

DETERMINAZIONE RAPIDA DELL'ACIDO (L) LATTICO SU LATTE INTERO E SCREMATO CON CDR FOODLAB

C Pinelli^{1*}, F Venè¹, E Dallaturca¹, B Tedeschi¹, F Bonicolini²

INTRODUZIONE

L'acido lattico è il prodotto della fermentazione dei batteri lattici ed è un indice della freschezza del latte. E' riportato come parametro igienico-sanitario per il latte crudo destinato alla produzione di "latte fresco pastorizzato di alta qualità" nella legislazione italiana [1].

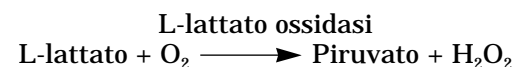
La ricerca dell'acido lattico nel latte, presente in preponderanza come isomero L, fornisce inoltre utili indicazioni su eventuali correzioni dell'acidità del latte che altrimenti non verrebbero rilevate con una normale titolazione acido-base e quindi costituisce indice di qualità della materia prima utilizzata.

I metodi comunemente utilizzati per la determinazione dell'acido lattico (D / L) utilizzano reazioni enzimatiche specifiche che richiedono trattamento del campione e tempi di analisi significativamente lunghi .

Il sistema oggetto del presente studio permette una rapida esecuzione (7 minuti) di misure estemporanee, in tempo reale, con manualità analitica ridotta al minimo e lavorando sul latte tal quale senza ulteriori trattamenti del campione.

MATERIALI E METODI

Il principio dello strumento CDR Foodlab si basa sul fatto che l'acido (L) lattico viene trasformato, in presenza di ossigeno, dall'enzima L-lattato ossidasi in piruvato e perossido di idrogeno:



Il perossido di idrogeno così ottenuto reagisce con un derivato fenolico, in presenza dell'enzima perossidasi, per dare chinoneimmina (composto viola) (reazione di Trinder) [2, 3] la cui intensità, misurata a 545 nm, è direttamente proporzionale alla concentrazione di acido lattico presente nel campione (Fig. 1).

La reazione consiste in una prima fase di preriscaldamento del rea-

¹ *Corrispondenza ed estratti:* costante_pinelli@parmalat.net

¹ Parmalat S.p.A., Servizio Qualità Centrale. Via Milano 1, 43044 Collecchio, Parma.

² CDR Biochemical Division. Via F.Crispi 33, 52100 Arezzo.

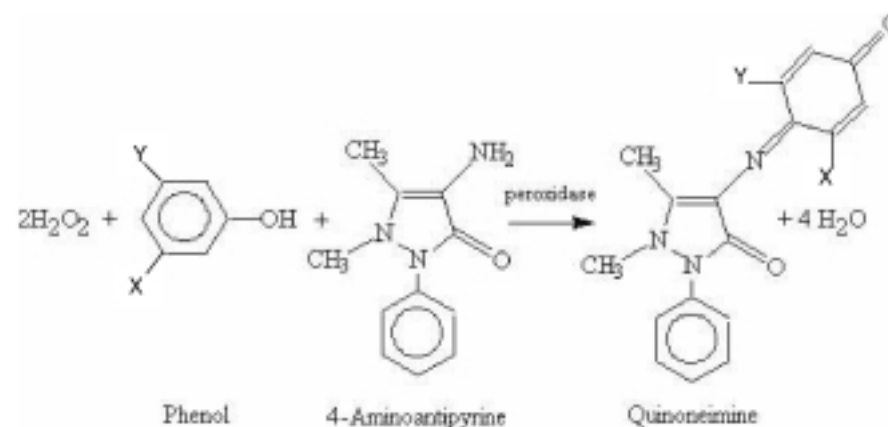


Figura 1 – Reazione di Trinder [2, 3]. I gruppi funzionali sono indicati con X, Y in quanto i reattivi sono oggetto di brevetto industriale.

Figure 1 - Trinder's reaction [2, 3]. Functional groups are listed with X, Y because the reactives are a patented system.

gente R1 (derivato fenolico mono o bisostituito in posizione meta e tamponato fosfato) con il campione (100µl) addizionato del reattivo R1_a (sistema ossidante, soggetto a brevetto industriale, necessario per eliminare eventuali interferenze di sostanze riducenti sulla formazione di perossido di idrogeno) della durata di 5 minuti, e di una seconda fase dove la reazione va a termine in 2 minuti dall'aggiunta del reagente R2 (4-aminoantipiridina, L-lattato ossidasi e perossidasi). Si esegue la lettura spettrofotometrica (545 nm) del bianco al termine della prima fase, successivamente si effettua la lettura spettrofotometrica (545 nm) finale al termine della seconda fase.

Lo strumento è stato tarato mediante analisi replicate su cinque diversi livelli di concentrazione in un range compreso tra 12,16 ppm e 50,56 ppm

Gli standard di riferimento sono stati ottenuti mediante aggiunte di una soluzione standard di acido (L) lattico, ottenuta a partire da una soluzione madre a 5000 ppm, al campione di latte a concentrazione nota di analita.

Le misure degli standard di riferimento vengono effettuate mediante l'utilizzo di un test enzimatico specifico prodotto dalla Boehringer Mannheim (lo spettrofotometro UV-visibile utilizzato per le misure è il JASCO Model 7800).

Questo test si basa sull'ossidazione dell'acido L-lattico a piruvato ad opera della nicotinamide-adenina dinucleotide (NAD⁺), in presenza di L-lattato deidrogenasi (L-LDH).

Il piruvato che si origina reagisce con L-glutammato in presenza dell'enzima glutammato-piruvato transaminasi (GTP) dando origine a L-alanina e 2-oxoglutarato [4].

La misura viene effettuata con uno spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 340 nm.

Il sistema CDR impiega campioni di latte non pretrattato, microcuvette usa e getta e reagenti pronti all'uso con vuoto a perdere. Il gruppo di lettura ed il gruppo di incubazione (massimo 14 campioni) sono termostatati a 37°C.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Sono stati eseguiti test sia su campioni di latte intero che su campioni di latte scremato e sono stati verificati i seguenti parametri:

- Omogeneità della varianza
- Linearità
- Analisi della varianza (ANOVA)
- Precisione (ripetibilità inter day e ripetibilità intermedia)

Di seguito (Fig. 2) viene riportata la retta di calibrazione per il campione di latte considerato. La retta ottenuta è stata valutata anche in relazione agli errori associati a ciascuno dei coefficienti, intercetta e penden-

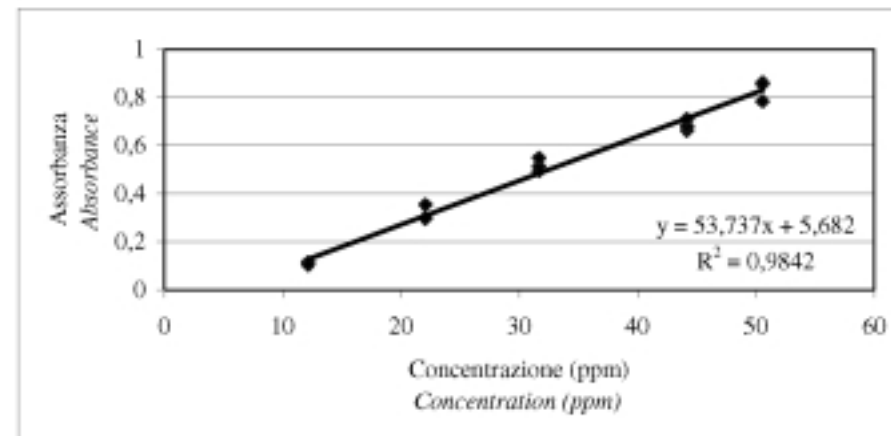


Figura 2 - Retta di calibrazione.

Figure 2 - Calibration curve.

za, nonché alla significatività dell'intercetta (mediante un t-test).

L'omogeneità della varianza è stata verificata mediante il test della varianza minima.

E' stato usato il test di Mandel per la verifica statistica della linearità. Dai risultati ottenuti è possibile affermare che la funzione di calibrazione

del primo ordine fornisce un modello significativamente adeguato a descrivere la relazione tra X e Y con un intervallo di confidenza del 95%.

Inoltre l'analisi dei residui conferma le conclusioni dedotte con il test di Mandel.

L'analisi della varianza (ANOVA) sulla bontà di adattamento del modello lineare ai dati relativi al campione di latte considerato ha rilevato come questo sia sufficientemente adeguato a descrivere la relazione tra X e Y ($\alpha=5\%$). Tale risultato è in accordo con i dati ottenuti dall'analisi dei residui e dalla verifica della linearità del modello (test di Mandel).

La precisione è stata valutata in termini di ripetibilità inter day su cinque livelli di concentrazione, eseguendo tre replicati per ogni livello. Sul latte preso in esame l'intervallo di concentrazione è risultato compreso tra 12,16 ppm e 50,56 ppm, mentre i parametri valutati sono stati: varianza della ripetibilità, scarto tipo della ripetibilità, ripetibilità, coefficiente di variazione (CV%) ed intervallo di confidenza (IC).

CONCLUSIONI

Sono state fatte prove ripetute sull'intera procedura di preparazione del campione e di lettura spettrofotometrica per entrambe le tecniche. I dati ottenuti mostrano come l'analisi effettuata mediante il kit enzimatico, preso a riferimento, comporta una maggiore variabilità nei risultati dovuta certamente ai diversi passaggi manuali cui è sottoposto il campione.

A differenza del kit enzimatico, dove è previsto un impiego maggiore di tempo (90 minuti), manualità, vetreria e reagenti, il sistema CDR fornisce un risultato direttamente espresso in termini di concentrazione di acido (L) lattico presente nel campione di latte, non richiede né trattamenti preliminari del campione né l'impiego di vetreria, e viene completato in 7 minuti.

RIASSUNTO – Scopo del lavoro è stato quello di valutare la funzionalità dello spettrofotometro CDR Foodlab per l'analisi rapida dell'acido (L) lattico. Come metodo di riferimento è stato utilizzato un test enzimatico specifico prodotto dalla ditta Boehringer Mannheim. Un ruolo di rilievo è stato riservato alla praticità d'uso; infatti lo strumento CDR richiede una ridotta manualità legata alla sola addizione dei reattivi R1_a e R2, non richiede trattamenti preliminari del campione e fornisce un risultato direttamente espresso in termini di concentrazione (ppm) di acido lattico presente nel latte. L'analisi, invece, condotta mediante il kit enzimatico della Boehringer Mannheim prevede un impiego più consistente di tempi d'analisi, manodopera, vetreria e reagenti. Quest'ultima analisi, infatti, richiede la preparazione di soluzioni (Carrez I e Carrez II) con il conseguente utilizzo di apposita vetreria (becker, pipette, *etc.*) e tempi di attesa lunghi tra uno step e l'altro della determinazione. Inoltre, la necessità di

effettuare diluizioni, aggiunte e filtrazione del campione può portare ad errori sistematici che possono incidere sul risultato finale della determinazione dell'acido lattico. Infatti nelle prove di ripetibilità effettuate per le due tecniche, è stato trovato un CV (%) di 3,54 per lo strumento CDR Foodlab, mentre per il Kit della Boehringer Mannheim il CV (%) è di 10,72.

Parole chiave: latte, acido lattico, reazioni enzimatiche, reazione di Trinder

ABSTRACT – *Quick determination of L- lactic acid in whole milk and skim milk.*– Lactic acid is the fermentation product of the lactic bacteria and an index of the milk freshness. As hygienic-sanitary parameter is reported for the raw milk destined to the production of “high quality fresh market milk” by Italian legislation. The determination of the lactic acid in the milk, mainly as L- isomer, gives useful indications on possible acidity corrections of the milk that would not be noticed otherwise with an acid-base titration: therefore it seems a useful index of the milk quality. The methods commonly used for the determination of the lactic acid (D / L) are based on specific enzymatic reactions that needs treatment of the sample and long times of analysis. The system object of the present study, based on Trinder reaction followed by photometric measurement, allows a rapid execution (7 minutes) of extemporaneous measures, in real time, with analytical skill reduced to the least and working on the raw milk without further treatments.

Keywords: milk, lactic acid, enzymatic reactions, Trinder's reaction.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Decreto Ministero della Sanità n.185 09/05/1991.
- 2) Trinder P (1969). *Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor.* Annals Clin. Biochem. 6, 24-27.
- 3) Barham D, Trinder P (1972). *Improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system.* Analyst 97, 142-145.
- 4) Noll F (1966). *[Method for the quantitative determination of L (+)-Lactate by Lactate-Dehydrogenase and Glutamate-Pyruvate-Transaminase].* Biochem. Z. 346, 41-49.