

R. ROMANO, I. BORRIELLO,
L. CHIANESE, F. ADDEO

La mozzarella di Bufala Campana (DOP): caratterizzazione quali-quantitativa della componente trigliceridica ed acidica (CLA) nell'arco dell'anno mediante gascromatografia ad alta risoluzione (HRGC)

PROGRESS IN NUTRITION
VOL. 10, N. 1, 22-29, 2008

TITLE

Quali-quantitative determination of triglyceridic, fatty acids and CLA in "Mozzarella di Bufala Campana" by high resolution gascromatography (HRGC)

KEY WORDS

Fatty acids, buffalo cheese, triglycerides, HRGC, CLA.

PAROLE CHIAVE

Acidi grassi, mozzarella di bufala, HRGC, trigliceridi, CLA.

Dipartimento di Scienza degli Alimenti
Università degli Studi di Napoli Federico II

Indirizzo per la corrispondenza:
Prof. Dr. Raffaele Romano
Dipartimento di Scienze degli Alimenti
Università degli Studi di Napoli Federico II
Via Università 100 – 80055 Portici (NA)
Tel: 081 – 2539348 fax: 081 – 7762580
E-mail: rafroman@unina.it

Summary

"Mozzarella di Bufala Campana" is a DOP buffalo cheese in according to DPR of the 10-05-03. It is products only in Campania region and in some province of Lazio region. The fat content percentage on the dry matter is minimum 52%, and water content is maximum of the 65%. The lipidic fraction is a technological-nutritional component very important for cheese production. Nowadays the lipidic fraction of the "Mozzarella di Bufala Campana" is to the centre of several study to characterize the triglyceridic and acidic composition. Among fatty acids identifies evidences a defined "minor" category (CLA, EPA, DHA, DPA) that it seems to have important physiological-nutritional property. Instead triglycerides, as in the case of cow's lipidic fraction, play an important role in the detection of foreign fats. Objective of this study has been: to determine "minor" acidic fraction of the "Mozzarella di Bufala Campana" by high resolution gascromatography (HRGC), and the distribution of Coniugated Linoleic Acid isomers. From the study it is emerged that 9c-11t isomer is more abundant (0.74%), approximately 80% of the CLA totals.

Riassunto

Il prodotto "Mozzarella di Bufala Campana" è stato riconosciuto come formaggio a denominazione d'origine in forza del DPR del 10-05-03. Lavorata solo in Campania e in alcune province della regione Lazio, presenta un contenuto in grasso sulla sostanza secca minimo del 52% e un umidità massima del 65%. La frazione lipidica del latte di bufala è una delle componenti più importanti per il valore tecnologico e nutrizionale della mozzarella. Negli ultimi anni è stata al centro, di numerose indagini volte a caratterizzarne la composizione acidica e trigliceridica. Gli acidi grassi, oltre ad essere dei descrittori di genuinità, rappresentano una categoria definita "minore" (CLA, EPA, DHA, DPA) la quale possiede importanti proprietà fisiologico-nutrizionali. Obiettivo dello studio è stato quello di determinare, attraverso la gascromatografia ad alta risoluzione (HRGC), la componente trigliceridica e acidica minore della Mozzarella di Bufala Campana nell'arco dell'anno ed in particolare la distribuzione degli isomeri coniugati dell'acido linoleico. Dallo studio è emerso che l'isomero 9c,11t risulta il più abbondante (0.74%) costituendo da solo circa l'80% dei CLA totali.

Introduzione

La denominazione d'origine "Mozzarella di bufala" è riconosciuta al: "formaggio da tavola a pasta filata molle prodotto in alcuni comuni della Campania, del Lazio, della Puglia e del Molise, esclusivamente con latte di bufala intero fresco..."; "di colore bianco porcellanato con crosta sottilissima, superficie liscia e pasta di struttura a foglie sottili; sapore caratteristico e delicato; grasso sulla sostanza secca minimo 52% ed umidità massima del 65%" (1). Il latte di bufala è l'unica materia prima utilizzabile per la preparazione delle mozzarelle, ha caratteristiche generali molto simili a quelle del latte vaccino ma se ne differenzia per una maggiore percentuale di componenti (2). I livelli quantitativi di grasso e proteine risultano in media rispettivamente del 7.5% e 4,4% nel latte bufalino e del 3.3% e 2.7% nel latte vaccino (3), inoltre recenti ricerche hanno mostrato che il latte bufalino contiene un numero maggiore di globuli di grasso e di minori dimensioni, indice di una discreta presenza di acidi grassi polinsaturi (4).

Importante è il suo valore nutrizionale dato dal contenuto in acidi grassi mono e polinsaturi essenziali, tra cui ω -3 come EPA, DHA, DPA e CLA (Coniugated Linoleic Acid)(5): acronimo con cui si intende un gruppo di composti contenenti una miscela di isomeri

geometrici e posizionali dell'acido linoleico (C18:2 ω -6), chimicamente inclusi nel gruppo degli acidi grassi trans (TFA) (c9-t11; t9-t11; t10-c12; t10-t12; e c9-c11 e t9-c11)(6, 7). Gli studi circa la sintesi dei CLA sono numerosi, essi si formano attraverso 2 vie metaboliche: bioisomerizzazione ruminale dell'acido linoleico per fermentazione batterica del *Butyrivibrio fibrisolvens* (8), ceppi di *Lactobacillus*, *Propionbacterium*, *Bifidobacterium*, ed *Enterococcus* (9) e la desaturazione dell'acido vaccenico (C18:1 t-11), proveniente dal rumine, nella ghiandola mammaria ad opera della Δ -9-desaturasi (10). Rappresenterebbero quindi degli intermedi della bioidrogenazione dell'acido linoleico ad acido stearico (11).

Diversi studi, hanno evidenziato la loro attività anticarcinogenica, antiaterogena, antiobesità e antidiabetica e la capacità di stimolare le proprietà immunologiche (11). Le principali fonti alimentari di CLA nella dieta dell'uomo sono i prodotti di origine animale come latte e carne ma la loro concentrazione negli alimenti dipende da molteplici fattori quali: composizione alimentare (12), contenuto in PUFA, regime alimentare (13), stagionatura dei formaggi, tipo di alimentazione (14), concentrazione dei TG ad alto PM (3). La letteratura attuale ha messo in evidenza che la frazione acidica minore (CLA, aci-

di grassi dispari, forme iso/anteiso, acidi grassi polinsaturi con un numero di atomi di carbonio superiori o uguale a 20) del grasso della Mozzarella di Bufala è scarsamente identificata, pertanto ci si è posti il problema della sua determinazione quali-quantitativa. Obiettivo del presente studio è stato: determinare, attraverso analisi gascromatografica con colonna capillare ad alta risoluzione (HRGC), la componente trigliceridica e acidica minore della Mozzarella di Bufala Campana ed in particolare valutare la distribuzione degli isomeri coniugati dell'acido linoleico.

Materiali e metodi

Campionamento

Sono stati prelevati dal commercio 100 campioni di Mozzarella di Bufala Campana durante il periodo Dicembre 2005-Dicembre 2006.

Estrazione del grasso dalla mozzarella e cagliata

La frazione lipidica è stata determinata gravimetricamente tramite idrolisi del prodotto, opportunamente omogeneizzato, con soluzione ammoniacale al 25% ed alcol etilico e successiva estrazione della materia grassa con una soluzione di etere etilico-n-eptano (2:1 v/v).

I reattivi utilizzati sono stati:

- soluzione ammoniacale al 25% p/v (d. 1.125);
- alcol etilico Carlo Erba 95% v/v;
- etere etilico Carlo Erba esente da perossidi;
- n-eptano Fluka 99.5% v/v;
- solfato di sodio anidro Appli-chem 99%;

A 6 grammi di mozzarella tritata, sono stati aggiunti 20 ml di soluzione ammoniacale e 20 ml di alcol etilico (CH₃CH₂OH). Il tutto è stato posto in agitazione a 500°C per 30 minuti. Dopo raffreddamento sono stati aggiunti 100 ml di soluzione etere etilico-n-eptano e mantenuto il tutto in continua agitazione.

Il campione è stato lasciato a riposo per 15 minuti per permettere la separazione delle fasi (fase eptanica superiore, fase acquosa inferiore). La procedura è stata ripetuta per 3 volte. Le fasi esaniche estratte sono successivamente state anidricate su solfato di sodio anidro e filtrate su filtri di cellulosa, prima di essere portate a secco mediante evaporatore rotante.

Analisi gascromatografica dei trigliceridi

L'analisi gascromatografica è stata effettuata preparando una soluzione al 4% di grasso anidro in esano e iniettando 1 µl al gascromatografo. È stata utilizzata una colonna capillare RTX 65 TG (35% dimethyl/65% diphenyl polysiloxane), 30 m, 0.25 mm ID, 0.10 µm df.

L'apparecchio utilizzato era un gascromatografo GC Dani 1000 equipaggiato con detector a ionizzazione di fiamma tenuto a 360°C, con una miscela aria/idrogeno (10/1).

Il vaporizzatore a temperatura programmata (PTV) era tenuto in modalità split rapporto di splittaggio 1/60; gas carrier He 1.2 ml/min; colonna capillare. La temperatura iniziale del PTV era 60°C per 0,1 min, incremento di 500°C/min fino a 370°C per 5 min. La camera era tenuta a temperatura iniziale di 250°C per 2 min., incremento di 6°C/min fino alla temperatura finale di 360°C e mantenuta a questa temperatura per 25 min. L'analisi quantitativa è stata effettuata iniettando standard a composizione note di trigliceridi da 24 a 54 atomi di carbonio (BCR CRM 519) e con il successivo calcolo del fattore di correzione.

Analisi gascromatografica degli acidi grassi e dei CLA

La determinazione della componente acidica è stata eseguita mediante analisi degli esteri metilici degli acidi grassi previa trans-esterificazione effettuata con potassa metanolica (15). La procedura ha previsto la preparazione di una soluzione di grasso in esano al 5%. Ad 1 ml di campione sono stati aggiunti 300 µl di potassa metanolica 2N. Dopo agitazione è stato prelevato 1 µl

dalla fase superiore per l'analisi gascromatografica ad alta risoluzione. L'apparecchiatura utilizzata è stato un Gascromatografo Perkin Elmer mod. Auto System XL equipaggiato con vaporizzatore a temperatura programmata (PTV); rivelatore a ionizzazione di fiamma di idrogeno e colonna capillare lunga 100 m, 0,25 mm ID; 0,20 µm spessore film, fase stazionaria 50% Cyano-propil Methil Silicone mod. SP (Supelco Bellofonte, USA). Condizioni operative colonna: temperatura iniziale 100°C x 5 min, incremento di 3°C/min fino a 165°C con sosta di 10 min, incremento di 3°C/min fino a 260°C x 28 min PTV: 50°C x 0.1 min incremento di 500°C/min fino a 260°C dove sosta per 10 min. Rapporto di splittaggio: 1/60 ml/min. Gas carrier: H₂, flusso 20 cm/sec. Gas ausiliare: H₂. FID miscela aria/H₂ 10/1. Temperatura del rivelatore FID: 260°C. L'identificazione dei picchi è stata effettuata mediante uno standard esterno (Supelco™ 37 component FAME MIX 47885-U) e confronto dei tempi di ritenzione con dati di letteratura. L'area percentuale di ciascun composto è stata quantificata con il metodo dello standard esterno calcolandone il fattore di correzione.

Analisi statistica dei risultati

I dati raccolti sono stati analizzati utilizzando il software Statistical

Analysis Sistem (SAS) (Kremer et al. 2001). Tutte le variabili sottoposte ad elaborazione sono state analizzate con il test statistico del T-Student.

Risultati e discussioni

Composizione trigliceridica

In figura 1 viene mostrato un tipico profilo trigliceridico del grasso di latte di bufala ottenuto via HRGC. È possibile osservare la caratteristica distribuzione bimodale dei trigliceridi da 24 a 60 atomi di carbonio, ripartita in due gruppi (C24-C40 e C42-C60) dove le famiglie C38 e C50 sono prevalenti.

Osservando l'andamento stagionale dei trigliceridi della Mozzarella di Bufala Campana, riportato in figura 2 e 3 si possono notare delle differenze significative ($p < 0.01$ e $p < 0.001$).

E' stato possibile osservare una concentrazione superiore statisticamente significativa delle famiglie di trigliceridi C44, C46 e C48 nella mozzarella invernale rispetto alla mozzarella prodotta in altre stagioni. Situazione inversa si manifesta confrontando le famiglie trigliceridiche ad alto peso molecolare.

Nel latte di bufala e nei suoi derivati, la quantità dei trigliceridi a C36 e a C48 atomi di carbonio è positivamente correlata con l'aumento dell'acido palmitico (C16:0), mentre la quantità dei trigliceridi a C38 e a C52 atomi di

Figura 1 - Profilo Trigliceridico della Mozzarella di Bufala Campana

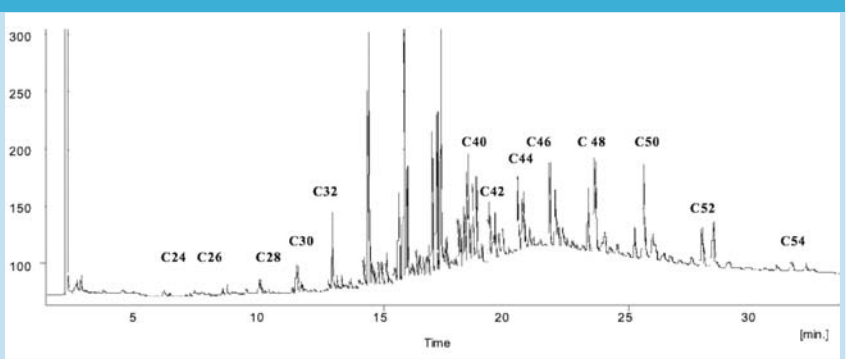
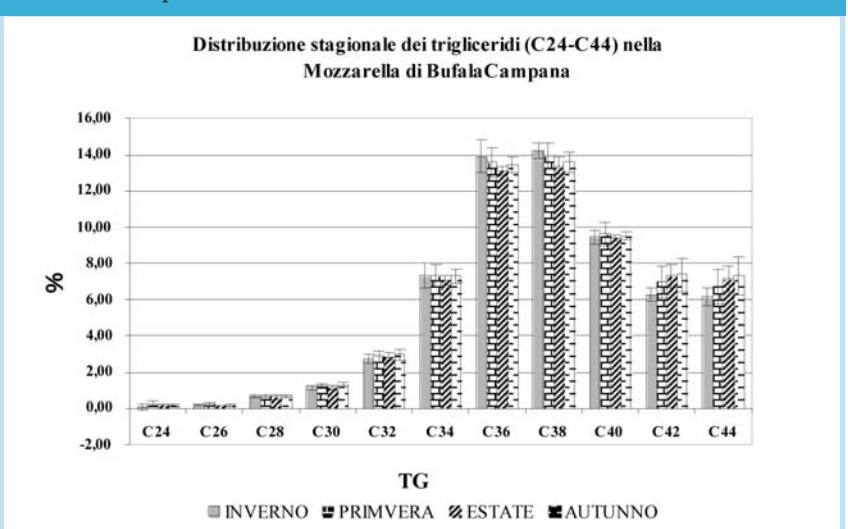


Figura 2 - Distribuzione stagionale dei trigliceridi C24-C44 della Mozzarella di Bufala Campana.



carbonio sembra legata all'acido oleico (C18:1). Il livello quantitativo dei trigliceridi a C50 atomi di carbonio è influenzato positivamente dall'acido stearico (16).

Lo studio della composizione e della struttura dei trigliceridi è importante in quanto da utili informazioni circa le proprietà fisiche del grasso quali:

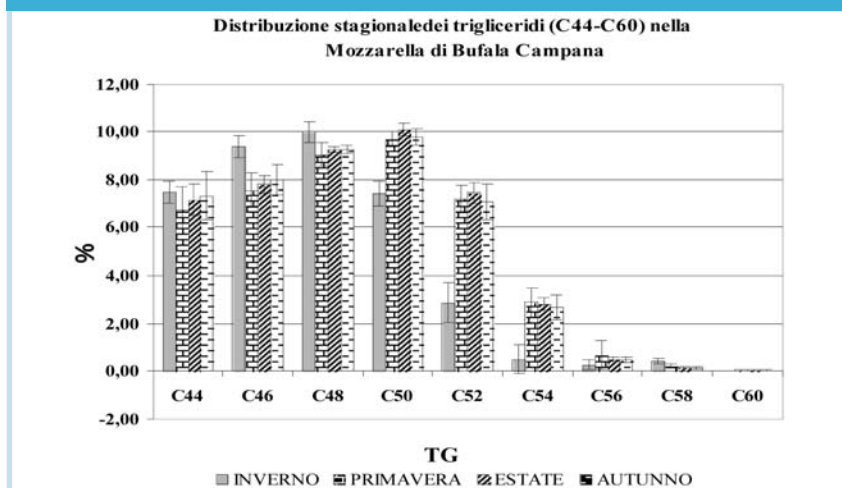
- punto di fusione;

- cristallizzazione;
- proprietà reologiche del grasso di latte e prodotti derivati (17).

Composizione in Acidi Grassi e CLA

Studi sul latte bufalino (18) hanno confermato che circa il 98% degli acidi grassi è costituito da un numero pari di atomi di carbonio compresi tra il C4 e il C20 mentre i

Figura 3 - Distribuzione stagionale dei trigliceridi C44 - C60 della Mozzarella di Bufala Campana



dispari sono presenti solo in tracce. Il livello quantitativo degli acidi grassi è influenzato da fattori di natura genetica (difficilmente modificabili), ambientali, dallo stadio di lattazione, dallo stato fisico dell'animale e dall'alimentazione (19). La sperimentazione condotta sulla mozzarella di bufala, durante il corso dell'anno, ha permesso l'identificazione di 44 diversi acidi grassi: dall'acido butirrico (C4:0) all'acido docosapentaenoico (DPA) (C22:5), compresi otto isomeri dell'acido linoleico coniugato (CLA) di cui due non identificati. In tabella 1 vengono

Tabella 1 - Composizione in acidi grassi della Mozzarella di Bufala Campana

EMAG	Media %	EMAG	Media %	EMAG	Media %
C4:0	2,80	X5	0,23	11t-13t	0,01
C6:0	1,50	X6	0,61	10t-12t, 9t-11t, 8t-10t, 7t-9t	0,04
C8:0	1,15	C16:1cis	2,45	X1CLA	0,01
C10:0	2,28	C17:0	0,63	C20:2	0,04
C11:0	0,18	iso/anteisoC18:0	0,38	X2CLA	0,04
C12:0	3,22	C18:0	10,08	C22:0	0,08
X1	0,02	C18:1(t6,t9,t10,t11)	1,85	C20:3n6	0,07
C12:1	0,04	C18:1n-9cis	17,82	X7	0,02
iso/anteisoC13:0	0,08	Altri C18:1	1,13	X8	0,03
X2	0,06	AltriC18:2 (isolati)	0,60	C20:3n3	0,15
C13:0	0,12	C18:2 9c,12c	1,91	C20:4n6	0,07
iso/anteisoC14:0	0,19	C20:0	0,20	X9	0,03
C14:0	12,26	C18:3 n6	0,02	C23:0	0,03
X3	0,04	C18:3 n3	0,15	C20:5n3	0,03
C14:1	0,39	C20:1	0,48	C24:0	0,05
X4	0,63	CLA(9c-11t)	0,75	X10	0,12
anteisoC15:0	0,89	CLA(9t-11c,7t-9c)	0,01	X11	0,05
C15:0	1,34	CLA(10c-12t)	0,08	X12	0,03
isoC16:0	0,29	CLA(11t-13c,9c-11c)	0,01	X13	0,03
C16:0	24,71			C22:5	0,06

Figura 4a - Profilo HRGC degli acidi grassi della Mozzarella di Bufala Campana

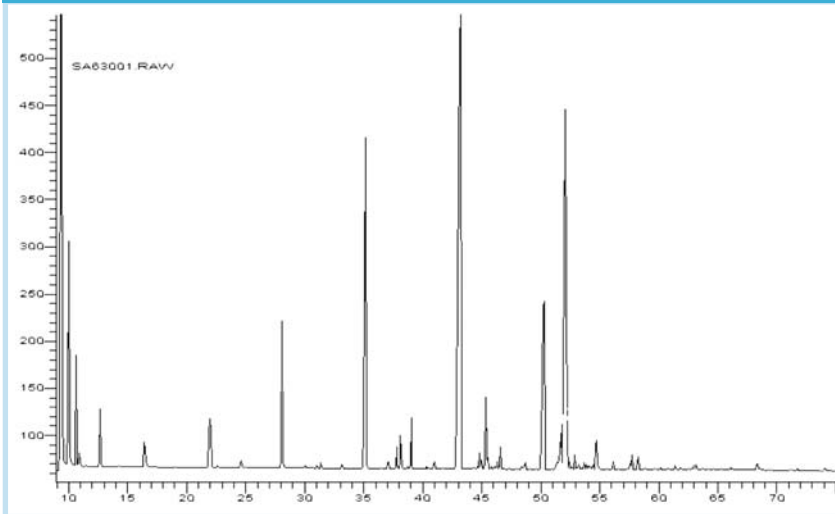
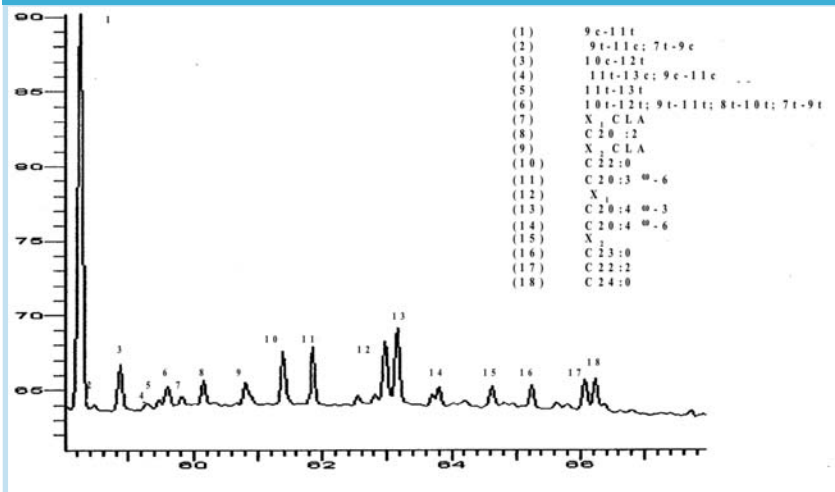


Figura 4b - Gascromatogramma relativo alla zona della componente acidica minore della Mozzarella di Bufala Campana



no riportati i valori medi degli acidi grassi determinati. Gli acidi grassi a medio peso molecolare dal C11:0 al C16:1cis sono risultati più abbondanti (47.8% circa). Tra i saturi (63% circa del totale), il più rappre-

sentativo è risultato l'acido palmitico (C16:0) con il 24.7%. Tra gli insaturi (29.4% circa del totale), l'oleico corrisponde al 18% circa. Gli isomeri coniugati dell'acido linoleico (CLA) sono stati valutati in-

torno all'1% sul totale degli acidi grassi calcolati. In figura 4a-b, è possibile osservare un tipico gascromatogramma degli esteri metilici degli acidi grassi (EMAG) della Mozzarella di Bufala Campana e l'amplificazione della zona relativa ai CLA. Tra questi: 9c-11t; 9t-11c; 7t-9c; 10c-12t; 11t-13c; 9c-11c; 11t-13t; 10t-12t; 9t-11t; 8t-10t; 7t-9t; X1CLA; X2CLA, il più rappresentativo è stato l'isomero 9c-11t (0.74%) seguito dall'isomero 10c-12t (0.08%).

In figura 5 viene messa a confronto la concentrazione totale dei CLA della mozzarella prodotta nelle quattro stagioni. E' possibile osservare come il contenuto degli acidi grassi è rispettivamente più elevato nella mozzarella estiva e autunnale. I prodotti d'origine ruminale (latte e derivati) hanno generalmente un contenuto più alto di CLA dei prodotti d'origine non-ruminale (20). Ciò è dovuto alla presenza dell'acido linoleico isomerasi nella flora batterica, la quale isomerizza l'acido linoleico a CLA. Per le categorie dei formaggi freschi a pasta filata la mozzarella di Bufala Campana presenta un quantitativo medio di CLA pari all'1,1% sul totale degli acidi grassi (21).

Il contenuto di CLA negli alimenti dipende da molti fattori:

- composizione alimentare (22);
- contenuto in PUFA (23);
- regime alimentare (il latte di vacche al pascolo contiene più CLA

Figura 5 - Distribuzione stagionale dei CLA della Mozzarella di Bufala Campana.

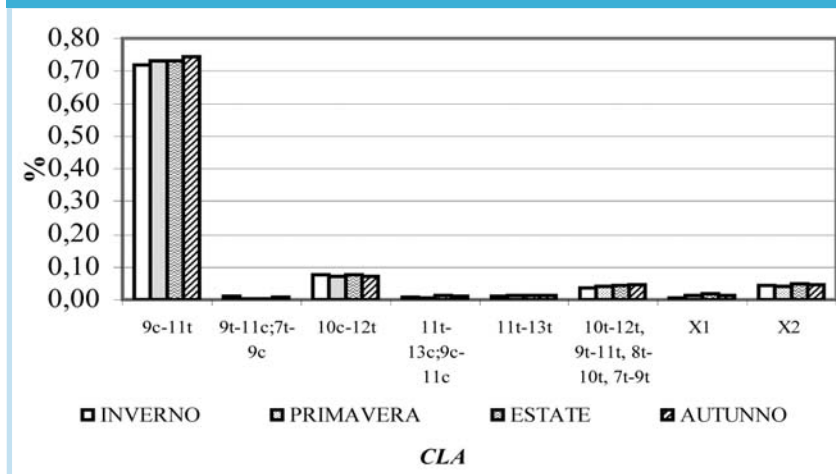


Tabella 2 - Valori medi stagionali degli isomeri dei CLA della Mozzarella di Bufala Campana

Acidi grassi	Inverno	Primavera	Estate	Autunno	Valore medio
					media %
CLA(9c-11t)	0,72	0,73	0,73	0,74	0,74
CLA(9t-11c,7t-9c)	0,08	0,00	0,00	0,01	0,01
CLA(10c-12t)	0,08	0,07	0,08	0,07	0,08
CLA(11t-13c,9c-11c)	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01
CLA(11t-13t)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
10t-12t, 9t-11t, 8t-10t, 7t-9t	0,04	0,04	0,04	0,05	0,04
X1CLA	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01
X2CLA	0,04	0,04	0,05	0,04	0,04
Δ CLA	0,91	0,92	0,94	0,95	0,93

di quello di vacche in stalla (24);
 • stagionatura dei formaggi (24);
 • concentrazione dei TG ad alto PM (21).

In accordo con i dati bibliografici, i CLA sono risultati sostanzialmente inferiori nella stagione invernale,

quando cioè l'animale è alimentato in stalla con foraggi conservati, rispetto all'estate, quando è tenuto al pascolo (25).

Più dettagliatamente, in tabella 2 sono stati riportati i valori medi stagionali degli isomeri dei CLA

della mozzarella prelevata nel corso dell'anno. Tra gli isomeri individuati il più rappresentativo è risultato il 9c-11t CLA che variava tra lo 0,72% e lo 0,74%.

Conclusioni

L'analisi trigliceridica della Mozzarella di Bufala Campana ha evidenziato una distribuzione bimodale dei trigliceridi dal C24 al C60 e differenze significative nella loro concentrazione stagionale.

La sperimentazione con l'ausilio della HRGC con colonna capillare da 100 metri, ha permesso di identificare 44 acidi grassi molti dei quali (acidi grassi dispari, forme iso/anteiso, isomeri coniugati dell'acido linoleico, acidi insaturi con un numero di atomi di carbonio superiore a 20) presenti in tracce. Nelle mozzarelle estive e autunnali è stato riscontrato un contenuto più elevato in CLA (0,94% circa sul totale degli acidi grassi). In particolare l'isomero più rappresentativo è risultato il 9c-11t CLA variando tra lo 0,72% e lo 0,74%.

Bibliografia

1. Decreto ministeriale 18 settembre 2003.
2. Zicarelli L. Scienza e Tecnica lattiero-casearia 2004; 55: 167-8.
3. Romano R, Lambiase G, Spagna Musso S, Chianese L. La distribuzione

- quali-quantitativa della componente lipidica del latte indotta dal processo di lavorazione della Mozzarella di Bufala Campana. *Progress in Nutrition* 2004; 6 (4): 275-84.
4. Martini M, Spinelli S, Scolozzi C, Cecchi F. Studio delle caratteristiche lipidiche del latte di bufale allevate in Toscana: nota II. *Atti II Congresso nazionale sull'allevamento del bufalo*, 2003; 28-30: 147-51.
 5. Bretoni G. Ambiente, alimentazione e qualità del latte. *Supplemento all'Informatore Agrario* 1996; 21.
 6. Fritsche S, Fritsche J. Occurrence of CLA isomers in beef. *J Am Oil Chem Soc* 1998; 75: 1449-51.
 7. Mulvihill B. Ruminant meat as a source of conjugated linoleic acid (CLA). *British Nutrition Foundation* 2001; 26: 295-9.
 8. Kepler CR, Tove SB. Biohydrogenation of linoleic acids. III. Purification and properties of a linoleate Δ^{12} cis, Δ^{11} -trans isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J Biol Chem* 1967; 242: 5686-92.
 9. Collomb M, Sollberg H, Butikofer U, Sieber R, Stoll W, Schaeren W. Impact of basal diet of hay and fodder beet supplemented with rapeseed, linseed and sunflowerseed on the fatty acid composition of milk fat. *Int Dairy J* 2004; 14: 49-559.
 10. Evans ME, Brown MK, McIntosh M. Isomer-specific effects of conjugated linoleic acid (CLA) on adiposity and lipid metabolism. *J Nutr Biochem* 2002; 13 (9): 508.
 11. Griinari JM, Barman DE. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk ruminants. *J Am Sci* 2000; 77: 1-15.
 12. McGuire MA, McGuire MK. Conjugated linoleic acid (CLA): a ruminant fatty acid with beneficial effects on human health. *Proceedings of the American Society of Animal Science* 1999: 1-8.
 13. Saurer FD, Fellner V, Kinsman R, et al. Methane output and lactation response in holstein cattle with monensin or unsaturated to the diet. *J Anim Sci* 1998; 65: 906-914.
 14. Dhiman TR, Anand GR, Satter LD, Pariza MW. Conjugated linoleic acid of milk from cows fed different diets. *J Dairy Sci* 1999; 82: 2146-56.
 15. Addeo F, Kuzdzal-Savoie S. La coposition triglycéridique du lait de buffonne. *Le Lait* 1980; 61: 14-26.
 16. Nota G, Spagna Musso S, Naviglio D, Romano R, Improta G. Idrolisi rapida degli esteri degli steroli dei grassi. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* 1995; 7: 24-5.
 17. Jensen RG, Clark RM. Lipid composition and properties. *Fundamentals of dairy chemistry*. 3rd ed N P, 1998: 171.
 18. Clapperton JL, Banks W. Factor affecting the yield of milk and its constituent, particularly fatty acids when dairy cows consume diets containing added fat. *J Sci Food Agric* 1985; 36: 1205
 19. Chin SF, Liu W, Storkson JM, HA YL, Pariza MW. Dietary source of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anti-carcinogens. *J Food Compos Anal* 1992; 5: 185-97.
 20. Park Y, Storkson JM, Albright KJ, Liu W, Pariza MW: Evidence that the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. *Lipids* 1999; 34: 235-41.
 21. Romano R, Lambiase G, Spagna Musso S, Chianese L. La distribuzione quali-quantitativa della componente lipidica del latte indotta dal processo di lavorazione della Mozzarella di Bufala Campana. *Progress in Nutrition* 2004; 6: 275-84.
 22. Griinari JM, Bauman DE. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk ruminants. *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*, AOCS Press, Champaign, IL 1999; 1: 180-200.
 23. Lin H, Boylston TD, Chang MJ, Lueddecke O, Shultz TD. Survey of the conjugated linoleic acid contents of dairy products. *J Dairy Sci* 1995; 78: 2358-65.
 24. Dhiman TR, Anand GR, Satter LD, Pariza MW. Conjugated linoleic acid of milk from cows fed different diets. *J Dairy Sci* 1999; 82: 2146-56
 25. White SL, Bertrand JA, Wade MR, Washburn SP, Green JT, Jenkins TC. Comparison of fatty acid content of milk from jersey and Holstein cows consuming pasture or a total mixed ration. *J Dairy Sci* 2001; 84: 2295-301.