

D.M. 10 novembre 1997 (1).

Ufficializzazione del metodo di analisi per la «Determinazione enzimatica dell'acido lattico nel latte».

(1) Pubblicato nella Gazz. Uff. 3 gennaio 1998, n. 2.

L'ISPETTORE GENERALE CAPO DELL'ISPettorATO CENTRALE REPRESSIONE FRODI DI
CONCERTO CON IL DIRETTORE GENERALE DEL DIPARTIMENTO DELLE DOGANE E DELLE
IMPOSTE INDIRETTE DEL MINISTERO DELLE FINANZE IL DIRETTORE GENERALE
DEL DIPARTIMENTO DEGLI ALIMENTI E NUTRIZIONE E DELLA SANITÀ PUBBLICA
VETERINARIA DEL MINISTERO DELLA SANITÀ IL DIRETTORE GENERALE PER LO SVILUPPO
PRODUTTIVO E LA COMPETITIVITÀ DEL MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E
DELL'ARTIGIANATO

Visto l'art. 2 del decreto legislativo 4 giugno 1997, n. 143, che istituisce il Ministero per le politiche agricole;

Visto il decreto legislativo 3 febbraio 1993, n. 29, concernente norme per la razionalizzazione dell'organizzazione delle amministrazioni pubbliche e revisione della disciplina in materia di pubblico impiego, a norma dell'art. 2 della legge 23 ottobre 1992, n. 421;

Visti l'art. 43 del regio decreto-legge 15 ottobre 1925, n. 2033, convertito nella legge 18 marzo 1926, n. 562, riguardante la repressione delle frodi nella preparazione e nel commercio di sostanze di uso agrario e di prodotti agrari, e l'art. 108 del regolamento per l'esecuzione dello stesso regio decreto-legge, approvato con regio decreto 1° luglio 1926, n. 1361, i quali prescrivono che le analisi occorrenti in applicazione delle norme contenute nel regio decreto-legge e nel regolamento di esecuzione suddetti dovranno essere eseguite dai laboratori incaricati con i metodi di analisi prescritti da questo Ministero, di concerto con il Ministero delle finanze, il Ministero della sanità ed il Ministero dell'industria, del commercio e dell'artigianato;

Visto il decreto del Presidente della Repubblica 26 marzo 1980, n. 327 «Regolamento di esecuzione della legge 30 aprile 1962, n. 283», e successive modificazioni, in materia di disciplina igienica della produzione e della vendita delle sostanze alimentari e delle bevande;

Vista la legge 3 maggio 1989, n. 169, sulla disciplina del trattamento e della commercializzazione del latte alimentare vaccino;

Visto il decreto interministeriale 26 marzo 1992, pubblicato nel supplemento ordinario alla Gazzetta Ufficiale n. 90 del 16 aprile 1992, con il quale è stata data attuazione alla decisione n. 91/180/CE concernente la fissazione di metodi di analisi e prova relativi al latte crudo e al latte trattato termicamente;

Visto il decreto del Presidente della Repubblica 14 gennaio 1997, n. 54, pubblicato nel supplemento ordinario alla Gazzetta Ufficiale n. 59 del 12 marzo 1997, con il quale è stata data attuazione alle direttive n. 92/46 e n. 92/47 in materia di produzione ed immissione sul mercato di latte e di prodotti a base di latte;

Considerato che, come noto, l'acido lattico, quale prodotto della fermentazione del lattosio, è un parametro qualitativo indice dello stato di conservazione del prodotto latte;

Ritenuto pertanto opportuno disporre di un metodo analitico che tramite il dosaggio dell'acido lattico fornisca elementi informativi a supporto di un giudizio di genuinità e qualità del prodotto latte sia sotto il profilo igienico-sanitario che di composizione;

Ritenuto altresì indispensabile porre a disposizione di tutti gli istituti e laboratori pubblici idonei metodi di analisi per il controllo del latte, perché le analisi da essi compiute risultino uniformi nei procedimenti e nei risultati;

Sentito il parere della Commissione UE - a norma della direttiva n. 83/189/CE, che dispone una procedura di notifica nel settore delle norme e regolamentazioni tecniche - al fine di prevenire l'adozione di norme che possano creare ostacoli alla libera circolazione delle merci;

Sentito il parere della Commissione per l'aggiornamento dei metodi ufficiali di analisi per i prodotti agrari e le sostanze di uso agrario - sottocommissione per i formaggi - di cui al decreto ministeriale 11 febbraio 1981 e successive modificazioni, alla quale con decreto ministeriale 19 dicembre 1992 è stato attribuito anche l'aggiornamento dei metodi ufficiali di analisi del prodotto agricolo latte;

Vista la legge 14 gennaio 1994, n. 20, contenente disposizioni in materia di giurisdizione e controllo della Corte dei conti;

Decreta:

Articolo unico

1. È approvato il metodo ufficiale di analisi relativo alla «Determinazione enzimatica dell'acido lattico nel latte» descritto nell'allegato al presente decreto.
2. È fatto salvo il principio del mutuo riconoscimento in virtù del quale la qualità e l'autenticità del latte legalmente fabbricato e/o commercializzato in un altro Stato membro o Paese firmatario dell'accordo sullo S.E.E. e immesso sul mercato italiano possano altresì essere controllate tramite metodi di analisi alternativi che offrano garanzie equivalenti al metodo di cui al presente decreto.
3. Il presente decreto è inviato alla Corte dei conti per il controllo preventivo di legittimità ed entrerà in vigore il giorno successivo a quello della sua pubblicazione nella Gazzetta Ufficiale della Repubblica italiana.

Allegato

Determinazione enzimatica dell'acido lattico nel latte

1 - Scopo e campo di applicazione.

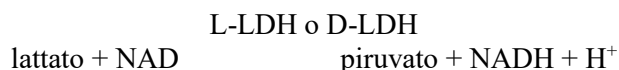
Determinazione del tenore in acido lattico, come somma di acido D-lattico e L-lattico, nel latte crudo, pastorizzato e sterilizzato.

2 - Riferimenti.

D.M. 26 marzo 1992 - Attuazione della decisione n. 91/180/CE - Allegato I - Metodi di campionamento.

3 - Principio.

La determinazione enzimatica dell'acido L-lattico e D-lattico viene eseguita sul latte, deproteinizzato e diluito opportunamente, utilizzando gli enzimi L-lattato deidrogenasi, D(-)-lattato deidrogenasi. In presenza di questi enzimi, gli ioni L-lattato e D(-)-lattato vengono ossidati a piruvato dal cofattore nicotinamide-adenin-dinucleotide (NAD) che, a sua volta, si riduce a NADH.



Poiché l'equilibrio di questa reazione è quasi completamente spostato dalla parte del lattato, si sottrae il piruvato per mezzo di una reazione catalizzata dall'enzima glutammato-piruvato-transaminasi (GPT) in presenza di L-glutammato.



In tal modo, l'equilibrio viene spostato dalla parte del piruvato e del NADH. La quantità di NADH formatosi nella reazione, equivalente a quella di L-lattato e di D-lattato iniziali, viene dosata per via spettrofotometrica.

4 - Reattivi.

4.1 - Acqua bidistillata.

4.2 - Soluzione diluita di Carrez I.

Sciogliere 3,60 g di ferrocianuro di potassio ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$) in 100 ml di acqua (4.1).

4.3 - Soluzione diluita di Carrez II.

Sciogliere 7,20 g di solfato di zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) in 100 ml di acqua (4.1).

4.4 - Soluzione di idrossido di potassio 2 N circa.

4.5 - Soluzione Tampone (acido L-glutammico 0,1 M in tampone glicilglicina 0,6 M a pH10).

Sciogliere in un pallone tarato da 50 ml, 3,96 g di glicilglicina e 0,73 g di acido L-glutammico con circa 40 ml di acqua (4.1), aggiungere 3,8 ml di soluzione di idrossido di sodio 10 M e portare a volume con acqua (4.1). La soluzione è stabile per almeno tre mesi se conservata in frigorifero.

4.6 - Soluzione NAD (nicotinamide 47 mM).

Sciogliere 0,21 g di beta nicotinamide adenina dinucleotide monoidrato (beta NAD^+) in 6 ml di acqua (4.1).

La soluzione è stabile almeno un mese se conservata in frigorifero.

4.7 - Soluzione GPT (enzima glutammato-piruvato transaminasi).

Centrifugare una sospensione commerciale dell'enzima (solitamente in ammonio solfato 3,2 M e con attività di circa 80 U/mg) a 4000 rpm per 10 minuti; prelevare il surnatante limpido e scartare il residuo. La soluzione è stabile almeno un anno se conservata in frigorifero.

4.8 - Soluzione D-LDH (enzima D(-)-lattato deidrogenasi) da *Lactobacillus leichmannii*.

Soluzione commerciale dell'enzima (solitamente in miscela glicerolo acqua, da 5 mg/ml e con attività specifica di circa 300 U/mg). La soluzione è stabile almeno un anno se conservata in frigorifero.

4.9 - Soluzione L-LDH (enzima L-lattato deidrogenasi).

Soluzione commerciale dell'enzima (solitamente in miscela glicerolo-acqua, da 10 mg/ml e con attività specifica di circa 550 U/mg). La soluzione è stabile almeno un anno se conservata in frigorifero.

4.10 - Soluzione Standard-D-Lattico circa 40 mg/l (calcolata in base alla esattezza della pesata).

Pesare esattamente 42,6 mg circa di D(-)lattato di litio anidro oppure 49,7 mg circa di D-Lattato di sodio (titolo > 99%) e scioglierli in 100 ml di acqua (4.1). Prelevare 10 ml e diluirli a 100 ml. La soluzione corrisponde a circa 40 mg/l di acido D(-)-

lattico. Se si dispone di soluzioni già pronte, diluirle fino a ottenere una concentrazione finale nota di circa 40 mg/l.

4.11 - Soluzione Standard-L-Lattico circa 40 mg/l (calcolata in base alla esattezza della pesata).

Pesare esattamente 42,6 mg circa di L-lattato di litio anidro oppure 49,7 mg circa di L-Lattato di sodio (titolo > 99%) e scioglierli in 100 ml di acqua (4.1). Prelevare 10 ml e diluirli a 100 ml. La soluzione corrisponde a circa 40 mg/l di acido L-

lattico. Se si dispone di soluzioni già pronte, diluirle fino a ottenere una concentrazione finale nota di circa 40 mg/l.

5 - Apparecchiatura.

5.1 - Provette graduate da 10 ml con tappo.

5.2 - Pipette con puntali monouso per volumi di 20, 100, 200, 500, 1000 microlitri.

5.3 - Spettrofotometro.

5.4 - Cuvette in quarzo o in plastica monouso con cammino ottico da 1 cm.

5.5 - Bacchette con estremità appiattite, tali da entrare nelle cuvette (5.4).

6 - Campionamento.

Vedi punto 2.

7 - Procedimento.

7.1 - Preparazione del campione.

7.1.1 - Pesare 5 g di campione in una provetta da 10 ml (5.1). Aggiungere 0,75 ml di soluzione di Carrez I (4.2) e mescolare. Aggiungere 0,75 ml di soluzione di Carrez II (4.3), mescolare e neutralizzare con alcune gocce idrossido di potassio (4.4). Portare a volume con acqua (4.1).

7.1.2 - Filtrare.

7.2 - Determinazione.

7.2.1 - Preparare una serie di cuvette (5.4) e denominarle:

B: cuvetta per la prova del bianco

St: cuvetta per il controllo degli standard D-Lattico (4.10) e L-Lattico (4.11)

C: cuvetta per la determinazione del campione.

7.2.2 - Con pipette (5.2), pipettare in tutte le cuvette, nell'ordine:

1,00 ml di soluzione Tampone (4.5);

0,20 ml di soluzione NAD (4.6);

0,02 ml della soluzione GPT (4.7).

7.2.3 - Con pipette (5.2), pipettare in:

cuvetta B: - 1,00 ml di acqua (4.1)

cuvetta St: - 0,50 ml di standard D-Lattico (4.10) e 0,50 ml di standard L-Lattico (4.11).

cuvetta C: - 1,00 ml di campione filtrato (7.1.2)

Mescolare con le bacchette (5.5) (una per cuvetta) e lasciar riposare per 5 minuti.

7.2.4 - Determinazione dell'acido D-Lattico.

Misurare le estinzioni delle singole cuvette a 340 nm contro acqua (4.1). I valori letti sono denominati E1 e, abbinati alle rispettive cuvette, diventano:

E1B l'estinzione iniziale del bianco per il D-Lattico

E1St l'estinzione iniziale dello standard D-Lattico

E1C l'estinzione iniziale del campione per il D-Lattico.

7.2.5 - Aggiungere nelle cuvette:

0,02 ml di soluzione D-LDH (4.8)

Mescolare e lasciar riposare per 30 minuti.

7.2.6 - Misurare le estinzioni delle singole cuvette a 340 nm contro acqua (4.1). I valori letti sono denominati E2 e, abbinati alle rispettive cuvette, diventano:

E2B l'estinzione finale del bianco per il D-Lattico

E2St l'estinzione finale dello standard D-Lattico

E2C l'estinzione finale del campione per il D-lattico.

7.2.7 - Determinazione dell'acido L-Lattico.

La determinazione, continua nelle stesse cuvette ancora contenenti le soluzioni della determinazione dell'acido D-lattico. Le estinzioni finali relative all'acido D-Lattico (7.2.6) costituiscono anche le estinzioni iniziali per l'acido L-Lattico.

E2B l'estinzione iniziale del bianco per l'L-Lattico

E2St l'estinzione iniziale dello standard L-Lattico

E2C l'estinzione iniziale del campione per l'L-lattico.

7.2.8 - Aggiungere nelle cuvette:

0,02 ml di soluzione L-LDH (4.9)

Mescolare e lasciar riposare per 30 minuti.

7.2.9 - Misurare le estinzioni delle cuvette a 340 nm contro acqua (4.1). I valori letti sono denominati E3 e, abbinati alle rispettive cuvette, diventano:

E3B l'estinzione finale del bianco per l'L-Lattico

E3St l'estinzione finale dello standard L-Lattico

E3C l'estinzione finale del campione per l'L-lattico).

8 - Espressione dei risultati.

8.1 - Calcolo

La formula generale di calcolo è:

$C(\text{in mg/l}) = V \cdot PM$

$$\frac{\epsilon \cdot d \cdot v}{\Delta E}$$

dove:

V = volume finale del test (2,24 ml - per bianco, campione e standard D-Lattico, 2,26 per bianco, campione e standard L-Lattico)

v = volume della soluzione analizzata (0,50 ml per gli standard, 1,00 ml per il campione e 1,00 ml per il bianco)

PM = peso molecolare dell'acido lattico (90,1 sia nella forma L che nella forma D)

d = spessore della cuvetta (1 cm)

$\hat{\epsilon}$ = coefficiente di estinzione molare a 340 nm del NADH pari a 6,3

DeltaECD = (E2C-E1C) = differenza estinzioni acido D-Lattico

DeltaECL = (E3C-E2C) = differenza estinzioni acido L-Lattico

DeltaEStD = (E2St-E1St) = differenza estinzioni standard D-Lattico

DeltaEStL = (E3St- E2St) = differenza estinzioni standard L-Lattico

DeltaEBD = (E2B-E1B) = differenza estinzioni bianco D-Lattico

DeltaEBL = (E3B-E2B) = differenza estinzioni bianco L-Lattico.

8.2 - Verifica della validità del metodo - Prova di recupero.

Si confronta il valore determinato delle soluzioni standard di acido D-Lattico e di acido L-Lattico con il valore teorico delle stesse. Il volume finale del test di controllo (V) è pari a 2,24 ml per l'acido D-Lattico e a 2,26 per l'acido L-Lattico; il volume di standard usato è pari a 0,5 ml. Sostituendo nella formula, si ottiene:

Conc. Standard D-Lattico (mg/l) = $64,07 \cdot (\text{DeltaEStD} - \text{DeltaEBD})$

Conc. Standard L-Lattico (mg/l) = $64,64 \cdot (\text{DeltaEStL} - \text{DeltaEBL})$

I valori determinati degli standard devono corrispondere ai valori dichiarati iniziali con recupero pari almeno al 95%.

8.3 - Tenore di acido D-Lattico in mg/Kg di latte.

Il volume finale del test è 2,24 ml e il volume di campione è pari a 1,00 ml. Sostituendo i valori nella formula e facendo riferimento ai grammi pesati (G) e diluiti a 10 ml, si ottiene:

Conc. D-Lattico (mg/Kg) = $32,03 \cdot (\text{DeltaECD} - \text{DeltaEBD}) \cdot 10/G$

8.4 - Tenore in acido L-Lattico in mg/Kg di latte.

Il volume finale del test è 2,26 ml e il volume di campione è pari a 1,00 ml. Sostituendo i valori nella formula e facendo riferimento ai grammi pesati (G) e diluiti a 10 ml, si ottiene:

Conc. L-Lattico (mg/Kg) = $32,32 * (\Delta\text{ECL} - \Delta\text{EBL}) * 10/G$

8.5 - Il tenore finale di acido lattico in mg/Kg di latte (p.p.m.) è dato dalla somma delle concentrazioni del D-Lattico e del L-Lattico.

Per la somma, devono essere prese in considerazione solo le concentrazioni superiori a 4 mg/Kg di latte.

Determinazione acido lattico

Tabella riassuntiva

	Bianco	Standard	Campione
	B	ST	C
Aggiungere nelle cuvette	ml	ml	ml
Soluzione Tampone(4.5)	1,00	1,00	1,00
Soluzione NAD (4.6)	0.20	0,20	0,20
Soluzione GPT (4.7)	0,02	0,02	0,02
Acqua (4.1)	1,00	--	--
Standard D-Lattico(4.10)	--	0,50	--
Standard L-Lattico(4.11)	--	0,50	--
Campione filtrato (7.1.2)	--	--	1,00
Leggere le estinzioni	E1B	E1St	E1C
Soluzione D-LDH (4.8)	0,02	0,02	0,02
Leggere estinzioni	E2B	E2St	E2C
Soluzione L-LDH (4.9)	0,02	0,02	0,02
Leggere estinzioni	E3B	E3St	E3C

9 - Osservazioni.

9.1 - La temperatura di lavoro ottimale deve essere compresa fra 20 e 25 gradi C.

9.2 - La quantità di acido lattico (D o L) non deve essere inferiore a 2 mg in cuvetta, corrispondente a 4 mg/kg nel campione operando come descritto. La quantità di 4 mg/kg pertanto diviene la quantità minima determinabile di acido lattico.

9.3 - La quantità di acido D-Lattico normalmente riscontrabile è inferiore a 4 mg/kg e pertanto il tenore di acido lattico totale nel campione in esame sarà dato dalla somma dei due enantiomeri solo quando la quantità di D-Lattico risulterà superiore a 4 mg/kg. In caso contrario, il tenore di acido lattico sarà dato dalla quantità del solo acido L-Lattico.

10 - Precisione del metodo.

10.1 - Su un latte con tenore di acido lattico pari a circa 10 mg/kg, sono state eseguite 15 determinazioni.

Dalle valutazioni statistiche si è ricavato:

Coefficiente di variazione (C.V.) = 10%

Intervallo di confidenza ($\bar{x} \pm 2 s$) = $\bar{x} \pm 2$