

Appunti del corso di Analisi dei prodotti di origine animale

Parte 1

ZEPPA G.
Università degli Studi di Torino



Alcuni concetti

➤ *Scopi delle analisi degli alimenti*

- ✓ Conoscenza tecnica
- ✓ Valutazione legale
- ✓ Valutazione commerciale
- ✓ Controllo genuinità

➤ *Adulterazione* : aggiunta o sottrazione al prodotto di sostanze facenti parte della sua normale composizione

➤ *Sofisticazione* : aggiunta al prodotto di sostanze estranee alla sua normale composizione

➤ *Contraffazione* : sostituzione della denominazione o del marchio di un prodotto o attribuzione di una marca ad un prodotto di marca diversa

- ***Problemi di prelievo del campione***

- ***Problemi di conservazione del campione***
 - ✓ **Riscaldamento**
 - ✓ **Raffreddamento**
 - ✓ **Antimicrobici**

- ***Metodi di analisi***
 - ✓ **Ufficiali**
 - **Di riferimento**
 - **Usuali**
 - ✓ **Pratici**

Industria

lattiero-casearia



Generalità sul latte....



RD 994/29: “Per latte deve intendersi il prodotto ottenuto dalla mungitura **regolare, ininterrotta e completa** della mammella di animali in **buono stato di salute e di nutrizione**. Con la sola parola ‘latte’ deve intendersi il latte proveniente dalla vacca. Il latte di altri animali deve portare la denominazione della specie cui appartiene l’animale che lo fornisce

Reg. 853/2004 “latte crudo : il latte prodotto mediante secrezione della ghiandola mammaria di animali di allevamento che non è stato riscaldato a più di 40 °C e non è stato sottoposto ad alcun trattamento avente un effetto equivalente”

Il latte è una miscela complessa in cui i componenti si trovano nella soluzione e rispetto al solvente acqua in:

- ✓ fase di soluzione (zuccheri, sali, vitamine idrosolubili, sostanze azotate non proteiche);
- ✓ fase colloidale (proteine, parte dei fosfati e citrati di calcio);
- ✓ fase emulsione (lipidi, vitamine liposolubili)

Il colore bianco è dato dalle micelle di caseina mentre le sfumature giallastre sono conferite dalla frazione lipidica e da pigmenti giallo-verdastri, le flavine.

Nel latte ovino e caprino sono assenti pigmenti coloranti.

Il sapore del latte è leggermente dolce per la presenza di lattosio. Il latte non possiede un odore proprio, ma assorbe gli odori esterni.

Generalità sul latte....

	Donna	Bovina	Capra	Asina	Bufala	Pecora
Grassi %	3.8-4.1	3.7-3.9	3.5-4.5	1.5	6-9.5	5.7-6.5
Proteine %	0.9-1.5	3.2-3.4	2.9-3.1	1.8	4.4-4.8	6-6.3
Caseine %	0.2-0.25	2.6-2.7	2.3-2.9	0.7	3.9	4-5.2
Lattosio %	7.0-7.2	4.8-5.0	4.1-4.8	6.2	4.7-4.9	3.8
Ceneri %	0.79	0.73	0.79	0.4	0.85	0.9
Calcio mg/100 g	30-34	120	126	67	180	185
Sodio mg/100 g	18	50	40	21	40	46

Composizione chimica e principali caratteristiche del latte vaccino

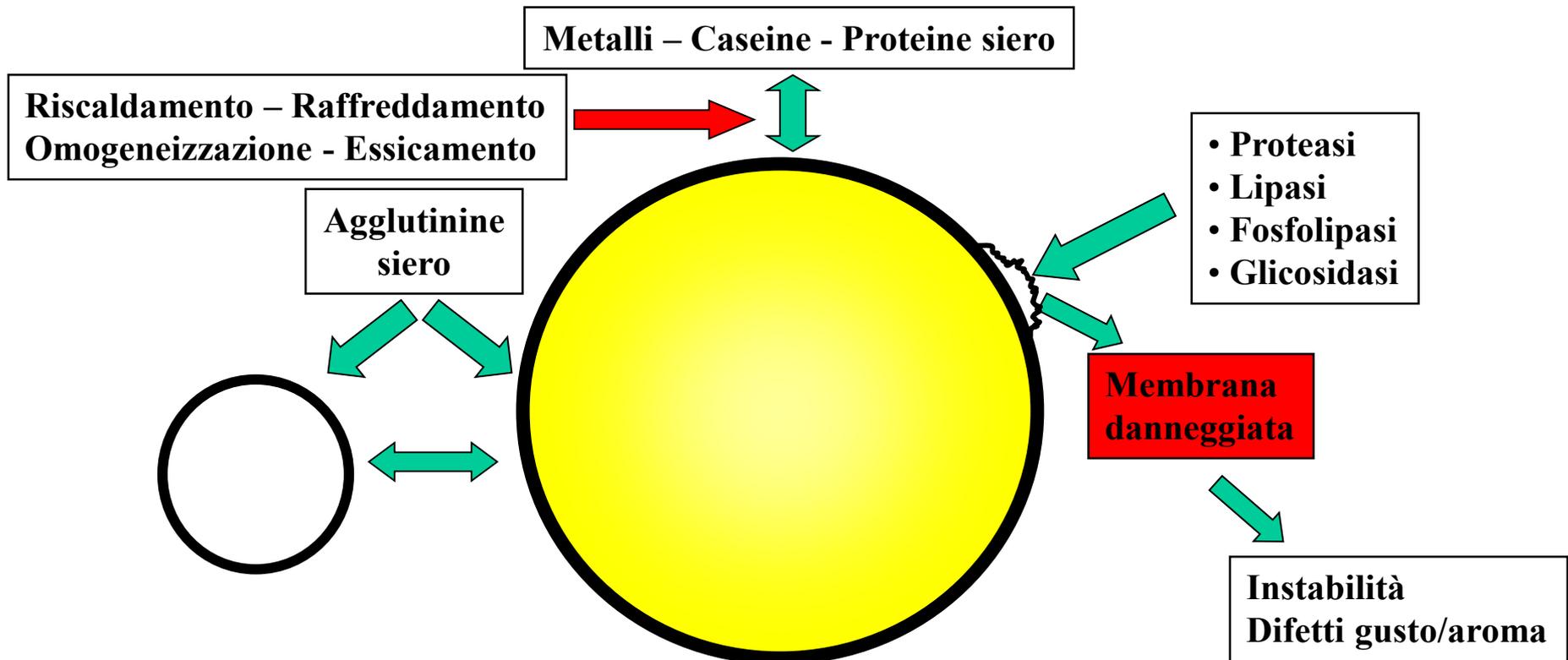
Acqua (%)	86.9-88.5
Materia grassa (%)	3.3-4.4
Lattosio (%)	4.8-5.1
Sostanze azotate (%)	2.8-3.3
Sali minerali (%)	0.6-0.8
Estratto secco totale (%)	11-13
Estratto secco magro (%)	8.5-9.5
pH	6.5-6.7
Acidità di titolazione	6-8 °SH (Soxhlet-Henkel)* 14-18 °D (Dornic)** 0.14-0.18 g/100 ml lattico
Densità a 20 °C	1.030-1.033 intero g/ml
Punto di congelamento	-0.530 ÷ -0.540 °C

* mL di NaOH N/4 necessari per neutralizzare fino al viraggio della fenolftaleina 100 mL di latte

** mL di NaOH N/9 necessari per neutralizzare fino al viraggio della fenolftaleina 100 mL di latte

Sostanza grassa

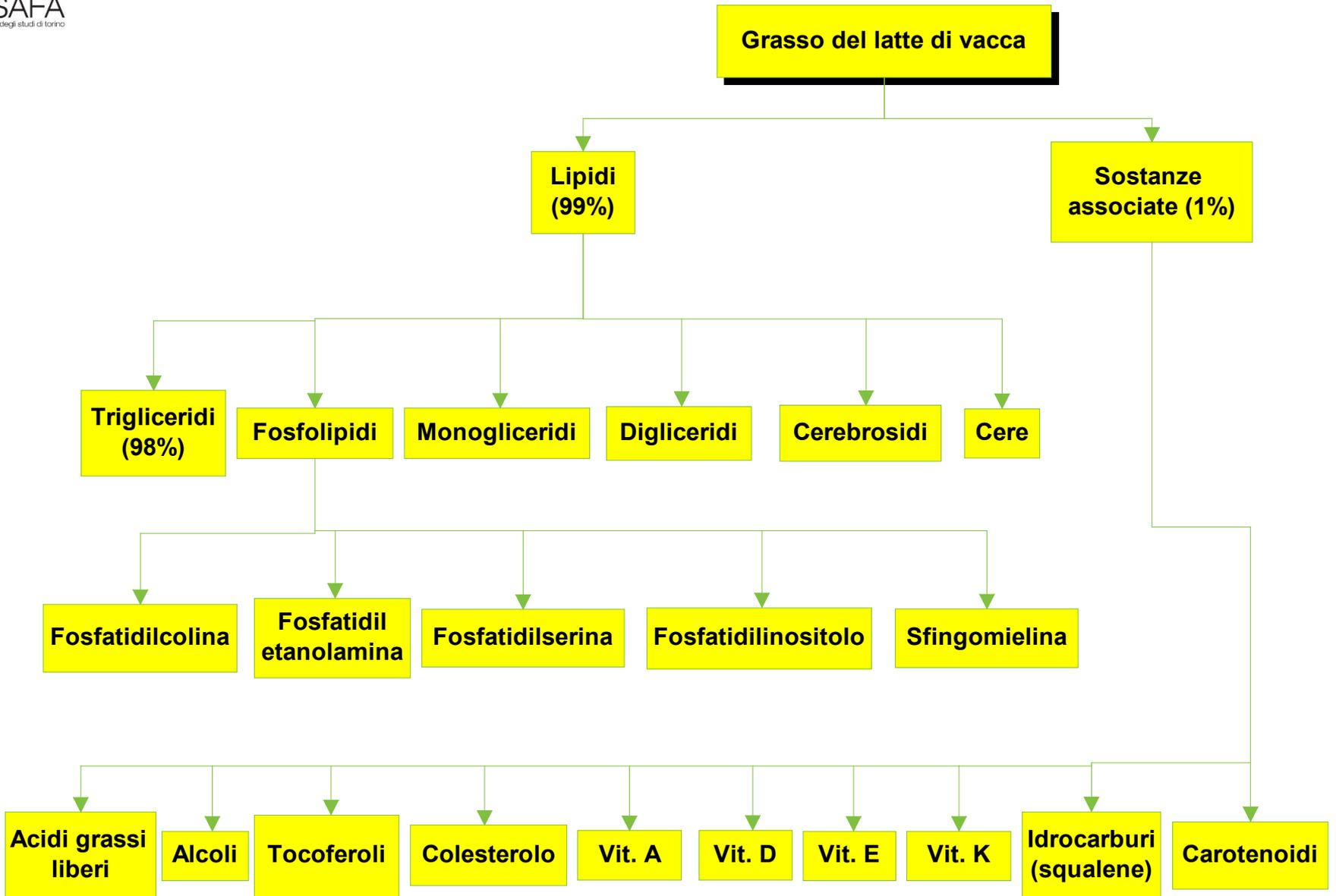
- Globuli (diametro medio 3 μm per vaccino e 1 μm per l'ovino). Quindi il grasso del latte ovi-caprino non si separa (centrifugazione o affioramento), non rimane inglobato nel reticolo caseinico (formaggi più bianchi, siero più grasso), irrancidisce più facilmente (più globuli, maggiore rapporto superficie/volume)
- Formati da membrana (proteine, fosfolipidi, colesterolo; 20 nm), parte intermedia (lipidi ad alto punto di fusione), parte interna (lipidi a basso punto di fusione)
- Nella parte interna presenti anche pigmenti (carotenoidi, xantofille) e vitamine (A, D, E, K)



- La superficie specifica dei globuli in 100 mL di latte varia da 5 a 11 m²
- I costituenti di membrana si orientano con una zona idrofila a contatto della fase acquosa e le zone idrofobe a contatto della fase lipidica. Le zone idrofile sono essenzialmente costituite da gruppi carichi e glucidici
- La repulsione elettrostatica è di circa -13 mV al pH del latte ed unita all'ingombro sterico delle proteine impedisce le interazioni dei globuli
- Un abbassamento del pH od un aumento della forza ionica abbassa le repulsioni elettrostatiche e diminuisce la stabilità dell'emulsione

Sostanza grassa

- Composizione molto complessa
 - Trigliceridi 97-98%
 - Digliceridi 0.3-0.6 %
 - Monogliceridi 0.01-0.03%
 - Acidi liberi 0.2%
 - Steroli 0.2-0.4%
 - Fosfolipidi 0.2-1%
- Gli acidi sino a C16 sono sintetizzati nella mammella, oltre di origine esogena
- Molto importanti gli acidi butirrico, capronico, caprilico, caprico e laurico (a corta catena) ed oleico, palmitico, stearico, miristico (a lunga catena)
- Degli acidi presenti circa il 64% è saturo, il 31% monoinsaturo, il 3% biinsaturo ed l'1% polinsaturo
- All'interno di una specie la composizione del grasso del latte varia poco a seconda della razza e molto di più in funzione dell'alimentazione
- Una alimentazione con erba fresca favorisce la presenza di acidi insaturi a lunga catena e determina la produzione di burro più molle mentre l'alimentazione con fieno e prodotti ricchi di cellulosa favorisce la sintesi di acidi grassi saturi e quindi la produzione di burro più duro
- Gli acidi grassi hanno una azione batteriostatica e quindi i formaggi magri si alterano più facilmente dei corrispondenti grassi



Principali acidi grassi del latte di vacca

Saturi

Butirrico	C4:0	(2.7-3.3 %)
Caproico	C6:0	(0.9-1.2 %)
Caprilico	C8:0	(0.4-0.8 %)
Caprico	C10:0	(1.7-2.7 %)
Laurico	C12:0	(2.1-3.4 %)
Miristico	C14:0	(8.9-11.0 %)
Pentadecanoico	C15:0	(1.1-1.5%)
Palmitico	C16:0	(26.7-30.0 %)
Stearico	C18:0	(10.6-12.0 %)
Arachico	C20:0	(0.1-0.3 %)

Insaturi

Monoinsaturi

Palmitoleico	C16:1	(1.2-1.7 %)
Oleico (cis)	C18:1	(23.2-26.8 %)
Vaccinico (trans)	C18:1	

Polinsaturi

Linoleico	C18:2	(0.7-1.5 %)
Linolenico	C18:3	
Arachidonico	C18:4	

Principali acidi grassi di alcuni latti

	C4	C6	C8	C10	C12
	Butirrico	Caproico	Caprilico	Caprico	Laurico
Vacca	1.4	2.2	1.8	3.6	4.1
Pecora	1.1	2.7	3.3	7.6	5.5
Capra	0.7	2.4	3.2	8.7	4.7
Umano	0.1	0.2	0.3	2.1	7.2
Scrofa	0.2	0.2	0.2	0.6	0.8
	C14	C16	C18	C18:1	C18:2
	Miristico	Palmitico	Stearico	Oleico	Linoleico
Vacca	13.1	30.2	13.7	27.1	3.1
Pecora	14.1	28.1	11.8	22.7	3.1
Capra	10.7	28.5	13	25.2	2.9
Umano	10.9	29.6	7.3	35.4	6.7
Scrofa	4.1	35.1	4.6	44.9	9.7

Non esiste una definizione completa ed esaustiva per le sostanze grasse. Il termine 'grasso' dovrebbe essere utilizzato per una sostanza solida e 'olio' per una sostanza liquida a temperatura ambiente, ma non è definita questa temperatura. I grassi sono una miscela complessa di gliceridi e altri componenti

- **97-98% miscela di gliceridi (esteri del glicerolo con acidi grassi)**

- ✓ **monogliceridi**

- 2-monogliceride
- 1-monogliceride / 3-monogliceride (enantiomeri; differiscono solo per il segno del potere rotatorio)

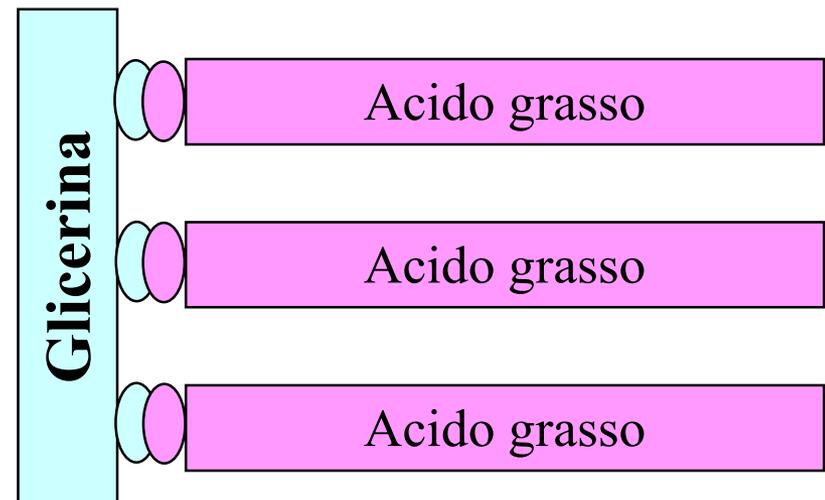
- ✓ **digliceridi**

- 1,3-digliceride
- 2,3-digliceride / 1,2-digliceride (enantiomeri)

- ✓ **trigliceridi**

- semplici ($R = R' = R''$)
- misti
 - $R \neq R' \neq R''$
 - $R \neq R' = R''$
 - $R = R' \neq R''$

- **2-3% componenti minori**



Acidi grassi

Gli acidi grassi sono in genere monocarbossilici ($C_nH_{2n+1}COOH$), pari, a catena aperta ed in configurazione *cis*

- Saturi
 - ✓ A catena corta
 - ✓ A catena lunga
- Monoinsaturi
- Polinsaturi

Nomenclatura

Ogni acido grasso viene indicato prendendo come riferimento l'idrocarburo con lo stesso numero di atomi di carbonio e sostituendo il suffisso "o" con "oico". L'insaturazione si indica con "en" ed un numero di posizione. L'isomeria con *cis* o *trans*

Acido ottadeca-9-enoico

Acido ottadeca-9,12-dienoico

Acido 9-idrossiottadeca-12-enoico

Acido ottadeca-*cis*-9, *trans*-11, *trans*-13-trienoico

L'isomeria geometrica *cis* e *trans* viene anche indicata rispettivamente con Z (*zusammen* = insieme) e E (*entechen* = opposti)

Acido ottadeca-(9Z), (11E), (13E)-trienoico

Si può semplificare il tutto riportando solo il numero di atomi di carbonio, il numero di insaturazioni e la loro posizione

Acido 18:3(9Z, 11E, 13E)



N° atomi carbonio	Nome IUPAC	Formula	Origine	Nome comune
Acidi grassi saturi				
1	Metanoico	HCOOH	secrezione delle formiche	formico
2	Etanoico	CH ₃ COOH	aceto	acetico
3	Propanoico	CH ₃ CH ₂ COOH	latte	propionico
4	Butanoico	CH ₃ (CH ₂) ₂ COOH	burro (butyrum in latino)	butirrico
5	Pentanoico	CH ₃ (CH ₂) ₃ COOH	radice della valeriana	valerianico
6	Esanoico	CH ₃ (CH ₂) ₄ COOH	capra	capronico
7	Eptanoico	CH ₃ (CH ₂) ₅ COOH	fiore di vite (dal greco oinanthè)	enantico
8	Ottanoico	CH ₃ (CH ₂) ₆ COOH	capra	caprilico
9	Nonanoico	CH ₃ (CH ₂) ₇ COOH	Pelargonium roseum	pelargonico
10	Decanoico	CH ₃ (CH ₂) ₈ COOH	capra	caprinico
12	Dodecanoico	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COOH	alloro (dal latino laurus)	laurico
14	Tetradecanoico	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COOH	seme di Myristica (noce moscata)	miristico
16	Esadecanoico	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH	palma	palmitico
18	Ottadecanoico	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH	grasso (dal greco stéar)	stearico
20	Eicosanoico	CH ₃ (CH ₂) ₁₈ COOH	arachide	arachico
Acidi grassi insaturi				
16	cis-9-esadecenoico	C ₁₆ Δ ₉	palma	palmitoleico
18	cis-9-ottadecenoico	C ₁₈ Δ ₉	olio oliva	oleico
18	trans-9-ottadecenoico	C ₁₈ Δ ₉	olio (dal greco élaion)	elaidinico
18	9,12-ottadecadienoico	C ₁₈ Δ _{9,12}	olio di lino	linoleico
18	9,12,15-ottadecatrienoico	C ₁₈ Δ _{9,12,15}	olio di lino	linolenico
20	5,8,11,14-eicosatetraenoico	C ₂₀ Δ _{5,8,11,14}	arachide	arachidonico
20	5,8,11,14,17-eicosapentenoico	C ₂₀ Δ _{5,8,11,14,17}	-	-
22	4,8,12,15,19-docosapentenoico	C ₂₂ Δ _{4,8,12,15,19}	cheppia, pesce tipo sardina (dal latino clupea)	clupanodonico

Saturi		
C12	n-dodecanoico	laurico
C14	n-tetradecanoico	miristico
C16	n-esadecanoico	palmitico
C18	n-ottadecanoico	stearico
C20	n-eicosanoico	arachico
Insaturi		
C16	cis-9-esadecenoico	palmitoleico
C18	cis-9-ottadecenoico	oleico
C18	cis,cis-9,12-ottadecadienoico	linoleico
C18	cis,cis,cis-9,12,15-ottadecatrienoico	linolenico
C20	cis,cis,cis,cis-5,8,11,14-eicosatetraenoico	arachidonico

N.B.

✎ Gli acidi grassi insaturi hanno un PF più basso dei corrispondenti saturi

✎ I doppi legami non sono in genere coniugati, ma sempre separati da un gruppo metilenico

✎ I doppi legami, in genere, sono in configurazione *cis*

I più diffusi acidi insaturi con doppi legami coniugati

- ottadeca-*cis*-9, *trans*-11, *trans*-13-trienoico → α -eleostearico → olio di tung
- ottadeca-*cis*-9, *trans*-11, *cis*-13-trienoico → α -punico → rosacee
- ottadeca-9,11,13,15-tetraenoico → α -pumarico → rosacee

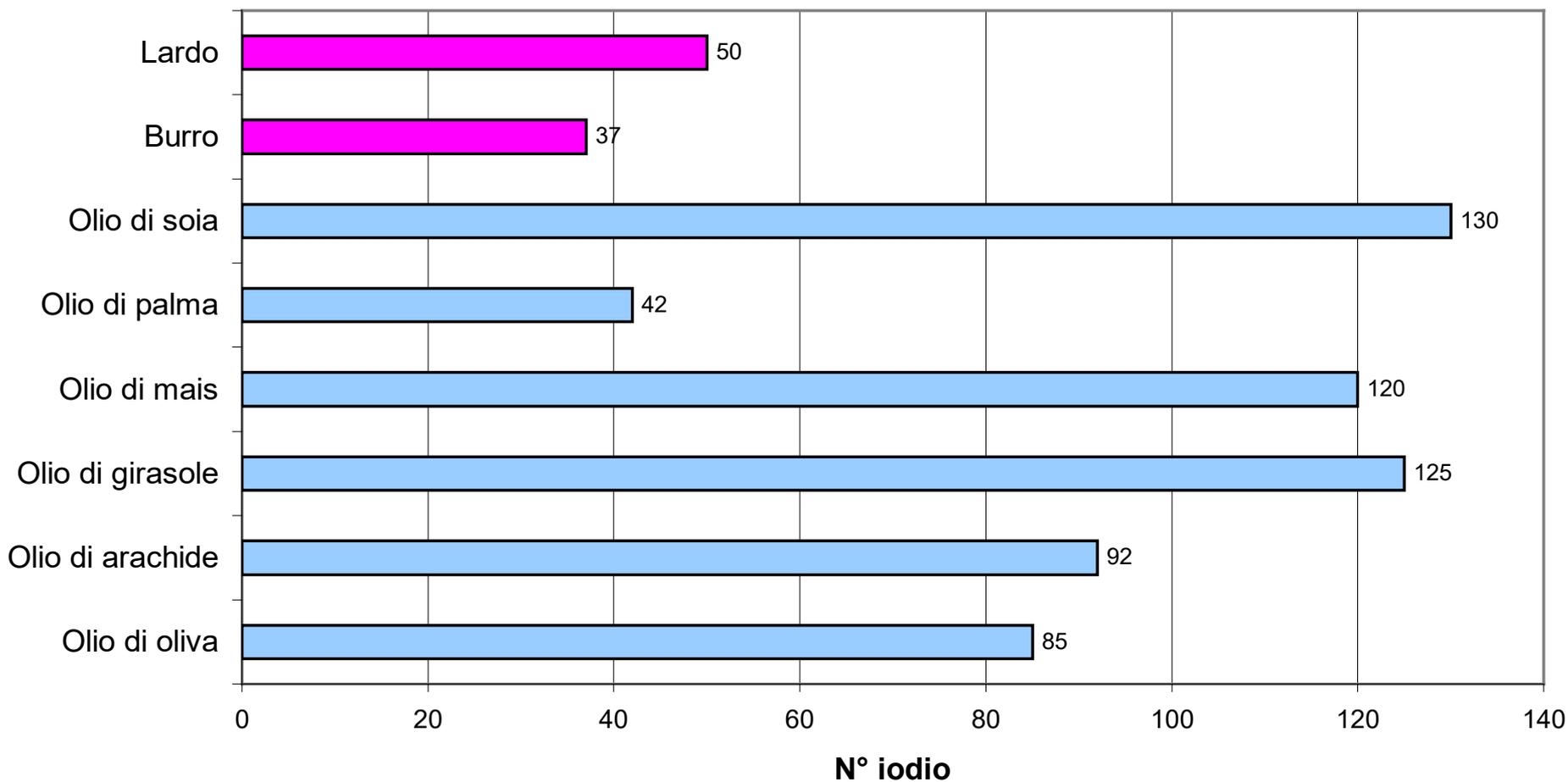
Gli acidi grassi con doppi legami multipli possono essere raggruppati in quattro serie principali in relazione alla struttura terminale della catena: le serie si differenziano per il numero di atomi di carbonio presenti prima dell'ultimo doppio legame

- serie linolenica (ω_3 o n-3) $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)-CH=CH-}$
- serie linoleica (ω_6 o n-6) $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_4\text{-CH=CH-}$
- serie oleica (ω_9 o n-9) $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_7\text{-CH=CH-}$
- serie esadecenoica (ω_7 o n-7) $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_5\text{-CH=CH-}$

	Formula bruta	Oliva	Palma	Soia	Arachide	Girasole	Colza	Girasole	Mais	Burro
Butirrico	$C_4H_8O_2$									3 - 4.5
Capronico	$C_6H_{12}O_2$									1 - 2.3
Caprilico	$C_8H_{16}O_2$		tr							1 - 1.5
Caprinico	$C_{10}H_{20}O_2$		tr							2 - 3
Laurico	$C_{12}H_{24}O_2$	tr	0.1							2 - 4.5
Miristico	$C_{14}H_{28}O_2$	tr	0.5 - 1.3	tr		tr	0.1	tr	tr	10 - 14
Palmitico	$C_{16}H_{32}O_2$	10 - 15	38 - 45	9 - 12	9 - 14	5 - 8	2.5 - 4	5 - 8	10 - 15	24 - 32
Stearico	$C_{18}H_{36}O_2$	2 - 3	4 - 6	4 - 5	3 - 5	3 - 6	1 - 2	3 - 6	1.5 - 3	10 - 14
Arachico	$C_{20}H_{40}O_2$	0.2 - 0.5	0.3 - 0.5	0.3 - 0.6	1.5 - 3	0.2 - 0.4	0.3 - 0.7	0.2 - 0.4	0.2 - 0.5	0.5 - 1.5
Beenico	$C_{22}H_{44}O_2$	tr		0.1 - 0.3	2.5 - 3.8	0.5 - 0.8	0.1 - 0.2	0.5 - 0.8	tr	
Lignocerico	$C_{24}H_{48}O_2$				1 - 2.5	tr		tr		
Palmitoleico	$C_{16}H_{30}O_2$	0.5 - 2.5	0.3 - 0.5	0.2 - 0.5	0.2 - 0.5	0.1 - 0.3	0.2 - 0.4	0.1 - 0.3	0.1 - 0.4	2 - 3
Oleico	$C_{18}H_{34}O_2$	65 - 85	35 - 45	20 - 30	45 - 65	20 - 45	15 - 20	20 - 45	28 - 40	25 - 30
Erucico	$C_{22}H_{42}O_2$						40 - 50			
Linoleico	$C_{18}H_{32}O_2$	5 - 12	9 - 10	50 - 55	15 - 20	45 - 68	10 - 18	45 - 68	45 - 60	2.5 - 3
Linolenico	$C_{18}H_{30}O_2$	0.5 - 1	0.2 - 0.4	5.5 - 9		tr	7 - 12	tr	0.5 - 1.5	0.5 - 2
Arachidonico	$C_{20}H_{32}O_2$									
Colesterolo					0.01					0.25
β - sitosterolo		0.48		0.24	0.39	0.21	0.3	0.21	0.52	
Fitosteroli totali		0.5	0.15	0.4	0.5	0.35	0.5	0.35	0.7	
Isaponificabile		0.5 - 1.5	1	0.5 - 1.5	0.5	1.5 - 2.5	1 - 2	1.5 - 2.5	1 - 2.5	0.4 - 0.5
N° iodio		79 - 88	35 - 55	125 - 143	85 - 100	120 - 135	95 - 100	120 - 135	110 - 130	25 - 45

Grado di insaturazione di alcuni grassi - Numero di Iodio

- ❖ Indica i grammi di I_2 che vengono fissati da 100 g di grasso
- ❖ Consente di valutare il grado di insaturazione del grasso

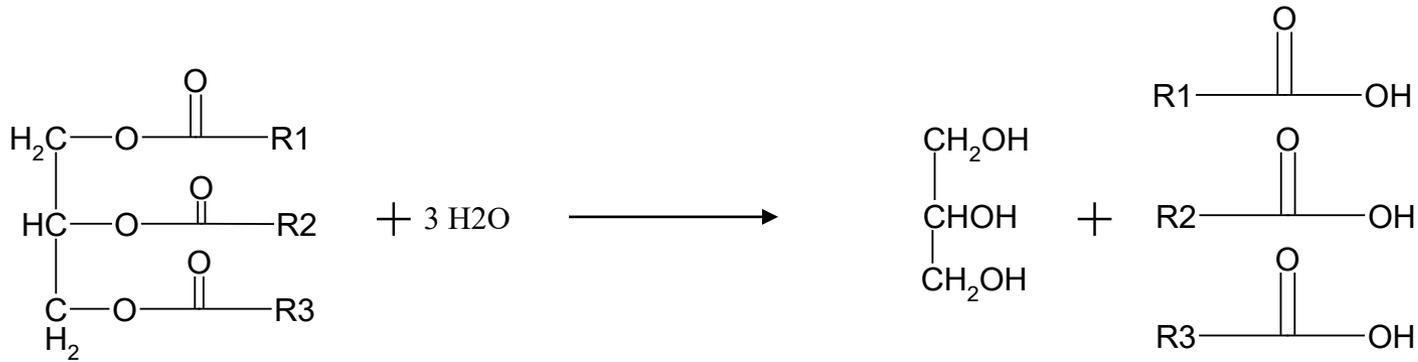


- La quantità di lipasi nel latte è sufficiente per l'idrolisi completa che non avviene in quanto:
 - ✓ l'enzima è legato in parte alla caseina quindi la quantità libera è minore
 - ✓ i globuli nei grappoli non sono attaccabili
 - ✓ la tensione interfacciale è alta e limita la penetrazione dell'enzima
 - ✓ l'enzima ha un ottimo di attività a pH 8.5 e 37 °C
 - ✓ serve un cofattore
 - ✓ presenza di inibitori enzimatici
- Alcuni fattori stimolano la lipolisi (omogeneizzazione, schiuma, agitazione)
- La lipasi è termosensibile (75 °C – 20")

Alterazioni del grasso

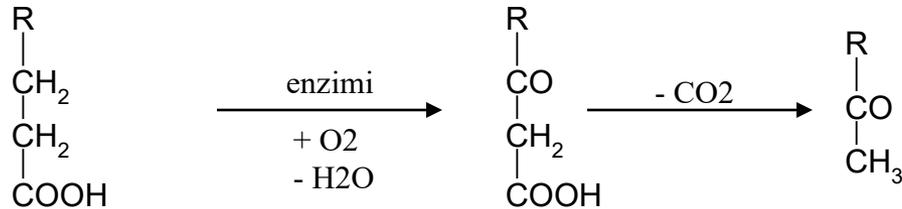
Irrancidimento idrolitico o inacidimento

E' un fenomeno essenzialmente di natura enzimatica provocato dalle lipasi presenti nel latte (native o microbiche o aggiunte) che provocano la rottura del legame estere dei lipidi con liberazione della glicerina e di acidi grassi



Irrancidimento chetonico

E' un fenomeno di ossidazione del gruppo metilenico in posizione β rispetto al carbossile dell'acido grasso e formazione di un chetoacido che per successiva ossidazione porta ad un metil chetone. E' catalizzata da un enzima, la β -ossidasi prodotta ad esempio da funghi (Gorgonzola)



Irrancidimento ossidativo

Fattori determinanti:

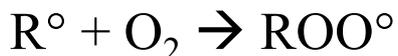
- ☛ Presenza di ossigeno
- ☛ Grado di insaturazione dell'olio
- ☛ Presenza di metalli
- ☛ Irraggiamento, soprattutto con radiazioni UV

Cinetica:

- ☛ Iniziazione (con formazione di radicali liberi)



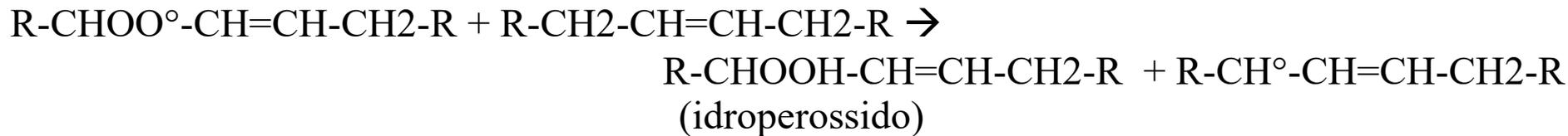
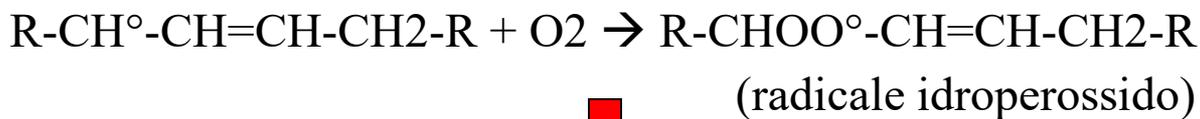
- ☛ Propagazione



- ☛ Terminazione



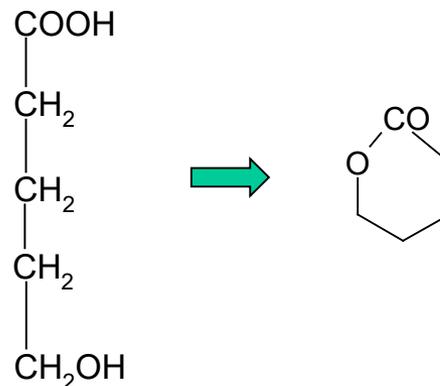
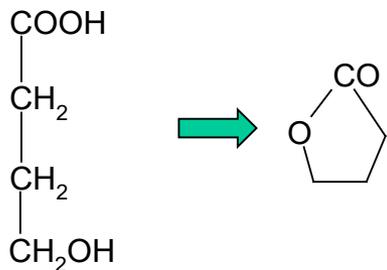
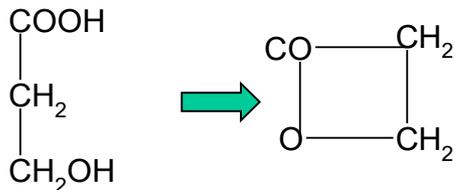
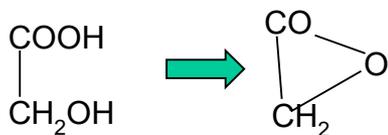
E' un fenomeno di natura prevalentemente chimica e consiste in un assorbimento di ossigeno da parte degli acidi grassi insaturi. E' una reazione autocatalitica. Si formano idroperossidi da cui derivano vari composti (aldeidi, acidi, chetoni ed idrocarburi).



Altre reazioni

Formazione di lattoni dagli ossiacidi per riscaldamento. I lattoni sono in genere codificati in accordo all'acido precursore (aceto = 2 carboni, propio = 3, butyro = 4, valero = 5, capro = 6, etc.), con il suffisso -lattoneed una lettera greca di prefisso che specifica il numero di carboni nell'eterociclo, ossia la distanza fra l'OH ed il COOH nella catena.

Il primo carbonio dopo il COOH è indicato come α , il secondo β e così via. Quindi il prefisso indica anche la dimensione dell'anello lattonico : α -lactone = 3 atomi nell'anello, β -lactone = 4-atomi, γ -lactone = 5 atomi ecc.



Sostanze azotate del latte

Si dividono in

- caseine ($\alpha s1$, $\alpha s2$, β , k , γ dalla β , λ dalla $\alpha s1$): 80% circa delle proteine del latte
- sieroproteine: 20% circa delle proteine del latte (più abbondanti nei latti ovi-caprini)
- sostanze azotate non proteiche (NPN) : 5-7%; PM < 500, non precipitano

Distribuzione % media delle frazioni azotate (N*6.38)

	Vacca	Pecora	Capra
Caseine	77.8	78.5	75.6
Sieroproteine	17	16.8	15.7
NPN	5.2	4.7	8.7

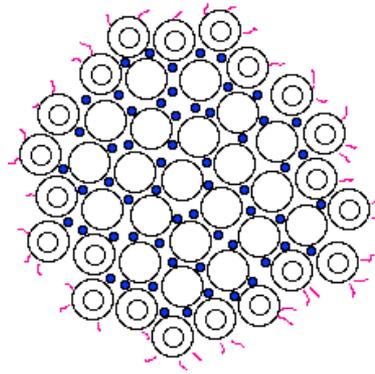
Contenuto proteico (%) dei latti di alcuni mammiferi

	Proteine totali	Caseina	Sieroproteine
Umano	1.1	0.5	0.6
Bovino	3.4	2.7	0.7
Bufala	4.3	3.5	0.8
Asina	2.7	1.8	0.9
Capra	3.7	2.9	0.8
Pecora	5.3	4.5	0.8
Renna	10.3	8.7	1.6
Gatto	7	3.8	3.2
Cane	7.4	4.8	2.6

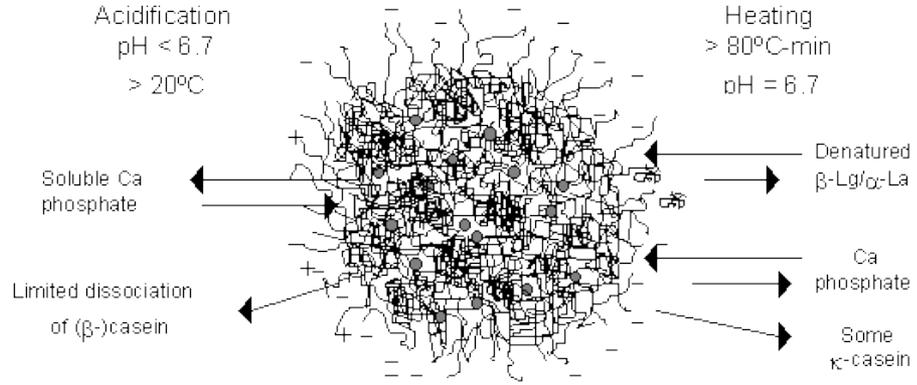
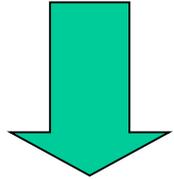
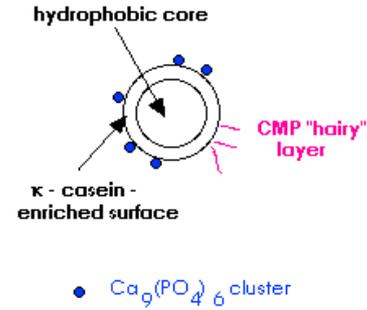
Sostanze azotate del latte

- La caseina è la frazione del latte che a 20 °C precipita per acidificazione a pH 4.6 e rappresenta circa il 77% dell'azoto totale.
- Ha una digeribilità elevata (95-98%) mentre le siero-proteine essendo globulari sono meno digeribili (75-90%)
- $\alpha s1$: 199 aminoacidi
- $\alpha s2$: 207 aminoacidi
- β : 209 aminoacidi
- k : 169 aminoacidi; è la sola glico-proteina fra le caseine; è idratata e carica negativamente; si pone all'esterno come colloide protettore
- γ : deriva dalla β per idrolisi post-secretoria; particolarmente abbondante nei latti ad elevata attività proteolitica (fine lattazione, mastite)
- λ : deriva dalla $\alpha s1$, è poco conosciuta
- Gli enzimi modificano la caseina in para-caseina che gelifica con ioni calcio
- E' presente nel latte sotto forma di particelle sferiche o micelle in cui è presente una componente minerale (calcio, fosforo, magnesio e citrato) e quindi di "fosfocaseinato di calcio"
- La micella ha un diametro di 30 – 300 nm

Casein Micelle



Casein Submicelle



50 nm

Le **siero-proteine** non sono aggregati proteici ma si trovano nel latte come monomeri o polimeri che precipitano per riscaldamento o salatura. Non sono sensibili agli enzimi coagulanti.

Sono costituite da:

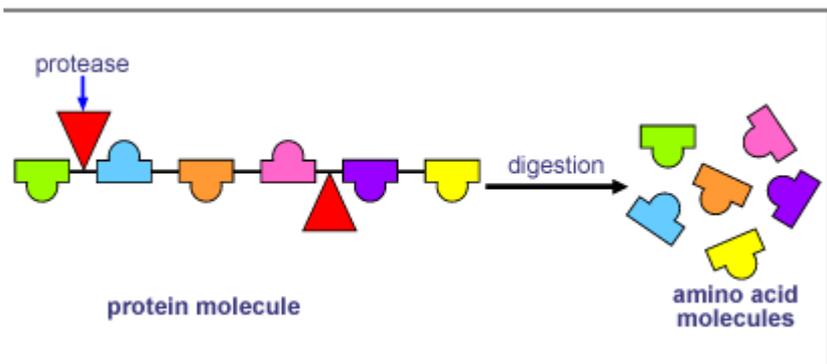
- β -lattoglobulina : la più importante (2-3 g/L)
- α -lattalbumina : 1-1.5 g/L
- sieralbumina : 0.3 g/L
- immunoglobuline : 0.5 g/L; importanti la IgG1, la IgG2, la IgA, la IgM
- proteoso-peptoni : molti composti
- lattoferrina
- transferrina
- ceruloplasmina

Le **sostanze azotate non proteiche** aumentano nei latti mastitici. Sono costituite da molte sostanze quali **enzimi**, aminoacidi liberi, urea, nucleotidi ecc.

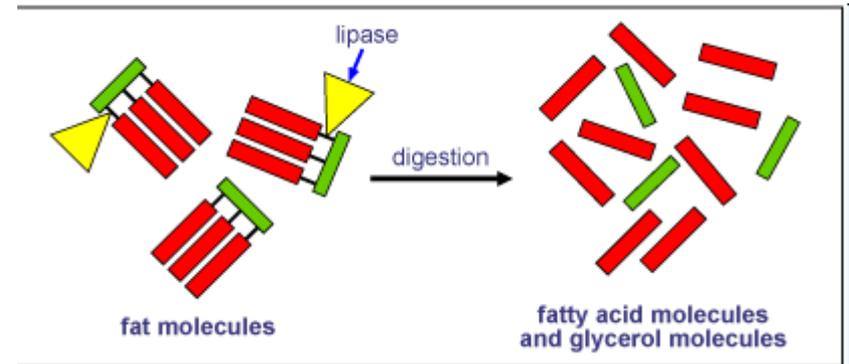
Enzimi del latte

- Molto numerosi di cui circa 60 endogeni
- Importanti:
 - **Catalasi:** è un enzima ossidante che decompone l'acqua ossigenata con formazione di ossigeno molecolare; è molto abbondante nel colostro e nel latte mastitico
 - **Lattoperossidasi:** è l'enzima più abbondante ed aumenta nei latti mastitici; viene inattivata a 80 °C per 30 secondi e la sua presenza in un latte pastorizzato è indice di trattamento a bassa temperatura
 - **Lipasi:** catalizza la rottura dei legami esteri dei trigliceridi
 - **Fosfatasi alcalina:** importante la sua termolabilità (72 °C per 16 secondi)

Proteasi



Lipasi

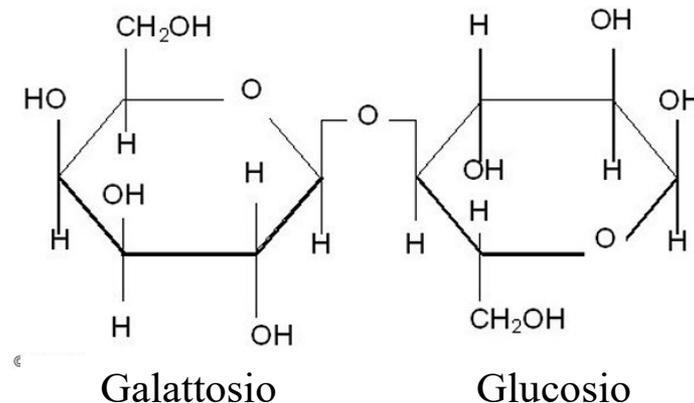


Resistenza termica (T °C/tempo) dei
principali enzimi del latte

Termolabili (disattivazione inferiore a 60 °C/30')	
Aldolasi	45/30'
α -amilasi	50/30'
Lipasi	55/30'
Termostabili (disattivazione superiore a 60 °C/30')	
Fosfatasi alcalina	62/30' (72/15")
Catalasi	70/30'
Perossidasi	70/30' (80/15")
Proteasi (plasmina)	70/30'
Xantina-ossidasi	70/30'
Termoresistenti (disattivazione superiore a 90 °C)	
Fosfatasi acida	
Ribonucleasi	
Lisozima	

Glucidi (lattosio)

- Diolossido --> glucosio + galattosio entrambi in forma piranica
- PM 342
- 'Zucchero di latte'
- Poco solubile (max 22 g/100g acqua a 25 °C)
- Poco dolce (1/6 del saccarosio)
- Energetico



- Provoca disturbi gastrici in assenza di lattasi
- A 15 °C la solubilità della forma α è 7 g/100 g e di 51 g/100 g per la forma β
- E' la base della fermentazione lattica da parte dei batteri lattici
 - Mesofili (20-30 °C)
 - Termofili (37-47 °C)
 - Omofermentanti (acido lattico)
 - Eterofermentanti (acido lattico, acido acetico, anidride carbonica)
 - Da 1 g di lattosio --> 0.95 g acido lattico
- Da reazione di Maillard --> melanoidine --> imbrunimento
- Può isomerizzarsi a lattulosio (glucosio + fruttosio) per trattamento termico → indice trattamento termico, presente solo in latti UHT e sterili

Glucidi

- Nel latte sono presenti anche oligosaccaridi (max 10 monosaccaridi)
- Considerati pre-biotici
- Hanno attività biologica (immunostimolante, antiinfiammatoria, antivirale)

Sali minerali

- Il latte contiene circa l'1% di sali minerali (Ca, K, P, citrati)
- Possono essere in soluzione vera o legati agli altri componenti
- Ca circa 1,30 g/L di cui 40% in soluzione e 60% colloidale
- P circa 1 g/L di cui 60% in soluzione e 40% colloidale
- Le due forme sono in equilibrio dinamico

Solubile -----→ Colloidale se pH ↑ T ↑

Solubile ←----- Colloidale se pH ↓ T ↓

Costituenti biocatalitici - Vitamine

Solubili nel grasso

A (retinolo) --> colore giallo del grasso

D (calciferolo)

E (tocoferolo) --> antiossidante

K --> antiemorragico

F



SCREMATURA

Solubili in acqua

B1 (tiamina)

B2 (riboflavina) --> colore giallo del siero

B6 (piridossina)

B12

PP

Acido pantotenico

C (acido ascorbico) antiossidante

Acido folico

H

Termolabili

C (Acido ascorbico)

Acido folico

B6

B 12

D (pastorizzazione)

Termostabili

F

B1 (tiamina)

B2 (riboflavina)

PP

A (retinolo)

H

E (tocoferolo)

Inquinanti

- ☛ Antibiotici
- ☛ Antiparassitari
- ☛ Detergenti e sanitizzanti
- ☛ Isotopi radioattivi (^{90}Sr ; ^{131}I)

Costituenti biologici

- ☛ Elementi cellulari (linfociti, cellule somatiche)
- ☛ Microrganismi (lattici, proteolitici, lieviti, patogeni). Molto importanti i patogeni (tubercolosi, brucellosi, carbonchio, febbre Q, salmonellosi, vaiolo, febbri varie)

ATTENZIONE AL CONSUMO DI LATTE CRUDO

Analisi del latte

Le analisi chimiche del latte sono assolutamente necessarie per valutarne i caratteri organolettici e, soprattutto, la genuinità. Il numero di parametri determinati di routine non è elevatissimo; normalmente, le procedure inerenti al campionamento e all'esecuzione delle analisi chimiche risultano essere molto più semplici rispetto a quelle per le analisi microbiologiche

Le principali analisi che si effettuano di routine sul latte sono le seguenti:

determinazione dell'indice crioscopico

valutazione dello stato di freschezza

pH

determinazione del residuo secco e secco-magro
caseina

determinazione del lattosio

prova dei fosfati

prova lattofermentativa

densità del latte e del siero

acidità titolabile

determinazione della materia grassa

determinazione delle proteine e della

determinazione dei cloruri

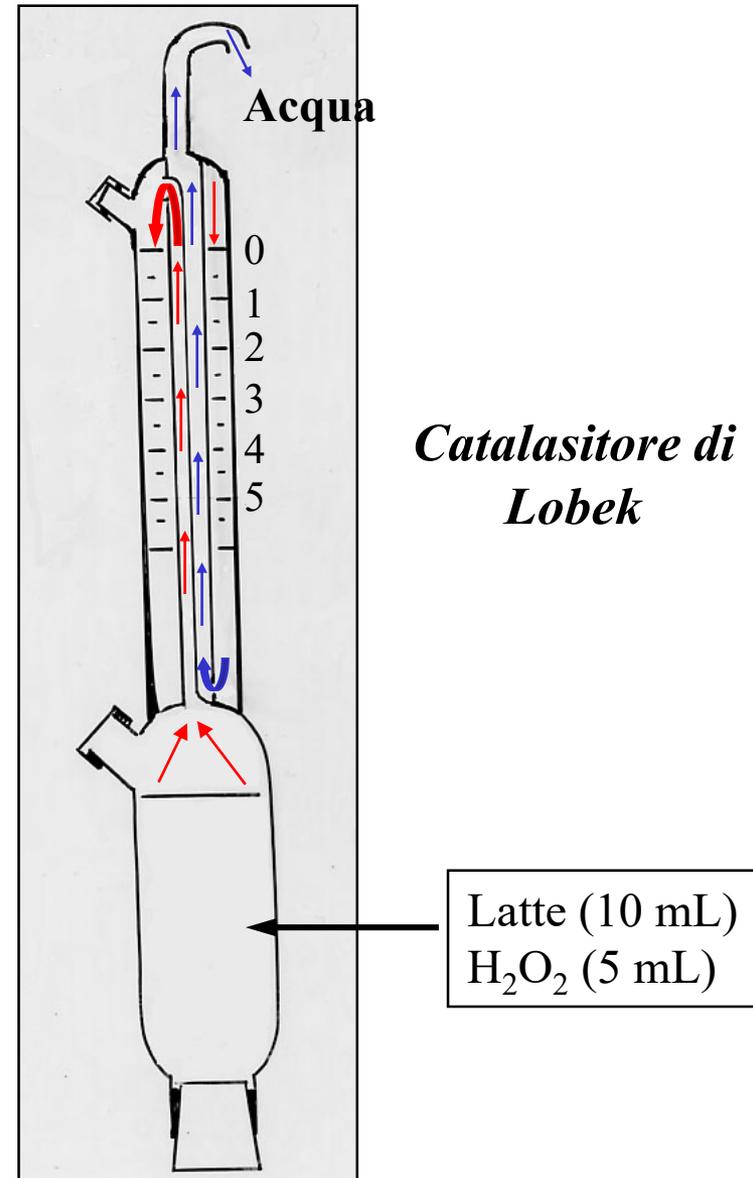
prova della perossidasi

prova caseozimoscopica

Sono poi effettuate prove microbiologiche e prove per valutare la presenza di antibiotici e altre sostanze di interesse tossicologico come le micotossine

Controllo della freschezza e del grado di inquinamento

- ✓ **Metodi microbiologici**
- ✓ **Metodi rapidi**
 - **Prova alcol 68%**
 - **Saggio all'Alizarina**
 - **Saggio all'Alizarolo**
 - **Saggio della Reduttasi**
 - **cat. A > 4.30 h**
 - **cat B**
 - **cat C < 2 h**
 - **Saggio della Catalasi**



Acidità del latte

L'acidità del latte è dovuta a quattro componenti, di cui i primi tre formano l'acidità naturale del latte:

- acidità dovuta ai gruppi acidi della caseina: 2/5 dell'acidità naturale
- acidità dovuta alle sostanze minerali (acido carbonico) e alle tracce di acidi organici (acido citrico), sia liberi sia legati alle micelle di caseina: 2/5 dell'acidità naturale
- reazioni secondarie dovute ai fosfati: 1/5 dell'acidità naturale
- acidità sviluppata che è dovuta all'acido lattico proveniente dalla fermentazione del lattosio ad opera dei fermenti lattici dopo la mungitura

Le unità di misura utilizzate per esprimere l'acidità del latte sono tre:

Gradi SH°= Soxhlet- Henkel: sono usati in tutto il mondo, tranne che in Francia ed Inghilterra. Sono i ml di NaOH 0,25 N necessari per neutralizzare 100 ml di latte (6-8 SH°/100 ml in un latte normale)

Gradi D°= Dornic: sono usati in Francia. Sono i ml di NaOH al 0,11 N necessari per neutralizzare 100 ml di latte (14-18 D° in latte normale)

Gradi T°= Turner: sono usati in Inghilterra. Sono i decimi di ml di NaOH al 0,1 N necessari per neutralizzare 10 ml di latte

Acidità del latte

☞ **Energia acida → pH**

Valori normali → pH compresi fra 6.5 e 6.8

pH < 6.5 → latte inacidito

pH > 6.8 → latte mastitico

☞ **Acidità di titolazione**

Si esprime in Gradi S.H (Soxhlet-Henkel ed indica i mL di NaOH N/4 necessari per neutralizzare alla fenolftaleina 100 mL di latte.

Il latte fresco ha 6-7 SH; a 16-20 SH il latte coagula

Scelta indicatore

$$K = \frac{[A]*[H]}{[AH]}$$

$$[AH] = C_a \quad [A] = C_s$$

$$[H] = K * C_a / C_s$$

$$\text{pH} = \text{pK} + \log C_s / C_a$$

$$\text{pH} = \text{pK} + \log (S/L)$$

$$\text{pH} = \text{pK} + 2$$

Indica il pH che bisogna raggiungere per neutralizzare completamente un acido

Indicatori

- metilarancio \rightarrow 3.2 - 4.4 \rightarrow rosso – giallo
- rosso di metile \rightarrow 4.2 – 6.3 \rightarrow rosso – giallo
- blu di bromotimolo \rightarrow 6 – 7.6 \rightarrow giallo – blu
- rosso fenolo \rightarrow 6.8 – 8.4 \rightarrow giallo – rosso
- fenolftaleina \rightarrow 8.2 – 10 \rightarrow incolore - rosso

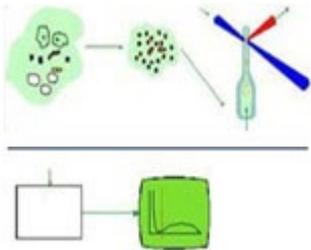
Bactoscan

Strumento per la conta microbica nel latte; i batteri ed i funghi vengono separati dalla matrice, colorati e contati mediante un analizzatore d'immagine in citometria di flusso

Funzionamento

- Riscaldamento del latte a 40 °C
- Trattamento con soluzione enzimatica
- Colorazione dei batteri
- Passaggio in capillare
- Illuminazione con luce allo xeno e rilevamento con microscopio dei batteri (rossi)

Potenzialità → 100/150 campioni/ora



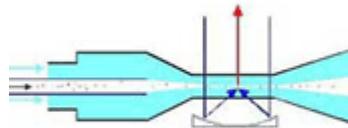
Fossomatic

Strumento per la determinazione delle cellule somatiche nel latte mediante colorazione con Iditio-bromuro e conta con analizzatore di immagine in citometria di flusso

Funzionamento

- Trattamento del latte con Iditio-bromuro
- Rivelazione delle cellule somatiche con microscopio a basso ingrandimento (5x) e conta mediante analizzatore

Potenzialità → 200-500 campioni/ora



Controllo genuinità o ricerca adulterazioni

- **Densità del latte 1,029-1,033 a 15 °C (± 0.0002)**
- **Densità del siero clorocalcico 1,027 a 15 °C**
- **Δ punto crioscopico (-0.55 °C)**
- **Residuo secco magro > 8.5%**

Densità del latte

La densità o peso specifico o massa volumica è un parametro di base. Il suo valore nel latte è determinato da due opposti fattori di variazione: la concentrazione di elementi disciolti ed in sospensione (residuo magro), proporzionale alla densità, e la quantità di grasso in emulsione, inversamente proporzionale.

A 15°C la densità deve avere valori compresi fra 1.029 e 1.034 g/ ml. Questi valori risultano superiori in caso di latte scremato (tra 1.035 e 1.037), inferiori in caso di latte annacquato. Se la scrematura e l'annacquamento vengono effettuati sullo stesso prodotto, potrebbero non verificarsi variazioni del peso specifico e la sofisticazione sarebbe nascosta; in tal caso si può effettuare un controllo sulla % di materia grassa, sull'indice crioscopico e sulla densità del siero

Oltre che sul latte, la densità è controllata anche sul siero, cioè il latte privato di proteine e grassi mediante coagulazione. La densità del siero a 15° C deve avere valori compresi fra 1.026 e 1.028 g/ ml; le variazioni sono più contenute in quanto è diminuito uno dei fattori che influenzano la densità.

Per la determinazione della densità si utilizza un areometro, il lattodensimetro di Quevenne, un'asta di vetro contenente un'estremità zavorrata e una avente una scala graduata in 29 tacche, comprese tra 14 e 42: le due cifre indicano la seconda e la terza decimale, quindi si deve anteporre ad esse 1.0.

Lo strumento incorpora un termometro ed è tarato a 15°C.

La determinazione è basata sul Principio di Archimede: un corpo galleggiante (in questo caso l'areometro) si immerge nel latte fino a quando il peso del liquido spostato equivale al peso dell'areometro

La densità del siero si misura alla stessa maniera, dopo coagulazione di proteine e grassi con una soluzione di CaCl_2 a caldo, raffreddamento e separazione del precipitato di caseina



Indice crioscopico

Si dice punto di congelamento o indice crioscopico la temperatura a partire dalla quale la fase solida e quella liquida coesistono.

Se consideriamo il punto di congelamento dell'acqua pura, 0°C , una soluzione acquosa tenderà a congelare a temperature proporzionalmente più basse in ragione della quantità di sostanze disciolte, a causa dell'interazione tra i soluti e il solvente che causa il cosiddetto abbassamento crioscopico

Il latte congela naturalmente attorno a -0.5°C ; questo valore, più basso di quello dell'acqua, è giustificato dal fatto che il latte contiene una quantità elevata di sostanze disciolte, principalmente il lattosio e i sali minerali; tra le sostanze in soluzione ci sono anche le sieroproteine, ma dato che hanno peso molecolare nell'intervallo 15.000-150.000 e sono presenti nel latte solo in concentrazione di 5-7 g/l, la loro concentrazione osmotica (moli/l) non influenza molto l'indice crioscopico



Nel latte genuino l'indice crioscopico è di -0.55°C . Si possono avere variazioni stagionali da -0.53°C a -0.575°C : l'abbassamento è più consistente nei mesi freddi, mentre l'aumento è più evidente nei mesi caldi a causa dell'alto tenore nei sali della reazione alimentare. In realtà, l'indice è piuttosto costante perché le sostanze che lo determinano maggiormente sono quelle che hanno una minore variabilità percentuale nel corso della lattazione (lattosio e sali)

Fattori che influenzano localmente l'indice crioscopico del latte possono essere:

- l'età, la razza e lo stato di salute delle mucche; il latte proveniente da vacche ammalate ha un indice crioscopico compreso tra -0.56°C e $+0.610^{\circ}\text{C}$ e nelle vacche affette da mastiti può arrivare a $+0.81^{\circ}\text{C}$
- la disponibilità di acqua
- l'alimentazione
- il tempo meteorologico e la temperatura delle stalle
- il periodo di mungitura
- i trattamenti del latte
- la conservazione dei campioni prima della determinazione dell'indice crioscopico

Determinazione Residuo Secco (R.S.)

① Per via diretta

Si fanno evaporare 3 mL di latte in capsula a 102 °C

② Per via indiretta (Formula di Fleischmann)

$$\text{R.S.} = 1.2 * g + 266.5 * [(d-1)/d]$$

dove

g = grasso %

d = densità latte

Determinazione Residuo Secco Magro (R.S.M.)

$$\text{R.S.M.} = \text{R.S.} - \text{grasso \%}$$

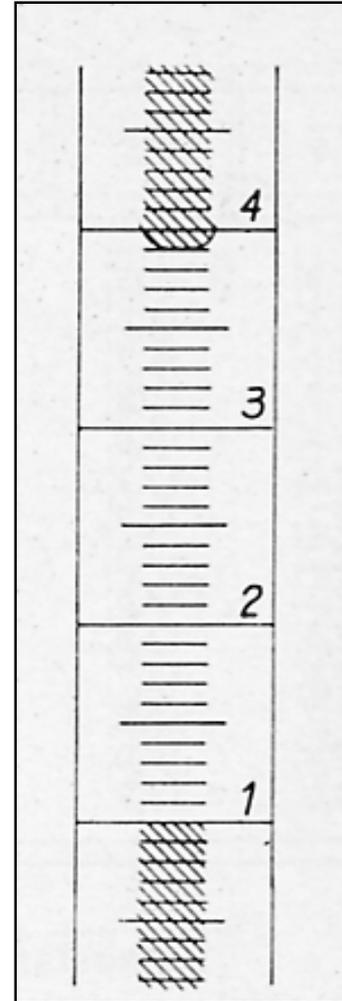
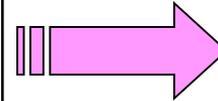
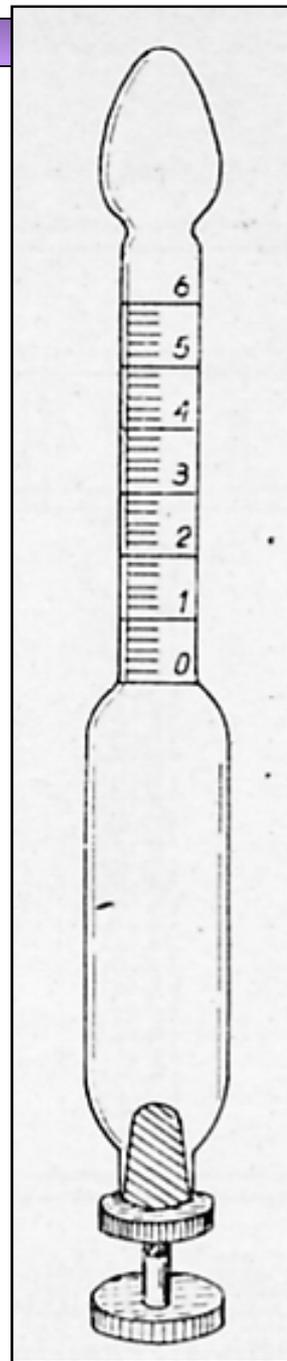
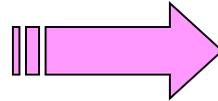
Butirrometro di Gerber



1 mL alcol iso-amilico

11 mL latte

10 mL ac. solforico



Metodo Rose-Gottlieb

È il metodo ufficiale per la determinazione del grasso nel latte. La determinazione viene effettuata per estrazione con etere etilico ed etere di petrolio di una soluzione etanolica-ammoniacale seguita da evaporazione dei solventi e determinazione ponderale della massa del residuo

- ✓ 10 g campione
- ✓ 2 mL NH_3 25%
- ✓ 10 mL etanolo
- ✓ estrarre con 25 mL etere etilico + 25 mL etere di petrolio
- ✓ centrifugare
- ✓ ripetere l'estrazione
- ✓ portare a secco e pesare

Metodo Soxhlet

- ✓ Viene usato l'estrattore Büchi con circa 5 g di campione; se liquido aggiunti 10 g solfato di sodio
- ✓ Estrazione con solventi vari
- ✓ Pesatura estratto



Determinazione delle sostanze azotate

✂ Metodo al formolo

Si può utilizzare esclusivamente per il latte, previa neutralizzazione.

Si titola l'acidità liberatasi dalle proteine per reazione dei gruppi aminici con l'aldeide formica (reazione di Schiff)



Aggiungere 5 mL di aldeide formica 38-40% e titolare con NaOH N/4

Operando su 100 mL di latte con NaOH N/4 si ha

$$\text{Proteina \%} = \text{mL NaOH N/4} * 0.49$$

Determinazione delle sostanze azotate

Metodo Kjeldahl

- ➊ Mineralizzazione
- ➋ Distillazione
- ➌ Neutralizzazione
- ➍ Titolazione



- ✓ campione + Solfato rame + acido solforico conc.
- ✓ digestione all'ebollizione



- ✓ raffreddamento
- ✓ aggiungere NaOH
- ✓ distillare



- ✓ raccogliere il distillato



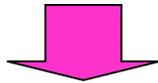
- Titolazione a ritorno

L'ammoniaca viene recuperata con un eccesso conosciuto di acido in soluzione standard e poi si titola l'eccesso di acido.

L'indicatore garantisce di avere un eccesso di acido

$$\text{eq N} = [(\text{mL acido} * \text{eq acido}) / 1000] - [(\text{mL base} * \text{eq base}) / 1000]$$

$$\% \text{ N} = (\text{eq N} * 14) / p$$



$$\% \text{ N} = [0.14 * (\text{V acido} - \text{V base})] / p$$

$$\% \text{ proteine} = \% \text{ N} * 6.38$$

- Titolazione diretta

Si raccoglie il distillato in una soluzione di acido bórico 2% e si forma un complesso di ammonio borato. Poi si titola con un acido noto (solforico o cloridrico). Il vantaggio è di usare una sola soluzione standard

$$\% N = 0.14 * V \text{ acido} / p$$

$$\% \text{ proteine} = \% N * 6.38$$

Milko-scan

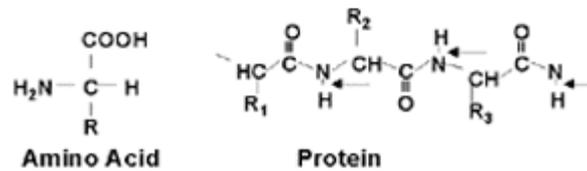
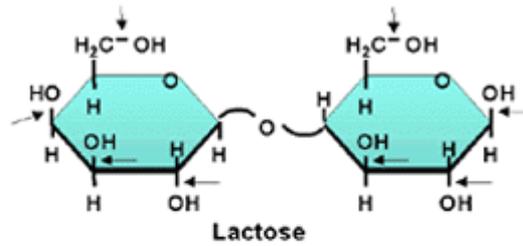
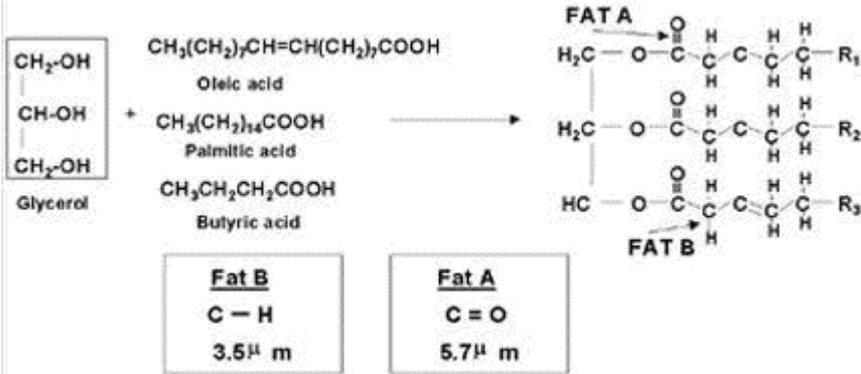
Strumento per la determinazione rapida di grasso, proteina e lattosio nel latte mediante spettrofotometria IR

MilkoScan Minor



- ✓ 4 filtri (grasso, proteina, lattosio, riferimento)
- ✓ 40 campioni/ora
- ✓ Grasso 0-40%
- ✓ Proteina 0-8%
- ✓ Lattosio 0-7%
- ✓ RSM 0-15%
- ✓ Estratto 0-50%
- ✓ Punto crioscopico -0.45/-0.55 °C

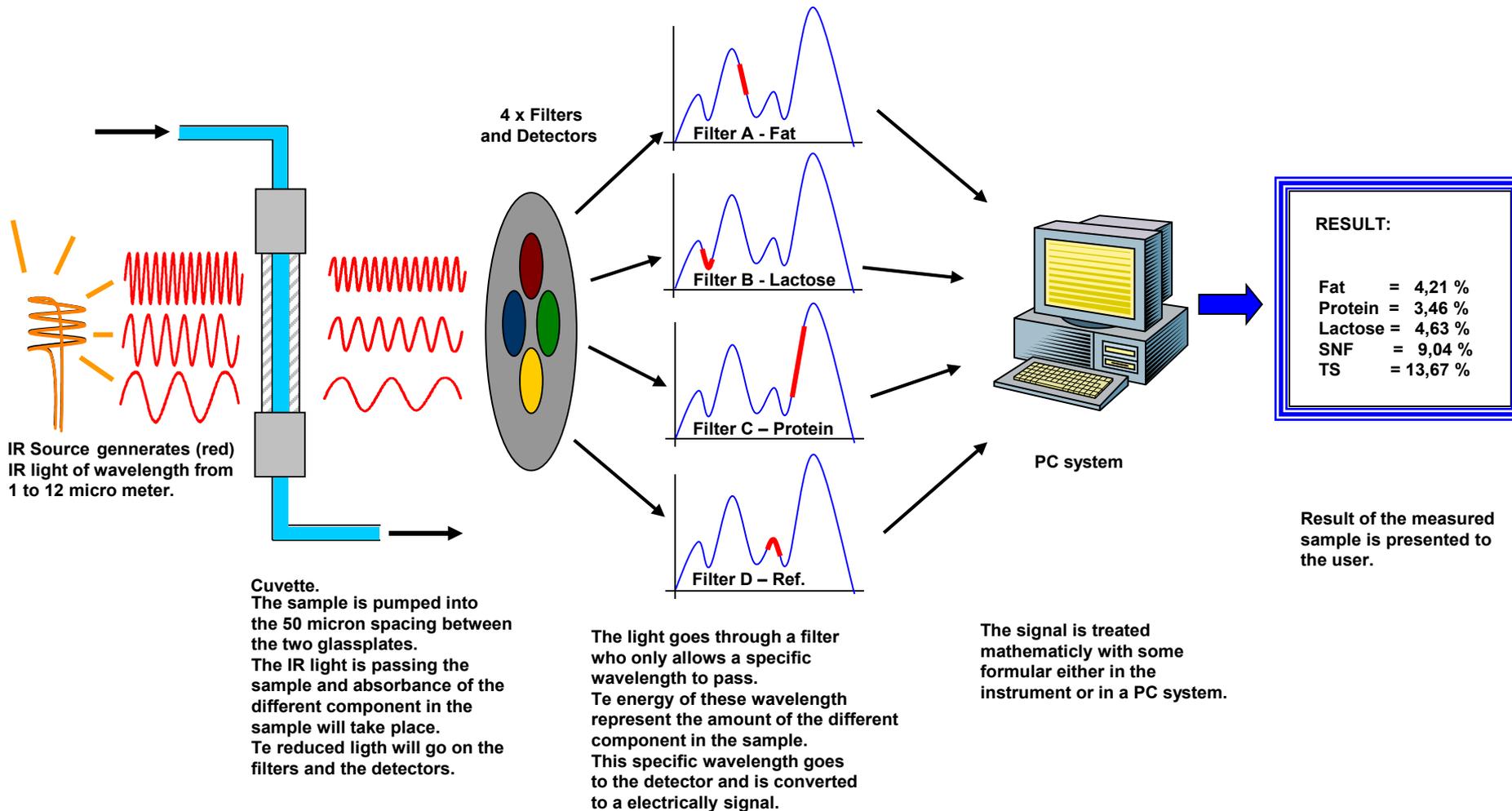
- Grasso → legame C-H della catena (3.5 μm)
- Lattosio → legame C-OH (9.55 μm)
- Proteina → legame N-H (6.5 μm)



FOSS IR- Technology

Analysis method based on filters

Click to start



Milko-scan

MilkoScan 50 ✓ 4 filtri (grasso, proteina, lattosio, riferimento)



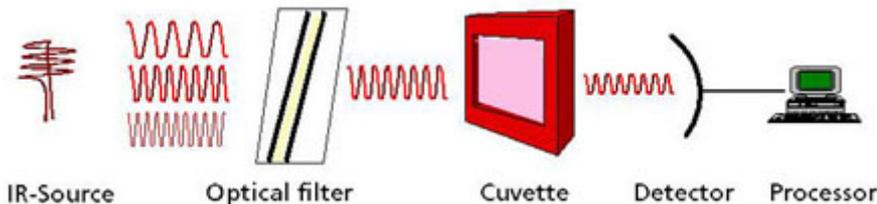
✓ 50 campioni/ora

✓ Grasso 0-50%

✓ Proteina 0-10%

✓ RSM 0-15%

✓ Estratto 0-60%



- Grasso → legame C-H della catena (3.5 μm)
- Lattosio → legame C-OH (9.55 μm)
- Proteina → legame N-H (6.5 μm)

Milko-scan

MilkoScan 120



Il FT120 lavora nel medio infrarosso da 3 a 10 μm con una scansione completa mediante un interferometro

FT 120

System Edit View Analysis Results Window Help

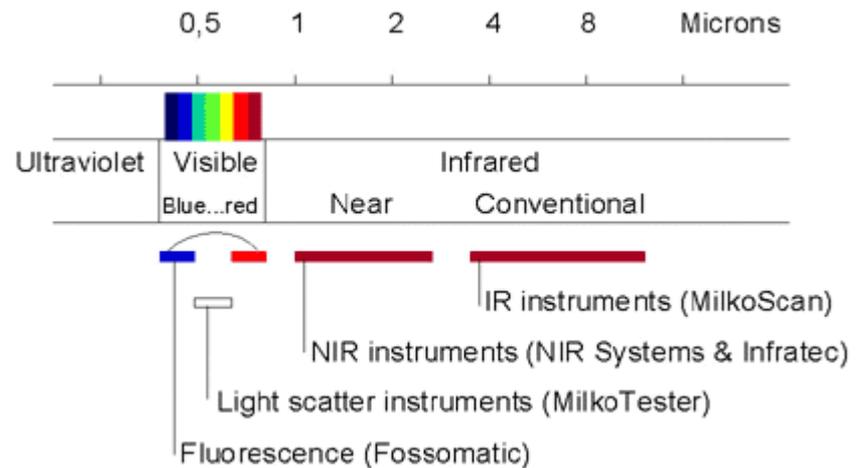
Milk

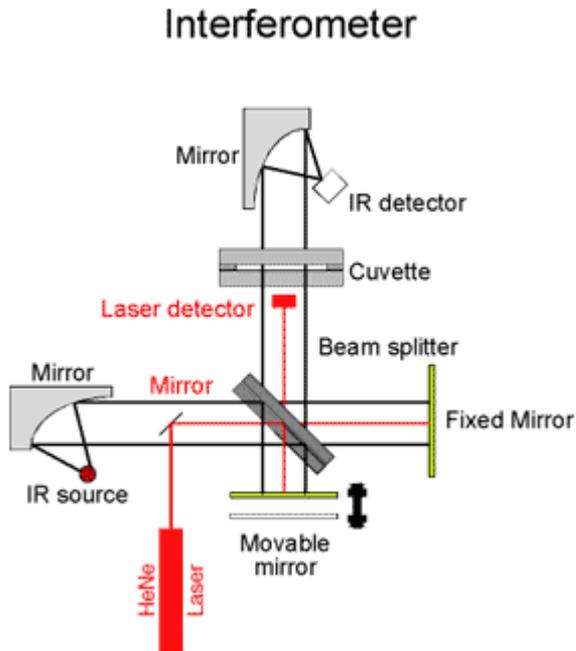
Results

Sample Id	Rep #	Product	Fat	Protein	Lactose	TS	SNF	Date	T
Zero correction									
	Corr.	Zero Setting	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01	16.11.99	
Zero setting									
1		Zero Setting	0,01	-0,01	0,01	0,01	0,00	16.11.99	
2		Zero Setting	0,00	0,00	-0,00	0,00	-0,00	16.11.99	
3		Zero Setting	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	16.11.99	
4		Zero Setting	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	16.11.99	
5		Zero Setting	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	16.11.99	
Mean		Zero Setting	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	16.11.99	
Sd		Zero Setting	0,003	0,004	0,005	0,004	0,003	16.11.99	
Zero correction									
	Corr.	Zero Setting	-0,01	-0,00	-0,00	-0,01	-0,00	16.11.99	
Sample Id Rep # Product Fat Protein Lactose TS SNF Date									
1		Milk	3,59	3,73	4,48	12,91	9,33	16.11.99	
2		Milk	3,60	3,74	4,49	12,93	9,35	16.11.99	
Mean		Milk	3,59	3,73	4,48	12,92	9,34	16.11.99	
Sd		Milk	0,004	0,007	0,006	0,017	0,014	16.11.99	

Tracking results

Manual Analysing





- ✓ Determinazione di
- ✓ Grasso → legame C=O del carbonile (5.73 μm) e legame C-H della catena acida (3.5 μm)
- ✓ Lattosio → legame C-OH (9.55 μm)
- ✓ Proteina → legame N-H (6.5 μm)
- ✓ Altri componenti (urea, caseina, glucosio, acido lattico, acidità, acidi grassi liberi, densità, punto crioscopico, sali ecc.)
- ✓ 30-45 sec per campione
- ✓ Grasso 0-50%
- ✓ Proteina 0-10%
- ✓ RSM 0-15%
- ✓ Estratto 0-60%

Determinazione sostanze inibenti

- Test microbiologici : consistono nel rilevare la presenza di antibiotici mediante un microrganismo che viene inibito dalla loro presenza. La soglia è uguale in genere al Limite Massimo Residuo (MRL). Sono test qualitativi (presenza/assenza) (Delvotest)
- Test rapidi : usano diverse tecniche e rilevano in pochi minuti, senza quantificare, la presenza di una famiglia di antibiotici. In genere si cercano i beta-lattamici ma anche le tetracicline e altre famiglie (Penzym, Betastar, Snap, Charm II ecc)
- Test specifici : usando l'HPLC si cercano molecole singole e le si quantifica. Si possono cercare anche più molecole. Alcune molecole (eritromicina) non assorbono però agli UV
- Identificazione e quantificazione : usando sistemi LC-MS-MS si possono cercare e quantificare tutte le molecole, anche quelle che non assorbono agli UV

Test microbiologici

- Evidenziamo molte molecole
- Sensibilità diversa da una molecola all'altra
- Possibilità di effetti sinergici fra le molecole

Il più diffuso è il Delvotest ma ne esistono altri (Copan, Eclipse ecc.) basati sull'utilizzo di *Bacillus stearothermophilus* o altri batteri (*Streptococcus thermophilus* nel Valio T101). Alcuni test usano più batteri.

Delvotest®



Delvotest® reading colours

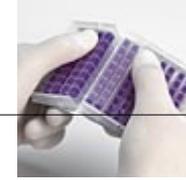
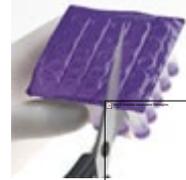
Negative

Detection limit

Positive



Copan®



- Positive result = Antibiotics are present
- Negative result = No Antibiotics present



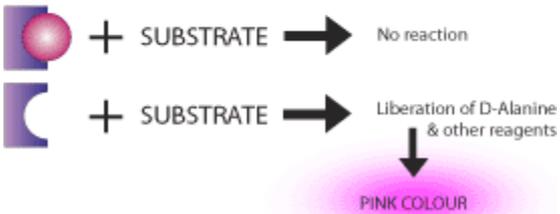
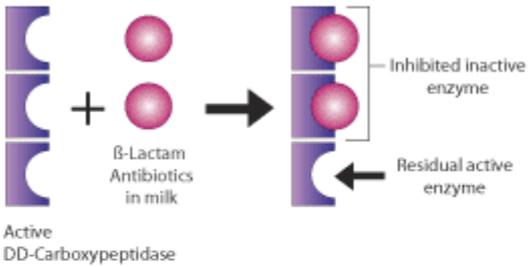
Test rapidi

Sono test qualitativi che consentono in pochi minuti di fare una analisi qualitativa (presenza o assenza) e sono usati come test di accettazione prima dello scarico. In genere individuano solo i beta-lattamici che sono i più usati ed i più contaminanti.

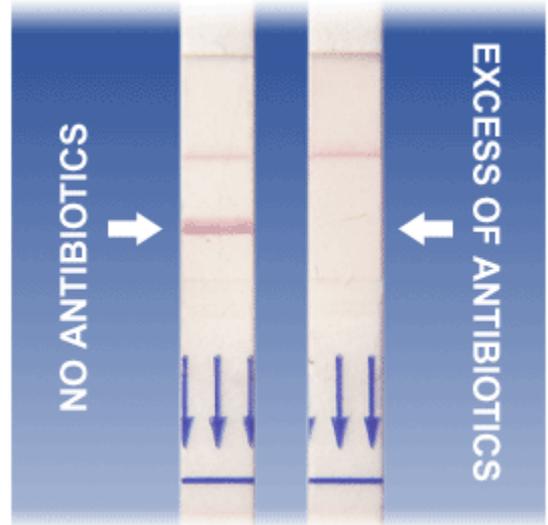
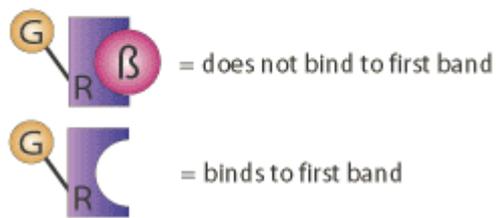
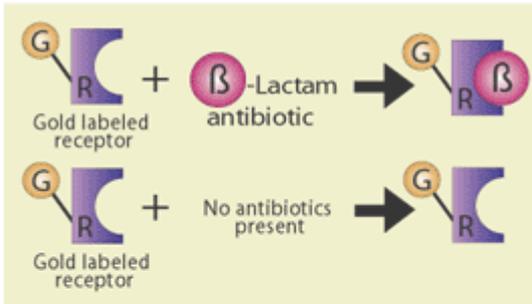
I principali sono:

- Penzym : usa una DD-carbossipeptidasi che viene inibita in presenza di betalattamici
- Delvo-XPress : test immuno-enzimatico con dosaggio colorimetrico dell'eccesso di uno specifico reagente
- Betastar : usa un recettore bloccato su particelle di oro che migra su di una strisca in modo differente se vi sono dei beta-lattamici
- Snap : test immuno-enzimatico
- Charm II : viene valutata la reazione di immunocompetizione fra la molecola cercata ed un test marcato con C14 o H3. Molto costoso.

Penzym®



BetaStar®



Altre determinazioni

- Lattosio → enzimatica
- Calcio → assorbimento atomico in emissione
- Cloruri → titolazione potenziometrica con AgCl
- Acidi grassi → GC previa esterificazione
- Ceneri → incenerimento in muffola
- Acido D/L lattico → enzimatica
- Lattulosio (fru+gal) → enzimatica

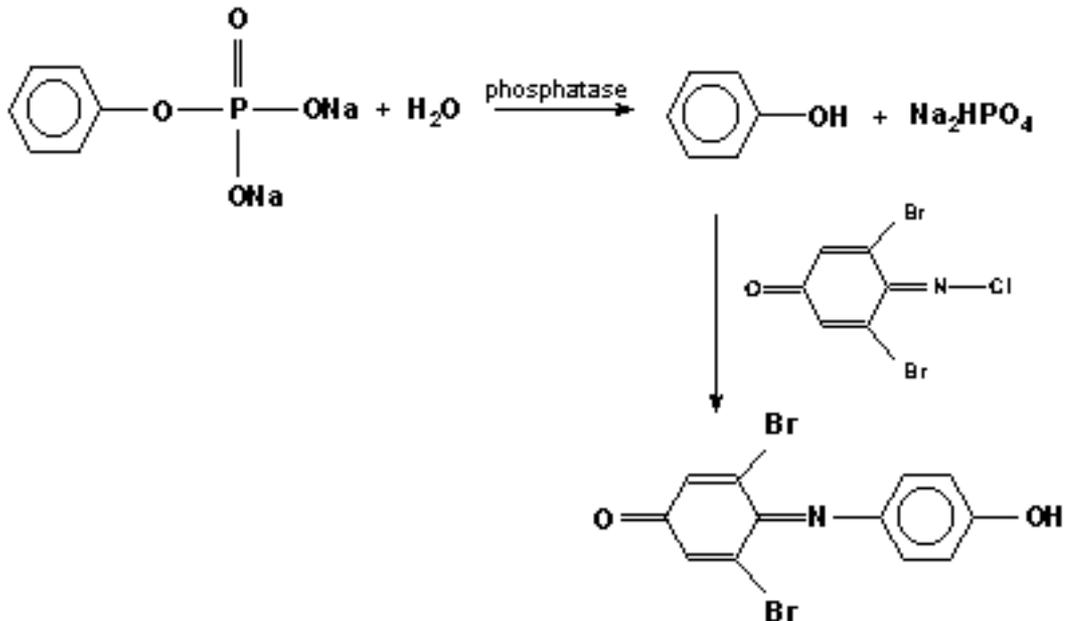
Determinazione Attività Fosfatasica

Misura della attività fosfatasica espressa come quantità di fenolo, in microgrammi, liberata da 1 mL di latte. Si considera negativa se inferiore a 4 µg/mL

Principio del metodo

L'attività fosfatasica è determinata dalla quantità di fenolo liberata dal fenilfosfato disodico addizionato al campione. Il fenolo liberato reagisce con dibromochinoneclorimide dando dibromoindofenolo (di colore azzurro) che viene determinato a 610 nm.

Si utilizzano in genere kit → Lactognost, Reflectoquant



Determinazione Attività Perossidasi

Principio del metodo

L'enzima perossidasi decompone il perossido di idrogeno. L'ossigeno liberato ossida l'1,4-fenilendiammina incolore trasformandola in indofenolo rosso porpora (test di Storchs). L'intensità di colore è proporzionale alla concentrazione dell'enzima.

Determinazione

- 5 mL latte
- 5 mL soluzione 1,4-fenilendiammina
- 2 gocce perossido idrogeno
- Se entro 30 sec compare il colore il test è positivo

Analisi formaggio

① Caratteri organolettici

② Residuo secco (102 °C in stufa)

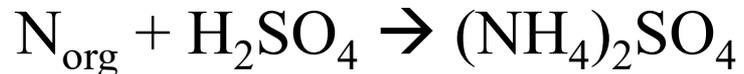
③ Grasso

① Metodo volumetrico (Gerber)

② Metodo ponderale (Schmidt-Bondzynsky-Ratzlaff)

④ Azoto (Metodo Kjeldahl)

① Mineralizzazione



② Distillazione



③ Neutralizzazione

④ Titolazione

Altre determinazioni

- Lattosio → enzimatica, HPLC
- Calcio → assorbimento atomico in emissione
- Cloruri → titolazione potenziometrica con AgCl
- Acidi grassi → GC previa esterificazione
- Ceneri → incenerimento in muffola
- Acido D/L lattico → enzimatica, HPLC