 | 2,02 | 0,60 |
| 54 | 3,08 | 1,91 | 3,45 | 1,01 | 12,10 |

A e B indicano una differenza significativa entro la riga con $P < 0.05$

a e b = indica una differenza significativa entro la riga con $P < 0.001$

Tab. 23- Valori medi e variazione percentuale dei trigliceridi della banda alta.

Dall'elaborazione dei dati sono emerse, per alcune famiglie trigliceridiche presenti nella banda alta (C₄₀ e C₅₄) e nella banda media (C₃₂ e C₃₄), variazioni percentuali superiore al 10% (rispettivamente 22,6 e 12,1 per la banda alta e 35,74 e 18,32 per la banda media). Tuttavia l'analisi statistica dei risultati non ha evidenziato differenze significative ($p < 0.001$; $p < 0.05$) a carico delle medesime famiglie.

Nella banda bassa sono state riscontrate variazioni superiori al 10% per la famiglia dei C₃₀ (91.67%) e per la famiglia dei C₃₂ (36.15%) corrispondenti a variazioni statisticamente significative con un $p < 0.001$.

Individuate le famiglie (C₃₀ e C₃₂) che mostrano le differenze maggiori (statisticamente significative) tra le due tipologie di grasso, si è proceduto con il confronto tra gli intervalli di oscillazione (min-max) al fine di verificare le eventuali sovrapposizioni.

Questo confronto ha portato ad escludere anche queste famiglie come potenziali indici di genuinità in quanto gli intervalli ottenuti per le due specie si intersecano.

Dallo studio delle tre frazioni è stato dimostrato che le differenze quantitative, notate sul campione di grasso analizzato tal quale, dopo il frazionamento dello stesso, si riducono.

Per tale motivo l'attenzione si è spostata ulteriormente prendendo in esame i risultati ottenuti dell'analisi degli isomeri dei singoli gliceridi (sul campione tal quale)attraverso HRGC.

Motivo di attenzione sono stati gli isomeri delle famiglie trigliceridiche che mostrano una variazione statisticamente significativa ($p < 0.05$; $p < 0.001$).

Dall'analisi statistica è emerso che le differenze statisticamente significative tra il profilo trigliceridico del grasso vaccino e bufalino si ha per $-C_{32}$, C_{40} e C_{50} con $p < 0.001$; C_{34} , C_{36} , C_{38} , C_{42} , C_{44} , C_{46} e C_{48} con $p < 0.05$.

All'interno di queste, sono stati individuati gli intervalli di oscillazione (min-max) dei singoli isomeri strutturali (**tabella 24a; 24b**). Non conoscendo la distribuzione degli acidi grassi di ogni isomero, questi sono stati numerati progressivamente al fine di identificarli in modo univoco.

| TG | N° progr. per famiglia | VACCA | | | | BUFALA | | | |
|----|------------------------|-------|------|-------|------|--------|------|-------|------|
| | | min | MAX | media | d.s. | min | MAX | media | d.s. |
| 34 | a1 | 0,20 | 0,30 | 0,26 | 0,05 | 0,20 | 0,30 | 0,22 | 0,04 |
| | a2 | 0,10 | 0,20 | 0,16 | 0,05 | 0,10 | 0,20 | 0,12 | 0,04 |
| | a3 | 0,80 | 1,00 | 0,84 | 0,07 | 0,60 | 1,00 | 0,77 | 0,15 |
| | a4 | 1,30 | 4,80 | 3,93 | 1,09 | 4,80 | 6,40 | 5,33 | 0,57 |
| | a5 | 0,60 | 0,80 | 0,74 | 0,07 | 0,70 | 0,90 | 0,79 | 0,06 |
| | a6 | 0,20 | 0,20 | 0,20 | 0,00 | 0,20 | 0,30 | 0,26 | 0,05 |
| | a7 | 0,40 | 0,50 | 0,41 | 0,04 | 0,50 | 0,70 | 0,58 | 0,07 |
| | a8 | 0,40 | 0,50 | 0,49 | 0,04 | 0,40 | 0,60 | 0,50 | 0,05 |
| | a9 | 0,04 | 0,10 | 0,07 | 0,03 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,00 |
| | a10 | 0,50 | 0,60 | 0,53 | 0,05 | 0,50 | 0,70 | 0,59 | 0,06 |
| | a11 | 0,05 | 0,20 | 0,13 | 0,06 | 0,10 | 0,20 | 0,13 | 0,05 |
| 36 | b1 | 0,70 | 0,90 | 0,76 | 0,09 | 0,50 | 0,80 | 0,64 | 0,10 |
| | b2 | 1,80 | 2,30 | 2,00 | 0,16 | 1,80 | 2,50 | 2,02 | 0,28 |
| | b3 | 6,10 | 7,10 | 6,44 | 0,32 | 7,60 | 9,80 | 8,54 | 0,68 |
| | b4 | 2,40 | 3,10 | 2,73 | 0,19 | 2,90 | 3,30 | 3,06 | 0,13 |
| | b5 | 0,20 | 0,40 | 0,31 | 0,08 | 0,30 | 0,40 | 0,32 | 0,04 |
| | b6 | 0,20 | 0,30 | 0,26 | 0,05 | 0,30 | 0,40 | 0,32 | 0,04 |
| | b7 | 0,60 | 0,80 | 0,63 | 0,07 | 0,70 | 0,80 | 0,72 | 0,04 |
| | b8 | 0,40 | 0,70 | 0,52 | 0,10 | 0,50 | 0,70 | 0,56 | 0,07 |
| | b9 | 0,30 | 0,50 | 0,36 | 0,07 | 0,30 | 0,40 | 0,33 | 0,05 |
| 38 | c1 | 0,50 | 0,80 | 0,63 | 0,09 | 0,20 | 0,50 | 0,39 | 0,11 |
| | c2 | 0,70 | 0,90 | 0,82 | 0,07 | 0,60 | 0,90 | 0,70 | 0,10 |
| | c3 | 2,80 | 3,40 | 3,04 | 0,21 | 2,80 | 3,70 | 3,13 | 0,3 |
| | c4 | 3,20 | 3,70 | 3,52 | 0,20 | 3,70 | 5,00 | 4,21 | 0,39 |
| | c5 | 5,10 | 6,10 | 5,54 | 0,39 | 5,80 | 7,30 | 6,76 | 0,52 |
| | c6 | 0,30 | 0,40 | 0,37 | 0,05 | 0,30 | 0,50 | 0,40 | 0,05 |
| | c7 | 0,30 | 0,40 | 0,32 | 0,04 | 0,20 | 0,50 | 0,33 | 0,09 |
| | c8 | 0,30 | 0,50 | 0,38 | 0,08 | 0,50 | 0,80 | 0,58 | 0,10 |
| | c9 | 0,20 | 0,40 | 0,22 | 0,07 | 0,10 | 0,20 | 0,14 | 0,05 |
| | c10 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,10 | 0,10 | 0,00 |
| | c11 | 0,10 | 0,20 | 0,13 | 0,05 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,00 |
| 40 | d1 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,00 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,00 |
| | d2 | 1,20 | 1,80 | 1,53 | 0,20 | 0,80 | 1,30 | 1,07 | 0,16 |
| | d3 | 0,80 | 1,10 | 0,99 | 0,10 | 0,70 | 1,00 | 0,82 | 0,08 |
| | d4 | 1,70 | 1,90 | 1,79 | 0,06 | 1,40 | 1,70 | 1,56 | 0,10 |
| | d5 | 2,40 | 2,80 | 2,54 | 0,13 | 2,40 | 3,00 | 2,70 | 0,17 |
| | d6 | 1,20 | 1,80 | 1,51 | 0,24 | 1,20 | 2,10 | 1,64 | 0,26 |
| | d7 | 0,30 | 0,40 | 0,33 | 0,05 | 0,20 | 0,40 | 0,32 | 0,07 |
| | d8 | 1,20 | 1,90 | 1,55 | 0,28 | 0,90 | 1,80 | 1,41 | 0,30 |
| | d9 | 0,20 | 0,40 | 0,30 | 0,08 | 0,20 | 0,40 | 0,29 | 0,06 |
| | d10 | 0,30 | 0,50 | 0,36 | 0,07 | 0,20 | 0,50 | 0,37 | 0,10 |

Tab. 24a- Intervalli di oscillazione (min-max), degli isomeri strutturali dei TG C₃₄-C₄₀.

| TG | N° progr. per famiglia | VACCA | | | | BUFALA | | | |
|----|------------------------|-------|------|-------|------|--------|------|-------|------|
| | | min | MAX | media | d.s. | min | MAX | media | d.s. |
| 42 | e1 | 2,10 | 3,00 | 2,61 | 0,30 | 1,60 | 2,40 | 1,96 | 0,25 |
| | e2 | 0,30 | 0,40 | 0,39 | 0,03 | 0,30 | 0,40 | 0,33 | 0,05 |
| | e3 | 0,70 | 0,80 | 0,76 | 0,05 | 0,40 | 0,50 | 0,47 | 0,05 |
| | e4 | 1,40 | 1,90 | 1,57 | 0,14 | 1,10 | 1,30 | 1,21 | 0,06 |
| | e5 | 0,70 | 0,90 | 0,86 | 0,07 | 0,60 | 0,80 | 0,70 | 0,05 |
| | e6 | 0,80 | 1,00 | 0,89 | 0,08 | 0,60 | 0,80 | 0,74 | 0,07 |
| | e7 | 0,10 | 0,20 | 0,18 | 0,04 | 0,10 | 0,20 | 0,11 | 0,03 |
| | e8 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,00 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,00 |
| 44 | f1 | 2,00 | 2,70 | 2,50 | 0,24 | 2,00 | 2,60 | 2,19 | 0,20 |
| | f2 | 1,90 | 2,30 | 2,08 | 0,14 | 1,40 | 1,60 | 1,51 | 0,06 |
| | f3 | 0,80 | 0,90 | 0,84 | 0,05 | 0,60 | 0,70 | 0,62 | 0,04 |
| | f4 | 0,90 | 1,00 | 0,92 | 0,04 | 0,60 | 0,70 | 0,62 | 0,04 |
| | f5 | 0,30 | 0,60 | 0,41 | 0,08 | 0,20 | 0,30 | 0,29 | 0,03 |
| | f6 | 0,20 | 0,90 | 0,34 | 0,21 | 0,10 | 0,20 | 0,18 | 0,04 |
| | f7 | 0,10 | 0,40 | 0,14 | 0,10 | 0,10 | 0,20 | 0,16 | 0,05 |
| 46 | g1 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,10 | 0,10 | 0,00 |
| | g2 | 2,00 | 2,60 | 2,30 | 0,19 | 2,10 | 2,80 | 2,42 | 0,22 |
| | g3 | 2,10 | 2,50 | 2,30 | 0,12 | 1,70 | 2,10 | 1,88 | 0,12 |
| | g4 | 0,50 | 0,70 | 0,62 | 0,07 | 0,40 | 0,60 | 0,46 | 0,07 |
| | g5 | 1,00 | 1,40 | 1,17 | 0,11 | 0,70 | 1,00 | 0,84 | 0,10 |
| | g6 | 0,30 | 0,50 | 0,41 | 0,08 | 0,30 | 0,40 | 0,39 | 0,03 |
| | g7 | 0,20 | 0,40 | 0,31 | 0,06 | 0,20 | 0,30 | 0,22 | 0,04 |
| | g8 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,00 | 0,10 | 0,20 | 0,11 | 0,03 |
| | g9 | 0,10 | 0,20 | 0,11 | 0,03 | 0,10 | 0,20 | 0,11 | 0,03 |
| 48 | h1 | 1,30 | 2,30 | 1,87 | 0,27 | 1,80 | 2,40 | 2,11 | 0,23 |
| | h2 | 3,10 | 3,70 | 3,44 | 0,17 | 2,80 | 3,50 | 3,20 | 0,25 |
| | h3 | 0,10 | 0,40 | 0,26 | 0,09 | 0,20 | 0,20 | 0,20 | 0,00 |
| | h4 | 0,40 | 0,60 | 0,50 | 0,05 | 0,20 | 0,50 | 0,32 | 0,08 |
| | h5 | 0,70 | 0,90 | 0,80 | 0,09 | 0,60 | 0,90 | 0,72 | 0,08 |
| | h6 | 0,30 | 0,40 | 0,37 | 0,05 | 0,30 | 0,40 | 0,31 | 0,03 |
| | h7 | 0,30 | 0,60 | 0,44 | 0,10 | 0,30 | 0,50 | 0,36 | 0,07 |
| | h8 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,10 | 0,05 | 0,07 |
| 50 | i1 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,00 | 0,10 | 0,20 | 0,12 | 0,04 |
| | i2 | 0,90 | 1,50 | 1,17 | 0,18 | 1,00 | 1,60 | 1,29 | 0,20 |
| | i3 | 3,60 | 4,40 | 3,99 | 0,27 | 3,20 | 4,30 | 3,82 | 0,40 |
| | i4 | 1,30 | 1,80 | 1,61 | 0,19 | 0,60 | 1,10 | 0,89 | 0,15 |
| | i5 | 0,50 | 1,00 | 0,74 | 0,16 | 0,70 | 1,00 | 0,87 | 0,14 |
| | i6 | 0,40 | 0,70 | 0,56 | 0,09 | 0,30 | 0,50 | 0,41 | 0,09 |
| | i7 | 0,40 | 0,70 | 0,50 | 0,11 | 0,20 | 0,40 | 0,27 | 0,09 |
| | i8 | 0,20 | 0,50 | 0,28 | 0,11 | 0,10 | 0,40 | 0,18 | 0,10 |

Tab. 24b- Intervalli di oscillazione (min-max), degli isomeri strutturali dei TG C₄₂-C₅₀.

Identificati gli intervalli degli isomeri che non presentano sovrapposizione, attraverso elaborazione statistica dei dati (confronto dei singoli trigliceridi nelle due tipologie di grasso), sono stati individuati alcuni indicatori specifici per ogni famiglia trigliceridica.

Gli indicatori schematizzati di seguito, essendo delle formule, sono stati identificati con la dicitura “formula” seguita dalla lettera caratteristica della famiglia di appartenenza:

FORMULA a: $(a_4+a_7)/\Sigma C_{34}$

FORMULA c: $(c_1+c_4+c_8)/\Sigma C_{38}$

FORMULA e: $(e_2+e_3+e_5)/\Sigma C_{42}$

FORMULA f: $(f_2+f_3+f_4+f_5+f_6)/\Sigma C_{44}$

FORMULA g: $(g_3+g_5)/\Sigma C_{46}$

FORMULA i: $(i_4+i_7)/\Sigma C_{52}$

In **tabella 25** si riporta l’intervallo di ogni singola formula ottenuta dall’analisi dei singoli campioni.

| FORMULA | BUFALA | | VACCA | |
|---------|--------|-------|-------|-------|
| | min | max | min | max |
| a | 0.607 | 0.650 | 0.554 | 0.602 |
| c | 0.292 | 0.341 | 0.294 | 0.318 |
| e | 0.426 | 0.464 | 0.416 | 0.530 |
| f | 0.533 | 0.614 | 0.611 | 0.643 |
| g | 0.461 | 0.492 | 0.422 | 0.484 |
| i | 0.123 | 0.168 | 0.191 | 0.255 |

Tab.25- Intervalli delle formule per il grasso vaccino e bufalino.

Per le formule **c**, **e**, **f** e **g** (relative ai trigliceridi a 38, 42, 44, 46 e 48 atomi di Carbonio), gli intervalli ottenuti mostrano una sovrapposizione, quindi sono stati eliminati dalla lista dei possibili indicatori per lo studio di genuinità.

Al contrario gli intervalli ottenuti dall’analisi della famiglia del C₃₄ e del C₅₀ (formula “a” e formula “i”), non presentando sovrapposizione.

Queste formule sono state testate attraverso miscele a titolo noto (30%, 20%, 15%, 10%, 7%) di grasso vaccino in grasso bufalino al fine di individuare il limite di rilevabilità.

Procedendo in questo modo si è potuto constatare (**tabella 26**) che soltanto la formula “**i**”, presenta un limite di rilevabilità del 10%, mentre la formula “**a**” risulta utile solo per verificare miscele superiori al 30%, quindi non può essere presa in considerazione per valutare l’aggiunta di latte vaccino in latte bufalino

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

Tab. 26- Valori delle formule a e i calcolate per i mix.

Bisogna a questo punto fare una precisazione poiché, quando si parla di percentuale di rilevabilità, questa è riferita ad aggiunte di grasso di vacca a grasso di bufala.

Per tale motivo, considerando un latte di vacca con un contenuto medio di grasso del 4% ed uno di bufala pari all’8%, il limite del 10% grasso/grasso (p/p) ritrovato diventa 20% (v/v) per aggiunte latte/latte.

9.3 Caratterizzazione della componente acidica e trigliceridica della Mozzarella di Bufala Campana

La distribuzione dei trigliceridi nella Mozzarella di Bufala Campana, che vanno dal C24 al C56, come mostrato in **figura 12**, segue una distribuzione bimodale con andamento a doppia campana, classico del latte di bufala e dei suoi derivati.

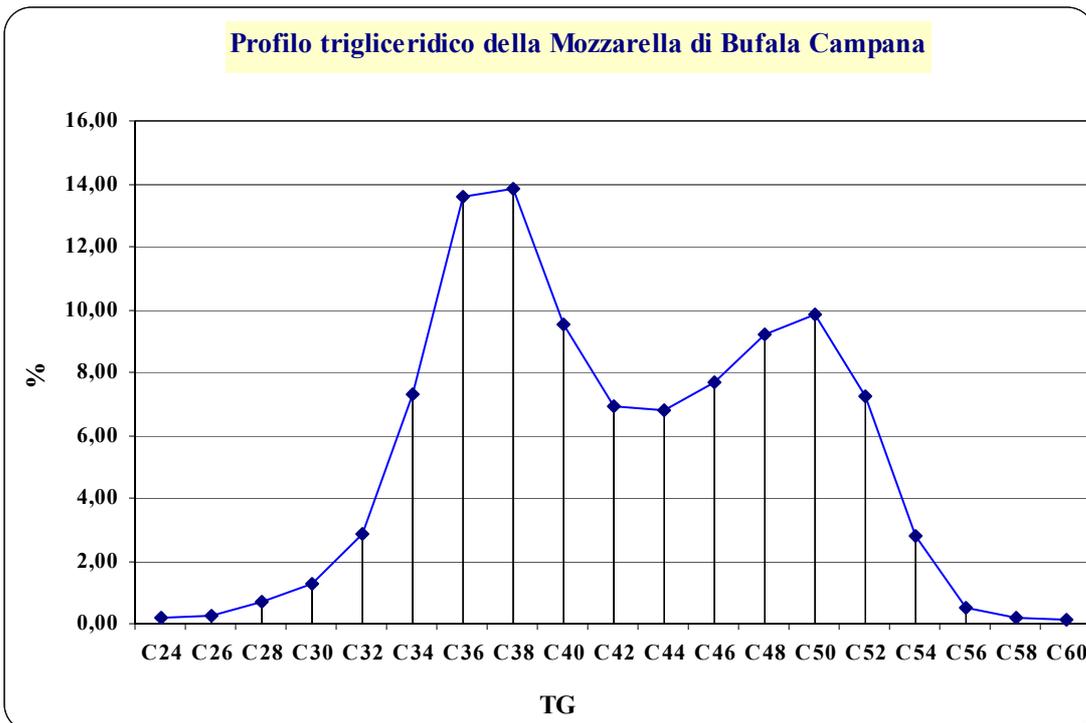


Fig. 12. Profilo dei trigliceridi nella Mozzarella di Bufala Campana.

Nella prima campana, compresa tra i trigliceridi a 24 e 44 atomo di carbonio, il massimo si identifica nella famiglia dei C38, nella seconda campana (C44-C60) nella famiglia dei C50. Il minimo è rappresentato dalla famiglia dei C44.

Per quanto riguarda la componente acidica della Mozzarella di Bufala Campana, in **tabella 27** sono stati riportati i risultati schematizzati che mostrano l'identificazione di 44 diversi acidi grassi che vanno dall'acido butirrico (C4) all'acido docosapentaenoico (DPA) (C22:5), compresi sette isomeri dell'acido linoleico coniugato (CLA) di cui due sconosciuti (X₁ CLA e X₂ CLA).

| EMAG | Media% | EMAG | Media% | EMAG | Media% |
|-------------------|--------|----------------------|--------|--------------------------------|--------|
| C4:0 | 2,80 | X ₅ | 0,23 | 11t-13t | 0,01 |
| C6:0 | 1,50 | X ₆ | 0,61 | 10t-12t, 9t-11t, 8t-10t, 7t-9t | 0,04 |
| C8:0 | 1,15 | C16:1cis | 2,45 | X ₁ CLA | 0,01 |
| C10:0 | 2,28 | C17:0 | 0,63 | C20:2 | 0,04 |
| C11:0 | 0,18 | iso/anteisoC18:0 | 0,38 | X ₂ CLA | 0,04 |
| C12:0 | 3,22 | C18:0 | 10,08 | C22:0 | 0,08 |
| X ₁ | 0,02 | C18:1(t6,t9,t10,t11) | 1,85 | C20:3n6 | 0,07 |
| C12:1 | 0,04 | C18:1n-9cis | 17,82 | X ₈ | 0,02 |
| iso/anteiso C13:0 | 0,08 | Altri C18:1 | 1,13 | X ₉ | 0,03 |
| X ₂ | 0,06 | Altri C18:2(isolati) | 0,60 | C20:3n3 | 0,15 |
| C13:0 | 0,12 | C18:2 9c,12c | 1,91 | C20:4n6 | 0,07 |
| iso/anteiso C14:0 | 0,19 | C20:0 | 0,20 | X ₁₀ | 0,03 |
| C14:0 | 12,26 | C18:3 n6 | 0,02 | C23:0 | 0,03 |
| X ₃ | 0,04 | C18:3 n3 | 0,15 | C20:5n3 | 0,03 |
| C14:1 | 0,39 | C20:1 | 0,48 | C24:0 | 0,05 |
| X ₄ | 0,63 | CLA (9c-11) | 0,75 | X ₁₁ | 0,12 |
| anteiso C15:0 | 0,89 | CLA (9t-11c;7t-9c) | 0,01 | X ₁₂ | 0,05 |
| C15:0 | 1,34 | 10c-12t | 0,08 | X ₁₃ | 0,03 |
| iso C16:0 | 0,29 | CLA (11t-13c;9c-11c) | 0,01 | X ₁₄ | 0,03 |
| C16:0 | 24,71 | | | C22:5 | 0,06 |

Tab.27- Componente acidica della Mozzarella di Bufala Campana.

Gli acidi grassi a medio peso molecolare dal C11:0 al C16:1cis sono risultati più abbondanti (47.8% circa). Tra i saturi (63% circa del totale), il più rappresentativo è risultato l'acido palmitico (C16:0) con il 24.7%.

Tra gli insaturi (29.4% circa del totale), l'oleico corrisponde al 18% circa.

Gli isomeri coniugati dell'acido linoleico (CLA) sono stati valutati intorno all'1% sul totale degli acidi grassi identificati.

Da un punto di vista nutrizionale è importante considerare il rapporto Saturi/Insaturi che nella Mozzarella di Bufala Campana è pari circa a 2.00 e valutare, nella componente ad alto peso molecolare, il quantitativo di ω -3 (acido eicosatrienoico cis11,14,17 ed eicosapentaenoico) (0.18%) e di ω -6 (eicosatrienoico cis 8,11,14 ed arachidonico) (2.11%) e di conseguenza, il loro rapporto (ω -3/ ω -6) in questo caso pari a 0.09 circa.

Infine non è da sottovalutare il contenuto in acidi grassi trans (2.64%), che si ritiene svolgano un ruolo negativo per la salute dell'uomo, ma di cui fanno parte anche gli isomeri coniugati dell'acido linoleico (CLA) che rappresentano lo 0.20% sul totale degli acidi grassi.

In **figura 13**, è possibile osservare un tipico gascromatogramma degli esteri metilici degli acidi grassi (EMAG) della Mozzarella di Bufala Campana.

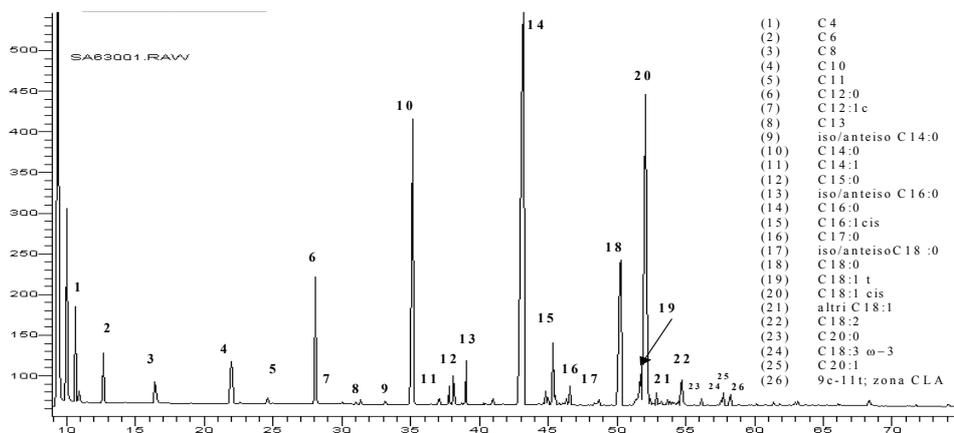


Fig.13. Gascromatogramma degli EMAG della Mozzarella di Bufala Campana.

In **figura 14**, è possibile osservare un tipico gascromatogramma di esteri metilici degli acidi grassi (EMAG) della Mozzarella di Bufala Campana relativo alla zona dei CLA.

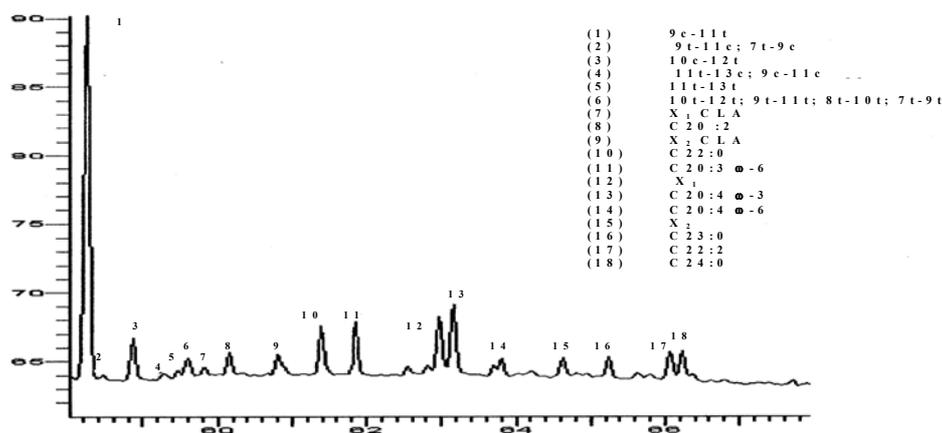


Fig.14. Gascromatogramma relativo alla zona della componente acidica minore della Mozzarella di Bufala Campana.

Tra questi: 9c-11t; 9t-11c; 7t-9c; 10c-12t ; 11t-13c; 9c-11c; 11t-13t; 10t-12t; 9t-11t; 8t-10t; 7t-9t; X₁CLA; X₂CLA, il più rappresentativo è risultato l'isomero 9c-11t (0.74%) seguito dall'isomero 10c-12t (0.08%).

Anche per la mozzarella così come per il latte è stata riscontrata una variazione della composizione lipidica in funzione dell'epoca di prelievo.

Gli acidi grassi a medio peso molecolare restano la componente acidica quantitativamente maggiore in tutti i campioni, indipendentemente dalla stagione. Dal confronto tra le mozzarelle invernali e quelle estive, la componente acidica a basso e medio peso molecolare è maggiore nelle mozzarelle estive mentre, la componente ad alto peso molecolare nelle invernali. Dal confronto tra le mozzarelle primaverili e le autunnali, risulta che, la componente a basso e medio peso molecolare è quantitativamente maggiore nelle mozzarelle primaverili mentre la situazione si presenta opposta per la componente ad alto peso molecolare.

Ancora, si può notare per il C14 un andamento pressoché costante, per il C16:0 un andamento non ben definito, discontinuo nelle quattro stagioni, mentre per il C18:0 ed il C18:1n-9 cis l'andamento è abbastanza simile, con una tendente diminuzione dalla mozzarelle alle autunnali.

Una delle possibili spiegazioni per questa distribuzione è da associare alla differente alimentazione delle bufale nel corso dell'anno.

Il foraggio fresco, somministrato in estate, ha un contenuto maggiore in acidi grassi volatili, incidendo sulla sintesi ruminale del butirrato e dell'acetato, precursori degli acidi grassi a basso peso molecolare. Ciò giustificherebbe il livello più elevato raggiunto in questa stagione da tale componente.

Diversamente gli insilati e i concentrati, ricchi in grasso somministrati in inverno per bilanciare la razione alimentare con lo scompenso energetico dovuto alle basse temperature, presentano una composizione più ricca in acidi grassi polinsaturi che giustifica la distribuzione della componente ad alto peso molecolare nelle mozzarelle nei diversi periodi dell'anno.

Ulteriore fattore incidente sulla distribuzione degli acidi grassi può risultare lo stesso processo tecnologico di produzione della mozzarella. L'impiego di diversi enzimi, sieroinnesto e caglio durante la lavorazione, nelle quattro

stagioni, potrebbe infatti causare una diversa distribuzione dei trigliceridi e conseguentemente degli acidi grassi nelle mozzarelle prodotte.

9.4 Valutazione della genuinità del grasso della mozzarella

Come già precedentemente affermato, la qualità alimentare rappresenta un complesso insieme di proprietà e requisiti in grado di soddisfare i bisogni espressi dai consumatori divenendo quindi un dovere per i produttori responsabili della genuinità dei propri prodotti.

Tuttavia, non mancano casi accertati di frodi alimentari soprattutto nel settore lattiero-caseario che riguardano in particolare la Mozzarella di Bufala Campana, tra i prodotti tipici italiani uno dei più falsificati per aggiunta di grassi estranei al latte bufalino.

9.4.1 Analisi dei trigliceridi

Il metodo di riferimento per la rilevazione di grassi estranei, vegetali ed animali, come sego e lardo, nel grasso di latte vaccino e di prodotti lattiero-caseari, messo a punto da Precht, permette di rilevare attraverso l'analisi gascromatografica dei trigliceridi a numero pari di atomi di carbonio l'eventuale aggiunta attraverso il calcolo dei 5 indici S. Nulla però è riportato circa metodi gascromatografici per la rilevazione di sofisticazioni operate sulla Mozzarella di Bufala Campana.

Pertanto il primo passo è stato analizzare i campioni di grasso estratto dalla Mozzarella di Bufala Campana con al procedura analitica proposta da Precht.

Per la determinazione degli indici S massimi e minimi (così come fatto per il metodo definito al paragrafo precedente), le percentuali dei trigliceridi dal C26 al C54 delle mozzarelle sono state inserite nelle rispettive formule.

Confrontando i dati ottenuti per il grasso della Mozzarella di Bufala Campana con quelli validi per il grasso del latte bufalino, si è osservato che il 38,60%

delle mozzarelle non rientrava, per almeno 1 formula, nei range validi per il grasso di latte bufalino.

Pertanto si è evidenziata la necessità di stabilire dei nuovi intervalli del parametro S validi per la Mozzarella di Bufala Campana, riportati di seguito in **tabella 28**.

| Formula | Limiti di Riferimento “S” Mozzarella | Limiti di Riferimento “S” Latte Bufalino | Limiti di Riferimento “S” Latte Vaccino |
|---------------|--------------------------------------|--|---|
| Totale | 99,94 - 111,28 | 102.25 - 118.70 | 98.05 – 101.95 |
| Lardo | 98,25 - 107,62 | 92.350 - 106.50 | 99.42 – 100.58 |
| Palma | 99,28 - 111,13 | 102.83 - 118.03 | 95.90 – 104.10 |
| Soia | 99,19 - 103,21 | 98.76 - 104.37 | 97.96 – 102.04 |
| Cocco | 97,48 - 105,43 | 94.74 - 105.71 | 95.68 – 104.32 |

Tab.28- Confronto tra i limiti S per il grasso della Mozzarella di Bufala Campana, del latte bufalino e del latte vaccino.

Dal confronto riportato in **tabella 28** si possono chiaramente notare le differenze presenti tra la materia prima “latte” ed il prodotto finito “mozzarella”.

Quanto detto può essere spiegato considerando il processo di lavorazione della Mozzarella di Bufala Campana e la distribuzione della componente Trigliceridica nel latte di partenza, nel prodotto finito e in tutti gli intermedi (cagliata) e scarti di lavorazione (siero ed acqua di filatura e quindi burro).

Le diverse operazioni effettuate durante il processo produttivo, provocano una differente distribuzione della componente lipidica nelle diverse correnti di produzione **tabella 29**.

| Triglycerides | Latte | Siero | Acqua di filatura | Cagliata | MOZZARELLA |
|---------------|---------------------------------|---------------|-------------------|---------------|---------------------------------|
| C24 | 0,044±0,001 | 0,039±0,001 | 0,048±0,001 | 0,047±0,002 | 0,048±0,001 |
| C26 | 0,278±0,011 | 0,287±0,010 | 0,282±0,009 | 0,270±0,021 | 0,223 ±0,020 |
| C28 | 0,681±0,031 | 0,725±0,029 | 0,680±0,031 | 0,636±0,036 | 0,679 ±0,028 |
| C30 | 1,144±0,091 | 1,182±0,059 | 1,156±0,088 | 1,119±0,069 | 1,251±0,059 |
| C32 | 2,696±0,111 | 2,876±0,101 | 2,955±0,121 | 2,685±0,187 | 2,382±0,091 |
| C34 | 7,126±0,227 | 6,974±0,321 | 7,037±0,298 | 7,193±0,291 | 7,105±0,188 |
| C36 | 13,917±1,041^a | 13,907±1,321 | 13,997±1,321 | 13,935±1,114 | 13,032±1,544^b |
| C38 | 15,179±1,321^a | 15,941±1,304 | 15,986±1,020 | 15,576±1,322 | 13,856±1,082^b |
| C40 | 10,117±1,002^a | 10,218 ±1,009 | 10,107 ±1,112 | 10,101 ±1,122 | 9,212 ±1,141^b |
| C42 | 5,998±0,211^a | 5,872±0,227 | 5,013±0,782 | 5,961±0,232 | 6,974±0,760^b |
| C44 | 5,769±0,245^a | 5,223±0,333 | 5,183±0,564 | 5,323±0,231 | 6,814±0,227^b |
| C46 | 6,804±0,216^a | 6,899±0,367 | 6,648±0,460 | 6,563±0,447 | 7,707±0,243^b |
| C48 | 8,508±0,888^a | 7,850±0,263 | 7,895±0,557 | 8,740±0,971 | 9,238 ±1,21^b |
| C50 | 9,002±0,866^a | 9,939±0,677 | 9,521±0,599 | 9,896±1,244 | 9,945 ±0,923^b |
| C52 | 7,299±0,567 | 8,040±0,600 | 8,145±0,989 | 8,607±0,888 | 7,220 ±1,227 |
| C54 | 3,279 ±0,198 | 3,796 ±0,144 | 3,712 ±0,222 | 3,992 ±0,176 | 2,983 ±0,117 |

a,b p<0.01

A,B p<0.001

Tab.29- Confronto tra la composizione trigliceridica nel latte, nella mozzarella e negli intermedi e scarti di produzione della mozzarella di bufala Campana.

In particolare, il grasso della mozzarella risulta essere composto da una percentuale più alta in acidi grassi mono e poli – insaturi.

Ciò assume un'importanza nutrizionale notevole, specialmente se correlato all'aumento del valore dei CLA, i cui benefici effetti anticarcinogenici sono ben noti.

L'aumento di concentrazione degli isomeri dell'acido linoleico, può essere correlato sia a fenomeni di concentrazione di lavorazione, sia a fasi di processo (filatura) che possono permettere variazioni strutturali.

Spiegazioni possibili sono da ritrovarsi anche nella variabilità microbiologica del siero innesto utilizzato in lavorazione che, in associazione agli enzimi presenti e/o aggiunti per la coagulazione possono “operare” una variazione di concentrazione dei CLA.

La differenza compositiva della frazione trigliceridica nel latte e nella mozzarella si manifesta con un diverso riferimento (intervallo degli indici “S”) così come riportato in **tabella 28**.

9.4.2 Analisi degli acidi grassi

Come sperimentato da Toppino et al. nel 1988 sul grasso del latte vaccino e basandosi su studi precedenti circa la genuinità del burro, si è pensato di proporre come indici di genuinità della Mozzarella di Bufala Campana alcuni rapporti specifici tra acidi grassi individuati e quantificati attraverso HRCG.

I rapporti proposti come indici per la valutazione della genuinità della Mozzarella di Bufala Campana sono stati riportati in **tabella 30**.

| Rapporti acidi grassi | min | MAX |
|--|-------------|--------------|
| C4/(C6+C8) | 0,61 | 1,51 |
| C12:0/C10:0 | 1,17 | 2,16 |
| C14:0/C12:0 | 3,11 | 4,76 |
| C18:1/C18:0 | 1,25 | 2,08 |
| C10:0/C8 | 1,16 | 2,58 |
| C16:0/(C18:1+C18:2+C18:3) | 0,67 | 1,51 |
| C20/(C4+C6+C8) | 0,06 | 0,34 |
| Basso P.M./Medio P.M. | 0,12 | 0,25 |
| Medio P.M./Alto P.M. | 0,89 | 1,68 |
| Basso P.M./Alto P.M. | 0,14 | 0,42 |
| Dispari/Basso P.M. | 0,29 | 0,55 |
| Saturi/Insaturi | 1,68 | 2,93 |
| iso-anteiso C14/ C14 | 0,01 | 0,06 |
| iso-anteiso C16/ C16 | 0,01 | 0,02 |
| iso-anteiso C18/ C18 | 0,02 | 0,10 |
| C20:0/C20 Insaturi | 0,10 | 0,39 |
| C18:0/C8 | 4,55 | 15,39 |
| (C6+C8+C10+C12)/C18 | 0,45 | 1,58 |
| C14/C18:2 | 4,01 | 10,71 |
| C18:2/C8 | 0,82 | 2,92 |
| C14/C18:0 | 0,82 | 1,93 |
| CLA/C18:2 | 0,05 | 0,19 |
| CLA/C18:1 | 0,01 | 0,02 |
| (Basso P.M.+Medio P.M.)/Alto P.M. | 1,05 | 2,10 |

Tab.30- Rapporti fra acidi grassi della Mozzarella di Bufala Campana.

E' stato possibile calcolare e quindi proporre questi nuovi rapporti, grazie all'utilizzo della gascromatografia ad alta risoluzione (colonna capillare 100 metri) con la quale è stato possibile quantificare acidi grassi (EMAG) precedentemente non risolti.

BIBLIOGRAFIA

Garcia-Olmedo, R., Hellin, C.H. (1986). Dairy Sci. Abstr., 42; ref. 3838.

Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee. (1995). L46/11-23.

Precht D. (1991) Kielermilchwirtschaftliche Forschungsberichte 43, 219-242.

Collomb M., Spahni M., Buhler T. (1998). Trav. Chim. Aliment. Hyg. Vol. 89, 59 – 83.

Nota G., Naviglio D., Romano R., Luongo D. (1995). Vol. 72, 73-76.

Lercker G., Frega N., Bocci F., Bertacco G. (1992). Scienza e Tecnica Lattiero – Casearia. Vol 43, 95-110.

Banfi S., Bergna M., Povolò M., Contarini G. (1999). J. High Resol. Cromatogr. 22, 93-96.

Contarini G., Leardi R., Pezzi C., Toppino P.M. (1993). Riv. Ital. Sostanze Grasse. 70, 491-499.

Lipp M. Food Chemistry. (1996). Vol. 55 N° 4, 389-395

Lipp M. Food Chemistry. (1995). Vol. 54, 213-221

www.mozzarelladibufala.org.

10. CONCLUSIONI

Dalla sperimentazione effettuata sono emersi alcuni risultati di importanza notevole sia sotto il profilo zootecnico che nutrizionale e tecnologico.

Il primo dato da riferire è la dipendenza tra alcuni componenti della frazione lipidica come i trigliceridi e gli acidi grassi e fattori quali la razione alimentare fornita all'animale. Tale studio ha permesso di evidenziare che l'utilizzo di razioni ricche in acidi grassi mono e polinsaturi permettono di ottenere un latte con un contenuto più elevato di acidi grassi essenziali come i CLA. Il motivo di ciò risiede nel meccanismo di formazione di tali costituenti nel rumine. L'analisi gascromatografica ha evidenziato differenze significative a carico della componente trigliceridica ed acidica dei campioni di grasso lattico derivante da bufale alimentate con una dieta additivata con grassi rumino-protetti. In particolare i grassi by-pass di sintesi (saponi degli acidi grassi), provocano una diminuzione degli acidi grassi a catena corta e lunga; al contrario gli EMAG a medio peso molecolare subiscono un incremento significativo. Conseguenza di ciò è la diminuzione, nel grasso del gruppo by-pass, degli acidi grassi mono polinsaturi e CLA.

Dalla sperimentazione, inoltre, è stato possibile rilevare il diverso effetto sulla componente lipidica del latte dei diversi grassi rumino-protetti: grassi naturali (semi o fiocchi di soia) e di sintesi (saponi di calcio).

Questi influenzano in modo differente la composizione acidica e trigliceridica del latte di bufala. I primi permettono di ottenere un latte più ricco in acidi grassi dal valore nutrizionale elevato come $C_{18:1}$, $C_{18:2}$, CLA e $C_{18:3}$ mentre i saponi di calcio, pur determinando un aumento nel latte dei CLA, hanno comportato una riduzione degli altri acidi grassi mono e polinsaturi ad eccezione del $C_{16:1}$. Non è stata individuata inoltre alcuna relazione tra il contenuto di colesterolo del latte e l'alimentazione consumata dalle bufale. Questo ultimo dato concorda con recenti lavori effettuati sui ruminanti. Questa

serie di fenomeni in passato erano stati studiati in modo approfondito per il latte vaccino ed in modo frammentato ed incompleto per il latte bufalino.

La seconda considerazione a cui siamo pervenuti è che la stagionalità è un altro fattore incidente sulla componente lipidica del latte. Il grasso del latte estivo presenta un contenuto più elevato di acidi grassi mono e polinsaturi (C16:1, C18:1 e C18:2) mentre è il latte autunnale a far registrare il contenuto minimo in colesterolo. Dall'analisi quantitativa della frazione lipidica del latte è stato inoltre possibile delineare la curva del grasso del latte bufalino nell'anno, riscontrando il picco massimo in corrispondenza del mese di Gennaio e minimo a Settembre.

Questi dati correlati attraverso analisi statistica hanno portato alla mappatura della composizione trigliceridica ed acidica del latte di bufala.

Oltre allo studio sulla componente lipidica del latte di bufala, è stata studiato anche un prodotto di grande importanza economica: la Mozzarella di Bufala Campana.

La sperimentazione condotta sulla Mozzarella di Bufala Campana utilizzando la gascromatografia ad alta risoluzione con colonna capillare da 100 metri, ha permesso di identificare circa 40 acidi grassi molti dei quali (acidi grassi dispari, forme iso/anteiso, isomeri coniugati dell'acido linoleico, acidi insaturi con un numero di atomi di carbonio superiore a 20) presenti in tracce. Sulla base di tale identificazione si è potuto notare che i più abbondanti sono gli acidi grassi a medio peso molecolare (47.75%) dal C11 al C16:1 cis.

Sono state riscontrate differenze significative a carico di diversi acidi grassi nelle mozzarelle delle quattro stagioni. In particolare confrontando le mozzarelle invernali con le estive, e le primaverili con le autunnali, la componente acidica a basso e medio peso molecolare è risultata essere maggiore rispettivamente nelle estive e nelle primaverili, mentre la componente

ad alto peso molecolare è risultata maggiore nelle mozzarelle delle altre due stagioni.

Si è riscontrato inoltre, che tra gli acidi grassi saturi, massimi in estate e primavera, il palmitico (C16:0) è risultato il più abbondante mentre tra gli insaturi, massimi in inverno e primavera, il più abbondante è risultato essere l'oleico (C18:1n-9 cis).

Infine, valutando dettagliatamente la componente ad alto peso molecolare dal punto di vista nutrizionale è stato importante notare che tra gli acidi grassi ω -3, l'acido grasso C20:5 ω 3 (EPA) ha mostrato delle differenze significative durante le quattro stagioni mentre, gli ω -6 sul totale hanno evidenziato differenze quantitative a livello stagionale.

Per quanto riguarda gli isomeri dell'acido linoleico (CLA), (0.98% sul totale degli acidi grassi), tra i campioni di mozzarella analizzati, il loro contenuto totale è risultato essere rispettivamente più elevato nelle estive e nelle autunnali. E più precisamente, tra tutti i CLA, il più rappresentativo si è mostrato il 9c-11t (acido rumenico) rappresentando il 90 % dei CLA totali.

L'analisi trigliceridica delle Mozzarelle di Bufala Campana ha inoltre evidenziato una distribuzione bimodale dei trigliceridi dal C24 al C60.

Si è così confermato il tipico profilo del latte di bufala e dei suoi derivati, con i due massimi nelle famiglie dei C38 e dei C50 ed il minimo nella famiglia dei C44.

Contemporaneamente è stata studiata la distribuzione dei trigliceridi e degli acidi grassi nel latte, nella mozzarella e in tutti gli intermedi (cagliata) e scarti di lavorazione (siero ed acqua di filatura e quindi burro).

Le diverse operazioni effettuate durante il processo produttivo, provocano una differente distribuzione della componente lipidica nelle diverse correnti di produzione. Sono emerse sostanziali differenze a carico della componente

acidica, come confermato anche dalla variazione della componente trigliceridica.

Poiché la determinazione gascromatografia della componente trigliceridica ed acidica riveste un ruolo fondamentale nella rilevazione dei grassi estranei in prodotti lattiero-caseari, l'attenzione posta sulla frazione lipidica come potenziale indice di genuinità.

La sperimentazione effettuata ha permesso di ottenere risultati fondamentali per improntare una metodologia utile ed efficace per verificare la genuinità del grasso del latte bufalino.

È stata valutata la verifica della non applicabilità del metodo ufficiale (Precht) al grasso lattico di bufala. I dati hanno evidenziato infatti che nessun campione di latte di bufala rientra con i cinque parametri S e che solo l'8% dei campioni di burro rientra nelle cinque formule di Precht. È stato messo a punto un metodo per la verifica della genuinità del grasso del latte di bufala. La validità del metodo di Precht modificato è stata testata con l'analisi di 250 campioni prelevati random. Questo nuovo metodo, ci permette di rilevare tra il 3% ed il 5% di grassi estranei non lattici, mentre non è risultato un utile strumento per determinare il grasso vaccino aggiunto evidenziando una sensibilità pari al 25% (grasso-grasso) e 50 % (latte-latte).

Per tale motivo l'attenzione è stata rivolta all'analisi gascromatografica degli isomeri dei singoli gliceridi. La sperimentazione condotta sulla frazione trigliceridica del grasso vaccino e bufalino, utilizzando la tecnica gascromatografica, ha permesso di evidenziare la presenza di circa 130 isomeri diversi, tra i quali sono emerse differenze di tipo quantitativo ma non qualitativo.

La cromatografia su strato sottile (TLC) applicata all'analisi dei trigliceridi è risultata essere uno strumento poco efficace per rendere più evidenti queste differenze.

Informazioni utili sono state ricavate dall'analisi dei singoli isomeri strutturali sul campione tal quale (non frazionato).

Infatti, processando statisticamente i risultati, è stato possibile individuare alcuni intervalli caratteristici ottenuti applicando specifiche formule.

Dal confronto tra i valori ottenuti dalle miscele a titolo noto di grasso vaccino in grasso bufalino e l'intervallo di genuinità proposto è emerso che il limite di rilevabilità è pari al 10% (grasso-grasso) 20% (latte-latte).

In modo simile a quanto fatto per il grasso lattico, anche per la mozzarella sono stati proposti indicatori di genuinità.

Dall'analisi dei trigliceridi, seguendo la metodica ufficiale di Precht, si sono determinati i nuovi range dei cinque parametri S per la rilevazione della presenza di grassi estranei non lattici nella Mozzarella di Bufala Campana.

Dall'analisi degli acidi grassi con la HRGC si sono invece proposti specifici rapporti tra acidi grassi precedentemente non risolti con altre tecniche gascromatografiche.

In definitiva, è possibile concludere che la tecnica gascromatografica utilizzata nello studio della genuinità del latte di bufala e suoi derivati, pur mostrando una sensibilità pari al 10% nei confronti del latte vaccino e 3-5% per quelli di origine non lattica animale e vegetale, si è dimostrata versatile e di facile applicazione nonché più rapida e più economica rispetto alle tecniche elettroforetiche e biomolecolari.

Di conseguenza, è possibile ipotizzare una sua applicazione anche a livello aziendale come screening preliminare nello studio della genuinità.