



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA

**APPLICAZIONE DELLA SPETTROSCOPIA DI RISONANZA
MAGNETICA NUCLEARE PER L'ANALISI DEL LATTE E
PRODOTTI CASEARI.**

Relatrice: Prof.ssa Elisabetta Schievano

Laureanda: Diletta Testoni,
2008439

Anno accademico 2022/2023

INDICE

1. INTRODUZIONE	5
2. PRINCIPI DELLA TEORIA NMR	7
2.1 ¹ H NMR in soluzione	10
2.2 HRMAS NMR	11
3. IL LATTE	13
3.1 Le proteine del latte: caseine e sieroproteine	14
3.2 Glucidi del latte	15
3.3 Lipidi del latte	15
4. IL FORMAGGIO	17
4.1 Coagulazione	17
4.2 Maturazione o stagionatura	18
5. APPLICAZIONI NMR NEL LATTE	19
5.1 Componente IDROFILA del latte	19
5.1.1 Adulterazioni	20
5.1.2 Fisiologia dell'animale	22
5.2 Componente LIPIDICA del latte	23
5.2.1 Latti di diverse specie	24
6. APPLICAZIONI NMR NEL FORMAGGIO	27
6.1 Stadio di maturazione	27
6.2 Identificazione della catena di produzione: il formaggio Asiago	29
6.3 Origine e qualità della mozzarella di Bufala Campana DOP	31
7. CONCLUSIONE	35
8. BIBLIOGRAFIA	37

1. INTRODUZIONE

La spettroscopia NMR è una tecnica sempre più utilizzata nell'analisi metabolomica degli alimenti. Si tratta di una tecnica non distruttiva e molto versatile che è in grado di fornire diverse informazioni qualitative e quantitative in un unico esperimento. L'ampio utilizzo di questa spettroscopia risiede anche nel fatto che si tratta di una tecnica veloce, semplice da utilizzare e che richiede minime manipolazioni del campione.

L'obiettivo di questo elaborato è quello di fornire una panoramica generale del tipo di informazioni che si possono ottenere dall'applicazione di tecniche di risonanza magnetica nucleare su matrici di natura lattiero-casearia al fine di determinarne l'autenticità, la tracciabilità e la qualità.

Negli ultimi decenni l'applicazione della spettroscopia NMR per lo studio del latte si è rilevata estremamente utile nonostante la complessità del campione. È stato possibile ottenere informazioni precise e dettagliate per quanto riguarda la composizione in relazioni a variabili come l'origine animale, la razza ed il tipo di alimentazione delle bovine o evidenziare possibili adulterazioni del latte con altri latti a più basso valore economico.

La spettroscopia NMR trova una sua applicazione anche nel campo dei derivati caseari. Molte informazioni sulla composizione chimica dei formaggi possono essere ottenute mediante estrazione della componente liposolubile o idrosolubile e successiva analisi dell'estratto.

Alcune analisi possono essere anche condotte sul campione solido tal quale, sfruttando l'utilizzo del HRMAS-NMR, grazie a questo strumento è possibile osservare contemporaneamente i profili metabolici della fase liposolubile ed idrosolubile senza dover necessariamente separarle.

2. PRINCIPI DELLA TEORIA NMR

La spettroscopia magnetica è una tecnica utilizzata per analizzare tutti quei sistemi caratterizzati dalla presenza di nuclei magnetici, quindi con momenti angolari di spin (e relativo momento magnetico di spin) diverso da zero.

Questa tecnica permette di studiare le transizioni indotte tra i livelli energetici di spin quando vengono separati in energia da un campo magnetico esterno B_0 .

Lo spin nucleare è una proprietà quantistica, ad esso è associato il numero quantico di spin nucleare I che assume diversi valori a seconda del nucleo in esame. I nuclei rilevabili con NMR sono tutti quelli aventi $I \neq 0$ (^1H , ^{13}C , ^{31}P , ecc.) per i quali esiste la relazione [2.1] tra il momento magnetico di spin $\vec{\mu}$ ed il momento angolare di spin I , dove γ è il rapporto giromagnetico.

$$\vec{\mu} = \gamma \cdot \vec{I} \quad [2.1] \qquad \gamma = \frac{g_n \cdot u_n \cdot 2\pi}{h} \quad [2.2]$$

In un campione reale contenente molti spin, la sommatoria di tutti i momenti magnetici del campione coincide con il momento magnetico netto o magnetizzazione M_0 .

In assenza del campo magnetico esterno statico B_0 i momenti magnetici hanno una distribuzione isotropa (uguale in tutte le direzioni) e la magnetizzazione complessiva del campione risulta essere nulla.

In seguito all'applicazione di B_0 i momenti magnetici assumono una distribuzione anisotropa e la magnetizzazione complessiva non più è nulla. La magnetizzazione inizia un moto di precessione attorno alla direzione di B_0 con frequenza angolare pari alla frequenza di Larmor [2.4].

$$\omega_L = \gamma \cdot B_0 \quad [2.3] \qquad \nu_L = \frac{\gamma \cdot B_0}{2\pi} \quad [2.4]$$

Una conseguenza dell'applicazione del campo magnetico B_0 è che gli orientamenti degli spin nucleari non sono più equiprobabili: nel caso di spin con $I=1/2$, delle due possibili orientazioni è leggermente più probabile che gli spin si orientino con la componente lungo l'asse z del momento magnetico parallela al campo magnetico applicato B_0 , orientamento a cui corrisponde uno stato di minor energia rispetto a quello opposto al campo. Questo stato di spin viene denominato α , mentre quello a maggiore energia è chiamato β .

La spettroscopia NMR non misura direttamente la magnetizzazione M_0 indotta sui nuclei dal campo magnetico B_0 in quanto è molto debole, bensì viene misurata la magnetizzazione perpendicolare al campo B_0 che viene creata grazie all'applicazione di un campo magnetico oscillante B_1 .

La **Figura 2.1A** mostra che l'applicazione del campo magnetico B_0 non crea una magnetizzazione osservabile nel piano xy . Invece applicando il campo magnetico B_1 , che è un campo oscillante alla stessa frequenza del moto di precessione dei momenti magnetici di spin e con direzione perpendicolare a B_0 , viene indotta la rotazione della magnetizzazione M_0 che ha ora una componente sul piano xy (**Figura 2.1B**). Una volta terminato l'impulso è possibile studiare come evolve la magnetizzazione trasversale M_{xy} nel suo moto di precessione per tornare alla condizione di equilibrio $M_z=M_0$ (**Figura 2.1C**). Il moto di precessione di M_{xy} viene rivelato attraverso una spira posta perpendicolarmente al campo magnetico statico B_0 .

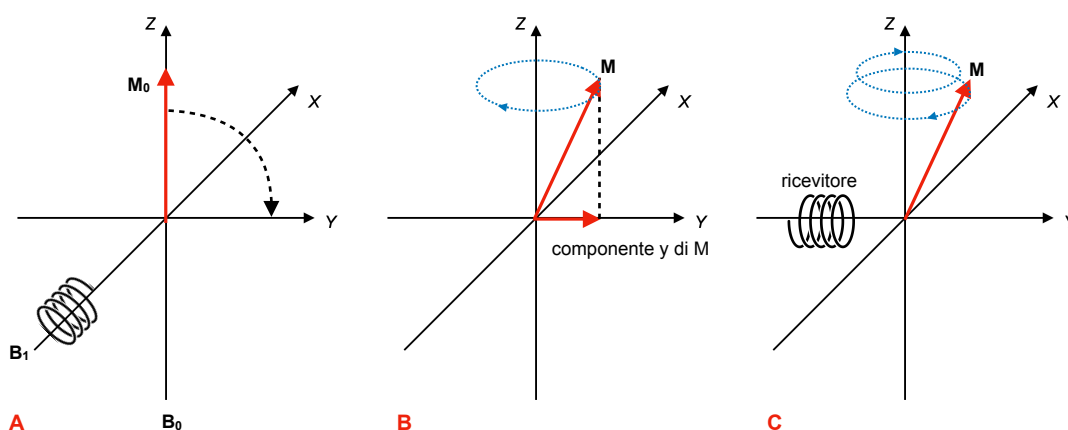


Figura 2.1 (A) e (B) Trasferimento della magnetizzazione sul piano xy ; (C) ritorno della magnetizzazione lungo l'asse z .

È di fondamentale importanza la contemporanea presenza dei campi magnetici B_0 e B_1 in quanto le rispettive interazioni con i momenti magnetici di spin nucleari del sistema comportano che:

- con il campo B_0 si ottiene la separazione dei livelli energetici di spin;
- con il campo B_1 si ottiene la transizione tra i livelli energetici di spin

La corrente risultante è dipendente dal tempo. Per tornare alla condizione di equilibrio il moto di precessione attua un decadimento smorzato ossia il sistema decade gradualmente grazie a fenomeni di:

- rilassamento trasversale spin-spin (T_2);
- rilassamento longitudinale spin-reticolo (T_1).

Viene acquisita una traccia in funzione del tempo detta FID. Applicando la trasformata di Fourier si è in grado di passare dal dominio dei tempi al dominio delle frequenze che permette di ottenere lo spettro NMR.

Il chemical shift δ di un dato nucleo è la differenza tra la frequenza di risonanza del nucleo stesso ν e quella di uno standard ν_{rif} . Nel caso di ^1H NMR, la frequenza di riferimento ν_{rif} è la frequenza di risonanza dei protoni di un composto standard (per esempio il tetra-metil-silano TMS). Il chemical shift δ si esprime in ppm ed è definito dalla relazione [2.5].

$$\delta = \frac{\nu - \nu_{rif}}{\nu_0} \quad [2.5]$$

Il valore del chemical shift di ciascun nucleo è dovuto al fatto che i momenti magnetici nucleari risentono di un campo magnetico locale B_{eff} , che è diverso dal campo magnetico esterno B_0 . In una molecola il campo magnetico effettivamente risentito dal nucleo (B_{eff}) dipende dal suo intorno chimico e crea uno shift della frequenza di Larmor ν_L di entità diverse a seconda degli atomi vicini. Nuclei dello stesso elemento ma appartenenti a gruppi chimici diversi presentano frequenze di Larmor ν_L diverse perché hanno costanti di schermo σ diverse.

$$B_{eff} = B_0(1 - \sigma) \quad [2.6] \qquad \nu_L = \frac{\gamma \cdot B_{eff}}{2\pi} = \frac{\gamma}{2\pi} \cdot B_0(1 - \sigma) \quad [2.7]$$

Dall'equazione [2.7] si evince che la frequenza di Larmor ν_L dipende dal campo magnetico applicato, mentre il chemical shift no. Quindi per un determinato nucleo in una molecola troviamo lo stesso chemical shift indipendentemente dal campo magnetico utilizzato per l'analisi.

La **Figura 2.2** mostra lo spettro ^1H NMR dell'etanolo.

I segnali dei protoni dei gruppi $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}_2$ sono in realtà dei multipletti e non delle semplici righe. Lo spettro infatti presenta una struttura fine dovuta dall'interazione del momento magnetico di spin di un nucleo con i momenti magnetici di spin dei nuclei vicini.

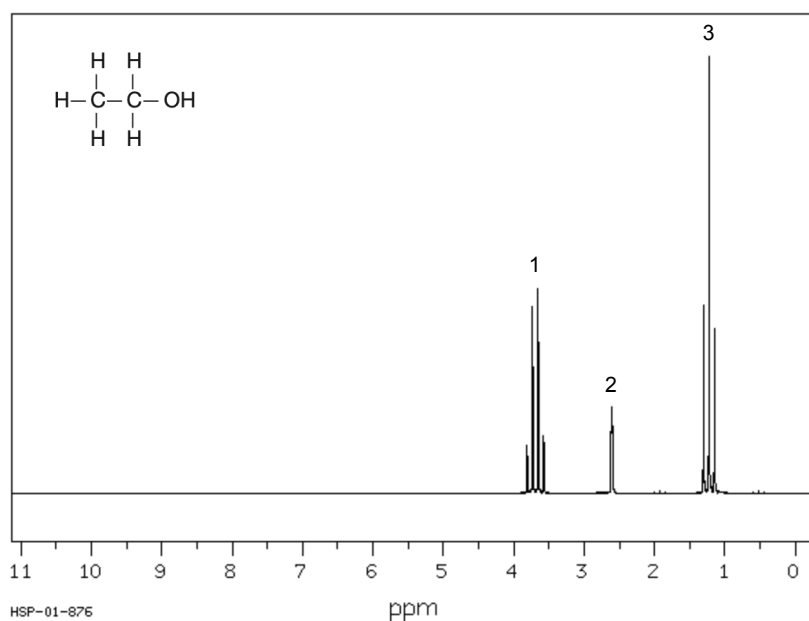


Figura 2.2 Spettro ^1H NMR 90MHz in CDCl_3 dell'etanolo $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$

L'interazione prende il nome di accoppiamento scalare o accoppiamento spin-spin, si tratta di un'interazione isotropa indiretta che avviene grazie agli elettroni di legame. L'accoppiamento scalare si propaga attraverso i legami e quindi dipende dalla mutua posizione dei nuclei e dalla tipologia di legame che li unisce. La forza dell'interazione tra i momenti magnetici di spin dei nuclei si esprime in funzione della costante di accoppiamento J (Hz), questa è indipendente dal campo magnetico B_0 . Gli accoppiamenti scalari che avvengono tra i nuclei forniscono informazioni importanti relativamente al numero e alla disposizione degli altri nuclei della molecola in esame.

2.1 ^1H NMR IN SOLUZIONE

La spettroscopia ^1H NMR in soluzione è la metodologia maggiormente utilizzata nello studio della chimica degli alimenti. Il principale vantaggio dell'utilizzo del NMR con campione in soluzione è l'ottenimento di spettri con buona risoluzione.

Si tratta di una tecnica che può essere applicata direttamente ad alimenti liquidi ma anche ad alimenti solidi in seguito a processi di estrazione.

Lo scopo dell'estrazione con solvente è trasferire in soluzione i componenti della matrice alimentare solida. Gli alimenti contengono una vasta gamma di metaboliti di diversa natura e polarità, è possibile sfruttare questa ultima caratteristica per estrarre componenti diversi a seconda del solvente utilizzato.

Se l'estrazione è stata effettuata con solvente non deuterato, esso viene allontanato, altresì darebbe origine nello spettro ad uno o più segnali protonici molto intensi che nasconderebbero i segnali delle sostanze estratte.

L'estratto ottenuto viene sciolto in un solvente deuterato e posto nel tubo NMR.

L'uso del solvente deuterato ha un duplice effetto:

- il nucleo di deuterio non interferisce con i segnali dei protoni ^1H perché ha momento angolare di spin diverso da quello del protio;
- permette di mantenere costante la frequenza del campo magnetico statico B_0 durante l'esperimento grazie al costante monitoraggio della frequenza del segnale del deuterio (sistema di lock).

Sono possibili, comunque, acquisizioni in acqua con la presenza di solo il 10% di D_2O grazie ad opportune sequenze in grado di sopprimere il segnale dell' H_2O .

2.2 HRMAS NMR

La spettroscopia High Resolution Magic Angles Spinning NMR è importante nella chimica degli alimenti in quanto permette di analizzare matrici dalla consistenza solida o semisolida ed ottenere spettri NMR con una risoluzione simile, se non pari, a quelli ottenuti in fase liquida⁽¹⁾.

Rispetto alla spettroscopia NMR in soluzione la HRMAS NMR permette di:

- evitare l'utilizzo di tecniche estrattive o di separazione che potrebbero danneggiare la natura del campione ed essere dispendiose in termini economici/temporali;
- ottenere spettri in cui sono contemporaneamente presenti i segnali dei metaboliti idrofilici e lipofilici.

La tecnica si basa sulla rapida rotazione del campione attorno ad un asse che forma un angolo $\theta = 54,7^\circ$ rispetto al campo magnetico statico B_0 (diretto lungo l'asse z)⁽¹⁾.

Allo stato solido l'interazione dipolare tra gli spin varia in dipendenza all'orientamento della molecola rispetto alla direzione del campo magnetico statico B_0 , le interazioni dipolari sono quindi anisotrope. Questa è una differenza fondamentale rispetto allo stato liquido in cui le interazioni dipolari venivano mediate dal rapido moto molecolare.

È possibile quindi constatare che per sopperire all'anisotropia bisogna lavorare ad alte velocità di rotazione quando si è in presenza di campioni solidi cristallini. Nei semisolidi la maggior mobilità molecolare media parzialmente l'effetto dell'interazione dipolare.

Nonostante la rapida rotazione intorno all'angolo magico, gli effetti dell'anisotropia rimangono visibili nello spettro HRMAS sotto forma di segnali aggiuntivi. Questi segnali prendono il nome di "spinning sideband" e si trovano ai margini dei picchi presenti nello spettro, la loro presenza rischia di "nascondere" i segnali del campione. È possibile spostare le spinning sideband aumentando la velocità di rotazione ma occorre tenere in considerazione il rischio di danneggiamento del campione a causa della forza centrifuga.

3. IL LATTE

Il latte è un liquido bianco secreto dalle ghiandole mammarie delle femmine dei mammiferi dopo il parto. Si tratta del prodotto ottenuto dalla mungitura regolare, ininterrotta e completa di animali in buono stato di salute e nutrizione.

Con il termine latte si intende il latte vaccino, altrimenti occorre specificare l'animale.

La composizione chimica (Figura 3.1) del latte varia in base a diversi fattori tra cui specie, razza ed alimentazione dell'animale ma anche dall'area geografica in cui vive, dal numero di mungiture e dallo stadio di lattazione.

Dal punto di vista chimico il latte è un sistema con caratteristiche complicate rispetto ai singoli componenti presi separatamente. È costituito da diverse fasi tra loro in equilibrio:

- fase acquosa, detta siero, dove sono disciolti lattosio, sieroproteine, sali minerali e vitamine idrosolubili;
- dispersione colloidale di aggregati proteici di caseina e sali di fosfato di calcio;
- fase in emulsione composta dalla frazione di lipidi e vitamine liposolubili;
- sospensione di microrganismi e cellule somatiche derivanti dallo sfaldamento della ghiandola mammaria.

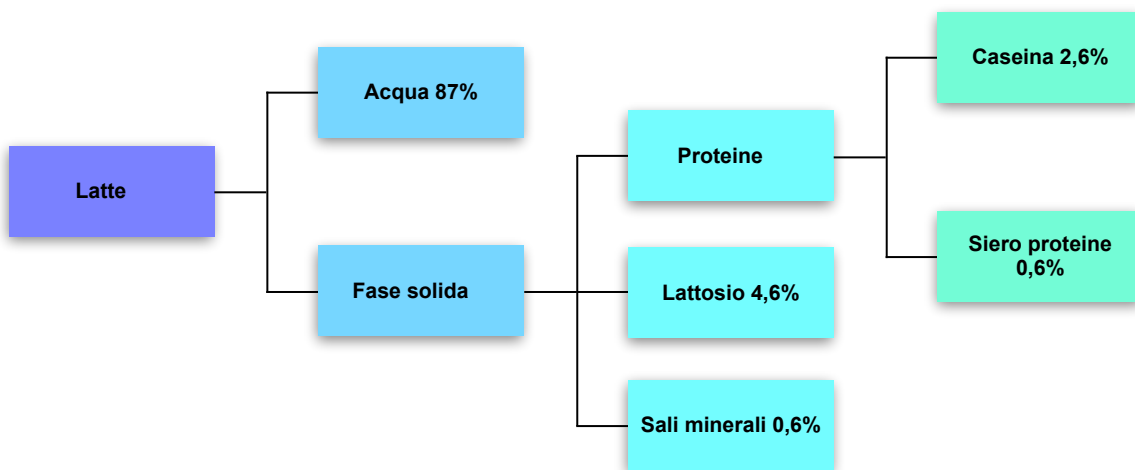


Figura 3.1 Composizione chimica del latte vaccino

Il latte crudo non trattato termicamente è uno “specchio” delle condizioni di igiene della stalla e della qualità del processo di mungitura. Per poter essere messo in commercio occorre che il latte crudo abbia una filiera produttiva corta, provenga da animali sani e che sia stato munto in condizioni igieniche perfette.

Il latte crudo prodotto nel massimo rispetto delle norme presenta una carica batterica patogena bassa ma può fungere da terreno di coltura per lo sviluppo di microrganismi patogeni, come la salmonella. Se non refrigerato questo prodotto ha una shelf life di qualche ora altrimenti si può conservare per al massimo una giornata.

Per aumentare il tempo di conservazione del latte è necessario sottoporlo a trattamenti termici (pastorizzazione/sterilizzazione) così da poter assicurare la morte dei microrganismi. Questi processi vengono regolati in modo tale da aver il minor impatto possibile sulle caratteristiche organolettiche del prodotto.

3.1 LE PROTEINE DEL LATTE: CASEINE E SIEROPROTEINE

Le caseine rappresentano circa l'80% di tutta la composizione proteica, ne esistono tre tipologie diverse: α -caseina, β -caseina (fosfo-proteine) e κ -caseina (glicoproteina). Le α/β -caseine sono ricche in prolina, ciò rende difficile per queste proteine avere una struttura secondaria e terziaria.

Per questa mancanza, quando le caseine si trovano in soluzione acquosa tendono ad aggregarsi in modo da minimizzare l'esposizione dei residui idrofobici (Figura 3.2A) formando le submicelle di caseina. Le submicelle si aggregano grazie a dei legami che si formano tra i residui fosforilati delle α/β -caseine con il calcio fosfato colloidale (Figura 3.2B) a formare le micelle.

La κ -caseina non essendo in grado di legare il calcio, rimane esposta al solvente ed il gruppo $-\text{COO}^-$ terminale (carico negativamente) funge un'azione colloidal-protettrice, è quindi fondamentale per mantenere in soluzione le micelle.

Dal punto di vista fisiologico l'aggregazione delle caseine in micelle è cardinale in quanto:

- se le proteine non fossero aggregate, considerando la loro elevata concentrazione, si avrebbe una soluzione troppo viscosa per la secrezione;
- grazie all'inglobamento del calcio fosfato colloidale viene raggiunta una quantità di calcio notevole senza che avvenga la precipitazione dei cristalli di $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

Le sieroproteine costituiscono il rimanente 20% del contenuto proteico del latte. Si tratta di proteine globulari ad alto valore biologico ricche in cisteina.

Le principali sono le lattoalbumine, le lattoglobuline e le immunoglobuline. Queste ultime derivano dal plasma dell'animale e costituiscono la barriera anticorpale necessaria per combattere la presenza di virus o batteri.

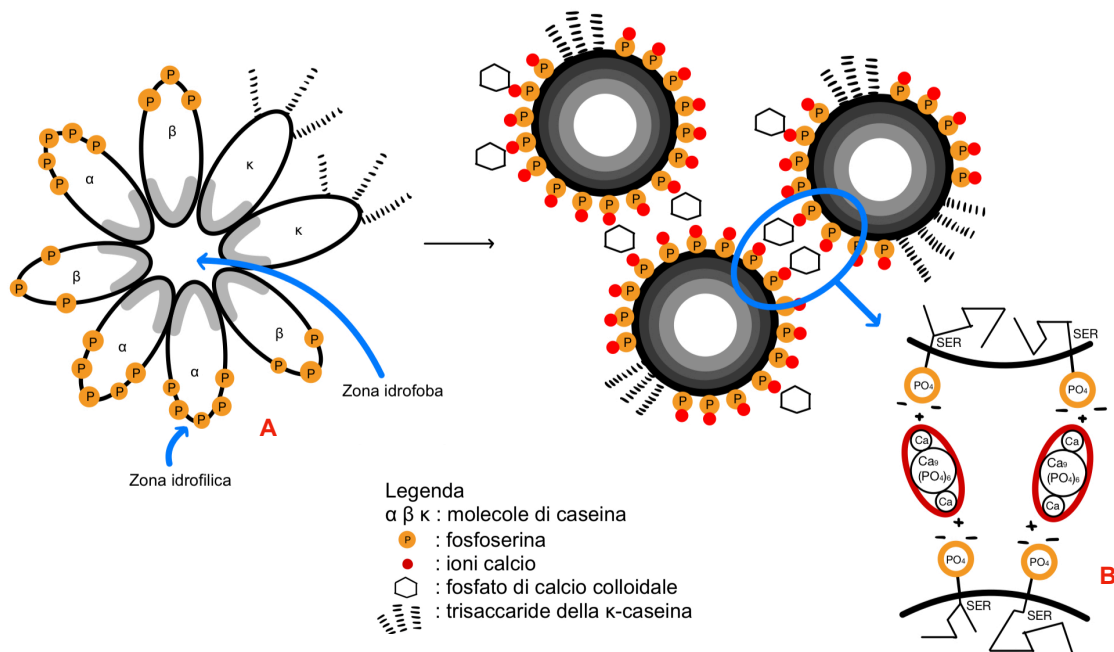


Figura 3.2 Step di formazione delle micelle di caseina con ingrandimento su: **(A)** sezione trasversale di una submicella; **(B)** legame dei residui fosforilati α/β -caseine con il fosfato di calcio colloidale $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

3.2 GLUCIDI DEL LATTE

Il lattosio è lo zucchero principale ed è caratteristico esclusivamente del latte. Si tratta di un disaccaride composto da D-glucosio e D-galattosio uniti tramite legame β -1,4-glicosidico. Esso funge da substrato per la fermentazione lattica ma è anche responsabile, insieme alle proteine, dell'imbrunimento non enzimatico per effetto del calore (reazione di Maillard). È possibile trovare anche oligosaccaridi nel latte ma a concentrazioni molto inferiori rispetto al lattosio.

3.3 LIPIDI DEL LATTE

La componente lipidica è organizzata sotto forma di globuli sferici costituiti da un core di trigliceridi a basso P.M. (98%) ed in quantità minoritarie fosfolipidi ed insaponificabili (colesterolo), il tutto è avvolto da una membrana lipoproteica. La membrana è formata da un doppio strato fosfo-lipidico, questa ha sia lo scopo di proteggere il latte da un eventuale irrancidimento ad opera della lipolisi ma anche di permettere ai globuli lipidici di dimorare in soluzione acquosa sotto forma di emulsione. Tra i due strati della membrana si trovano le vitamine liposolubili.

I globuli sferici sono secreti tal quali dalla ghiandola mammaria. Nel latte fresco lasciato a sé i globuli tendono a separarsi dalla soluzione e disporsi sulla superficie, si forma un sottile strato giallastro detto panna o crema. L'affioramento della crema è importante perché i globuli trascinano con loro anche la maggior parte dei microrganismi che hanno contaminato il latte successivamente alla mungitura.

La frazione lipidica del latte è composta principalmente da triacilgliceroli e, in misura minore, da fosfolipidi, diacilgliceroli, colesterolo, acidi grassi liberi, esteri del colesterolo e carotenoidi. Il profilo degli acidi grassi del latte è uno dei più complessi in natura: dipende dall'alimentazione dell'animale, dallo stadio di lattazione, dalla razza e da caratteristiche individuali. Il contenuto in acidi grassi a lunga catena dipende dalla dieta dell'animale; gli acidi grassi a catena corta sono sintetizzati dalla ghiandola mammaria (sono quindi specifici per ogni diversa specie)⁽²⁾.

Gli acidi grassi che esterificano il glicerolo sono per lo più acidi grassi saturi compresi tra il C:4 ed il C:20. Sono presenti anche acidi grassi insaturi in frazione minoritaria, fra questi gli omega-3, gli omega-6 e i CLA rappresentano la frazione lipidica che può avere possibili effetti benefici sulla salute umana ed infatti sono oggetto di studio. I CLA sono un gruppo di isomeri posizionali e geometrici dell'acido linoleico caratterizzati dalla presenza di due doppi legami coniugati in conformazione trans, il principale è l'acido octadecadienoico cis-9, trans-11 (acido rumenico).

Il titolo di grassi contenuti nel latte può essere modificato con la scrematura, si esegue la centrifugazione del liquido fino alla separazione della crema, questa viene poi riaggiunta al siero in quantità che dipende dalla tipologia di latte che si vuole:

- latte intero: sostanza grassa maggiore del 3,5%
- latte parzialmente scremato: sostanza grassa compresa tra 1,5% - 1,8%
- latte scremato: sostanza grassa inferiore allo 0,5%

4. IL FORMAGGIO

L'art. 32 del R.D.L n. 2033/1925, come modificato poi dall'art. N. 261/1933, recita: “ il nome ‘formaggio’ o ‘cacio’ è riservato al prodotto che si ricava dal latte intero o parzialmente o totalmente scremato, oppure dalla crema in seguito a coagulazione acida o presaminica, anche facendo uso di fermenti e di sale da cucina”.

In commercio si trova una grande varietà di tipologie di formaggio che sono classificabili a seconda del tipo di latte utilizzato, contenuto in grassi, consistenza della pasta, periodo di stagionatura. Alcuni formaggi possono avere il marchio DOP (denominazione di origine protetta), si tratta di un'etichetta creata dall'Unione Europea con lo scopo di salvaguardare e promuovere prodotti alimentari di alta qualità di specifiche aree geografiche ottenuti con procedimenti tradizionali unici nel rispetto del “disciplinare di produzione” (Commissione Europea, 2012).

Nonostante la grande varietà di formaggio, il principio di caseificazione è comune alle diverse tipologie: preparazione del latte, coagulazione, rottura della cagliata, cottura, messa in forma, salatura e maturazione.

La composizione chimica del formaggio dipende da molteplici fattori:

- dal tipo di latte utilizzato e dalla razza dell'animale, ciò determina in particolar modo il contenuto proteico e lipidico del prodotto;
- dal tipo di coagulazione a cui viene sottoposto il latte e dalla tipologia di microrganismi utilizzati per iniziare e mantenere il processo fermentativo;
- dal tempo di stagionatura;
- da procedimenti che attua il casaro che sono spesso legati alle tradizioni agricole dell'area geografica di produzione.

4.1 COAGULAZIONE

Come precedentemente descritto nel paragrafo 2.1 le caseine sono delle proteine ricche in prolina che fanno quindi fatica ad avere una struttura secondaria. In condizioni fisiologiche del latte le micelle di caseine non coagulano perché a pH neutro hanno una superficie carica negativamente (particelle con carica uguale si respingono). Le caseine coagulano per acidificazione o per l'azione di enzimi.

La scelta del tipo di coagulazione è a discrezione del casaro in base alle caratteristiche del latte e del tipo di formaggio che si intende produrre.

La coagulazione acida avviene per diminuzione del pH ad opera di fermenti lattici che possono essere naturalmente presenti nel latte o aggiunti dal casaro dopo una selezione laboratoriale (innesto). Quando il pH raggiunge un valore inferiore al punto isoelettrico (4,6) il gruppo $-COO^-$ terminale della κ -caseina viene protonato; le micelle perdono la loro carica negativa e viene meno la repulsione elettrostatica. Le micelle iniziano ad aggregarsi e coagulano inglobando i globuli di grasso, si forma la cagliata.

La coagulazione presaminica avviene tramite l'aggiunta di presame, o caglio, al latte portato alla temperatura di 37 °C. Il caglio contiene la chimosina, un enzima proteolitico che "taglia" la catena C-terminale della κ -caseina, con conseguente perdita delle capacità colloidale-protettrice nei confronti delle micelle di caseina. Normalmente si utilizza caglio animale che viene estratto dallo stomaco di ruminanti non svezzati; esiste anche una varietà di caglio vegetale.

4.2 MATURAZIONE O STAGIONATURA

In questa fase ha luogo una serie di trasformazioni enzimatiche che portano il formaggio ad avere determinate caratteristiche organolettiche (aroma, consistenza, colore, sapore). Gli enzimi possono essere sia quelli naturalmente presenti nel latte di partenza, quelli usati come innesto nel processo di coagulazione o quelli che hanno contaminato il prodotto nel decorso della caseificazione.

Si possono avere processi di:

- lipolisi dei triacilgliceroli con formazione di glicerolo ed acidi grassi liberi, questi vengono ulteriormente degradati ad aldeidi, chetoni o alcoli.
- proteolisi a carico delle proteine con formazioni di amminoacidi che vengono degradati a formare ammine, composti solforati, CO_2 ed acidi organici.
- fermentazione lattica.

5. APPLICAZIONI NMR NEL LATTE

La valutazione della qualità del latte non è un processo semplice sia per la complessità della matrice ma anche perché è la risultante di un insieme di fattori quali per esempio igiene delle stalle. L'applicazione della spettroscopia NMR permette di ottenere informazioni precise e dettagliate per quanto riguarda la composizione in relazioni a variabili come: l'origine animale, la razza, la salubrità ed il tipo di alimentazione delle bovine.

Oltre che per studiarne la composizione, la spettroscopia NMR viene applicata anche per identificare la presenza di possibili frodi. Tra le frodi che più comunemente interessano il latte vi è la vendita di latte scremato o parzialmente scremato come se fosse latte intero, la diluizione con acqua, acqua ossigenata per ridurre la carica batterica elevata, la sottrazione di grasso, l'aggiunta di acqua, la vendita di latte ottenuto dalla ricostituzione del latte in polvere e di latte acidificato neutralizzato con l'aggiunta di soda.

5.1 COMPONENTE IDROFILA DEL LATTE

La frazione idrofila del latte è composta principalmente da proteine, dal lattosio ed in quantità molto inferiore anche da metaboliti a basso P.M. (amminoacidi, acidi organici, ecc. ecc.). Per poter svolgere studi su questa frazione e analizzarne anche i componenti minoritari è necessario preventivamente eliminare la parte proteica e la lipofila del campione; si utilizzano per lo più metodi di estrazione a freddo che prevengono l'ossidazione dei lipidi e ne preservano la composizione originale. Il metodo più utilizzato a tale scopo è l'ultrafiltrazione del campione.

In **Figura 5.1** si riporta lo spettro ^1H NMR di un campione di latte vaccino ultrafiltrato (U.K. Sundekilde, 2013)⁽³⁾: sono qui evidenziati i segnali relativi ai metaboliti a basso P.M. nella zona compresa tra 3-1ppm, la zona centrale è invece dominata dalla risonanza del lattosio.

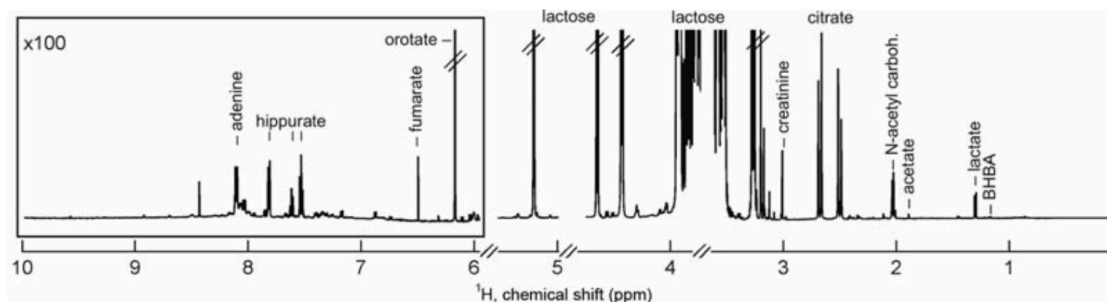


Figura 5.1 Spettro ^1H NMR di un campione di latte ultrafiltrato con un ingrandimento x100 della zona compresa tra i 10-6ppm (Sundekilde et al., 2013)⁽³⁾

5.1.1 Adulterazioni

Il latte vaccino è il latte più consumato nel mondo, tuttavia la domanda di latte di capra sta aumentando notevolmente soprattutto perché ha un valore nutrizionale superiore. Il latte di capra viene prodotto stagionalmente con un tasso di produzione di gran lunga inferiore rispetto al latte vaccino; considerando anche il suo sapore unico e la sua complessità aromatica è facile rendersi conto come il prezzo di questo alimento sia nettamente superiore.

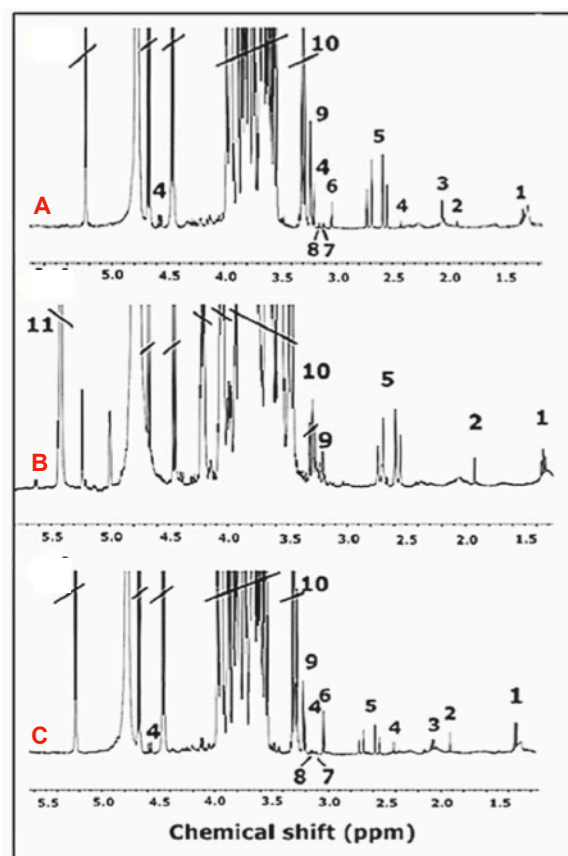
Tutti questi fattori contribuiscono a rendere il latte caprino il candidato perfetto per subire adulterazioni, ossia una frode alimentare in cui ad un latte ad alto valore viene addizionato un latte a basso valore in modo tale da aumentare i profitti dei produttori. Per la legge italiana viene considerata adulterazione l'aggiunta di latte vaccino superiore allo 0,5%.

Un'altra tipologia frequente di adulterazione è quella di aggiungere latte di soia nel latte sia vaccino che caprino. Il latte di soia è un valido adulterante in quanto è economico ed ha una composizione proteica simile a quella degli altri latti.

Si riportano i risultati dello studio condotto da Qiangqiang Li et al. (2016)⁽⁴⁾. Dall'analisi degli spettri ¹H NMR delle frazioni idrofiliche di campioni di latte puro di diversa specie (**Figura 5.2**) è stata evidenziata l'esistenza di 10 biomarcatori per l'autenticazione del latte: carnitina, N-acetilcarboidrati, acetato, colina, etanolamina, citrato, creatina, lecitina, D-saccarosio e D-lattosio. È stato identificato anche il lattato come biomarcatore, tuttavia questo metabolita non è stato utilizzato per la caratterizzazione in quanto si sovrappone con altri picchi.

Dalla differente concentrazione dei 10 biomarcatori nei differenti campioni di latte puro di diversa specie (**Tabella 1**) è possibile concludere che:

- il latte vaccino contiene una quantità maggiore di N-acetilcarboidrati, etanolamina, citrato e lecitina rispetto al latte di capra;
- nel latte caprino sono presenti quantità maggiori di acetato, carnitina e creatina rispetto che il latte vaccino (ciò riflette il maggiore valore nutrizionale del latte di capra);
- il latte di soia contiene metaboliti differenti da entrambi e solamente acetato, citrato, lecitina e D-lattosio sono presenti in concentrazioni tali da poter essere quantificati. Tuttavia nel latte di soia è presente D-saccarosio in elevate concentrazioni che è invece assente nelle altre due tipologie di latte.



ATTRIBUZIONE DEI PICCHI	
1	Lattato
2	Acetato
3	N-acetilcarboidrati
4	Carnitina
5	Citrato
6	Creatina
7	Etanolamina
8	Colina
9	Lecitina
10	D-lattosio
11	D-saccarosio

Figura 5.2 Spettri ^1H NMR, registrati a 400MHz, di un campione di (A) latte vaccino, (B) latte di soia, (C) latte caprino. (Qiangqiang L 2016)⁽⁴⁾

Tabella 1 Attribuzioni dei picchi degli spettri della Figura 5.2

METABOLITI	LATTE VACCINO	LATTE CAPRINO	LATTE DI SOIA
Carnitina	0.33 ± 0.03a	0.43 ± 0.07b	ND
N-acetilcarboidrati	2.09 ± 0.15a	1.39 ± 0.17b	ND
Acetato	0.27 ± 0.05a	0.50 ± 0.13b	0.66 ± 0.13b
Colina	0.04 ± 0.01a	0.03 ± 0.01b	ND
Etanolamina	0.25 ± 0.03a	0.15 ± 0.04b	ND
Citrato	4.64 ± 0.42a	2.92 ± 0.54b	5.88 ± 0.52c
Creatina	1.22 ± 0.07a	1.45 ± 0.16b	ND
Lecitina	0.94 ± 0.07a	0.69 ± 0.07b	0.23 ± 0.03c
D-lattosio	128.10 ± 5.58a	108.61 ± 9.75b	8.90 ± 4.87c
D-saccarosio	ND	ND	174.24 ± 13.53

Tabella 2 Concentrazione dei 10 metaboliti caratteristici nei differenti campioni di latte puro (mmol L^{-1}). I valori sono espressi con la loro deviazione standard. (Qiangqiang L 2016)⁽⁴⁾

Per identificare la presenza di una possibile adulterazione sono stati analizzati 115 spettri ^1H NMR delle frazioni idrofiliche di campioni di latte vaccino e caprino a cui è stata addizionata una quantità nota di latte di soia, e campioni di latte caprino a cui è stato addizionato una quantità nota di latte vaccino. Dall'impiego in sincrono della spettroscopia ^1H NMR con metodi di analisi statistica multivariata ed univariata si è evinto che un'abbondanza di N-acetilcarboidrati nel latte caprino è correlabile positivamente con un'aggiunta di latte vaccino. Con questo metodo è possibile rivelare aggiunte del 2% (v/v) di latte di soia in latte vaccino o caprino con una precisione dell'85%, ed aggiunte del 5% di latte vaccino in latte caprino con una precisione del 90%.

5.1.2 Fisiologia dell'animale

Come descritto in precedenza oltre che per casi di frode alimentare, l'applicazione della spettroscopia NMR può essere utilizzata anche per ottenere informazioni sulla fisiologia delle bovine. La salubrità dell'animale è uno dei requisiti essenziali per il processo di mungitura, il latte proveniente da una vacca non in salute non è commerciabile.

Una delle malattie più comuni tra le vacche da latte è la mastite bovina. Questa condizione può essere valutata attraverso il conteggio delle cellule somatiche (SCC somatic cell count) nel latte, si tratta di un parametro accettato a livello internazionale in quanto il valore di SCC è strettamente associato all'infiammazione. Sfortunatamente la mastite non è facilmente rilevabile poiché non esistono indicatori visivi dell'infiammazione, tuttavia questa condizione, oltre a causare un cambiamento nel profilo proteico (C.J. Hogarth, 2004)⁽⁵⁾, comporta un afflusso di diversi metaboliti nel latte.

Dati questi presupposti si giunge alla conclusione che è possibile evidenziare la presenza di mastite bovina tramite analisi ^1H NMR. Secondo la letteratura esistente (U.K. Sundekilde et al., 2013)⁽⁶⁾, confrontando spettri ^1H NMR della frazione idrofila del latte provenienti da due razze bovine diverse, con differenti valori di SCC, si notano delle differenze correlabili con i livelli di SCC (**Figura 5.3**).

Il latte avente alti valori di SCC mostra contenuti maggiori in butirrato, β -idrossibutirrato (BHBA), isoleucina, lattato e acetato; viceversa lattosio, fumarato, ippurato e citrato diminuiscono. In animali sani invece, con basso SCC, si verifica l'esatta situazione opposta. L'utilizzo della spettroscopia NMR può essere tempestivo nella diagnostica della mastite bovina.

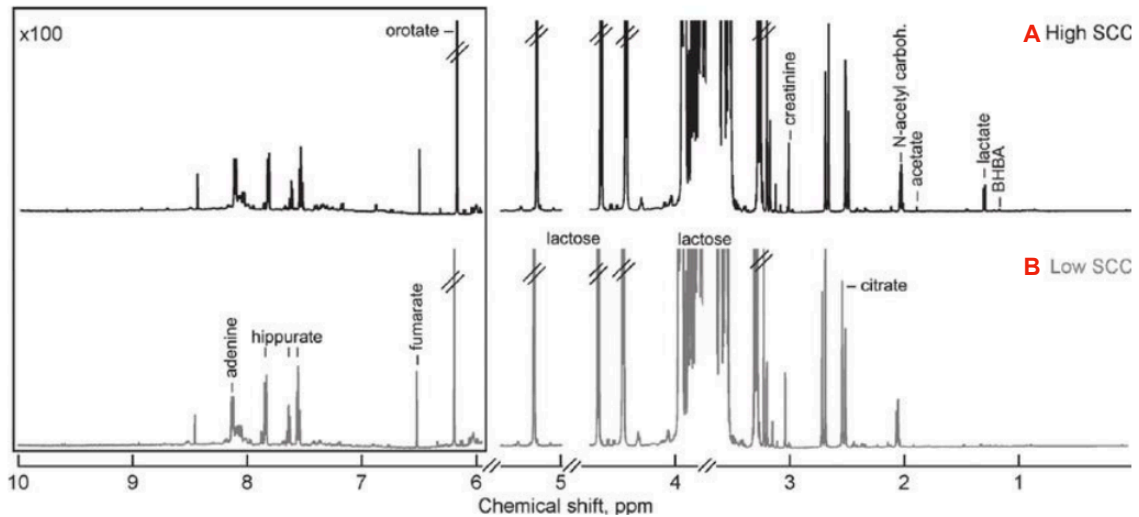


Figura 5.3 Spettri ^1H NMR, registrati a 600MHz, relativi a due soggetti rispettivamente con valori alti di SCC (**A**) e bassi valori di SCC (**B**) (Sundekilde et al., 2013)⁽⁶⁾.

5.2 COMPONENTE LIPIDICA DEL LATTE

Come descritto nel paragrafo 2.3 la frazione lipidica del latte è composta principalmente da triacilgliceroli la cui composizione in acidi grassi varia in base all'alimentazione e alla specie. Lo spettro NMR al nucleo di ^{13}C dell'estratto lipidico consente la caratterizzazione quali-quantitativa di tale frazione: l'analisi dello spettro permette la differenziazione degli acidi grassi, sia saturi sia insaturi, e la loro distribuzione posizionale sul glicerolo.

La **Figura 5.4** mostra lo spettro ^{13}C NMR della frazione lipidica estratta da un latte di bufala riportato in uno studio condotto da Mazzei et. al (2008)⁽⁷⁾.

Nella regione tra 30-10ppm si trovano i segnali dei carboni alifatici delle catene laterali degli acidi grassi, tra i 60-70 ppm i segnali del glicerolo. Nella regione spettrale compresa tra 120-140 ppm risuonano i carboni olefinici mentre intorno ai 170-180 ppm risuonano gli atomi di carbonio carbonilici e carbossilici

Per uno stesso acido grasso i segnali sono diversi a seconda della diversa posizione sul glicerolo (*Sn-1,3* o *Sn-2*) e dell'eventuale saturazione (S) / insaturazione (U) della catena acilica.

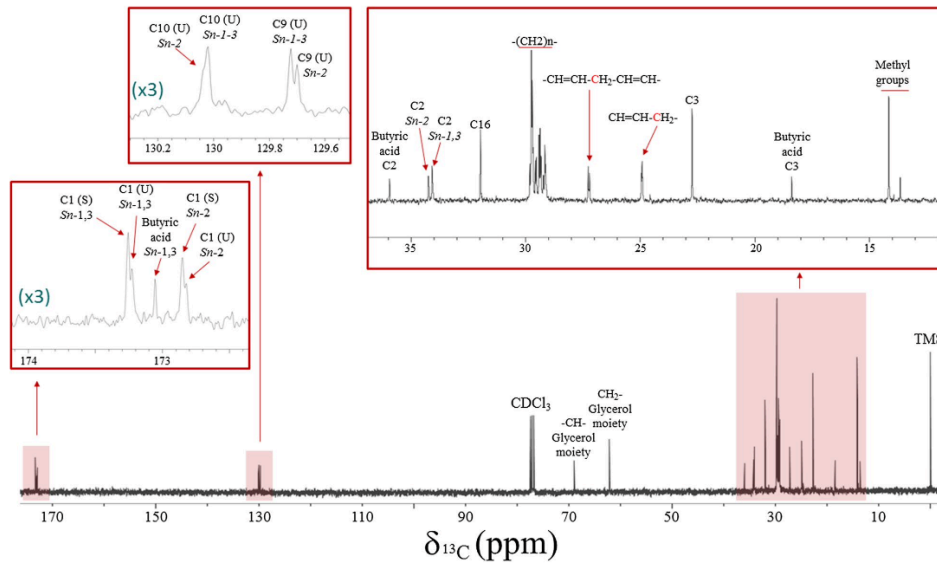


Figura 5.4 Spettro ^{13}C NMR ,registrato a 400MHz, relativo alla frazione lipidica di un campione di latte di bufala. La figura riporta anche le relative assegnazioni dei picchi. Le regioni riquadrate in rosso sono ingrandite rispettivamente di 3 volte rispetto alla zona a campi bassi. (Mazzei et al. 2018)⁽⁷⁾.

5.2.1 Latti di diverse specie

Partendo dal presupposto che la frazione lipidica del latte dipende dalla specie (quindi dalla genetica dell'animale), è allora possibile sfruttare la spettroscopia ^{13}C NMR per trovare alcuni parametri che possono identificare inequivocabilmente la specie basandosi sul profilo lipidico del latte.

Nello studio condotto da Andreotti et al. (2016)⁽⁸⁾ sono stati analizzati gli spettri ^{13}C NMR della frazione lipidica di campioni di latte provenienti da ruminanti differenti (capra, pecora, vacca, bufala). Dalla comparazione degli spettri dei 4 campioni si è evinto che le frazioni lipidiche del latte di capra e pecora sono simili, così come quelli di latte di vacca e bufala. Viene riportata in **Figura 5.5** l'equiparazione tra le regioni ω_2 e ω_3 degli spettri ^{13}C NMR della frazione lipidica del latte di pecora (**Figura 5.5B**) e vacca (**Figura 5.5A**), qui si osservano le maggiori differenze da specie a specie. In **Tabella 4** si riportano la composizione percentuale degli acidi grassi ricavata dagli spettri.

I dati ottenuti dagli autori⁽⁸⁾ permettono di distinguere correttamente i campioni di latte di capra da quelli di pecora e ciascuno di essi dai campioni di latte di vacca e di bufala. Si osservano differenze a carico degli acidi grassi a catena corta. In particolare sia il latte di capra che quello di pecora hanno un contenuto superiore in acido caproico e caproleico, ciò è in parte compensato da una diminuzione della quantità di acido butirrico che invece è presente in quantità notevoli nel latte di vacca e bufala.

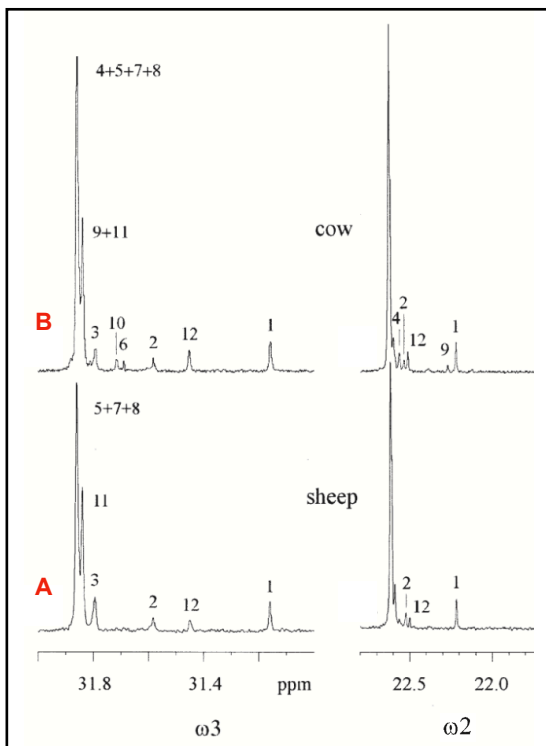


Figura 5.5 Regione ω_2 e ω_3 degli spettri ^{13}C NMR, registrati a 75,5MHz, relativi alla frazione lipidica di campioni di latte di vacca (A) e pecora (B). (Andreotti et al. 2016)⁽⁸⁾

ATTRIBUZIONE DEI PICCHI	
1	Acido Caproico
2	Acido Caproleico
3	Acido Caprico
4	Acido Laurico
5	Acido Miristico
6	Acido Pentadecanoico
7	Acido Palmitico
8	Acido Stearico
9	Acido Miristoleico
10	Acido Palmitoleico
11	Acido Oleico
12	Acido Linoleico
13	Acido α -linolenico

Tabella 3 Attribuzioni dei picchi degli spettri della Figura 5.5. L'identificazione dei picchi è stata ottenuta tramite comparazione con standard di acidi grassi.

ACIDI GRASSI	Composizione (mol%)			
	vacca	bufala	pecora	capra
Butirrico	10.1	10.7	9.3	6.6
Caproico	4.6	3.9	4.7	5.0
Caproleico	2.0	1.5	3.0	4.1
Caprico	3.1	1.6	8.6	12.8
Pentadecanoico	1.4	0.9	1.2	ND
Laurico, Miristico, Palmitico, Stearico	52.0	52.3	42.8	45.1
Palmitoleico	1.9	2.6	1.0	ND
Oleico, Miristoleico	18.5	20.7	21.6	18.2
Linoleico	3.3	2.7	1.9	1.8
Linolenico	ND	1	2.4	0.7

Tabella 4 Composizione percentuale (mol) in acidi grassi delle frazioni lipidiche dei campioni di latte provenienti da differenti specie di ruminanti. (Andreotti et al. 2016)⁽⁸⁾

6. APPLICAZIONI NMR NEL FORMAGGIO

Le prime applicazioni della spettroscopia NMR per lo studio dei prodotti caseari si sono incentrate sull'analisi della mobilità molecolare di proteine, lipidi ed acqua dato il loro ruolo fondamentale nel conferire le proprietà strutturali e funzionali al formaggio. Nell'ultimo periodo è stata posta l'attenzione sullo studio dei metaboliti idrofili a basso P.M. (amminoacidi/peptidi/acidi organici/ammine), la tipologia e la quantità di questi metaboliti infatti dipendono da: caratteristiche del latte di partenza, attività proteolitica dei microrganismi naturalmente presenti o aggiunti, fermentazione lattica e tempo di maturazione. L'analisi qualitativa di questi marker è uno strumento utile per la valutazione dell'autenticità e della qualità del formaggio.

6.1 STADIO DI MATURAZIONE

Il "fiore sardo" è un formaggio ovino a pasta dura che viene prodotto esclusivamente in Sardegna secondo antiche tecniche di lavorazioni artigianali, queste caratteristiche conferiscono al prodotto la "denominazione di origine protetta" DOP. Il fiore sardo è ottenuto dalla coagulazione del latte di pecora crudo senza l'aggiunta di alcun innesto. La maturazione avviene esclusivamente ad opera dei microrganismi naturalmente presenti nel latte crudo e nell'ambiente con cui il formaggio viene a contatto.

Studi recenti (Piras et al. 2016)⁽⁹⁾ hanno mostrato la variazione del profilo dei metaboliti idrofili a basso P.M. durante il processo di maturazione. Dal confronto degli spettri ¹H NMR dell'estratto acquoso del formaggio "Fiore Sardo" campionato a 2 (Figura 6.1A), 15 (Figura 6.1B), 90 (Figura 6.1C) giorni di maturazione si osserva come l'intensità dei vari segnali cambi durante il decorso. In particolare si nota come le intensità dei segnali relativi ad amminoacidi ed acidi organici aumentino progressivamente nel tempo mentre le intensità dei picchi del lattosio diminuiscano. Queste variazioni composizionali sono una chiara evidenza della presenza di processi di fermentazione lattica, operata da lactobacilli, che hanno luogo durante la maturazione del formaggio.

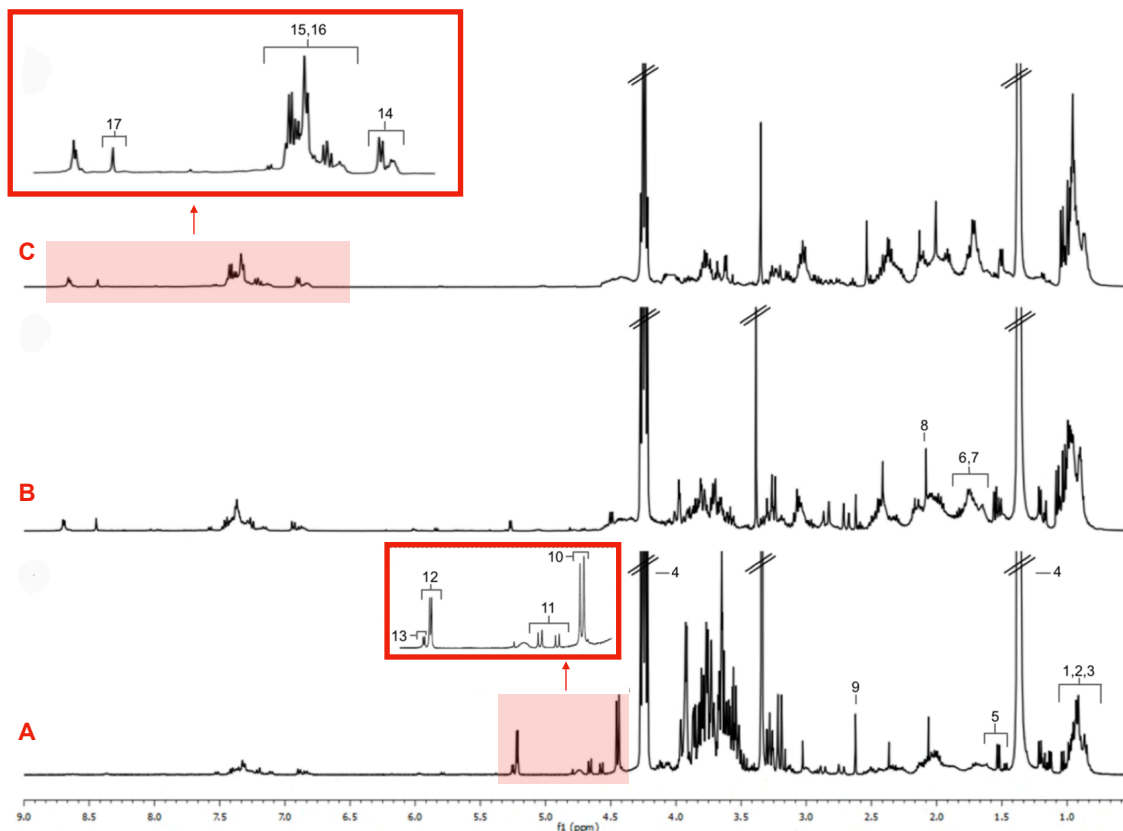


Figura 6.1 Spettri ^1H NMR dell'estratto acquoso del formaggio Fiore Sardo campionato a 2(A), 15(B), 90(C) giorni di maturazioni. (Piras et al. 2016)⁽⁹⁾

ATTRIBUZIONE DEI PICCHI			
1	Leucina	10	β -galattosio
2	Isoleucina	11	B-glucosio
3	Valina	12	α -glucosio
4	Acido Lattico	13	α -galattosio
5	Alanina	14	Tirosina
6	Arginina	15	Fenilalanina
7	Lisina	16	Triptofano
8	Acido Acetico	17	Acido Formico
9	Acido Succinico		

Tabella 5 Attribuzioni dei picchi degli spettri della Figura 6.1. L'identificazione dei segnali è stata effettuata sfruttando the Human Metabolome Database (HMD) (www.hmdb.ca), Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB) (www.bmrwisc.edu), e dati già presenti in letteratura (Brescia M.A. et al., 2005; Consonni R. et al., 2008; Gianferri R. et al., 2007)

6.2 IDENTIFICAZIONE DELLA CATENA DI PRODUZIONE: IL FORMAGGIO ASIAGO

L'Asiago è un formaggio di latte bovino a pasta semi-cotta. La sua produzione è tutelata dal marchio DOP e deve avvenire in una ristretta area geografica e solamente con latte proveniente da allevamenti circoscritti nell'area. La zona comprende sia rilievi montuosi che aree pianeggianti, in entrambi gli scenari deve essere applicato lo stesso disciplinare di produzione nonostante le diverse condizioni di allevamento delle vacche.

Originariamente (ed anche in parte tutt'ora) l'Asiago veniva prodotto nelle caratteristiche malghe dell'omonimo altipiano e solamente nel periodo estivo seguendo le tradizionali metodiche. Qui le bovine pascolano in tranquillità ed hanno un'alimentazione a base di erbe spontanee, si tratta di un regime alimentare che comporta una minore produzione di latte e quindi un minor numero di forme. La grande richiesta di formaggio Asiago ha portato all'industrializzazione del processo. Gli stabilimenti industriali di pianura sono caratterizzati da una maggiore produzione in termini di forme annue. Questi lavorano il latte proveniente da allevamenti intensivi di vacche da latte (Frisona, Bruna Italiana), si tratta di animali alimentati con foraggi ad alto valore nutrizionale composti da fieno di erba medica e mais. Gli stabilimenti industriali di montagna raccolgono e lavorano il latte proveniente da bovine da latte alimentate similmente a quelle di pianura.

Le differenti catene di produzioni si riflettono sulle caratteristiche nutrizionali ed organolettiche del prodotto finale: l'alimentazione delle bovine è stato visto essere un fattore predominante sulla qualità del latte⁽²⁾. La qualità del mangime in termini di composizione e sistema di stoccaggio, possono portare ad un diverso prodotto anche all'interno della stessa filiera produttiva.

Dallo studio di Schievano et al. (2008)⁽¹⁰⁾ è emerso come l'applicazione della spettroscopia ^1H NMR e ^{13}C NMR all'estratto lipofilico di campioni di Asiago, in accoppiata con metodi di analisi statistica multivariata, permetta di distinguere tra formaggio di malga e formaggio derivante dall'industria.

Lo studio si è focalizzato esclusivamente sull'Asiago d'Alleva, caratterizzato da una stagionatura più lunga. Sono stati presi in considerazione tutti i siti di produzione, ai quali sono state assegnati tre diverse catene di produzione in base alla loro ubicazione e al sistema di produzione.

Sono stati analizzati in tutto 47 campioni : 11 provenienti da caseifici industriali ubicati in pianura, 6 in montagna mentre 15 provenienti da malga.

I campioni provenienti dall'industria e dalla malga mostrano lo stesso profilo spettrale: sono presenti maggiormente i segnali dei triacilgliceroli ed in parte minore i segnali dei CLA. La differenza tra i campioni risiede nell'intensità dei segnali soprattutto per quanto riguarda la regione di risonanza dei protoni bisallici ed olefinici (Figura 6.2). In particolare lo studio ha riportato che un relativamente più alto contenuto in acidi grassi insaturi, polinsaturi e CLA indicano un campione di Asiago prodotto in alpeggio con latte proveniente da bovine che pascolano.

Gli autori⁽¹⁰⁾ non sono stati in grado di differenziare i campioni di Asiago prodotti in industrie collocate in montagna o in pianura. Questo risultato è connesso con l'aumento del prezzo del latte e la diminuzione del costo dell'energia nelle zone montane. Dati questi presupposti le industrie hanno iniziato a sviluppare allevamenti intensivi di bovine da latte, si tratta di una soluzione molto simile a quella presente nelle industrie di pianura. Nel piano alimentare di questi animali, il foraggio locale e il pascolo sono stati a man a mano sostituiti con foraggi ricchi in fieno di erba medica e mais. La conseguenza di questa scelta alimentare è stata un aumento della produzione di forme, ma una qualità standardizzata di latte e formaggio, che ricordano i prodotti di pianura.

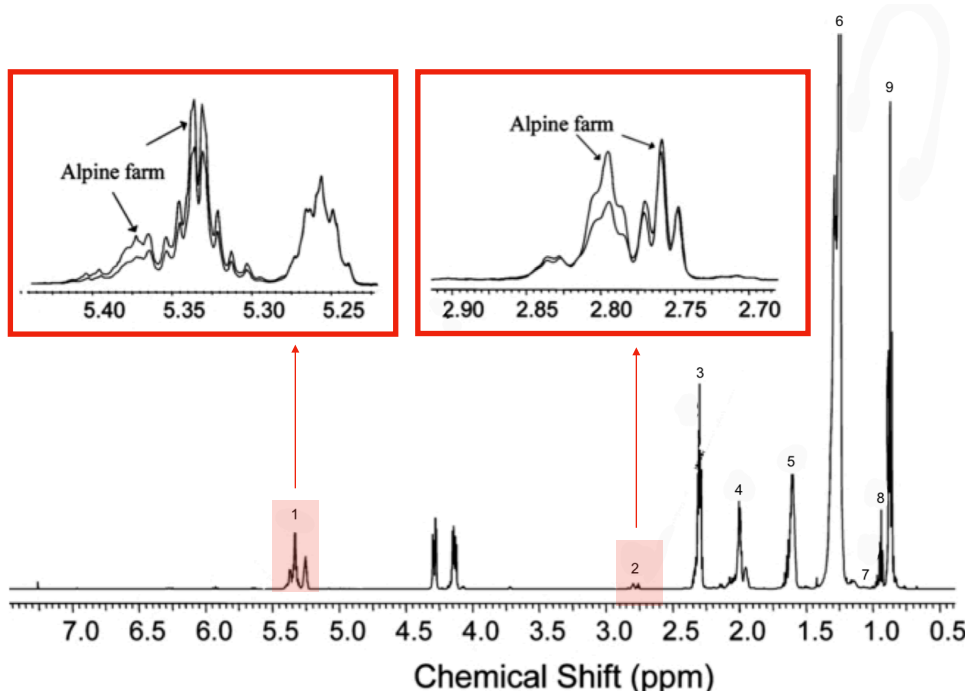


Figura 6.2 Spettro ^1H NMR, registrato a 600MHz, dell'estratto lipofilico del formaggio Asiago prodotto in alpeggi di montagna. Le regioni spettrali riquadrate in rosso sono degli ingrandimenti delle regioni di risonanza dei protoni bisallici ed olefinici degli acidi grassi. (Schievano et al. 2008)⁽¹⁰⁾

ATTRIBUZIONE DEI PICCHI	
1	Protoni olefinici di tutte le catene insature
2	Protoni bisallilici
3	Protoni metilenici legati al C2 di tutte le catene laterali degli acidi grassi
4	Protoni allilici
5	Protoni metilenici legati al C3 di tutte le catene laterali degli acidi grassi
6	Protoni metilenici
7	Protoni metilici dell'acido linoleico
8	Protoni metilici dell'acido butirrico
9	Tutti gli altri protoni metilici

Tabella 6 Attribuzioni dei picchi degli spettri della Figura 6.2. L'identificazione dei picchi è stata ottenuta tramite comparazione con standard di acidi grassi.

6.3 ORIGINE E QUALITÀ DELLA MOZZARELLA DI BUFALA CAMPANA DOP

La mozzarella di Bufala Campana (MBC) è un formaggio molle a pasta filata prodotto esclusivamente con latte fresco ed intero di bufala di razza mediterranea (*bubalus bubalis*) entro 16 ore dalla mungitura. Sono diverse le zone di produzione della MBC ma per ottenere il marchio DOP i caseifici devono produrre il formaggio solamente con latte proveniente da bufale allevate in selezionati comuni della provincia di Caserta e Salerno.

Mazzei et al. (2011)⁽¹¹⁾ hanno sfruttato l'applicazione della spettroscopia ¹H HRMAS-NMR, in combinazione con metodi di analisi statistica multivariata, per valutare la qualità e la provincia di provenienza della MBC.

Nello studio⁽¹¹⁾ sono stati analizzati:

- 37 campioni di MBC ottenute dal caseificio "La perla del mediterraneo" situato nel comune di Paestum (P), provincia di Salerno;
- 12 campioni di MBC comprate al supermercato e prodotte presumibilmente nella provincia di Caserta (C).

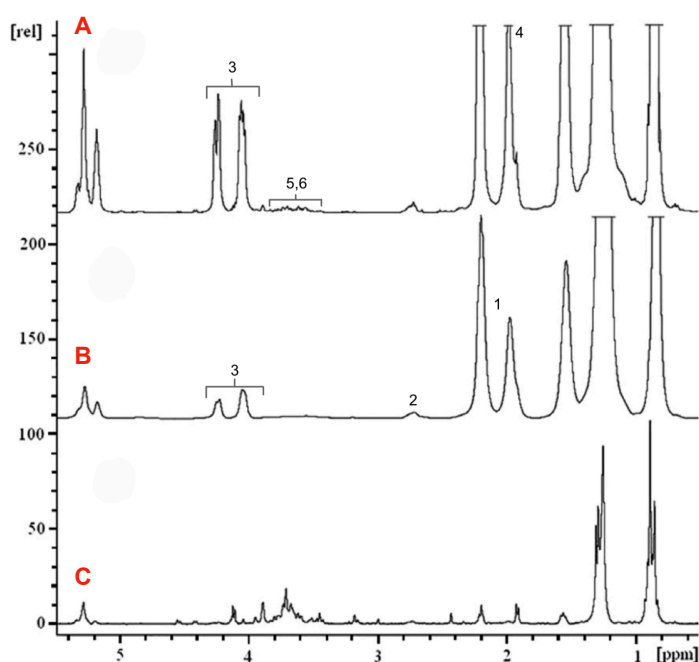
Gli spettri ¹H HRMAS-NMR tal quali (Figura 6.3A) non sono in grado di fornire una correlazione tra il profilo metabolomico globale e l'origine geografica dei campioni di mozzarella. Questa limitazione è dovuta alla complessità dello spettro in quanto sono presenti in esso sia i segnali della fase lipidica che quelli

della fase idrofila. Applicando opportune sequenze di filtro, si ottengono spettri di più facile interpretazione e con maggiore risoluzione.

L'analisi delle componenti principali (PCA) sui dati ricavati dagli spettri eCPGM (Figura 6.3C) e su quelli ricavati dal eDiff (Figura 6.3B) hanno evidenziato differenze significative nel profilo metabolomico dei due campioni di MCB⁽¹¹⁾:

- dalla PCA ottenuta dai dati degli spettri eCPGM si nota come i campioni MBC(P) contengano un quantitativo maggiore rispetto a MBC(C) sia di β -galattosio che β -lattosio ma un contenuto inferiore di acido acetico;
- dalla PCA ottenuta dai dati degli spettri eDiff si nota come i campioni MBC(P) contengano un quantitativo maggiore rispetto a MBC(C) di acidi grassi polinsaturi (acido linoleico ed acido linolenico).

La diversa composizione dei due campioni con distinta origine geografica è attribuibile al differente processo di caseificazione. Nonostante si tratti sempre di latte di bufala, la minima variazione di metodica produttiva e dei fermenti utilizzati come starter possono diventare fattori critici per la composizione e qualità del prodotto finale.



ATTRIBUZIONE DEI PICCHI	
1	Protoni allilici
2	Protoni bisallilici
3	Glicerolo
4	Acido Acetico
5	β -galattosio
6	β -lattosio

Tabella 6 Attribuzioni dei picchi degli spettri della Figura 6.3. L'identificazione dei picchi è stata ottenuta tramite comparazione con spettri ¹H NMR in soluzione di un estratto idrofilo della mozzarella (gli spettri non sono mostrati) ed letteratura già presente. (Mazzei et al. 2011)⁽¹¹⁾

Figura 6.3 Spettri ¹H MAS NMR, registrati a 400MHz, di campioni di mozzarella di Bufala Campana: **A** spettro convenzionale; **B** spettro con filtro eDiff; **C** spettro con filtro eCPGM. (Mazzei et al. (2011)⁽¹¹⁾)

Grazie alla notevole riproducibilità ottenuta negli spettri HRMAS e al numero significativo di campioni analizzati, i 37 spettri raccolti da Mazzei et al.⁽¹¹⁾ per la mozzarella di Bufala di Paestum (Salerno) costituiscono un database spettrale rappresentativo del profilo metabolomico della MBC.

Questo database può essere impiegato come strumento per valutare la qualità del prodotto incognito, rintracciarne l'origine geografica e riconoscere le possibili pratiche fraudolente.

Gli autori⁽¹¹⁾ inoltre hanno sfruttato il database di spettri per osservare possibili cambiamenti che avvengono nella MBC(P) dopo due giorni dalla sua data di produzione. Dalla comparazione dello spettro ¹H HRMAS-NMR con filtro eCPGM di un campione di prodotto fresco ed uno invecchiato (**Figura 6.4**) sono stati evidenziati cambiamenti sistematici nel profilo dello spettro.

I nuovi metaboliti presenti nel campione invecchiato 2 giorni (**Figura 6.4C**) sono attribuibili ad: alcool isobutilico ed acido lattico. Si nota anche un aumento di intensità del picco dell'acido acetico.

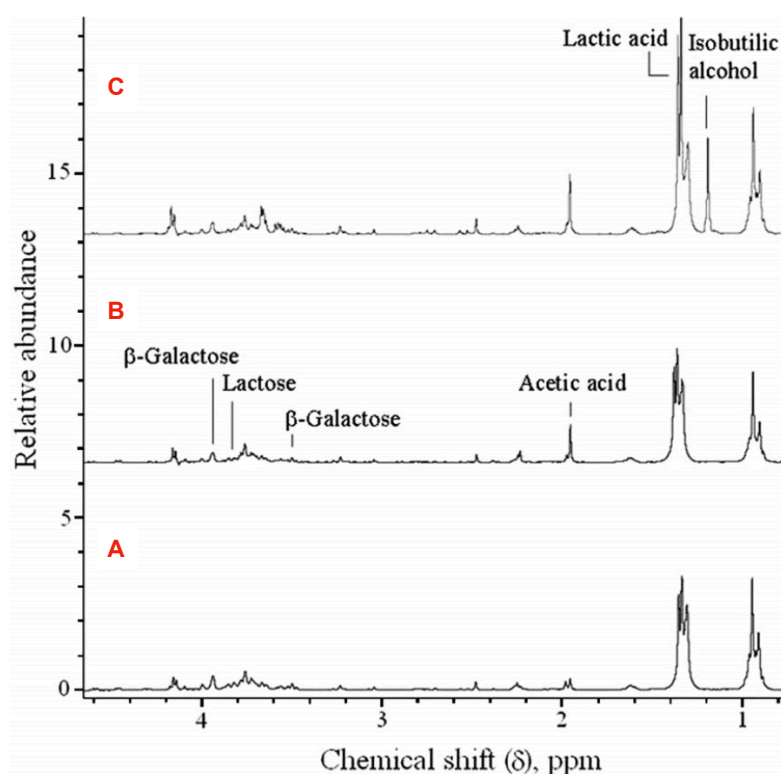


Figura 6.4 Spettri ¹HRMAS NMR, registrati a 400MHz, con filtro eCPGM di campioni di mozzarella di Bufala Campana: **A** campione fresco di origine Paestum; **B** campione fresco di origine Caserta; **C** campione invecchiato 2 giorni di origine Paestum. (Mazzei et al. (2011)⁽¹¹⁾)

Le variabili derivanti dall'invecchiamento della MBC sono sottoprodotti della biodegradazione e rappresentano elementi specifici per la caratterizzazione del profilo metabolomico del prodotto invecchiato.

L'origine dell'alcool isobutilico è attribuibile alla degradazione della valina ad opera degli enzimi rilasciati dal lievito *Saccharomyces cerevisiae*, come descritto dalla via Eldritch (Hazelwood, Daran, van Maris, Pronk e Dickinson, 2008)⁽¹²⁾. La presenza di acido lattico è correlata con processi di glicolisi di glucosio o il galattosio, derivanti dalla rottura dei legami glicosidici del lattosio. Il lattosio inoltre viene metabolizzato in etanolo dai lactobacilli, naturalmente presenti nella microflora della mozzarella, questo viene poi ulteriormente degradato ad acido acetico mediante fermentazione acetica (*acetobacter*).

Queste trasformazioni biochimiche spiegano l'aumento dell'acido lattico e acetico osservato dagli autori⁽¹¹⁾ durante il progressivo invecchiamento dei campioni di MBC. La possibilità di identificare metaboliti correlati con il grado di invecchiamento della MBC ha fornito un ulteriore metodo di controllo per la protezione dei consumatori.

7. CONCLUSIONE

In questo elaborato è stata posta l'attenzione sugli studi che coinvolgono l'identificazione del profilo metabolomico dei prodotti lattiero-caseari tramite tecniche di spettroscopia NMR. Si tratta di un campo di studi promettente in quanto ha il potenziale per impattare sia i produttori primari che l'industria ed i consumatori.

L'accoppiamento della tecnica NMR con la chemiometria ha preso di identificare il profilo metabolomico degli alimenti analizzati ed avere per esempio, una migliore comprensione sulla fisiologia dell'animale (*razza, mastite bovina*), sull'alimentazione (*formaggio Asiago*), sulla qualità del prodotto (*adulterazioni del latte, tempo di stagionatura del Fiore Sardo*) e sull'origine geografica (*mozzarella di bufala*).

Questo elaborato ha contribuito a confermare le grandi potenzialità della spettroscopia NMR nelle scienze alimentari, mostrando la grande versatilità di questa e la forte sinergia tra NMR e chemiometria.

Il riconoscimento dell'approccio NMR e la sua applicazione come metodica ufficiale per determinare l'autenticità, la tracciabilità, la qualità in prodotti alimentari è fortemente auspicabile. Tuttavia questa tecnica ha alcuni svantaggi come gli alti costi di acquisizione e manutenzione, che limitano l'uso di questa nelle piccole aziende.

8. BIBLIOGRAFIA

- (1) Bertocchi, F.; Paci, M.J. *Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 9317-9327
- (2) Mansbridge, R.J.; Blake, J.S. *Br. J. Nutr.* **1997**, *78(S1)*, S37-S47
- (3) Sundekilde, U.K.; Larsen, L.B.; Bertram, H.C. *Metabolites* **2013**, *3*, 206-211
- (4) Qiangqiang, L.; Zunbo, Y.; Dan, Z.; Xianghe, M.; Xiumei, P.; Yue, L.; Russell, F.; He, C.; Gang, C. *J Sci Food Agric* **2017**, *97*, 2875–2882
- (5) Hogart, C.J.; Fitzpatrick, J.L.; Nolan A.N.; Young F.J.; Pitt, A.; Eckersall, P.D.; *Proteomics* **2004**, *4*, 2094–2100
- (6) Sundekilde, U.K.; Larsen, L.B.; Bertram, H.C. *J. Dairy Sci.* **2013**, *96*, no. 1, 290-299
- (7) Mazzei, P.; Piccolo, A. *Chem. Biol. Technol. Agric.* **2018**, *5*
- (8) Andreotti, G.; Lamanna, R.; Trivellone, E.; Motta, A. *JAOCs* 2002, *79*, no. 2, 123-127
- (9) Piras, C., Marincola, F.M.; Savorani, F.; Engelsen, S.B.; Cosentino, S.; Viale, S.; Pisano, M.B. *Food Chem.* **2013**, *141*, 2137–2147
- (10) Schievano, E.; Pasini, G.; Cozzi, G.; Mammi, S. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 7208–7214
- (11) Mazzei, P.; Piccolo, A. *Food Chem.* **2012**, *132*, 1620-1627
- (12) Hazelwood, L.A.; Daran, J-M.; van Maris, A.J.A.; Pronk, J.T.; Dickinson, J.R.; *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, no. 8, 2259-2266